

**POLITECHNIKA POZNAŃSKA**  
**WYDZIAŁ TECHNOLOGII CHEMICZNEJ**  
**Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej**  
**Zakład Technologii Chemicznej**



**ROZPRAWA DOKTORSKA**

**Wykorzystanie immobilizowanych enzymów w fabrykacji  
substancji farmaceutycznie aktywnych**

Application of immobilized enzymes in the fabrication  
of active pharmaceutical ingredients

**mgr inż. Oliwia Degórska**

**Promotor:** dr hab. inż. Jakub Zdarta, profesor PP

Poznań, 2025

*Serdecznie podziękowania składam:*

***dr hab. inż. Jakubowi Zdarta, prof. PP***

*za zapewnienie możliwości stałego rozwoju,  
motywację, pokazywanie wspaniałego świata nauki  
i wsparcie na każdym etapie mojej akademickiej drogi*

***mgr inż. Weronice Badzińskiej***

*za wspólne godziny spędzone w laboratorium i owocne współpracy*

*Dziękuję **Moim Rodzicom** za bezgraniczne wsparcie,  
mądre wskazówki i nieocenioną pomoc na każdym etapie mojej drogi.*

*To dzięki Waszej miłości, cierpliwości  
i wierze w moje możliwości mogłam wytrwale dążyć do celu,  
nawet wtedy, gdy sama w siebie wątpiłam.  
Wasza obecność była dla mnie kotwicą w chwilach zwątpienia  
i wiatrem w skrzydłach, gdy potrzebowałam odwagi.  
Gdyby nie Wy, nie byłoby mnie w tym miejscu, w którym jestem dziś.*

***Moj ljubljeni bodoči mož,**  
zaradi tebe sem na novo spoznala samo sebe,  
odkrivajoč globlje izvire občutljivosti, ambicij in predanosti.  
Tvoja toplina in vztrajnost me vsak dan vodita v pravo smer.  
Si moja največja opora in moj dom,  
in prav zaradi tebe sem lahko v miru preplula razburkano morje  
znanja in dvomov — naravnost proti svojemu cilju.*

*Big thank you to my dear friends,  
**Agata, Karo, Anne, Nina, Patrycja,**  
for being there, no matter what.*

## Lista skrótów i symboli

3H3P	- 3-hydroksy-3-fenylpropanonitryl
API	- substancja farmaceutycznie aktywna (ang. <i>active pharmaceutical ingredient</i> )
AM	- akrylamid
[BMIM]Cl	- chlorek 1-butylo-3-metyloimidazoliowy
[BMIM]PF <sub>6</sub>	- heksafluorofosforan 1-butylo-3-metyloimidazoliowy
CA	- octan choliny
CC	- chlorek choliny
CLEAs	- usieciowane agregaty enzymów (ang. <i>cross linked enzyme aggregates</i> )
CLSM	- konfokalna laserowa mikroskopia skaningowa (ang. <i>confocal laser scanning microscopy</i> )
DKR	- dynamiczny rozdział kinetyczny (ang. <i>dynamic kinetic resolution</i> )
ee	- stopień czystości enancjomerycznej (ang. <i>enantiomeric excess</i> )
FTIR	- spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
GC-MS	- chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (ang. <i>gas chromatography with mass spectrometry</i> )
HLES	- ang. <i>high-loaded enzyme system</i>
IF	- współczynnik oddziaływania (ang. <i>Impact Factor, IF</i> )
IL	- ciecz jonowa (ang. <i>ionic liquid</i> )
KR	- rozdział kinetyczny (ang. <i>kinetic resolution</i> )
KSM	- kluczowe wyjściowe związki (ang. <i>key starting materials</i> )
LC-MS	- chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (ang. <i>liquid chromatography with mass spectrometry</i> )
LLES	- ang. <i>low-loaded enzyme system</i>
MOF	- metaloorganiczne struktury szkieletowe, ang. <i>metal-organic frameworks</i>
M-CLEAs	- magnetyczne usieciowane agregaty enzymów (ang. <i>magnetic cross linked enzyme aggregates</i> )
NSAID	- niesteroidowy lek przeciwzapalny (ang. <i>nonsteroidal antiinflammatory drug</i> )
PVC	- poli(chlorek winylu)
PAM	- poli(akrylamid)
PIL	- poli(ciecz jonowa)
STY	- wydajność przestrzenno-czasowa (ang. <i>space-time yield</i> )
SEM	- skaningowy mikroskop elektronowy ang. <i>scanning electron microscope</i> )
SSRI	- selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (ang. <i>selective serotonin reuptake inhibitors</i> )

## Spis treści

<i>Lista publikacji naukowych będących podstawą rozprawy doktorskiej</i> .....	7
<b>1. Streszczenie</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Abstract</b> .....	<b>11</b>
<b>3. Wprowadzenie teoretyczne</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1. Hydrolazy - podstawowe informacje, mechanizm działania, katalizowane reakcje, przykłady i zastosowanie</b> .....	<b>14</b>
3.1.1. <i>Hydrolazy - charakterystyka i podstawowe właściwości</i> .....	14
3.1.2. <i>Lipazy - charakterystyka</i> .....	16
3.1.3. <i>Zastosowanie lipaz w nauce i przemyśle</i> .....	21
<b>3.2. Immobilizacja enzymów - podstawowe informacje i charakterystyka procesu</b> <b>26</b>	
3.2.1. <i>Rodzaje immobilizacji</i> .....	26
3.2.2. <i>Nośniki w immobilizacji enzymów</i> .....	28
3.2.3. <i>Wpływ immobilizacji na właściwości enzymów</i> .....	32
<b>3.3. Asymetryczne API - znaczenie oraz nowoczesne, zrównoważone metody syntezy</b> <b>35</b>	
3.3.1. <i>Znaczenie chiralności w projektowaniu leków</i> .....	35
3.3.2. <i>Immobilizowane enzymy w syntezie związków chiralnych - przewaga nad klasycznymi katalizatorami</i> .....	37
3.3.3. <i>Wykorzystanie lipaz w syntezie substancji farmaceutycznie aktywnych</i> .....	40
<b>4. Motywacja i hipotezy badawcze oraz cel pracy</b> .....	<b>47</b>
<b>5. Opis i dyskusja osiągnięć badawczych</b> .....	<b>50</b>
<b>5.1. Rozwój i charakterystyka strukturalno-morfologiczna systemów biokatalitycznych</b> .....	<b>50</b>
<b>5.2. Ocena stabilności wytworzonych układów</b> .....	<b>58</b>
<b>5.3. Zastosowanie immobilizowanych enzymów w syntezie asymetrycznej API</b> .....	<b>67</b>
<b>6. Podsumowanie, wnioski i przyszłe badania</b> .....	<b>77</b>
<b>7. Bibliografia</b> .....	<b>83</b>
<b>8. Opis osiągnięć naukowych</b> .....	<b>94</b>

<b>9. Aktywność naukowa .....</b>	<b>96</b>
<b>10. Teksty publikacji naukowych stanowiących monotematyczny cykl prac (P1-P5)</b>	
<b>101</b>	
Publikacja 1.....	101
Publikacja 2.....	120
Publikacja 3.....	128
Publikacja 4.....	144
Publikacja 5.....	155
<b>11. Zgody współautorów.....</b>	<b>174</b>

## Lista publikacji naukowych będących podstawą rozprawy doktorskiej

Przygotowano zbiór publikacji naukowych stanowiących monotematyczny cykl prac, będący podstawą rozprawy doktorskiej, koncentrujących się na projektowaniu, fabrykacji, charakterystyce oraz zastosowaniu nowatorskich układów biokatalitycznych. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) publikacji stanowiących podstawę do uzyskania stopnia naukowego doktora wynosi 32,3, natomiast łączna liczba punktów MNiSW przypisana tym pracom wynosi 540.

Lp.	Publikacja naukowa	IF	IF 5-letni	Punktacja ministerialna
P1	<b>Degórska O</b> , Szada D, Zdarta A, Smulek W, Jesionowski T, Zdarta J. Immobilized lipase in resolution of ketoprofen enantiomers: Examination of biocatalysts properties and process characterization <i>Pharmaceutics</i> (2022), 14, 1443.	5,4	5,8	100
P2	<b>Degórska O</b> , Szada D, Jesionowski T, Zdarta Z. A biocatalytic approach for resolution of 3-hydroxy-3- phenylpropanonitrile with the use of immobilized enzymes stabilized with ionic liquids (2023), <i>Computational and Structural Biotechnology Journal</i> , 21, 1593-1597.	4,4	5,2	140
P3	<b>Degórska O</b> , Szada D, Fu Q, Nghiem LD, Biadasz A, Jesionowski T, Zdarta Z. Ionic liquid supported hydrogel-lipase biocatalytic systems in asymmetric synthesis of enantiomerically pure (S)-ibuprofen (2024), <i>International Journal of Biological Macromolecules</i> , 281, 136221.	8,5	8,7	100
P4	<b>Degórska O</b> , Zasada N, Jesionowski T, Zdarta Z, Immobilized lipase in the resolution of racemic atenolol - a possible key to sustainable pharmaceuticals synthesis (2025), <i>International Journal of Biological Macromolecules</i> , 318, 3.	8,5	8,7	100
P5	<b>Degórska O</b> , Zasada N, Badzińska W, Fu Q, Jesionowski T, Zdarta Z, Targeted biocatalyst design for asymmetric citalopram conversion in a membrane reactor (2025), <i>Pharmaceutics</i> , 17, 1497.	5,5	5,8	100

## 1. Streszczenie

Współczesne biokatalityczne metody syntezy substancji farmaceutycznie aktywnych (API, ang. *active pharmaceutical ingredients*) w dużej mierze opierają się na wykorzystaniu wolnych enzymów. Choć są one wysoce selektywne i pozwalają prowadzić reakcje w łagodnych warunkach, ich zastosowanie wiąże się z szeregiem ograniczeń praktycznych. Wolne enzymy trudno jest bowiem odzyskać i ponownie wykorzystać, co zwiększa koszty procesu, a dodatkowo mogą one powodować zanieczyszczenie produktów reakcji. W celu usprawnienia procesów syntezy API, jednym z głównych kierunków badań jest opracowanie układów biokatalitycznych opartych o immobilizowane enzymy, co umożliwi wielokrotne użycie biomolekuł, zapewnia poprawę ich stabilności oraz zwiększenie wydajności i czystości mieszaniny poreakcyjnej.

Podstawą przedstawionej dysertacji było opracowanie oraz charakterystyka układów biokatalitycznych złożonych z enzymów immobilizowanych na nośnikach nieorganicznych i organicznych. W ramach badań przetestowano enzymy pozyskane z różnych źródeł oraz materiały nośne o odmiennej charakterystyce fizykochemicznej i morfologicznej w celu uzyskania najbardziej efektywnego systemu. Nośniki poddano modyfikacjom chemicznym mającym na celu zwiększenie liczby i różnorodności grup funkcyjnych na ich powierzchni, co umożliwiło skuteczniejsze i trwalsze związanie enzymów zarówno poprzez adsorpcję, jak i na drodze wiązań kowalencyjnych. Następnie powstałe systemy biokatalityczne szczegółowo scharakteryzowano pod kątem potwierdzenia efektywności immobilizacji, a ich stabilność i aktywność monitorowano metodami spektrofotometrycznymi.

Istotnym aspektem projektu było również zastosowanie cieczy jonowych, zarówno jako modyfikatorów nośników jak i jako środowiska reakcji syntezy API. Ciecze jonowe, ze względu na swoje unikalne właściwości fizykochemiczne - m.in. niską lotność, wysoką stabilność termiczną i zdolność do stabilizacji struktury białek - pozytywnie wpływały na aktywność i trwałość immobilizowanych enzymów. Dodatkowo w połączeniu z odpowiednio dobranym nośnikiem stanowiły one obiecujące narzędzie do opracowania wysoce wydajnych i przyjaznych środowisku systemów biokatalitycznych. Otrzymane biokatalizatory wykorzystano finalnie w syntezie i rozdziale enancjomerów API należących do różnych grup farmaceutyków, takich jak niesteroidowe leki

przeciwzapalne (NSAIDs ang. *nonsteroidal antiinflammatory drugs*), leki psychotropowe czy przeciwnowotworowe. Produkty reakcji analizowano za pomocą technik chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS, ang. *liquid chromatography with mass spectrometry*) oraz chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS, ang. *gas chromatography with mass spectrometry*) w celu potwierdzenia ich struktury chemicznej, określenia wydajności reakcji i stopnia czystości enancjomerycznej (ee, ang. *enantiomeric excess*). W testach tych immobilizowane enzymy wykazywały znacznie wyższą stabilność w zmiennych warunkach procesowych (temperatura, pH, rodzaj rozpuszczalnika) niż ich wolne odpowiedniki, co przekładało się na uzyskanie wysokich wydajności i selektywności procesów.

W pierwszym z opracowanych układów wykorzystano lipazę *Aspergillus niger* immobilizowaną na nośnikach krzemionkowych metodą adsorpcji fizycznej, opartą na aktywacji międzyfazowej. System ten zastosowano w procesie rozdziału racemicznego ketoprofenu, uzyskując ok 90-proc. aktywność katalityczną w szerokim zakresie pH i temperatur oraz 99,85% nadmiaru enancjomerycznego dla (S)-ketoprofenu. W drugiej publikacji przetestowano lipazę *Pseudomonas fluorescens* unieruchomioną kowalencyjnie na funkcjonalizowanych nanocząstkach krzemionki, z dodatkiem imidazoliowych cieczy jonowych ([BMIM]Cl i [BMIM][NTf<sub>2</sub>]). System ten wykorzystano do rozdziału 3H3P (3-hydroksy-3-fenylpropanonitryl), będącego kluczowym związkiem przejściowym w syntezie fluoksetyny, osiągając 97,4% konwersji oraz 79,5% ee (S)-enancjomeru. Ciecze jonowe stabilizowały strukturę enzymu, tworząc mikrośrodowisko hydrofobowe, co zapewniało wysoką stabilność w środowisku niewodnym i poszerzało zakres operacyjny immobilizowanej lipazy. W publikacji trzeciej natomiast przedstawiono opracowanie nowych hydrożelowych biokatalizatorów z unieruchomioną lipazą, stabilizowanych cieczami jonowymi. Optymalizowano czas immobilizacji i stosunek substratów, aby uzyskać jak najbardziej stabilny i aktywny biokatalizator. Analiza fizykochemiczna potwierdziła prawidłową syntezę hydrożelu oraz skuteczne osadzenie enzymu. Hydrożele z dodatkiem 5% mas. cieczy jonowej i po 8-godzinnej immobilizacji osiągnęły najwyższą zachowaną aktywność wynoszącą 62%. Po 10 cyklach reakcji aktywność wciąż przekraczała 60%, a wpływ pH i temperatury na immobilizowaną lipazę był znacznie mniejszy niż w przypadku enzymu wolnego. W procesie dynamicznego kinetycznego rozdziału w izooktanie uzyskano wysokie ee

oraz wydajność reakcji rozdziału (S)-ibuprofenu na poziomie 95%. W czwartej publikacji, zaprojektowany hydrożel PIL-PAM (poli(akrylamid)-poli(ciecz jonowa)) wykorzystano w rozdziale atenololu, uzyskując 55-proc. konwersję oraz 100% ee (S)-atenololu, przy czym pełna enancjoselektywność dowodziła poprawnego ułożenia i stabilizacji struktury enzymu wewnątrz matrycy. Hydrożele zapewniały kontrolowaną dyfuzję substratu i chroniły enzym przed wypłukiwaniem, co przełożyło się na wysoką powtarzalność procesu. Ostatnia z publikacji prezentuje najbardziej zaawansowany układ - elektroprzędzoną membranę MOF-PVC (metalorganiczne struktury szkieletowe, ang. *metal-organic frameworks*) zawierającą strukturę UiO-66-NH<sub>2</sub> oraz ciecz jonową na bazie cholinylu. System ten zastosowano do syntezy (S)-citalopramu, osiągając 96-proc. konwersję oraz 93-proc. ee, a także utrzymanie ponad 80-proc. aktywności po 30 dniach przechowywania. Porowata struktura MOF, elastyczność matrycy PVC oraz stabilizujący wpływ cieczy jonowej działały synergicznie, minimalizując ograniczenia dyfuzyjne i chroniąc enzym przed dezaktywacją.

Analiza porównawcza wszystkich systemów wykazała, że immobilizacja istotnie zwiększa odporność lipaz na zmiany pH, temperatury i rodzaj środowiska reakcji, a zastosowanie cieczy jonowych w każdym przypadku zwiększało stabilność enzymów, bezpośrednio przekładając się na ich zachowaną wysoką aktywność katalityczną. Najwyższe wartości ee odnotowano dla (S)-ketoprofenu (99,85%) oraz (S)-atenololu (100%), natomiast najwyższe konwersje uzyskano dla 3H3P (97,4%) oraz (S)-citalopramu (96%). Wyniki jednoznacznie potwierdziły, że właściwie zaprojektowane mikrośrodowisko enzymu umożliwiało efektywną i selektywną syntezę API. Stabilność i możliwość wielokrotnego wykorzystania uzyskanych biokatalizatorów wskazuje na ich duży potencjał wdrożeniowy, a rozwój technik koimmobilizacji oraz integracji z reaktorami przepływowymi otwiera nowe perspektywy dla zastosowań biokatalizy w zielonej chemii farmaceutycznej.

## 2. Abstract

Modern biocatalytic methods for synthesizing active pharmaceutical ingredients (APIs) largely rely on the use of free enzymes. Although these enzymes are highly selective and allow reactions to be carried out under mild conditions, their use entails several practical limitations. Free enzymes are difficult to recover and reuse, which increases process costs, and they may also contaminate reaction products. To improve API synthesis processes, one of the main research directions involves developing biocatalytic systems based on immobilized enzymes. Such systems enable repeated enzyme use, improve enzyme stability, and increase both the efficiency and purity of post-reaction mixtures.

The foundation of this dissertation was the development and characterization of biocatalytic systems composed of enzymes immobilized on inorganic and organic supports. The study involved testing enzymes from different sources as well as carrier materials with diverse characteristics to obtain the most efficient system. The supports were chemically modified to increase the number and variety of functional groups on their surface, which enabled more effective and durable enzyme attachment through both adsorption and covalent bonding. The resulting biocatalytic systems were then thoroughly characterized to confirm immobilization efficiency, while their stability and activity were monitored using spectrophotometric methods. An important aspect of the project was also the use of ionic liquids, both as modifiers of the supports and as reaction media for API synthesis. Owing to their unique physicochemical properties - such as low volatility, high thermal stability, and the ability to stabilize protein structures - ionic liquids had a positive effect on the activity and durability of immobilized enzymes. Combined with appropriately selected carriers, they formed a promising tool for developing highly efficient and environmentally friendly biocatalytic systems. The obtained biocatalysts were used for the synthesis and enantiomeric separation of APIs belonging to various pharmaceutical groups, including nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), psychotropic drugs, and anticancer agents. Reaction products were analyzed using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) to confirm their chemical structure, determine reaction yields, and assess enantiomeric excess (ee). Immobilized enzymes exhibited substantially higher

stability under varying process conditions (temperature, pH, solvent type) compared to free enzymes, which translated into high process yields and selectivity.

In the first system developed, *Aspergillus niger* lipase immobilized on silica supports by physical adsorption based on interfacial activation was used. This system was applied to the kinetic resolution of racemic ketoprofen, yielding 80-90% catalytic activity across a wide pH and temperature range and 99.85% enantiomeric excess (ee) for (S)-ketoprofen. The second publication presented *Pseudomonas fluorescens* lipase covalently immobilized on functionalized silica nanoparticles with the addition of imidazolium ionic liquids ([BMIM]Cl and [BMIM][NTf<sub>2</sub>]). This system was used to resolve 3H3P (3-hydroxy-3-phenylpropanenitrile), a key intermediate in fluoxetine synthesis, achieving 97.4% conversion and 79.5% ee of the (S)-enantiomer. The ionic liquids stabilized the enzyme structure by forming a hydrophobic microenvironment, providing high stability in non-aqueous media and broadening the operational range of the immobilized lipase. The third publication presented the development of new hydrogel-based biocatalysts with immobilized lipase stabilized by ionic liquids. Immobilization time and substrate ratios were optimized to obtain the most stable and active biocatalyst. Physicochemical analysis confirmed proper hydrogel formation and effective enzyme entrapment. Hydrogels containing 5 wt% ionic liquid and an 8-hour immobilization time achieved the highest activity (62%). After 10 reaction cycles, activity remained above 60%, and the influence of pH and temperature on the immobilized lipase was significantly reduced compared to the free enzyme. In the dynamic kinetic resolution process carried out in isooctane, high ee and reaction yield were achieved for (S)-ibuprofen, reaching 95%. In the fourth publication, an innovatively designed PIL-PAM hydrogel was used for atenolol resolution, yielding 55% conversion and 100% ee of (S)-atenolol. Complete enantioselectivity confirmed proper orientation and stabilization of the enzyme within the matrix. The hydrogels ensured controlled substrate diffusion and protected the enzyme from leaching, resulting in high process reproducibility. The final publication presented the most advanced system - an electrospun MOF-PVC membrane containing UiO-66-NH<sub>2</sub> and a choline-based ionic liquid. This system was applied to the synthesis of (S)-citalopram, achieving 96% conversion, 93% ee, and retaining more than 80% activity after 30 days of storage. The porous MOF structure, PVC matrix flexibility, and the

stabilizing effect of the ionic liquid acted synergistically, reducing diffusion limitations and protecting the enzyme from deactivation.

Comparative analysis of all systems demonstrated that immobilization significantly increases lipase resistance to changes in pH, temperature, and reaction medium, and that the use of ionic liquids consistently enhanced enzyme stability, directly contributing to the preservation of high catalytic activity. The highest ee values were recorded for (S)-ketoprofen (99.85%) and (S)-atenolol (100%), while the highest conversions were obtained for 3H3P (97.4%) and (S)-citalopram (96%). The results clearly confirmed that a properly designed enzyme microenvironment - whether inorganic, polymeric, or hybrid-enables efficient and selective API synthesis. The stability and reusability of the developed biocatalysts indicate strong implementation potential, while advances in co-immobilization and integration with flow reactors open new perspectives for biocatalysis in green pharmaceutical chemistry.

The developed systems represent environmentally friendly solutions that help reduce production costs and energy consumption while enabling the preparation of pure enantiomers of pharmaceutically active substances. The results may significantly influence the development of biotechnology, pharmacy, and the chemical industry, contributing to the wider adoption of biocatalysis as an efficient and sustainable alternative to traditional chemical synthesis methods.

### **3. Wprowadzenie teoretyczne**

#### **3.1. Hydrolazy - podstawowe informacje, mechanizm działania, katalizowane reakcje, przykłady i zastosowanie**

##### *3.1.1. Hydrolazy - charakterystyka i podstawowe właściwości*

Będąc największą i najbardziej zróżnicowaną klasą enzymów, hydrolazy (EC 3) oferują różnorodność konformacyjną, która stanowi podstawę ich zróżnicowanych funkcji biologicznych [1]. Hydrolazy są trzecią grupą według klasyfikacji EC i posiadają wspólną cechę katalizowania rozszczepiania różnorodnych wiązań chemicznych przy udziale cząsteczki wody. Mechanizm reakcji polega na tym, że grupa hydroksylowa (-OH) z cząsteczki H<sub>2</sub>O przyłącza się do jednej części rozszczepianego wiązania, natomiast atom wodoru (-H) do drugiej, prowadząc do powstania dwóch produktów reakcji [2]. Dzięki tej uniwersalnej reakcji, enzymy hydrolityczne mają nie tylko istotne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych, odgrywając ważną rolę w wielu procesach komórkowych, ale mają również niezliczone zastosowania komercyjne [3]. Znaczenie praktyczne hydrolaz przewyższa znaczenie innych klas enzymów, co powoduje, że enzymy z grupy EC 3 stanowią największy odsetek enzymów wykorzystywanych w przemyśle [4], bowiem prawie 75% wszystkich enzymów przemysłowych to enzymy hydrolityczne. Mają one szerokie zastosowanie w przemyśle zarówno kosmetycznym, są wykorzystywane w środkach piorących w celu usuwania zabrudzeń, a także w przemyśle papierniczym w bieleniu papieru czy produkcji biopaliw, co powoduje, że wiele sektorów przemysłu, takich jak przemysł detergentów, skórzany, tekstylny, celulozowo-papierniczy, spożywczy i paszowy, mleczarski, biopaliwowy i gospodarki odpadami, jest zależnych od hydrolaz [2,5]. Co więcej, karbohydrazy, a także proteazy i lipazy, dominują na rynku enzymów, stanowiąc ponad 70% całkowitej komercyjnej sprzedaży enzymów. Proteazy w przemyśle detergentów i mleczarskim pozostają dominującym typem enzymów ze względu na ich szerokie zastosowanie. Z kolei karbohydrazy, głównie amylazy i celulazy, wykorzystywane są w przemyśle skrobiowym, tekstylnym, produkcji detergentów i piekarniczym [6].

Pod względem strukturalnym hydrolazy, podobnie jak inne enzymy, zbudowane są głównie z białek globularnych. Charakteryzuje je obecność centrum aktywnego, czyli wyspecjalizowanego fragmentu cząsteczki enzymu, w którym zachodzi właściwa reakcja

katalityczna. [7]. Często w centrum aktywnym obecne są specyficzne triady katalityczne (np. w proteazach serynowych: seryna, histydyna i kwas asparaginowy), które odpowiadają za obniżenie energii aktywacji i ułatwienie ataku nukleofilowego np. cząsteczki wody na wiązanie w substracie. Budowa centrum aktywnego decyduje o wysokiej specyficzności substratowej hydrolaz - każda z nich rozpoznaje tylko określony rodzaj wiązania chemicznego (np. wiązania estrowe, peptydowe, glikozydowe, tioestrowe) [8]. Hydrolazy mogą mieć dodatkowo domeny regulatorowe i strukturalne, które stabilizują ich konformację, umożliwiając działanie w określonych warunkach środowiskowych (pH, temperatura) oraz wpływając na aktywność katalityczną. Podstawowym etapem aktu katalitycznego hydrolaz jest przyłączenie substratu do centrum aktywnego poprzez oddziaływania niekowalencyjne (wiązania wodorowe, siły van der Waalsa, oddziaływania elektrostatyczne). Następnie enzym stabilizuje stan przejściowy substratu, co obniża energię aktywacji reakcji. Wprowadzona cząsteczka wody atakuje wiązanie chemiczne, prowadząc do jego rozszczepienia i powstania produktów reakcji. Enzym po zakończeniu cyklu katalitycznego pozostaje niezmienny i może przeprowadzać kolejne reakcje. Należy dodać, że hydrolazy są niezwykle efektywne bowiem jedna cząsteczka enzymu potrafi przeprowadzić nawet kilkadziesiąt tysięcy reakcji w ciągu sekundy [9].

Hydrolazy, jak wcześniej wspomniano, stanowią nieodłączny i kluczowy element przemysłu, natomiast co równie istotne, są wszechobecne w organizmach żywych i odpowiadają za szereg procesów metabolicznych, takich jak:

- trawienie (proteazy rozkładają białka, lipazy tłuszcze, amylazy i inne karbohydrazy polisacharydy),
- procesy naprawcze i degradacyjne (np. nukleazy rozkładające kwasy nukleinowe, fosfatazy usuwające grupy fosforanowe),
- kontrola cyklu komórkowego i apoptozy (hydrolazy lizosomalne uczestniczą w degradacji makrocząsteczek wewnątrzkomórkowych).

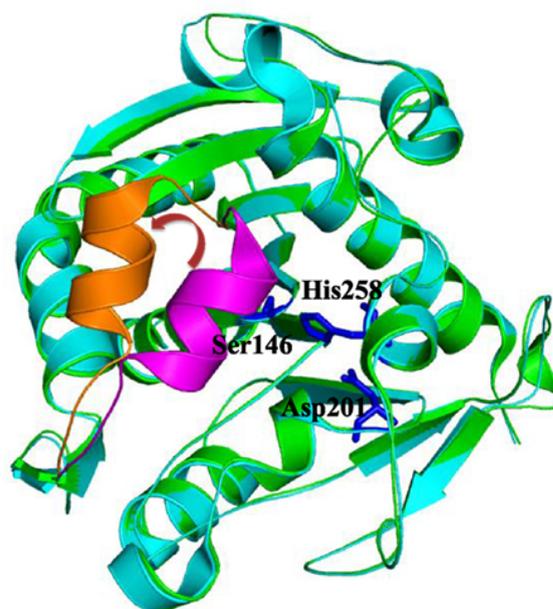
Dzięki tak szerokiemu spektrum działania hydrolazy pełnią kluczową rolę zarówno w utrzymaniu homeostazy organizmu, jak i w regulacji procesów fizjologicznych [10]. Ich znaczenie biologiczne obejmuje również fundamentalne procesy życiowe organizmów, a zastosowania przemysłowe czynią je kluczowym elementem współczesnej biotechnologii [11]. Dzięki wysokiej specyficzności

substratowej enzymy te stanowią nie tylko przedmiot intensywnych badań naukowych, ale również podstawę innowacyjnych technologii w przemyśle spożywczym, chemicznym, farmaceutycznym, energetycznym i ochronie środowiska, rozszerzając możliwości i zmieniając punkt widzenia na przyszłe innowacje biokatalityczne [12].

### 3.1.2. Lipazy - charakterystyka

Lipazy (EC 3.1.1.) to rozpuszczalne w wodzie enzymy, które hydrolizują nierozpuszczalne w wodzie cząsteczki lipidów, takie jak triglicerydy, fosfolipidy i galaktolipidy [13]. Lipazy występują powszechnie w organizmach zwierząt i ludzi, a także roślin, grzybów oraz w mikroorganizmach i stanowią jeden z najlepszych przykładów enzymów o wyjątkowej selektywności substratowej [14-16]. Chociaż definicja lipaz odróżniająca te enzymy od innych esteraz jest nadal niejednoznaczna i kontrowersyjna, lipazy są zazwyczaj definiowane jako karboksyloesterazy, które mogą katalizować rozszczepienie lub tworzenie nierozpuszczalnych w wodzie związków acylowych ( $R-C=O$ ), takich jak mono-, di- i triacyloglicerole zawierające estry kwasów tłuszczowych o stosunkowo długim łańcuchu (powyżej C6) [17].

Jedną z kluczowych cech charakterystycznych dla lipaz jest zjawisko aktywacji międzyfazowej (ang. *interfacial activation*) [18]. Struktura większości lipaz zawiera tzw. wieczko (ang. *lid*), czyli fragment białka zbudowany z jednej lub kilku helis  $\alpha$ , który w stanie zamkniętym zasłania centrum aktywne enzymu, co zostało przedstawione na Rysunku 1. Dopiero po kontakcie z hydrofobową powierzchnią substratu lipidowego następuje zmiana konformacyjna enzymu i otwarcie wieczka [19]. W efekcie odsłaniane jest hydrofobowe centrum aktywne, zdolne do wiązania niepolarnych cząsteczek lipidowych [20]. Zjawisko aktywacji międzyfazowej jest unikatowe dla lipaz i odróżnia je od innych hydrolaz, takich jak proteazy czy glikozydazy, które katalizują reakcje substratów rozpuszczalnych w wodzie [21].



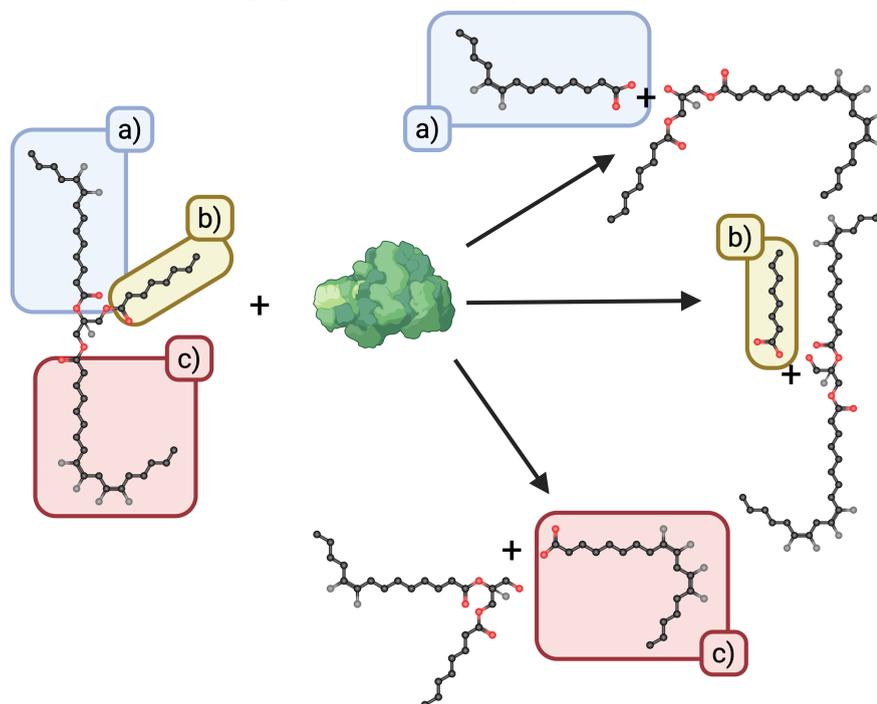
**Rysunek 1.** Mechanizm otwarcia i zamknięcia wieczka w lipazie: nałożenie konformacji zamkniętej (zielona, kod PDB: 1DT3) i otwartej (niebieska, kod PDB: 1EIN) lipazy z *Thermomyces lanuginosus*. Zamknięte i otwarte wieczko oraz triady katalityczne zostały wyróżnione odpowiednio kolorami różowym, pomarańczowym i niebieskim, na podstawie [22].

Jednak co najważniejsze, kluczową cechą lipaz, jest wspomniana już wcześniej selektywność substratowa, którą dzieli się na: typoselektywność (tj. preferencję dla określonych rodzajów kwasów tłuszczowych), regioselektywność (tj. numeracja stereospecyficzna, z ang. *stereospecific numbering (sn)*, np. sn-1 i sn-2) oraz stereoselektywność (tj. rozróżnianie pozycji enancjomerycznych; enancjoselektywność) [23]. W przeciwieństwie do innych typowych właściwości lipaz, każda lipaza o zmienionej strukturze białkowej wykazuje, w mniejszym lub większym stopniu, odmienną od swojego pierwowzoru selektywność. Główną reakcją katalizowaną przez lipazy jest hydroliza wiązań estrowych w triacyloglicerolach, w której cząsteczka wody atakuje wiązanie pomiędzy resztą kwasu tłuszczowego a glicerolem, prowadząc do powstania mono- i diacylogliceroli oraz wolnych kwasów tłuszczowych [24]. Wykazują również zdolność do katalizowania reakcji odwrotnych, takich jak synteza estrów oraz procesy transestryfikacji. Zjawisko to jest szczególnie intensywne w środowisku o niskiej aktywności wody, które sprzyja przesunięciu równowagi reakcji w kierunku tworzenia wiązań estrowych. W takich warunkach lipazy zachowują wysoką aktywność

i selektywność katalityczną, co wyróżnia je na tle wielu innych enzymów wymagających obecności wody do zachowania strukturalnej integralności. Właśnie ta dwufunkcyjność lipaz - możliwość katalizowania zarówno reakcji hydrolizy, jak i syntezy - czyni je wyjątkowo atrakcyjnymi biokatalizatorami w różnorodnych zastosowaniach przemysłowych. W procesie produkcji biodiesla lipazy umożliwiają enzymatyczną transestryfikację olejów roślinnych lub tłuszczów zwierzęcych z alkoholami, co pozwala na prowadzenie procesu w łagodnych warunkach, ograniczenie powstawania produktów ubocznych oraz łatwiejszą separację faz reakcyjnych. Z kolei w przemyśle farmaceutycznym lipazy wykorzystywane są do stereoselektywnej syntezy złożonych estrów i innych związków o wysokiej wartości dodanej, gdzie precyzyjna kontrola konfiguracji przestrzennej produktu końcowego ma kluczowe znaczenie. Zastosowanie lipaz w takich procesach wpisuje się w założenia zielonej chemii (ang. *green chemistry*), oferując możliwość redukcji zużycia rozpuszczalników organicznych, obniżenia energochłonności oraz zwiększenia efektywności reakcji poprzez wykorzystanie biodegradowalnych i nietoksycznych biokatalizatorów [25].

Chociaż lipazy wykazują dość zróżnicowane zachowanie niezależnie od długości i nasycenia łańcucha węglowego w cząsteczce substratu to każda z nich może preferencyjnie hydrolizować określone typy estrów kwasów tłuszczowych [26,27]. Ta zdolność lipaz nazywana jest typoselektywnością (przedrostek „typo-” odnosi się do kształtu, figury lub formy) lub specyficznością kwasów tłuszczowych i jest to najbardziej podstawowa właściwość lipaz. Istnieje wiele doniesień na temat typoselektywności lipaz w różnych warunkach reakcji (Rys. 2) [28]. Lipaza B z *Candida antarctica* i lipaza z *Thermomyces lanuginosus* faworyzują estry kwasów tłuszczowych o średniej długości łańcucha [29]. Wiadmo jest również, że lipaza z trzustki świni, lipaza z *Candida rugosa* i lipaza z *Bacillus licheniformis* preferują triacyloglicerole o krótkich łańcuchach nad tymi o dłuższych łańcuchach. Z kolei lipaza z *Rhizomucor miehei* wykazuje maksymalną aktywność wobec łańcucha zawierającego 8 atomów węgla i niską aktywność wobec nienasyconych triacylogliceroli, natomiast lipaza z *Geotrichum candidum* jest wysoce selektywna wobec długołańcuchowych i nienasyconych triacylogliceroli [30].

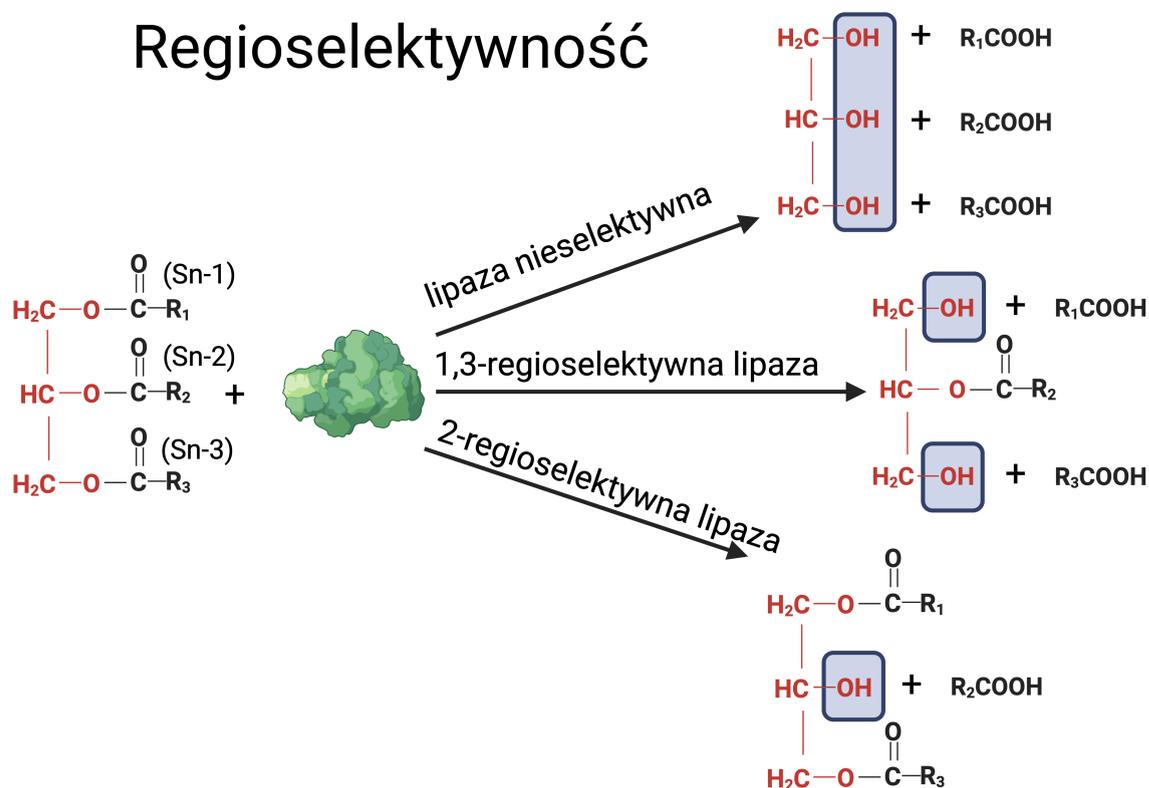
## Typoselektywność



**Rysunek 2.** Typoselektywność lipaz względem: a) średniej długości łańcuchów, b) krótkich łańcuchów, c) długich, rozbudowanych łańcuchów estrów kwasów tłuszczowych.

Co więcej, większość lipaz jest znana z preferencyjnego lub wyłącznego hydrolizowania grup estrowych w pozycjach zewnętrznych (sn-1 i sn-3) w stosunku do pozycji wewnętrznych (sn-2) [31]. Ta zdolność lipaz do rozróżniania pozycji sn-1 i sn-2 triacylogliceroli nazywana jest regioselektywnością (przedrostek „regio-” odnosi się do regionu w cząsteczce substratu) lub specyficzną pozycyjną. W porównaniu z typoselektywnością, która jest stosunkowo niejednoznaczną cechą, regioselektywność lipaz jest ściśle wykazywana podczas katalizy [32]. Dlatego lipazy rozróżniają nie tylko to, jakie kwasy tłuszczowe są przyłączone, ale również, gdzie są przyłączone do triacylogliceroli (Rys. 3).

## Regioselektywność

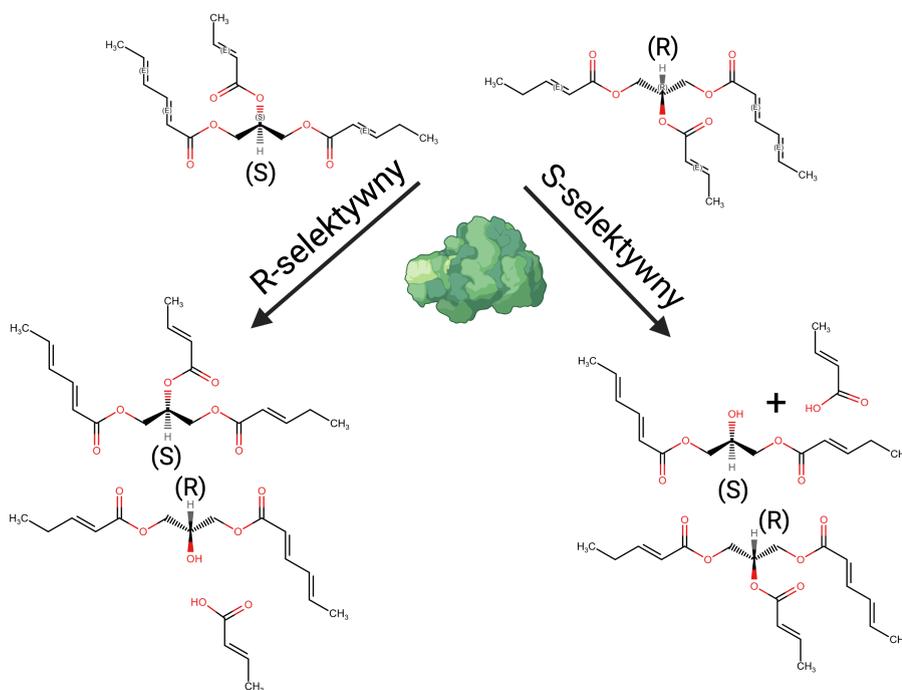


**Rysunek 3.** Regioselektywność lipaz względem rzędowości atomu węgla.

W projekcji Fischera cząsteczki triacyloglicerolu zauważalne jest, że drugorzędowy atom węgla acylowego (sn-2) związku może stanowić centrum asymetrii (zwane również centrum chiralnym), wskazując, że triacyloglicerole z różnymi fragmentami kwasów tłuszczowych w pierwszorzędowych pozycjach acylowych (sn-1 i sn-3) są związkami chiralnymi [33]. Podczas gdy inne hydrolazy, takie jak proteazy, fosfolipazy, glikozydazy i nukleazy, reagują wyłącznie z jednym z enancjomerów, lipazy mogą oddziaływać ze wszystkimi enancjomerami chiralnych acylogliceroli, a także prochiralnymi triacyloglicerolami. Hydroliza triacylogliceroli katalizowana lipazą ma tendencję do kinetycznego podążania określoną ścieżką enancjomeryczną. Odkrycia, że większość lipaz jest stereoselektywna w kierunku jednego enancjoimeru w stosunku do drugiego, sugerują, że lipazy potrafią rozróżnić pozycje enancjomeryczne w acyloglicerolach [34]. Ta zdolność lipaz nazywana jest stereoselektywnością (przedrostek „stereo-” odnosi się do trójwymiarowości), co stanowi najważniejszą selektywność substratową lipaz (Rys. 4). To właśnie ta cecha warunkuje ich kluczową

rolę w przemyśle farmaceutycznym, umożliwiając otrzymywanie enancjomerycznie czystych produktów [35].

## Stereoselektywność



**Rysunek 4.** Stereoselektywność lipaz względem enancjomerów (R)- i (S)- związków chiralnych.

Lipazy to jedne z najlepiej poznanych i najszerzej stosowanych hydrolaz. Dzięki unikalnemu mechanizmowi aktywacji międzyfazowej oraz wysokiej selektywności stanowią niezwykle cenne narzędzia w biotechnologii. Szczególnie istotna jest ich zdolność do katalizowania reakcji stereoselektywnych, co czyni je enzymami pierwszego wyboru w przemyśle farmaceutycznym, chemicznym i spożywczym.

### 3.1.3. Zastosowanie lipaz w nauce i przemyśle

Lipazy należą do najbardziej zróżnicowanej i jednej z najliczniejszych grup enzymów, głównie ze względu na ich unikalną selektywność substratową. Ta właściwość jest szeroko wykorzystywana w wielu nowatorskich reakcjach i zastosowaniach praktycznych, obejmujących produkcję m.in. środków czystości,

kosmetyków, żywności, biopaliw oraz farmaceutyków (Rysunek 5) [36]. Na rynku dostępnych jest już kilka skomercjalizowanych lipaz, takich jak Lipozyme® (Novozymes), które stały się kluczowymi narzędziami zarówno w badaniach naukowych, jak i w procesach przemysłowych. Mimo to wciąż istnieje potrzeba opracowania nowych, bardziej zaawansowanych lipaz o precyzyjnie ukierunkowanej selektywności substratowej, co umożliwi prowadzenie jeszcze bardziej specyficznych reakcji biokatalitycznych.

Jak już wspomniano, lipazy stanowią niezwykle ważną grupę biokatalizatorów, odgrywających kluczową rolę zwłaszcza w przemyśle farmaceutycznym. Ich wyjątkowa specyficzność sprawia, że są idealnymi narzędziami do syntezy substancji farmaceutycznie aktywnych [37]. Procesy enzymatyczne z udziałem lipaz cechują się wysoką selektywnością, ograniczonym powstawaniem produktów ubocznych, mniejszą ilością odpadów chemicznych oraz większą wydajnością, w porównaniu z klasycznymi procesami katalitycznymi. Dzięki temu wykorzystanie tych enzymów pozwala na prowadzenie procesów produkcyjnych w sposób bardziej ekologiczny i ekonomiczny i co równie istotne, w pełni zgodny z ideą zielonej chemii, która zakłada minimalizację negatywnego wpływu przemysłu na środowisko [38].

Lipazy, dzięki swoim unikalnym właściwościom katalitycznym, znalazły szerokie zastosowanie w różnych sektorach przemysłu [39]. W przemyśle spożywczym wykorzystywane są m.in. do hydrolizy tłuszczów mlecznych, poprawy smaku produktów oraz lipolizy tłuszczów maślanych [40]. Z kolei w produkcji serów enzymy te wykorzystywane są do przyspieszania dojrzewania i kształtowania profilu smakowego. Dodanie lipaz (często w parze z proteazami) powoduje hydrolizę tłuszczu mlecznego i uwalnianie wolnych kwasów tłuszczowych, które stanowią prekursorzy dla reakcji prowadzących do powstawania związków aromatycznych, a więc ketonów i laktonów odpowiedzialnych za charakterystyczny smak i zapach serów dojrzewających [41-43]. Lipazy wykorzystuje się również do modyfikacji tłuszczów w produktach mlecznych, np. w celu poprawy ich tekstury i właściwości sensorycznych, przy czym procesy te muszą być starannie kontrolowane, by uniknąć nadmiernego powstawania związków o niepożądanym, zjełczałym aromacie [44]. Dodatkowo lipazy mogą przyczyniać się do wydłużenia trwałości produktów, poprawy smaku i konsystencji soków, sosów, zup, serów czy wypieków. Lipazy stosuje się także do modyfikacji tłuszczów i olejów poprzez

zmianę położenia łańcuchów kwasów tłuszczowych w cząsteczce glicerolu, co umożliwia wytwarzanie tłuszczów o wyższej wartości rynkowej z surowców tańszych i mniej pożądanym, a często odpadowych [45,46]. Dzięki zdolności do działania w określonych pozycjach cząsteczki glicerolu (np. w pozycjach 1 i 3) lipazy mogą selektywnie wymieniać kwasy tłuszczowe w tłuszczach, co pozwala na tworzenie tzw. tłuszczów strukturalnych. W technologii żywności wykorzystywane są do produkcji tłuszczów specjalistycznych o kontrolowanej temperaturze topnienia, takich jak margaryny, tłuszcze cukiernicze czy komponenty do czekolad i polew, gdzie istotne jest uzyskanie odpowiedniej tekstury, plastyczności oraz stabilności temperaturowej. Ponadto tłuszcze strukturalne mają znaczenie w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym, gdzie stosuje się je jako nośniki substancji aktywnych, emolienty o określonej stabilności oksydacyjnej lub składniki formułacji o kontrolowanej biodostępności [47].

Znaczącą rolę lipazy odgrywają również w przemyśle detergentów i środków czystości, który jest jednym z największych odbiorców enzymów na świecie [48]. Składniki chemiczne detergentów powodują zanieczyszczenie środowiska i są niebezpieczne dla fauny i flory, dlatego lipazy są stosowane jako substytut szkodliwych substancji [49]. Obecnie niemal połowa dostępnych detergentów, zwłaszcza tych przeznaczonych do prania, zawiera enzymy takie jak lipazy, celulazy, proteazy czy amylazy, przy czym zdecydowanie dominujący udział przypada lipazom [50,51]. Zastosowanie enzymów pozwala zwiększyć skuteczność usuwania plam, a jednocześnie ograniczyć użycie substancji chemicznych szkodliwych dla środowiska, bowiem lipazy działające w temperaturze otoczenia skutecznie rozkładają tłuszcze obecne na tkaninach nie powodując przy tym ich uszkodzenia [52].



**Rysunek 5.** Przykłady zastosowania lipaz w różnych gałęziach przemysłu.

Innym obszarem zastosowań lipaz jest bioremediacja, czyli proces oczyszczania środowiska z zanieczyszczeń z wykorzystaniem substancji biologicznych. Enzymy te mogą być używane do usuwania odpadów ropopochodnych z wód i gleb, przywracając równowagę ekosystemów [53]. Niektóre szczepy drobnoustrojów, takie jak *Aspergillus niger* czy *Aspergillus terreus*, produkują lipazy zdolne do degradacji folii z poli(chlorku winylu) i/lub zanieczyszczeń ropopochodnych. Wykazano, że lipaza pochodząca z *Aspergillus niger* potrafi rozkładać węglowodory poliaromatyczne zawarte w ropie naftowej, nawet w 100% [54,55]. Lipazy znajdują również zastosowanie w produkcji biodiesla, gdzie katalizują reakcję transestryfikacji kwasów tłuszczowych z alkoholami, prowadząc do powstawania estrów, które są głównym składnikiem biopaliwa [56]. Enzymatyczna produkcja biodiesla jest procesem przyjaznym dla środowiska, ekonomicznym i umożliwia wykorzystanie odpadów, takich jak zużyte oleje roślinne. Do najczęściej stosowanych lipaz w tym procesie należą enzymy pochodzące z *Aspergillus niger*, *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor miehei* oraz

*Thermomyces lanuginosus*, charakteryzujące się wysoką stabilnością termiczną i odpornością na działanie alkoholi krótkołańcuchowych [57]. Z kolei w przemyśle kosmetycznym, dzięki zdolności do katalizowania reakcji estryfikacji w łagodnych warunkach, lipazy umożliwiają syntezę estrów wykorzystywanych jako składniki kremów, olejków, balsamów i perfum [58]. Typowym przykładem jest wytwarzanie estrów izopropylowych kwasów tłuszczowych, takich jak palmitynian izopropylu czy mirystynian izopropylu, które pełnią funkcję emolientów, a więc zmiękczejają skórę i poprawiają rozprowadzanie kosmetyku. Ciekawym przykładem może być, początkowo uważany za „drogi” proces enzymatyczny, synteza estrów zmiękczejających (np. mirystynianu mirystylu lub estrów oleju kokosowego) [59]. Opracowana przez firmę Goldschmidt (obecnie Evonik) synteza enzymatyczna zastąpiła „prostą i taną” reakcję chemiczną. Pomimo zastosowania relatywnie drogiego enzymu (immobilizowanej lipazy B z *Candida antarctica*) biokatalizator ten jest wielokrotnie poddawany recyklingowi w celu obniżenia całkowitych kosztów procesu. Co więcej, uwzględniając cały proces, a nie tylko etap syntezy estru, konwersja enzymatyczna okazała się opłacalna ze względu na kilka kluczowych aspektów. Proces chemiczny wymagał temperatur powyżej 180°C, co zwiększało koszty energii i prowadziło do powstawania zabarwionych, nieprzyjemnie pachnących produktów ubocznych, wymagających dodatkowych etapów oczyszczania, takich jak deodoryzacja i wybielanie. Metoda enzymatyczna jest znacznie korzystniejsza, ponieważ przebiega w niższej temperaturze (60-80°C), bez agresywnych reagentów i z minimalną ilością produktów ubocznych [60]. W produkcji perfum lipazy są natomiast wykorzystywane do transestryfikacji alkoholi i kwasów tłuszczowych, co pozwala uzyskać delikatne, naturalnie pachnące estry np. o nutach owocowych [61].

Można zatem podsumować, że lipazy stanowią niezwykle wszechstronne narzędzia w przemyśle, nauce i ochronie środowiska [62]. Dzięki swojej wysokiej specyficzności, zdolności do działania w łagodnych warunkach oraz możliwości kontrolowania reakcji chemicznych, enzymy te umożliwiają prowadzenie procesów bardziej efektywnie, w sposób bezpieczniejszy i przyjazny dla środowiska. Ich zastosowanie w przemyśle jasno pokazuje, że te hydrolazy nie tylko przyczyniają się do rozwoju technologii, ale również wspierają ideę zrównoważonego rozwoju i zielonej chemii. W perspektywie przyszłości, dalsze badania nad nowymi, bardziej selektywnymi

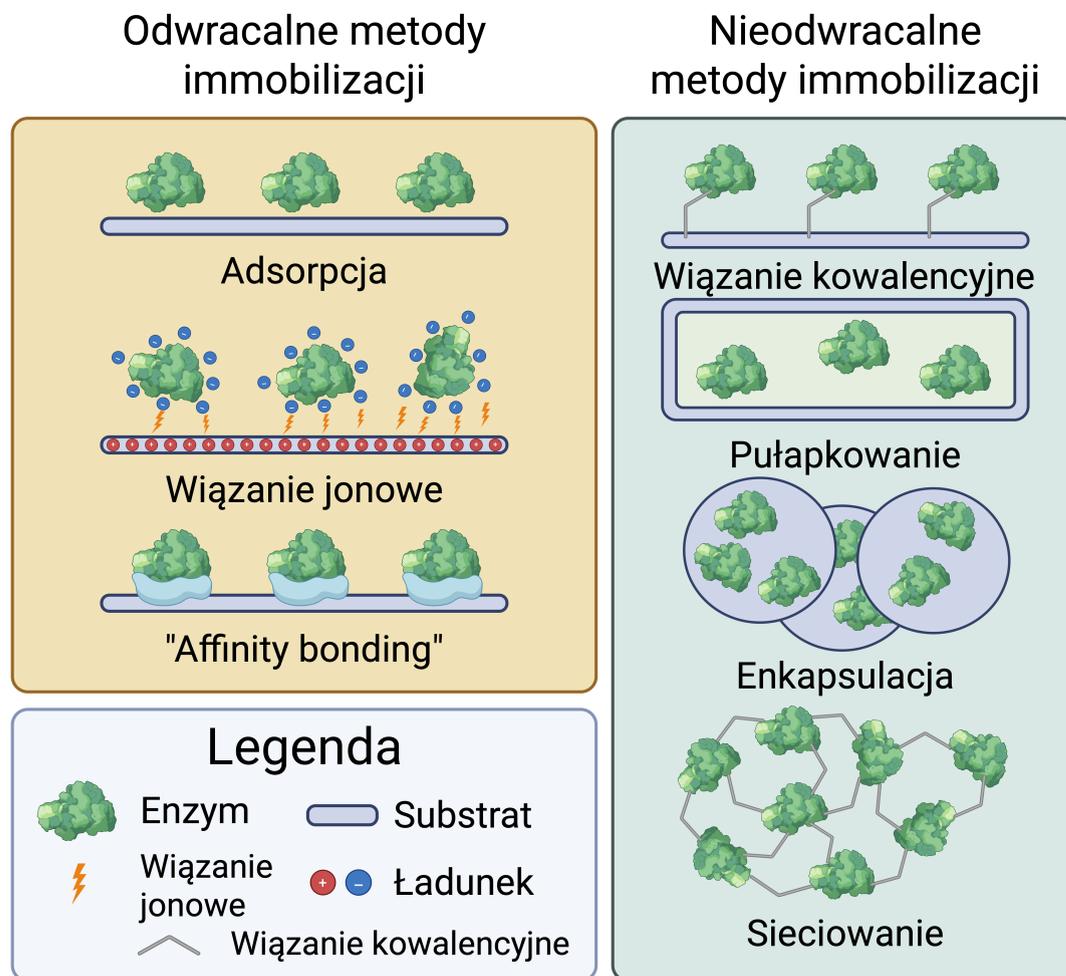
i stabilnymi biokatalizatorami otwierają szerokie możliwości dla innowacyjnych i ekologicznych rozwiązań w wielu dziedzinach przemysłu [63,64].

### **3.2. Immobilizacja enzymów - podstawowe informacje i charakterystyka procesu**

#### *3.2.1. Rodzaje immobilizacji*

Pomimo wcześniej wspomnianych licznych zalet hydrolaz, głównym czynnikiem ograniczającym ich szersze zastosowanie w przemyśle jest obniżona wydajność katalityczna, wynikająca głównie z wrażliwości na warunki reakcji. W związku z tym jednym z priorytetów jest opracowanie rozwiązań poprawiających wydajność enzymów oraz wydłużających możliwość ich stosowania w trudnych warunkach przemysłowych [65]. Wśród potencjalnych strategii szczególną uwagę poświęca się immobilizacji enzymów. Umożliwia ona nie tylko poprawę ich stabilności, ale także wielokrotne wykorzystanie, przyczyniając się do obniżenia kosztów produkcji całego procesu technologicznego [66]. Zastosowanie odpowiedniego nośnika dodatkowo może mieć działanie stabilizujące strukturę białka, przyczyniając się do zachowania a czasem nawet zwiększenia aktywności katalitycznej poprzez utworzenie stabilnego kompleksu enzym-substrat [67,68]. Proces immobilizacji polega na unieruchamianiu biokatalizatora poprzez jego związanie z odpowiednim nośnikiem lub umieszczenie w strukturze ograniczającej mobilność biomolekuł. Wyróżnia się trzy podstawowe typy immobilizacji: immobilizację bez udziału nośnika, immobilizację wewnątrz nośnika oraz immobilizację na powierzchni nośnika, które zostały opisane obszerniej w dalszej części pracy. Podział może być również według metod immobilizacji odwracalnej i nieodwracalnej, które zostały przedstawione na grafice poniżej (Rysunek 6) [69,70].

Immobilizacja bez udziału nośnika, nazywana również sieciowaniem lub flokulacją, polega na tworzeniu agregatów z enzymów lub mikroorganizmów przy użyciu związków wielofunkcyjnych [71]. W procesie tym zachodzą interakcje chemiczne lub fizyczne pomiędzy grupami funkcyjnymi enzymów i reagentami sieciującymi, co prowadzi do powstania trwałych połączeń, a dużą zaletą tej metody jest uzyskanie wysokiego stężenia biomasy [72].



**Rysunek 6.** Rodzaje immobilizacji odwracalnej i nieodwracalnej.

Istotnym atutem jest również brak wymywania enzymu z układu. Wadą natomiast może być częściowa utrata aktywności katalitycznej wynikająca z użycia toksycznych substancji podczas sieciowania oraz z możliwych zmian w strukturze przestrzennej enzymu [73]. Drugim typem jest immobilizacja wewnątrz nośnika, która obejmuje trzy podstawowe metody: enkapsulacja, pułapkowanie oraz unieruchomienie między membranami. We wszystkich tych technikach stosuje się półprzepuszczalne materiały, które umożliwiają swobodną dyfuzję reagentów, przy jednoczesnej ochronie enzymu wewnątrz nośnika [74]. Enkapsulacja polega na tworzeniu kapsułek zbudowanych z rdzenia (fazy stałej, ciekłej lub gazowej) oraz półprzepuszczalnej otoczki wykonanej z polimeru lub żelu. W wyniku tego powstają mikroskopijne kulki o średnicy kilkudziesięciu mikrometrów. Metoda ta pozwala na łatwe oddzielenie enzymu od środowiska reakcji, a zarazem chroni go przed zanieczyszczeniami i utratą aktywności,

co znacząco wydłuża jego trwałość [75,76]. Podczas pułapkowania enzym zostaje uwięziony w matrycy żelowej (naturalnej lub syntetycznej), w której następnie zachodzi proces sieciowania. Enzym wiąże się z matrycą poprzez słabe oddziaływania fizyczne, co może prowadzić do jego częściowego wymywania i utraty aktywności. Wadą tej metody są także duże opory dyfuzyjne ograniczające szybkość reakcji [77]. Unieruchomienie między membranami polega natomiast na zamknięciu enzymu pomiędzy dwiema półprzepuszczalnymi membranami, co umożliwia przepływ substratów i produktów, przy jednoczesnym zatrzymaniu biokatalizatora wewnątrz układu [78].

Trzecim sposobem jest immobilizacja na powierzchni nośnika, która polega na wytworzeniu odpowiedniego powinowactwa między enzymem a materiałem nośnym. Wyróżnia się dwa główne mechanizmy: wiązanie kowalencyjne oraz adsorpcję. Wiązanie kowalencyjne polega na tworzeniu trwałych połączeń chemicznych między grupami funkcyjnymi enzymu a nośnikiem [79]. Uzyskany w ten sposób układ charakteryzuje się wysoką stabilnością i odpornością na wymywanie biokatalizatora. Wadą tej metody jest konieczność stosowania często toksycznych reagentów oraz ryzyko obniżenia aktywności enzymu w wyniku zmian jego konformacji po wytworzeniu wiązań chemicznych. [80]. Z kolei adsorpcja jest metodą prostą, tanią i szeroko stosowaną. Enzym wiąże się z powierzchnią nośnika za pomocą nietrwałych oddziaływań fizycznych, takich jak siły van der Waalsa, oddziaływania elektrostatyczne, hydrofobowe czy wodorowe. Wadą tej techniki jest wrażliwość wiązań na zmiany pH i temperatury, co może prowadzić do desorpcji enzymu i obniżenia efektywności katalitycznej. W przypadku wiązania jonowego enzym łączy się z powierzchnią nośnika o zdefiniowanym ładunku poprzez oddziaływania elektrostatyczne między przeciwnie naładowanymi grupami. Ostatnią odwracalną metodą jest „affinity bonding” polegający na wiązaniu enzymu z nośnikiem poprzez specyficzne interakcje ligand-enzym, np. biotyna-awidyna, antygen-przeciwciało, substrat-enzym [81,82].

### 3.2.2. *Nośniki w immobilizacji enzymów*

Immobilizacja umożliwia nie tylko poprawę stabilności, ale także wielokrotne wykorzystanie enzymów, przyczyniając się do obniżenia kosztów przemian biokatalitycznych. Istotnym aspektem wpływającym na skuteczność wytworzenia nowego systemu biokatalitycznego oraz osiągnięcie jego maksymalnej aktywności

katalitycznej jest dobór nie tylko odpowiedniego typu immobilizacji, ale również dobór właściwego nośnika (w przypadku immobilizacji uwzględniającej jego dodatek) [83].

Nie opracowano dotąd uniwersalnego nośnika, który byłby odpowiedni dla wszystkich rodzajów enzymów. Każdy biokatalizator ma inne wymagania dotyczące środowiska pracy, dlatego powierzchnie nośników często poddaje się różnorodnym modyfikacjom chemicznym i/lub fizycznym, mającym na celu poprawę ich właściwości sorpcyjnych, zwiększenie liczby aktywnych miejsc wiązania enzymu oraz służących podniesieniu stabilności całego układu [83]. Skuteczność immobilizacji w dużej mierze zależy od kompatybilności grup funkcyjnych obecnych na powierzchni nośnika i enzymu, bowiem ich zgodność chemiczna umożliwia powstanie trwałego i efektywnego połączenia. Odpowiedni nośnik powinien charakteryzować się także wysoką biokompatybilnością, czyli brakiem toksycznego oddziaływania na enzymy. Istotne są również takie cechy, jak duża powierzchnia właściwa, stabilność chemiczna i mechaniczna, odporność na działanie rozpuszczalników oraz możliwość łatwej regeneracji i ponownego użycia [84]. Dodatkowo korzystne jest, jeżeli nośnik jest tani w produkcji, łatwo dostępny i odporny na degradację w warunkach reakcji, w których pracuje enzym.

Nośniki wykorzystywane w procesach immobilizacji dzieli się na dwie główne grupy: organiczne i nieorganiczne. Do nośników organicznych zalicza się przede wszystkim biopolimery naturalne, takie jak agar, chitozan, alginiany czy celuloza i jej pochodne. Substancje te często mogą tworzyć porowate struktury sprzyjające unieruchamianiu enzymów. Biopolimery te są biodegradowalne, biokompatybilne i stosunkowo tanie, co czyni je atrakcyjnymi w kontekście zastosowań przemysłowych oraz biotechnologicznych. Ich wadą jest jednak ograniczona stabilność w szerszym zakresie pH, wrażliwość na niektóre rozpuszczalniki organiczne oraz niska odporność mikrobiologiczna, co utrudnia ich wykorzystanie w długotrwałych procesach [85]. W celu zwiększenia trwałości i odporności nośników organicznych, prowadzi się ich modyfikacje strukturalne, na przykład poprzez sieciowanie chemiczne, tworzenie kopolimerów lub materiałów hybrydowych, łączących różne właściwości fizykochemiczne. Coraz większą popularność wśród materiałów organicznych zdobywają również polimery syntetyczne, takie jak poliamidy, poliuretany, polistyren, poli(chlorek winylu) czy żywice epoksydowe. Ich budowę chemiczną, porowatość,

wielkość cząstek i rozmieszczenie grup funkcyjnych można precyzyjnie kontrolować już na etapie syntezy, co umożliwia projektowanie materiałów dopasowanych do konkretnych enzymów. Hydrożele polimerowe stanowią natomiast inną obiecującą grupę materiałów do immobilizacji enzymów, ponieważ ich trójwymiarowa, wysoce uwodniona struktura sprzyja zachowaniu naturalnej konformacji białek. Dzięki możliwości precyzyjnego doboru monomerów i stopnia usieciowania mogą one tworzyć środowisko o kontrolowanej porowatości i dostępności substratów, co wspiera wysoką aktywność katalityczną. Dodatkowo hydrożele są często biokompatybilne i obojętne chemicznie, co minimalizuje ryzyko dezaktywacji enzymów podczas immobilizacji oraz pozwala na zastosowanie wytworzonych układów w procesach prowadzonych zarówno w roztworach wodnych, jak i w środowiskach o ograniczonej zawartości wody. [86]. Wadą syntetycznych polimerów jest jednak brak biodegradowalności oraz potencjalna szkodliwość procesu ich sieciowania dla środowiska. Ich dużą zaletą natomiast może być szeroki zakres technik służący ich wytwarzaniu, np. w procesach elektroprzędzenia, który umożliwia wytworzenie włókien polimerowych. Morfologia włókien zależna jest od stężenia polimeru, natężenia prądu podczas procesu przędzenia, wilgotności, masy polimeru czy dodatków użytych podczas procesu. Elektroprzędzenie zapewnia otrzymanie mat o dużej powierzchni właściwej, umożliwiając większe prawdopodobieństwo przyłączenia enzymu. Co więcej, wytworzone maty biokatalityczne mogą zostać wykorzystane jako membrany w reaktorach przepływowych, skutkując zastosowaniem biokatalizatorów w enzymatycznych reaktorach membranowych [87].

Istotna jest również grupa nośników nieorganicznych która obejmuje głównie tlenki metali (takie jak  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  czy magnetyt), krzemionkę, ceramikę, zeolity oraz porowate szkła. Materiały te cechują się wysoką odpornością chemiczną, termiczną i mechaniczną, a także obojętnością wobec większości reagentów chemicznych, dzięki czemu doskonale sprawdzają się w procesach prowadzonych w trudnych warunkach środowiskowych [88]. Kolejną znaczną zaletą nośników nieorganicznych jest ich duża powierzchnia właściwa wynikająca z dobrze rozwiniętej struktury porowatej, pozwalająca na efektywne unieruchomienie enzymów. Co więcej, synteza tych materiałów z reguły jest nieskomplikowana i stosunkowo tania, a otrzymane materiały cechują się znaczną powtarzalnością parametrów fizykochemicznych [89].

W ostatnich latach dużym zainteresowaniem cieszą się także nanomateriały nieorganiczne, takie jak nanocząstki magnetyczne, nanorurki węglowe czy nanowłókna krzemionkowe, które dzięki swoim rozmiarom i znacznemu stosunkowi powierzchni właściwej do objętości, umożliwiają bardzo efektywne wiązanie enzymów i ułatwiają ich separację z mieszaniny reakcyjnej przy użyciu np. klasycznych metod filtracyjnych. Dzięki temu możliwe jest uzyskanie układów o wysokiej aktywności katalitycznej i selektywności [90,91]. Zastosowanie nanocząstek niesie jednak także pewne ograniczenia. Często mają one tendencję do aglomeracji, co utrudnia ich równomierne rozmieszczenie w mieszaninie reakcyjnej i ogranicza zastosowanie na większą skalę. Problem ten można rozwiązać poprzez modyfikację powierzchni, np. pokrycie cząstek warstwą magnetytu, co ułatwia ich separację z roztworu reakcyjnego przy użyciu pola magnetycznego [92,93]. Immobilizacja enzymów na nanocząstkach może przebiegać poprzez adsorpcję (np. wymianę jonową, adsorpcję hydrofobową), wiązanie kowalencyjne (poprzez aktywację chemiczną lub przyłączenie międzyfazowe) bądź przez uwięzienie enzymu w strukturze nośnika. Zastosowanie nanonośników pozwala uzyskać systemy enzymatyczne o zwiększonej stabilności termicznej, większej odporności na denaturację oraz odznaczających się łatwiejszym procesie separacji produktów reakcji [94].

W praktyce jednak coraz częściej stosuje się materiały kompozytowe i hybrydowe, łączące zalety nośników organicznych i nieorganicznych. Dzięki temu można uzyskać układy, które łączą wysoką trwałość i odporność chemiczną z elastycznością oraz biogodnością, cechami, które są niezbędne dla aktywności enzymów. Dobór właściwego nośnika stanowi kluczowy etap procesu immobilizacji, gdyż decyduje o wydajności, stabilności i długowieczności enzymu [95]. Na efektywność całego układu wpływają m.in. rodzaj zastosowanego materiału, sposób jego modyfikacji, wielkość porów, stopień hydrofobowości oraz rodzaj oddziaływań pomiędzy enzymem a nośnikiem. Odpowiednio zaprojektowany nośnik pozwala zachować naturalną strukturę przestrzenną białka, minimalizując ryzyko jego denaturacji i utraty aktywności katalitycznej. Współczesne kierunki badań nad nośnikami skupiają się na opracowywaniu inteligentnych materiałów, które reagują na zmiany środowiska (np. pH, temperatury czy pola magnetycznego), a także na wykorzystaniu nanotechnologii i biomateriałów funkcjonalnych. Ich celem jest stworzenie systemów umożliwiających precyzyjne

sterowanie aktywnością enzymów, zwiększenie wydajności reakcji oraz ułatwienie regeneracji i ponownego użycia biokatalizatorów [96].

Na skuteczność immobilizacji wpływa również porowatość materiału. Zbyt małe lub zanieczyszczone pory mogą utrudniać kontakt enzymu z substratem, co obniża aktywność biokatalizatora. Istotnym czynnikiem jest także odpowiednia orientacja enzymu na powierzchni nośnika, pozwalająca na zachowanie dostępności centrum aktywnego [97].

Coraz większe zainteresowanie nanomateriałami, kompozytami czy hydrożelami świadczy o kierunku rozwoju współczesnej biokatalizy, ukierunkowanej na zwiększenie efektywności reakcji i ograniczenie negatywnego wpływu procesów przemysłowych na środowisko. Immobilizowane biokatalizatory, dzięki swoim wyjątkowym właściwościom, stanowią obecnie jeden z najbardziej perspektywicznych obszarów badań w dziedzinie enzymatycznych procesów technologicznych i zielonej chemii.

### 3.2.3. *Wpływ immobilizacji na właściwości enzymów*

Immobilizacja enzymów, rozumiana jako proces trwałego lub półtrwałego unieruchomienia cząsteczek enzymatycznych na nośnikach stałych, ma istotny wpływ na ich właściwości katalityczne, stabilność oraz selektywność [98]. Oddziaływanie pomiędzy enzymem a nośnikiem może prowadzić zarówno do korzystnych, jak i niekorzystnych zmian w strukturze i funkcji biokatalizatora. Charakter tych zmian zależy w dużej mierze od zastosowanej metody immobilizacji, rodzaju użytego nośnika oraz warunków środowiskowych procesu immobilizacji [99].

Jednym z głównych efektów immobilizacji jest zwiększenie stabilności enzymu. Unieruchomienie biokatalizatora na powierzchni nośnika często prowadzi do usztywnienia jego struktury przestrzennej, co ogranicza niekorzystne zmiany konformacyjne i chroni przed denaturacją termiczną, chemiczną lub mechaniczną, zwłaszcza gdy cząsteczka jest unieruchamiana wielopunktowo, co zapewnia większą sztywność struktury. W efekcie enzym może zachować aktywność przez dłuższy czas, nawet w warunkach, które dla formy rozpuszczonej (wolnej) byłyby niekorzystne [100]. Dodatkowym atutem jest możliwość wielokrotnego wykorzystania immobilizowanego enzymu oraz łatwiejsza separacja produktu reakcji od biokatalizatora, co czyni cały proces bardziej ekonomicznym i przyjaznym technologicznie. Immobilizacja ułatwia

również prowadzenie reakcji w układach przepływowych, umożliwiając automatyzację procesów i lepszą kontrolę parametrów reakcyjnych.

Z drugiej strony, proces immobilizacji może prowadzić do pewnych niekorzystnych zmian w aktywności katalitycznej enzymu. W wielu przypadkach obserwuje się spadek aktywności biokatalizatorów po immobilizacji względem wolnych odpowiedników, który może wynikać z ograniczenia swobody ruchu cząsteczki enzymu lub utrudnionego dostępu substratu do centrum aktywnego [101]. Wiązanie enzymu z nośnikiem może także powodować lokalne zmiany w mikrośrodkowisku biokatalizatora, takie jak modyfikacja pH czy polarności otoczenia, co wpływa na szybkość reakcji enzymatycznej. Nie bez znaczenia pozostaje również ryzyko częściowej denaturacji białka w trakcie samego procesu immobilizacji, zwłaszcza w przypadku metod chemicznych, które wymagają użycia reagentów sieciujących lub warunków odbiegających od optymalnych dla danego enzymu. W takich sytuacjach dochodzi do trwałej utraty aktywności katalitycznej. Ponadto, właściwie przeprowadzony proces immobilizacji może regulować selektywność, specyficzność i aktywność enzymu, dzięki pożądanym zmianom konformacyjnym zachodzącym w cząsteczce białka. Zmiana mikrośrodkowiska oraz ograniczenie ruchliwości enzymu mogą prowadzić także do modyfikacji orientacji substratu w centrum aktywnym, a tym samym wpływać na przebieg reakcji oraz produkty, które powstają [102]. Dodatkowo, jeżeli po immobilizacji powstaje korzystne mikrośrodkowisko wokół enzymu, jego aktywność i trwałość mogą ulec dalszemu zwiększeniu, co czyni taki układ szczególnie wartościowym w zastosowaniach przemysłowych.

Istotnym aspektem wpływającym na aktywność immobilizowanych enzymów są również zjawiska dyfuzyjne. W przypadku, gdy substrat musi przeniknąć przez porowatą strukturę nośnika lub warstwę żelu, może dojść do spowolnienia transportu substratu i produktów reakcji [98]. Tak zwany efekt dyfuzji wewnętrznej prowadzi wówczas do pozornego obniżenia aktywności enzymu, mimo że jego właściwości katalityczne na poziomie molekularnym pozostają niezmienione. Zjawisko to jest szczególnie istotne przy stosowaniu gęstych matryc lub dużych cząsteczek substratów [103]. Niekorzystnym zjawiskiem towarzyszącym immobilizacji jest również możliwość zakrycia centrum aktywnego przez powierzchnię nośnika, co skutkuje utrudnionym dostępem substratu i spadkiem aktywności enzymu. Problem ten można ograniczyć poprzez stosowanie

metod ukierunkowanej immobilizacji, w których enzym jest przyłączany w określonej orientacji, z zachowaniem dostępności miejsca katalitycznego. Co więcej, może to również wpływać na selektywność substratową osadzonego enzymu [104]. Unieruchomienie na odpowiednio dobranym nośniku może stabilizować określoną konformację enzymu, która w przypadku wolnego enzymu występuje jedynie przejściowo lub jest podatna na dezaktywację. Stabilizacja takiej „formy hiperaktywnej” lipaz immobilizowanych na hydrofobowych powierzchniach wznaga mechanizm aktywacji międzyfazowej, powodując trwałe utrzymanie otwartej konformacji domeny „wieczka”, co zwiększa dostęp substratu do centrum aktywnego i znacząco zwiększa jego stereoselektywność [105]. Immobilizacja zmienia mikrośrodowisko enzymu. Nośniki o określonej polarności, hydrofobowości, ładunku powierzchniowym lub obecności grup funkcyjnych mogą wpływać na sposób oddziaływania enzymu z substratem. Zmienione pH w bezpośrednim otoczeniu enzymu czy obecność oddziaływań elektrostatycznych mogą dodatkowo wpływać na energię aktywacji, a tym samym na selektywność produktu [87]. Zrozumienie tych mechanizmów stanowi kluczowy element projektowania wysoko selektywnych biokatalizatorów, szczególnie istotnych w procesach enancjoselektywnej syntezy API, gdzie precyzyjna kontrola stereochemii reakcji jest warunkiem koniecznym

Podsumowując, immobilizacja enzymów stanowi skuteczne narzędzie zwiększające ich stabilność, trwałość i użyteczność w procesach biotechnologicznych, jednak wpływa także na szereg właściwości katalitycznych, w tym aktywność i selektywność. Efekt ten może być zarówno pozytywny, jak i negatywny, w zależności od warunków procesu oraz rodzaju zastosowanego nośnika. Odpowiednie zaprojektowanie systemu immobilizacji, obejmujące wybór metody wiązania, charakter nośnika i warunki reakcji, jest kluczowe dla zachowania wysokiej efektywności katalitycznej enzymu oraz jego stabilności strukturalnej. W praktyce przemysłowej immobilizowane enzymy odgrywają coraz większą rolę w biokatalizie, zwłaszcza w produkcji farmaceutyków, biopaliw, żywności i biopolimerów. Dzięki zwiększonej odporności na warunki procesowe, a także możliwości pracy w układach ciągłych, biokatalizatory tego typu stają się nie tylko bardziej wydajne, lecz również ekonomicznie uzasadnione. Rozwój nowoczesnych metod immobilizacji, uwzględniających projektowanie nośników o kontrolowanej strukturze porów i właściwościach

chemicznych, pozwala coraz skuteczniej łączyć wysoką stabilność enzymów z zachowaniem ich pełnej aktywności i selektywności.

### **3.3. Asymetryczne API - znaczenie oraz nowoczesne, zrównoważone metody syntezy**

#### *3.3.1. Znaczenie chiralności w projektowaniu leków*

W ciągu ostatnich kilku lat biokataliza zyskała znaczne zainteresowanie jako alternatywa dla tradycyjnej syntezy organicznej, szczególnie w przemyśle farmaceutycznym, w syntezie substancji farmaceutycznie aktywnych [106]. Co istotne, biokataliza zaspokaja rosnące zapotrzebowanie na zrównoważony, ekologiczny i bezpieczny przemysł oraz jest zgodna z zasadami zielonej chemii. Przykładowo, enzymy ułatwiają i przyspieszają reakcje biochemiczne, eliminując potrzebę podnoszenia temperatury reakcji, a tym samym zwiększając efektywność energetyczną tych przemian [107]. Ich chemo-, regio- i stereoselektywność umożliwiają ograniczenie liczby etapów reakcji, zmniejszając zużycie energii i ograniczając powstawanie produktów ubocznych. Ta cecha sprawia, że biokataliza jest procesem przyjaznym dla środowiska i coraz częściej zastępuje tradycyjne metody syntezy organicznej w przemyśle farmaceutycznym [108,109]. Biokataliza oferuje również szereg możliwości asymetrycznej syntezy substancji farmaceutycznie aktywnych, ponieważ wiele leków zawiera chiralne substancje farmaceutycznie aktywne. Związki chiralne to takie, które występują w dwóch odmianach - enancjomerach (oznaczanych zwykle jako R i S) [110]. Choć mają identyczny wzór chemiczny i taką samą budowę wiązań, różnią się przestrzennym rozmieszczeniem atomów [111]. Enancjomery mogą mieć całkowicie odmienne właściwości biologiczne i farmaceutyczne. Klasycznym przykładem jest ibuprofen, którego (S)-enancjomer jest około 160 razy bardziej aktywny farmaceutycznie niż forma (R)-. Różnice te wynikają z odmiennego powinowactwa enancjomerów do enzymów i receptorów w organizmie, co prowadzi do zróżnicowanego działania tego leku [112].

Chiralność odgrywa kluczową rolę w dwóch podstawowych obszarach działania leków: farmakodynamice i farmakokinetyce. Farmakodynamika opisuje mechanizm działania leku, czyli to, jak lek oddziałuje na organizm. Z kolei farmakokinetyka dotyczy procesów, którym lek podlega w organizmie, a więc jego wchłaniania, dystrybucji,

metabolizmu i wydalania. W kontekście farmakodynamiki, chiralność decyduje o tym, czy cząsteczka leku jest w stanie skutecznie połączyć się z odpowiednim receptorem lub enzymem. Struktury biologicznych makrocząsteczek - takich jak białka, w tym enzymy i receptory - są z natury chiralne, dlatego często tylko jeden z enancjomerów pasuje do miejsca aktywnego biokatalizatora. Drugi enancjomer może być całkowicie nieaktywny, słabszy farmakologicznie, a w skrajnych przypadkach nawet toksyczny. Przykładem dramatycznych konsekwencji zignorowania istoty chiralności jest talidomid, stosowany w latach 50. XX wieku jako środek uspokajający i przeciwwymiotny dla kobiet w ciąży. Okazało się, że tylko (R)-enancjomer wykazywał działanie terapeutyczne, natomiast (S)-enancjomer miał działanie silnie teratogenne, prowadząc do ciężkich wad rozwojowych płodów [113]. Tragiczne skutki stosowania mieszaniny racemicznej talidomidu doprowadziły do wprowadzenia znacznie bardziej rygorystycznych regulacji dotyczących testowania leków pod kątem chiralności i oceny wpływu tego parametru na bezpieczeństwo stosowanie leków [114]. Innym przykładem jest propranolol, stosowany w leczeniu nadciśnienia tętniczego i chorób serca. Tylko (S)-enancjomer wykazuje aktywność biologiczną, wiążąc się z receptorami  $\beta$ -adrenergicznymi, natomiast forma (R) nie posiada tego działania [115]. Podobne różnice obserwuje się w przypadku metadonu, w którym (R)-enancjomer działa przeciwbólowo, a (S)-forma wykazuje działanie antyarytmiczne, co może prowadzić do złożonych efektów terapeutycznych lub ubocznych [116].

Z kolei z punktu widzenia farmakokinetyki różne enancjomery mogą różnić się szybkością wchłaniania, dystrybucji w tkankach oraz metabolizmem i wydalaniem. Na przykład cytochromy P450, odpowiedzialne za utlenianie leków w wątrobie, są enzymami chiralnymi i preferencyjnie metabolizują tylko jeden z enancjomerów. To może prowadzić do różnic w czasie działania i stężeniu terapeutycznym leku. Doskonałym przykładem jest warfaryna, lek przeciwzakrzepowy w którym (S)-enancjomer jest 3-5 razy bardziej aktywny niż (R)-forma, ale też szybciej metabolizowany przez enzym CYP2C9. Oznacza to, że nawet niewielkie różnice genetyczne między pacjentami mogą wpływać na skuteczność i bezpieczeństwo leczenia tą substancją [117]. Podobnie citalopram, lek przeciwdepresyjny z grupy SSRI (ang. *selective serotonin reuptake inhibitors*), w swojej (S)-formie (escitalopram) wykazuje znacznie większe powinowactwo do transportera serotoniny, co pozwala na stosowanie

niższych dawek i redukuje ryzyko działań niepożądanych [118]. Tego rodzaju modyfikacje stanowią przykład tzw. „*chiral switch*” - strategii polegającej na opracowaniu i wprowadzeniu na rynek enancjomerycznie czystej wersji leku, która jest bardziej skuteczna i bezpieczniejsza niż pierwotna mieszanina racemiczna [119].

Zrozumienie wpływu chiralności na działanie i metabolizm leków sprawiło, że w przemyśle farmaceutycznym coraz większą wagę przykładana się do syntezy enancjomerycznie czystych substancji aktywnych. Tradycyjne metody chemiczne często prowadzą do powstania mieszanin racemicznych, w których oddzielenie enancjomerów bywa kosztowne i czasochłonne [120]. Właśnie dlatego coraz częściej w syntezie API stosuje się biokatalizę [121]. Strategia ta pozwala na otrzymywanie produktów o wysokiej czystości enancjomerycznej bez konieczności stosowania skomplikowanych metod rozdzielania. Na przykład lipazy mogą być wykorzystywane do enancjoselektywnej hydrolizy estrów, w której tylko jeden enancjomer reaguje, a drugi pozostaje niezmieniony. Z kolei dehydrogenazy czy transaminazy pozwalają na stereoselektywną redukcję ketonów lub aminację aldehydów, prowadząc do uzyskania chiralnych alkoholi i amin, które stanowią platformę dla wielu leków [122]. Chiralność jest jednym z najistotniejszych czynników wpływających na działanie i bezpieczeństwo leków. Zarówno w aspekcie farmakodynamicznym, jak i farmakokinetycznym, a różnice między enancjomerami mogą prowadzić do odmiennych efektów terapeutycznych, toksyczności czy interakcji z innymi lekami [123]. Współczesna farmacja coraz częściej wykorzystuje wiedzę o stereochemii do projektowania enancjomerycznie czystych substancji czynnych, a kluczowym narzędziem w ich wytwarzaniu staje się biokataliza [124]. Dzięki enancjoselektywnym właściwościom enzymów możliwe jest prowadzenie reakcji chemicznych w sposób selektywny, efektywny energetycznie i przyjazny środowisku. Zatem biokataliza nie tylko umożliwia uzyskiwanie czystych enancjomerów, ale także wpisuje się w globalne trendy zrównoważonej produkcji chemicznej [125].

### 3.3.2. *Immobilizowane enzymy w syntezie związków chiralnych - przewaga nad klasycznymi katalizatorami*

Wspomniana w poprzednim podrozdziale chiralność ma zasadnicze znaczenie dla aktywności biologicznej wielu substancji, zwłaszcza farmaceutyków, środków agrochemicznych czy substancji zapachowych. Enancjomery tych samych związków

mogą wykazywać zupełnie odmienne działanie biologiczne, bowiem jeden może być aktywnym lekiem, drugi zaś toksyczny lub nieaktywny. Dlatego precyzyjna kontrola konfiguracji przestrzennej produktów reakcji jest jednym z głównych celów współczesnej chemii syntetycznej [126].

Tradycyjne metody syntezy chiralnej opierają się na klasycznych katalizatorach metalicznych (np. kompleksy rutenu, palladu, niklu, irydu) lub kwasowych (np. kwasy Lewisa, kompleksy  $\text{BF}_3$ ,  $\text{TiCl}_4$ ,  $\text{AlCl}_3$ ) [127]. Choć katalizatory te często cechują się wysoką aktywnością, ich użycie wiąże się z poważnymi ograniczeniami, w tym toksycznością, trudnością w separacji produktów, kosztownym odzyskiem metalu, ograniczoną selektywnością chiralną oraz generowaniem odpadów niebezpiecznych dla środowiska (Rysunek 7).

<b>TRADYCYJNE KWASOWE LUB METALICZNE KATALIZATORY</b>	<b>ENZYMY</b>
 Toksyczne i niebezpieczne katalizatory	 Biodegradowalne i bezpieczne katalizatory
 Konieczność stosowania złożonej i specjalistycznej aparatury	 Prosta aparatura
 Problemy z wydzieleniem katalizatora, jego regeneracją i zawrotem – WYSOKIE KOSZTY	 Łatwa separacja biokatalizatora i zawrót do kolejnego cyklu reakcyjnego
 Konieczność stosowania wysokich temperatur lub ciśnień	 Łagodne warunki procesowe
 Generowanie dużej ilości niebezpiecznych i łatwopalnych odpadów	 Wysoka czystość produktów – redukcja ilości generowanych odpadów
 Niskie bezpieczeństwo procesowe	 Bezpieczne warunki procesowe
 Nieprzyjazne dla środowiska	 Proces przyjazny dla środowiska

**Rysunek 7.** Porównanie właściwości tradycyjnych katalizatorów z biokatalizatorami.

Wspomnianą już wcześniej alternatywą dla klasycznych katalizatorów, o rosnącym znaczeniu, są enzymy immobilizowane, które łączą zalety biokatalizy (wysoka selektywność, łagodne warunki reakcji) z cechami typowymi dla katalizatorów heterogenicznych (możliwość wielokrotnego użycia, łatwa separacja od mieszaniny reakcyjnej) [128,129]. Jak przedstawiono w Tabeli 1 tradycyjne katalizatory metaliczne i kwasowe, mimo swojej wysokiej aktywności, mają szereg wad ograniczających ich praktyczne zastosowanie w syntezie związków biologicznie czynnych.

**Tabela 1.** Charakterystyka katalizatorów wykorzystywanych w przemyśle farmaceutycznym.

Parametr	Katalizator metaliczny	Katalizator kwasowy	Enzym natywny	Enzym immobilizowany
Typ katalizy	Chemiczna, często homogeniczna	Chemiczna, kwasowo-zasadowa	Biokataliza	Biokataliza (heterogeniczna)
Warunki reakcji	T>100°C, rozp. organiczne	Kwaśne pH, wysokie T	Łagodne, 25-40°C, pH neutralne)	Łagodne lub umiarkowane
Selektywność chiralna	Srednia (zależna od liganda)	Niska-umiarkowana	Bardzo wysoka	Bardzo wysoka
Aktywność katalityczna	Wysoka, ale ograniczona stabilnością	Wysoka	Umiarkowana (wrażliwość na warunki)	Utrzymana wysoka dzięki immobilizacji
Stabilność	Wrażliwe na powietrze, wilgoć	Degradacja katalizatora w dłuższym czasie	Ograniczona (denaturacja)	Wysoka stabilność strukturalna i termiczna
Możliwość ponownego użycia	Trudna, często niemożliwa	Ograniczona	Brak	Wysoka - do wielu cykli
Toksyczność i wpływ na środowisko	Wysoka (metale ciężkie, odpady toksyczne)	Umiarkowana (korozja, odpady kwasowe)	Niska	Bardzo niska, proces „zielony”
Separacja katalizatora od produktu	Trudna (konieczna filtracja i/lub ekstrakcji)	Często niemożliwa	Niemożliwa (rozpuszczony enzym)	Relatywnie łatwa
Koszty procesu	Wysokie (metal, oczyszczanie)	Umiarkowane	Umiarkowane-wysokie	Niższe przy długotrwałym użyciu
Bezpieczeństwo procesu	Ryzyko toksyczności i korozji	Ryzyko żrące i emisji toks. gazów	Bezpieczny	Bardzo bezpieczny
Zastosowanie w „zielonej chemii”	Ograniczone	Ograniczone	Wysokie	Bardzo wysokie
Przykłady zastosowań	Redukcja asymetryczna (Rh, Ru), hydrogenacja	Kataliza Friedela-Craftsa, acylacja	Racemizacja aminokwasów, hydroliza estrów	Enancjoselektywne redukcje, estryfikacje, transaminacje

W przeciwieństwie do procesów z użyciem metali ciężkich czy kwasów mineralnych, biokataliza nie wymaga stosowania agresywnych reagentów ani rozpuszczalników toksycznych. Reakcje prowadzone są w łagodnych warunkach

(temperatura pokojowa, neutralne pH), co minimalizuje ryzyko powstawania produktów ubocznych i redukuje ilość energii potrzebnej do procesu. Enzymy natywne (w postaci rozpuszczonej) charakteryzują się co prawda doskonałą selektywnością, lecz są wrażliwe na warunki reakcji i trudne do odzyskania. Dopiero enzymy immobilizowane łączą w sobie najlepsze cechy pozostałych grup katalizatorów - są aktywne, trwałe, selektywne, a przy tym bezpieczne i przyjazne dla środowiska [130]. Jednak to biokataliza enzymatyczna, zwłaszcza z wykorzystaniem enzymów immobilizowanych, stanowi jedno z najczystszych, najbezpieczniejszych i najbardziej zrównoważonych rozwiązań w procesach syntezy chemicznej. Dodatkowo enzymy immobilizowane mogą być wielokrotnie używane bez większej utraty aktywności, co znacznie zmniejsza koszty i wpływ procesu przemysłowego na środowisko. Wysoka enancjoselektywność i regioselektywność biokatalizatorów pozwala uzyskiwać produkty o czystości enancjomerycznej przekraczającej 99%, co ma kluczowe znaczenie dla farmacji i biotechnologii [131]. Biokataliza w ujęciu przemysłowym doskonale wpisuje się więc w ideę zielonej chemii, realizując jej główne założenia.

### 3.3.3. Wykorzystanie lipaz w syntezie substancji farmaceutycznie aktywnych

Jak wcześniej przybliżono, lipazy to enzymy hydrolizujące estry i triglicerydy, które wykazują dużą aktywność katalityczną - poza hydrolizą skutecznie katalizują też transestryfikację, estryfikację i acylotransfery. W skali przemysłowej enzymy takie jak lipaza typu B z *Candida antarctica* mogą być stosowane w syntezie chiralnych alkoholi lub amin. Jest to podyktowane przede wszystkim profilem farmakologicznym poszczególnych form związków terapeutycznych, ponieważ głównym celem jest osiągnięcie jak najkorzystniejszej biodostępności przy jednoczesnym ograniczeniu działań niepożądanych [132]. Enzymy, a zwłaszcza hydrolazy, mogą być z powodzeniem stosowane w syntezie API ze względu na swoje właściwości, ponieważ stereo-, regio- i chemoselektywność biokatalizatorów odgrywa kluczową rolę w tego typu syntezie.

W przemyśle chemicznym czy farmaceutycznym, ze względu na swoje właściwości i preferencje katalityczne, najlepiej znany jest komercyjny biokatalizator Novozym 435 (oznaczany też N435, wyprodukowany przez firmę Novozymes) - zbudowany z immobilizowanej lipazy B z *Candida antarctica* (CALB) zaadsorbowanej na makroporowatym nośniku żywicznym (Lewatit VP OC 1600) [133]. Katalizator ten

jest szeroko stosowany zarówno w badaniach akademickich, jak i w aplikacjach przemysłowych z uwagi na wysoką aktywność, szeroką tolerancję rozpuszczalników organicznych, znaczną dostępność oraz możliwość recyklingu enzymu. Jednym z najczęściej opisywanych zastosowań immobilizowanych lipaz w literaturze są kinetyczne rozdziały (KR) oraz dynamiczne kinetyczne rozdziały (DKR) racemicznych substratów - takich jak alkohole, aminy lub estry, które stanowią kluczowe wyjściowe związki (ang. *key starting materials*, KSM) lub same mieszaniny racemiczne API [134]. Przykładowo, Foresti i in. wykorzystali Novozym 435 oraz Lipozyme RM IM (lipaza *Rhizomucor miehei* immobilizowana na makroporowatej żywicy jonowymiennej) do syntezy S-ibuprofenu, uzyskując odpowiednio 54% i 63% nadmiaru enancjomerycznego [135]. Z kolei Wang i in. zastosowali Novozym 435 do syntezy (S)-citalopramu - selektywnego inhibitora wychwytu zwrotnego serotoniny, osiągając 91% nadmiaru enancjomerycznego i 98% wydajności reakcji [136].

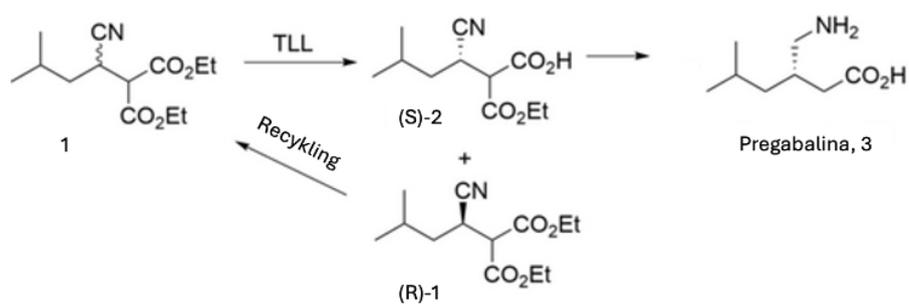
Istotnym aspektem wartym podkreślenia jest zwiększenie w ostatnich latach ilości doniesień naukowych poruszających procesy ciągłe w syntezie API, z wykorzystaniem immobilizowanych enzymów, co stanowi znaczny krok w stronę silnego rozwoju przemysłu farmaceutycznego (Tabela 2). Wykorzystanie immobilizowanych lipaz w syntezie API jest nie tylko możliwe, lecz coraz bardziej praktykowane szczególnie w reakcjach wymagających wysokiej selektywności lub modyfikacji struktury leku. W wielu przypadkach immobilizacja stanowi ważny krok umożliwiający wdrożenie enzymatycznych procesów w skali operacyjnej zapewniając stabilność, ponowne użycie katalizatora i możliwość pracy w heterogenicznym układzie.

**Tabela 2.** Zastosowanie immobilizowanych lipaz w syntezie asymetrycznej związków farmaceutycznych.

Lp.	Biokatalizator (enzym + nośnik)	Ilość biokatalizatora	Układ reakcyjny	Typ racemicznego substratu	Asymetryczny produkt	Czas reakcji	Konwersja / wydajność [%]	ee [%]	Ref.
1	Novozym 435 - lipaza B z <i>Candida antarctica</i> immobilizowana na polimetakrylanie (PMMA)	160 mg	1 mL EtOH (reagent i rozpuszczalnik) + 4,8% v/v H <sub>2</sub> O, 0,5 g ibuprofenu	Racemiczny ibuprofen	Ester etylowy (R)-ibuprofenu, a w mieszaninie pozostaje (S)-ibuprofen	72 h w 45°C, 200 obr./min	62-63% konwersji ibuprofenu do etylowego estru	54% ee (S)-ibuprofenu,	[135]
2	Lipazy wolne ze szczepów <i>Candida rugosa</i> , <i>Mucor javanicus</i> , lipaza trzustkowa oraz immobilizowana lipaza B z <i>Candida antarctica</i> (Novozym 435)	20%, 40% i 60% masy w stosunku do całkowitej masy odczynników	Stosunek w/w substratu do alkoholu i cykloheksanu jako rozp. 1:1, 5mmol ketoprofenu	Racemiczny ketoprofen	(S)-alkilowy ester ketoprofenu (ee 99%), następnie (S)-ketoprofen po hydrolizie	60 h; 250 obr./min	Ester: 47%; końcowy (S)-ketoprofen: 98,5% konwersji	99% ee (ester i kwas)	[142]
3	Lipaza <i>Candida rugosa</i> w formie CLEAs i magnetycznych CLEAs (M-CLEAs)	20 mg/mL	Izooktan z rozpuszczonym racemicznym EMN (10 mg/mL)	Racemiczny ester metylowy naproksenu	(S)-naproksen	Do 28-36 h (CLEAs vs M-CLEAs) 37 °C, pH 7.5, 300 obr./min	100%	100% dla CLEAs	[143]
4	Lipaza <i>Candida rugosa</i> immobilizowana na Amberlite XAD 7	320-800 U/mL	Dwufazowy układ 5 mL woda, 10 mL izooktan, 10 mg/mL racematu	Racemiczny ester metylowy naproksenu	(S)-naproksen	45°C, pH 6, 180 h	49%	Brak; E= 174.2 (enantiomeric ratio)	[144]
5	Lipaza B z <i>Candida antarctica</i> (CALB) immobilizowana na makroporowatej żywicy		1. MeCN (40 ml), chlorohydryna (0,56 g), butanonian winylu (1,43 g), CALB (0,71 g). 2. 0,9 g (R)-2-(4-(3-chloro-2-hydroxypropoxy)phenyl)acetamidu, i-PrNH <sub>2</sub> (3 mL), H <sub>2</sub> O (1 mL)	Racemiczna chlorohydryna na 4-(3-chloro-2-hydroksypropoksy)benzeneacetamidu (prekursor atenololu)	1. (R)-chlorohydryna (99% ee), dalej przekształcona do 2. (S)-atenololu	30°C, 200 obr./min	9,9% (S)-atenololu	>99% ee (produkt końcowy (S)-atenolol)	[145]

Lp.	Biokatalizator (enzym + nośnik)	Ilość biokatalizatora	Układ reakcyjny	Typ racemicznego substratu	Asymetryczny produkt	Czas reakcji	Konwersja / wydajność [%]	ee [%]	Ref.
6	Lipaza z <i>Burkholderia cepacia</i> immobilizowana kowalencyjnie na funkcjonalizowanych nanowłóknach węglowych	b.d.	Alkohol racemiczny (20 mM), octan winylu (100 $\mu$ L) w toluenie (900 $\mu$ L)	Racemiczny 1-chloro-3-(4-(2-methoxyethyl)phenoxy)propan-2-ol - kluczowy prekursor atenololu	(S)-1-chloro-3-(4-(2-methoxyethyl)phenoxy)propan-2-ol	30°C, 200 obr./min, 24 h	Konwersja 47,8%	ee <sub>p</sub> = 97,0% dla produktu	[146]
7	Lipazy <i>Candida rugosa</i> (OF i MY) immobilizowane kowalencyjnie na magnetycznych nanocząstkach Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -chitosan-Et(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> / Et(NH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	50 mg biokatalizatora na reakcję	10 mL mieszaniny: toluen + racemiczny atenolol (3,0 mg, 0,01 mmol) + izopropenylowy ester	Racemiczny atenolol	Octan (S)-atenololu (produkt), pozostający (R)-atenolol (substrat)	Do 240 h	Dla najlepszego układu (CRL OF/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CS-Et(NH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> ): konwersja 42,96%	ee <sub>p</sub> = 93,22%, ee <sub>s</sub> = 70,21%, E $\approx$ 60	[147]
8	Lipaza B z <i>Candida antarctica</i> (CALB) immobilizowana na nośniku Eupergit C	b.d.	Propranolol (0,1-0,08 mmol) i 0,3 mmol octanu winylu rozpuszczono w 3 ml toluenu	Racemiczny propranolol (1-isopropylamino-3-(1-naftoksy)-2-propanol)	Estry propranololu o wzbogaconym jednym enancjomerze (prekursor enancjomerycznie czystego propranololu)	25°C, 200 obr./min, 3h	58%	E=57; ee <sub>s</sub> = 96%	[148]
9	Novozym 435 - lipaza B z <i>Candida antarctica</i> immobilizowana na polimetakrylanie (PMMA)	1000 do 2000 U	Racemiczny metoprolol (7,52 do 18,80 mM), octan winylu (3,03 do 67 mM)	Racemiczny metoprolol	Octan (S)-metoprololu	40°C, 18 h	52%	ee <sub>s</sub> =62% oraz ee <sub>p</sub> =59%	[149]
10	Lipaza z <i>Pseudomonas cepacia</i> (Amberlite XAD 7)	40 mmol/L	0,2 g unieruchomionej lipazy i różne stężenia estru (R,S)-ibuprofenu (zakres od 20 do 50 mM)	Racemiczny ester ibuprofenu	(S)-ibuprofen	45°C, 200 obr./min, 120 h	DKR: 86% konwersji; zwykła KR: 42%	DKR: 99,4% ee (produkt S-ibuprofen); KR: 93% ee	[150]

W celu przybliżenia opisywanych zagadnień, poniżej przedstawiono kilka przykładów związanych z zastosowaniem enzymów w syntezie API. Zespół Pfizera opracował drugiej generacji proces syntezy pregabaliny, oparty na rozdziale katalizowanym lipazą [137]. Wykorzystano komercyjną lipazę *Thermomyces lanuginosus* Lipolase (TLL), która wykazała bardzo wysoką enancjoselektywność w kierunku enancjomeru (S)- podczas hydrolizy diestru (1) (Rysunek 8).

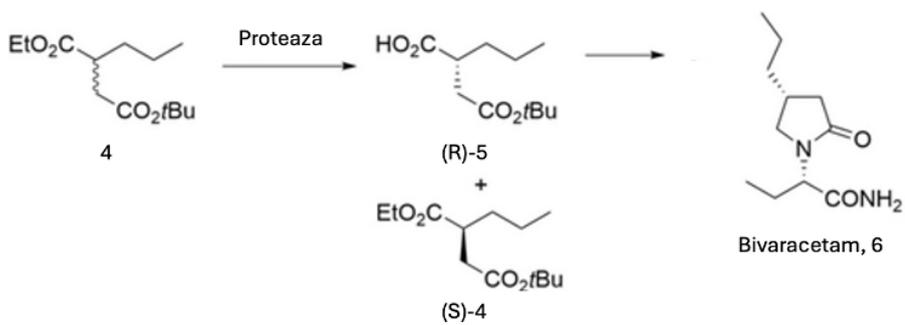


**Rysunek 8.** Schemat przedstawiający rozdział kinetyczny katalizowany lipazą TLL, w celu syntezy kwasu (S)-2-karboksyetylo-3-cyjano-5-metyloheksanowego (2) wykorzystywanego w produkcji pregabaliny (3), na podstawie [137].

Pomimo, iż przedstawiany układ biokatalityczny charakteryzował się zastosowaniem wolnej lipazy, w zoptymalizowanych warunkach związek (1) został zhydrolizowany przez TLL, dając (S)-2 z wydajnością 47,5% w ciągu 24 godzin przy czystości 99,5% i 99,75% ee. Proces został następnie skalowany do produkcji próbnej na poziomie 3,5 tony w reaktorze o pojemności 8000 L, otrzymując obiecujące rezultaty, wskazujące na wysoką możliwość implementacji w przyszłości. Natomiast, w ostatnich latach zespół Zheng i współpracowników przeprowadził modyfikację genetyczną, uzyskując enzym TLL(S58L/S83T), który charakteryzuje się 5,5-krotnie wyższą aktywnością właściwą niż typ dziki enzymu. Zastosowanie całych komórek *E. coli* (5% w/v) umożliwiających ekspresję modyfikowanego enzymu pozwoliło na hydrolizę związku 1 do (S)-2 o czystości enancjomerycznej wynoszącej 96% ee i konwersji na poziomie 45% po 24 godzinach [138].

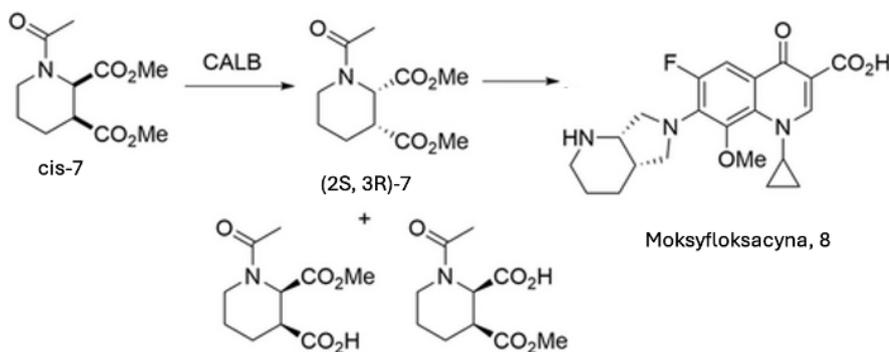
Pomimo, iż prezentowany rozdział dotyczy wyłącznie lipaz, warto krótko wspomnieć o proteazie, a więc enzymie również z rodziny hydrolaz. Zespół USB Pharma opracował proces biokatalityczny z wykorzystaniem proteazy do syntezy pochodnej kwasu (R)-bursztynowego ((R)-5), będącej kluczowym półproduktem w wytwarzaniu

Brivaracetamu (Rysunek 9). Zastosowano proteazę C pochodzącą z *Bacillus subtilis* do enancjoselektywnej hydrolizy racemicznego estru (4). Reakcję prowadzono z użyciem 1 kg substratu 78 oraz 10% (w/w) enzymu w 4,5 L wody, uzyskując po 19 godzinach (R)-5 o czystości enancjomerycznej 97% i z wydajnością 42% [139].



**Rysunek 9.** Proces kinetycznego rozdziału katalizowany hydrolazą w celu syntezy pochodnej kwasu (R)-bursztynowego (5) potrzebnej do produkcji Brivaracetamu (6), na podstawie [138].

W innych badaniach, lipazę B z *Candida antarctica* (CALB), wykorzystano do rozdzielania cis-dimetylo-1-acetylopiperidyno-2,3-dikarboksylanu (cis-7) w procesie syntezy moksyflokscyny (8) (Rysunek 10). Zastosowana lipaza charakteryzowała się bardzo wysoką aktywnością i zachowała doskonałą enancjoselektywność w hydrolizie cis-7. W warunkach reakcyjnych, przy użyciu 0,1 g/L enzymu, hydroliza 1 M cis-7 (243 g/L) przebiegała z konwersją 49,9% w ciągu 5 godzin [140].



**Rysunek 10.** Proces kinetycznego rozdziału oparty na lipazie w syntezie (2S, 3R)-dimetylo-1-acetylopiperidyno-2,3-dikarboksylanu (81) w celu produkcji moksyflokscyny (82), na podstawie [140].

Szczególnie istotnym etapem opracowanego procesu było unieruchomienie lipazy na żywicy aminowej aktywowanej aldehydem glutarowym i jej wykorzystanie w systemach reaktorowych. W reaktorze zbiornikowym z mieszadłem enzym zachował aktywność przez 50 cykli, osiągając średnią wydajność przestrzenno-czasową (STY, ang. *space-time yield*) 50 g/L·h. Podobną stabilność i efektywność odnotowano również w reaktorze przepływowym z obiegiem zamkniętym, co potwierdza wysoki potencjał tego rozwiązania dla zastosowań przemysłowych [141].

Przedstawione zagadnienia znacząco podkreślają kluczową rolę lipaz jako wszechstronnych biokatalizatorów zdolnych do prowadzenia różnorodnych reakcji, takich jak hydroliza, transestryfikacja, czy estryfikacja. W kontekście syntezy związków chiralnych, szczególnie istotnych w farmakologii, enzymatyczne metody oparte na lipazach umożliwiają otrzymywanie produktów o wysokiej stereo- i chemoselektywności, co stanowi istotną przewagę nad wieloma klasycznymi metodami chemicznymi. Szczególnie ważnym elementem nowoczesnych procesów biokatalitycznych jest immobilizacja enzymów. Immobilizowane lipazy wyróżniają się nie tylko wysoką aktywnością, ale przede wszystkim doskonałą stabilnością operacyjną, możliwością wielokrotnego użycia oraz kompatybilnością z szeroką gamą rozpuszczalników. Te cechy sprawiają, że są one wyjątkowo efektywne i niezawodne w procesach przemysłowych, umożliwiając prowadzenie reakcji w układach heterogenicznych oraz znacznie ułatwiając wdrażanie technologii ciągłych.

Zastosowanie immobilizowanych lipaz w syntezie API, w tym w kinetycznych i dynamicznych kinetycznych rozdzielach racemicznych substratów, stanowi obecnie jedno z najbardziej obiecujących narzędzi współczesnej chemii farmaceutycznej. Coraz liczniejsze doniesienia naukowe oraz udane implementacje przemysłowe jednoznacznie wskazują, że immobilizacja jest kluczowym czynnikiem umożliwiającym efektywne, skalowalne i zrównoważone wykorzystanie biokatalizy w produkcji nowoczesnych leków.

#### **4. Motywacja i hipotezy badawcze oraz cel pracy**

W przemyśle chemicznym, ze względu na stale rosnący nacisk na realizację procesów w sposób zrównoważony, stale poszukuje się nowych rozwiązań umożliwiających otrzymywanie produktów w sposób bardziej ekologiczny i przyjazny dla środowiska. Na chwilę obecną w przemyśle farmaceutycznym na dużą skalę wciąż wykorzystywane są klasyczne kwasowe i metaliczne katalizatory, a sam proces technologiczny często ma wiele punktów newralgicznych i generuje sporo toksycznych produktów ubocznych, a reakcje te prowadzone są zazwyczaj w wysokich temperaturach. Natomiast stosowane dotąd katalizatory, choć umożliwiają zajście reakcji, to nie warunkują dostatecznej enancjoselektywności, która w przemyśle farmaceutycznym jest tak bardzo poszukiwana. Często również odzysk katalizatora, jego oczyszczanie i zwracanie do mieszaniny reakcyjnej wiążą się z wieloma dodatkowymi operacjami jednostkowymi na linii przemysłowej, wpływając negatywnie na wydajność samego procesu oraz jego bezpieczeństwo i ekologię ze względu na konieczność stosowania silnych rozpuszczalników. Jednym z rozwiązań może być zastosowanie enzymów jako katalizatorów w reakcjach syntezy/konwersji substancji farmaceutycznie aktywnych, których czystość enancjomeryczna jest kluczowa. Dodatkowo, w celu podniesienia stabilności i możliwości ponownego wykorzystania, enzymy mogą zostać poddane procesowi immobilizacji, warunkując wyższą czystość i konwersję substratu.

Współcześnie enzymy znajdują coraz szersze zastosowanie w procesach biotechnologicznych i chemicznych, co potwierdza zarówno literatura przedmiotu, jak i informacje zawarte w części teoretycznej niniejszej pracy. Mimo postępu w ich wykorzystaniu, technologie oparte na biokatalizatorach wciąż napotykać istotne ograniczenia, które utrudniają ich pełne wdrożenie na skalę przemysłową. Jednym z kluczowych problemów pozostaje stosunkowo niewielka liczba enzymów dostępnych w formie immobilizowanej, choć właśnie immobilizacja stanowi podstawę stabilnych układów biokatalitycznych. Wiele enzymów nadal nie posiada zoptymalizowanych metod unieruchamiania, a te istniejące nie zawsze gwarantują odpowiednią aktywność, odporność na warunki procesowe czy możliwość integracji z nowoczesnymi platformami przepływowymi. Istotną luką badawczą jest również ograniczona liczba szczegółowych danych dotyczących reaktorów, w których stosuje się immobilizowane enzymy,

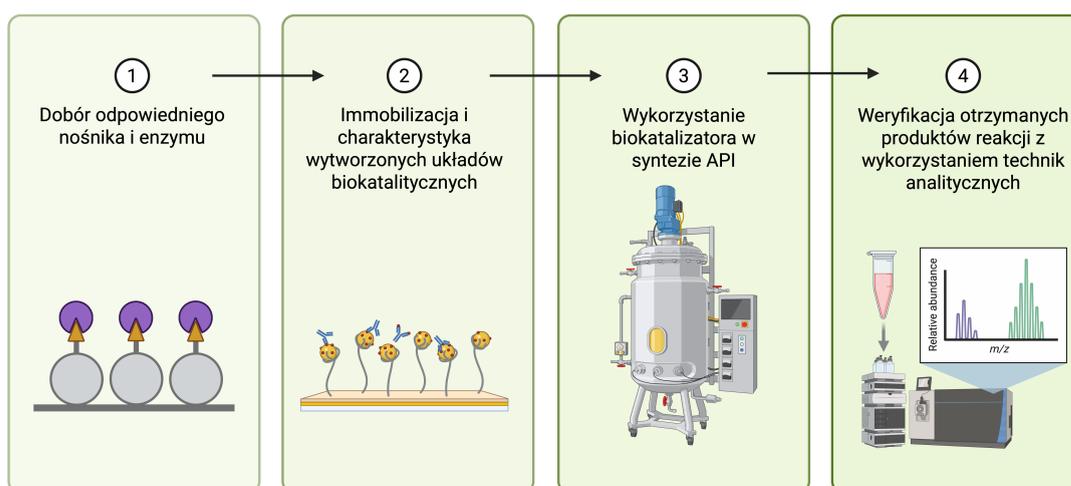
zwłaszcza tych pracujących w trybie przepływowym czy wsadowym. Chociaż reaktory przepływowe stanowią jedną z najbardziej obiecujących technologii umożliwiających przeniesienie biokatalizy na wyższy poziom wydajności, ich praktyczne wykorzystanie wciąż jest rzadkie, a charakterystyka procesowa słabo udokumentowana. Brakuje systematycznych badań opisujących zachowanie enzymów immobilizowanych w warunkach przepływu, definiujących stabilność układów w dłuższym okresie, a także brak dostatecznych danych nt. parametrów pozwalających na skalowalne, ekonomicznie i uzasadnione projektowanie takich instalacji. W konsekwencji rozwój biokatalizy nadal pozostawia szerokie pole do doskonalenia istniejących rozwiązań. Dotyczy to zarówno uproszczenia konstrukcji reaktorów i zwiększenia ich kompatybilności z różnymi typami systemów biokatalitycznych, jak i opracowania bardziej przyjaznych użytkownikowi, mniej złożonych systemów reakcyjnych.

Biorąc pod uwagę obecne ograniczenia i na podstawie dostępnej wiedzy oraz aktualnych doniesień literaturowych sformułowano główne założenia pracy doktorskiej, które opierały się na hipotezach badawczych, że immobilizowane enzymy posiadają zdolność syntezy/konwersji substancji farmaceutycznie aktywnych, oraz że odpowiednia kontrola warunków procesu i środowiska reakcji wpływa na wydajność konwersji i czystość uzyskanych produktów. Najważniejszymi problemami badawczymi było zatem wytworzenie aktywnych układów immobilizowanych enzymów oraz opracowanie założeń dotyczących zastosowania proponowanych układów w syntezie aktywnych związków farmaceutycznych prowadzonej w reaktorach, a także dobór korzystnych warunków procesu zapewniających uzyskanie pożądaných produktów z oczekiwaną wydajnością i czystością.

W celu rozwiązania postawionych problemów badawczych oraz aby zweryfikować słuszność postawionych hipotez zdefiniowano główne cele pracy doktorskiej traktujące o syntezie nowych układów biokatalitycznych opartych o immobilizowane enzymy, zaawansowanej charakterystyce tych systemów, a następnie zdefiniowaniu najkorzystniejszych warunków immobilizacji w celu uzyskania układów o najwyższej aktywności katalitycznej. Ostatecznym celem badań była implementacja otrzymanych układów biokatalitycznych w syntezie API w zmiennych warunkach procesowych, aby zwiększyć wydajność procesu i czystość enancjomeryczną końcowych związków. Realizacja założonych celów powinna ostatecznie pozwolić na

zapropowanie alternatywnych dróg syntezy wybranych API lub ich produktów pośrednich.

Podczas badań duży nacisk położono na rozwój innowacyjnych biokatalizatorów opartych o immobilizowane enzymy, a szczegółowy koncept prac zaprezentowano na Rys. 11. Przeprowadzano syntezę innowacyjnych nośników o zdefiniowanych właściwościach odpowiednio dostosowanych do potrzeb enzymu oraz przyszłego procesu syntezy substancji farmaceutycznie aktywnej. Nośniki dobierane były pod kątem maksymalnego zwiększenia aktywności i stabilności enzymu w konkretnych warunkach procesowych dodatkowo zapewniając efekt ochronny i stabilizujący dla biokatalizatora. Podczas produkcji układów biokatalitycznych zwrócono szczególną uwagę na odpowiedni dobór oraz optymalizację warunków immobilizacji, a także weryfikację efektywności przeprowadzanych działań. Kolejnym istotnym punktem było zastosowanie immobilizowanych układów w procesach asymetrycznej syntezy substancji farmaceutycznie aktywnych i/lub ich związków pośrednich wykorzystywanych do syntezy produktu końcowego. Skuteczność przeprowadzanych procesów określana była na podstawie stopnia konwersji substratu oraz czystości otrzymywanych produktów (nadmiar enancjomeryczny ee, ang. *enantiomeric excess*).



**Rysunek 11.** Poszczególne etapy realizacji założeń pracy doktorskiej.

## 5. Opis i dyskusja osiągnięć badawczych

Odnosząc się do hipotezy badawczej, że właściwie zaprojektowane immobilizowane enzymy posiadają zdolności katalizowania reakcji syntezy substancji farmaceutycznie aktywnych, przeprowadzono prace, których rezultaty zaprezentowano w **Publikacjach 1-5**, które stanowią spójną tematycznie podstawę niniejszej dysertacji i skupione są na zaprojektowaniu biokatalizatora, jego syntezie i charakterystyce oraz zastosowaniu w syntezie API.

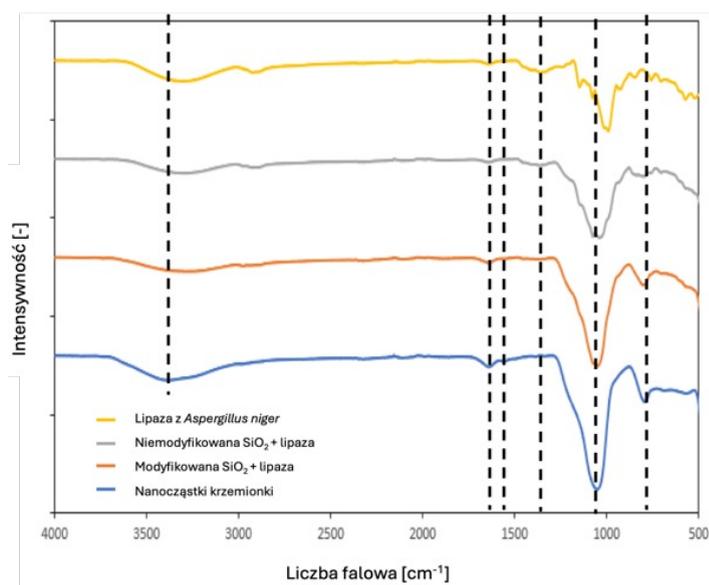
Rozwój immobilizowanych biokatalizatorów w ramach serii badanych systemów (**Publikacje 1-5**) koncentrował się na projektowaniu układów enzym-nośnik pod kątem uzyskania jak najwyższej aktywności katalitycznej, jak i stabilności operacyjnej w syntezie i rozdzielaniu chiralnych półproduktów farmaceutycznych. Publikacje należy traktować holistycznie, natomiast na potrzebę przedstawionej dysertacji podzielono otrzymane wyniki według trzech etapów: rozwoju i charakterystyki strukturalno-morfologicznej systemów biokatalitycznych, ocena ich aktywności oraz zastosowanie w syntezie substancji farmaceutycznie aktywnych.

### 5.1. Rozwój i charakterystyka strukturalno-morfologiczna systemów biokatalitycznych

W pierwszym etapie badań, opisanym w **Publikacji 1**, lipaza z *Aspergillus niger* została zimmobilizowana na nanocząstkach krzemionki poprzez adsorpcję fizyczną i częściową aktywację międzyfazową (na niezmodyfikowanej krzemionce) oraz przez aktywację międzyfazową i wymianę jonową (na krzemionce modyfikowanej (3-aminopropyl)trietoksyloksysilanem (APTES)), w celu porównania efektywności immobilizacji oraz aktywności układów otrzymanych różnymi metodami. W celu scharakteryzowania biokatalizatorów wykonano szereg analiz takich jak rozkład wielkości cząstek (w celu porównania jednorodności układów), spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) (otrzymane widma umożliwiły weryfikację pomyślniej immobilizacji), czy też spektroskopia UV-Vis w celu oceny aktywności biokatalizatora.

Analiza widm FTIR (Rys. 12) wykazała obecność charakterystycznych pasm pochodzących od drgań grup funkcyjnych zarówno w krzemionce (SiO<sub>2</sub>), jak i w lipazie,

co umożliwiło identyfikację grup uczestniczących w procesie immobilizacji enzymu. W widmie krzemionki przy wartościach liczby falowej 900-500  $\text{cm}^{-1}$  zaobserwowano sygnały typowe dla wiązań Si-O oraz potwierdzających obecność grup hydroksylowych ( $3400 \text{ cm}^{-1}$ ), które odpowiadają za wiązanie enzymu z powierzchnią nośnika. Widmo wolnej lipazy wskazuje na obecność licznych grup funkcyjnych, w tym amidowych, przy wartościach liczby falowej  $1250 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1545 \text{ cm}^{-1}$  i  $1650 \text{ cm}^{-1}$  charakterystycznych wartości drgań rozciągających pasm amidowych I, II i III rzędu, zdolnych do tworzenia wiązań z nośnikiem. Widma krzemionki z unieruchomioną lipazą wykazały obecność pasm charakterystycznych zarówno dla krzemionki, jak i enzymu, co potwierdza skuteczną immobilizację. Niewielkie przesunięcia pasm amidowych w kierunku niższych wartości (ok.  $10 \text{ cm}^{-1}$ ) wskazują na efektywne powstanie oddziaływań pomiędzy krzemionką a lipazą, które oparte są głównie o oddziaływania adsorpcyjne.



**Rysunek 12.** Widma FTIR nanokrzemionki (niebieska linia), lipazy z *Aspergillus niger* (żółta linia) poprzez adsorpcję fizyczną (szara linia) i aktywację międzyfazową (pomarańczowa linia).

W celu dodatkowego potwierdzenia unieruchomienia enzymu oraz scharakteryzowania wielkości otrzymanych cząstek biokatalizatorów lub potencjalnego tworzenia aglomeratów wykonano także analizę rozkładu wielkości cząstek, która pozwala śledzić zmiany właściwości nośnika po immobilizacji lipazy (Tabela 3). Czysta

krzemionka wykazuje rozmiary typowe dla nanomateriałów (59-220 nm) i niski PDI, natomiast po fizycznej immobilizacji cząstki powiększają się do 91-1106 nm. W przypadku immobilizacji mieszanej, obejmującej aktywację międzyfazową i wymianę jonową, obserwuje się jeszcze większe aglomeraty o rozmiarach 1484-6439 nm. Znaczny wzrost wielkości cząstek potwierdza skuteczną immobilizację oraz wpływ modyfikatora powierzchniowego na formowanie biokatalizatora.

**Tabela 3.** Wielkość cząstek czystej krzemionki i biokatalizatora z lipazą unieruchomioną przez adsorpcję oraz aktywację międzyfazową na nanocząstkach krzemionki. Przedstawione wyniki zaprezentowano jako wartość średnią, dla której odchylenie standardowe (wartość błęd) nie przekracza 5%.

Próbka	PdI	Zakres wielkości
Nanocząstki krzemionki	0,225	59-220 nm
Immobilizowana lipaza (niemodyfikowana)	0,805	91-1106 nm
Immobilizowana lipaza (modyfikowana)	0,935	1484-6439 nm

Testy wymywania enzymu dodatkowo potwierdziły, że rodzaj oddziaływań między enzymem a nośnikiem zależy od sposobu immobilizacji i modyfikacji powierzchni. Najmniejsze ubytki aktywności enzymu zaobserwowano po zastosowaniu Triton X-100 jako eluentu, natomiast największe po użyciu roztworu NaCl, co sugeruje znaczny udział wymiany jonowej w procesie desorpcji i zdecydowaną przewagą oddziaływań adsorpcyjnych jako sił wiążących lipazę z nośnikiem. Modyfikacja powierzchni krzemionki (np. poprzez wprowadzenie grup aminowych) zwiększyła stabilność układu enzym-nośnik, umożliwiając silniejsze związanie enzymu zarówno przez oddziaływania adsorpcyjne, jak i aktywację międzyfazową.

Można więc podsumować, że modyfikacja chemiczna powierzchni krzemionki znacząco poprawia stabilność immobilizowanej lipazy, umożliwiając tworzenie trwalszych i bardziej efektywnych oddziaływań enzym-nośnik, co przekłada się na wyższą aktywność i odporność biokatalizatora.

W przypadku **Publikacji 2**, do unieruchomienia lipazy pozyskanej z *Pseudomonas fluorescens* zastosowano nośnik na bazie nanometrycznej krzemionki. Powierzchnię krzemionki zmodyfikowano za pomocą organosilanów: (3-(aminopropylo)trietoksy-silanu, trietoksy(oktylo)silanu, winylotrimetoksy-silanu i 3-(merkaptopropylo)trimetoksy-silanu w celu wprowadzenia reaktywnych grup

funkcyjnych promujących wytworzenie wiązania kowalencyjnego w celu silniejszego związania enzymu z nośnikiem.

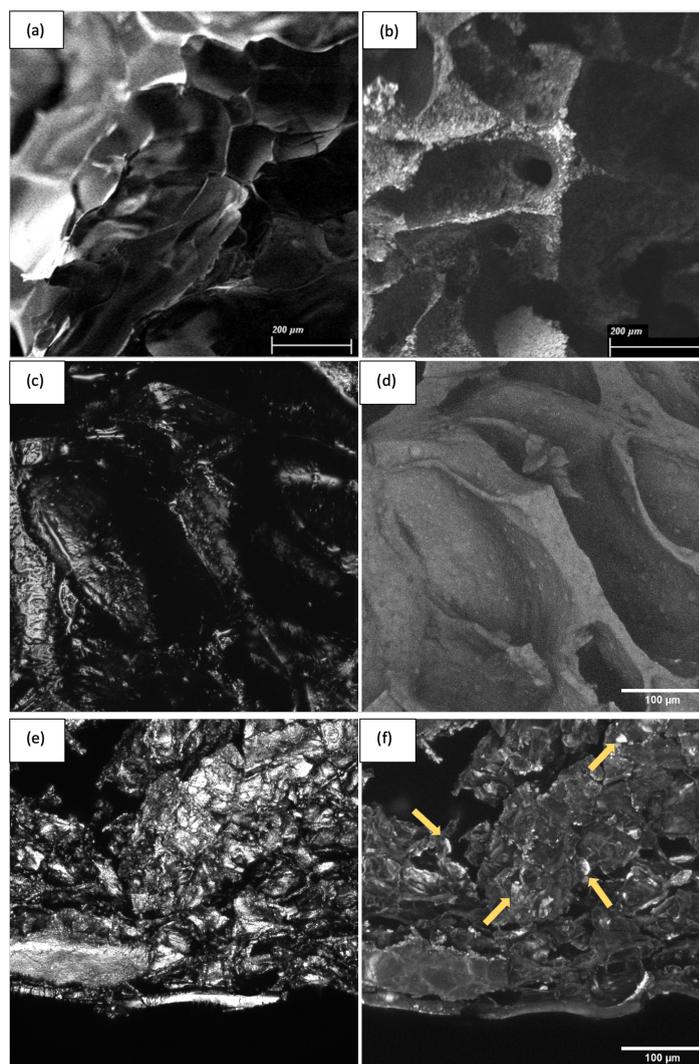
W celu zdefiniowania najwłaściwszego modyfikatora nośnika, głównym badanym parametrem była zachowana aktywność katalityczna (Tabela 4). Najwyższą aktywność immobilizowanej lipazy uzyskano dla nośnika modyfikowanego APTES, gdzie uzyskano aktywność na poziomie 93% względem wolnej lipazy. Wynik ten może być związany z obecnością na powierzchni modyfikowanej krzemionki grup aminowych (-NH<sub>2</sub>), które są najbardziej kompatybilne z grupami powierzchniowymi enzymu, tworząc stabilne wiązania chemiczne między nośnikiem a lipazą. W przypadku pozostałych modyfikowanych materiałów aktywność katalityczna była niższa i wynosiła około 90%.

**Tabela 4.** Odzyskiwanie aktywności katalitycznej lipazy unieruchomionej na modyfikowanych nanocząstkach krzemionki. Przedstawione wyniki zaprezentowano jako wartość średnią, dla której odchylenie standardowe (wartość błędu) nie przekracza 5%.

Modyfikator	Aktywność katalityczna [%]	Ilość unieruchomionego enzymu [mg/g]
(3-aminopropylo)trietoksysilan	93%	105
(3-merkaptopropylo)trimetoksysilan	91%	98
trietoksy(octylo)silan	88%	94
vinylotrimetoksysilan	89%	97

W **Publikacji 3** zastosowano alternatywne podejście do immobilizacji. W badaniach tych lipaza z *Candida rugosa* została uwięziona w polimerycznych hydrożelach modyfikowanych dodatkowo cieczami jonowymi (ILs) w celu zwiększenia wydajności immobilizacji i stabilności osadzonych enzymów. Hydrożele zsyntetyzowano przy użyciu akrylamidu (AM) i czynników sieciujących, takich jak N,N'-metylenobisakrylamid (MBAm), z nadsiarczanem amonu jako inicjatorem. Ciecze jonowe ([BMIM]Cl i [BMIM]PF<sub>6</sub>) dodano w różnych proporcjach w celu kontrolowania porowatości i hydrofilowości hydrożelowych nośników. Powstałe hydrożele charakteryzowały się porowatą strukturą trójwymiarową, co potwierdzono zdjęciami SEM (skaningowy mikroskop elektronowy, ang. *scanning electron microscope*) i CLSM (konfokalna laserowa mikroskopia skaningowa, ang. *confocal laser scanning microscopy*) (Rysunek 13). Co więcej, na zdjęciach CLSM materiału hydrożelowego po

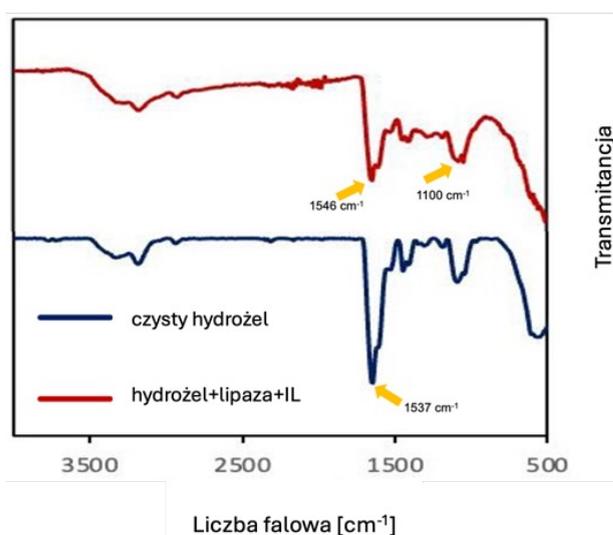
immobilizacji, wyraźnie widoczne są cząstki enzymu (białe inkluzje), a najistotniejszym aspektem jest ich równomierne rozłożenie na materiale, świadczące o pożądanym rozproszeniu enzymu w matrycy.



**Rysunek 13.** Zdjęcia SEM: (a) czystego materiału hydrożelowego, (b) hydrożelu z osadzonymi enzymami. Fotografie CLSM (c) czystego materiału hydrożelowego oraz (d) hydrożelu z osadzonymi enzymami w trybie odbicia (po lewej) i fluorescencji (po prawej). Żółte strzałki wskazują osadzone enzymy. Na wszystkich zdjęciach przedstawiono hydrożele PAM (poli(akrylamid) o stosunku AM do MBAm wynoszącym 9:1 (15% wag.).

Analiza FTIR (Rysunek 14) wykazała obecność na widmie hydrożelu z unieruchomioną lipazą, oprócz pasm charakterystycznych dla hydrożelu

poliakrylamidowego, intensywne pasmo absorpcji przy około  $1100\text{ cm}^{-1}$ , będące następstwem drgań rozciągających mostka C–O–C, charakterystycznego dla struktury lipazy. Dodatkowo, efektywność unieruchomienia potwierdzają pasma pochodzące od drgań deformacyjnych z maksimum przy  $844\text{ cm}^{-1}$ ,  $752\text{ cm}^{-1}$  i  $619\text{ cm}^{-1}$ , charakterystyczne dla białek bogatych w wiązania amidowe, które nie były widoczne w widmie czystego hydrożelu [152].



**Rysunek 14.** Widma FTIR czystego hydrożelu i hydrożelu z unieruchomioną lipazą z dodatkiem [BMIM]PF<sub>6</sub> IL.

Wyniki badań wskazały, że najbardziej aktywnym i stabilnym systemem okazał się być układ zawierający 5% wag. [BMIM]PF<sub>6</sub>, który osiągnął 62-proc. aktywność katalityczną po 8 godzinach immobilizacji, co wskazuje na wyraźną korelację między stężeniem IL a integralnością strukturalną matrycy hydrożelowej. Dodatek tej IL wzmocnił także hydrofobowe mikrośrodowisko wokół enzymu dodatkowo stabilizując strukturę trzeciorzędową lipazy zapobiegając denaturacji podczas powtarzających się po sobie cykli katalitycznych.

Obiecujące wyniki prac związanych z zastosowaniem hydrożeli spowodowały, że w **Publikacji 4** skupiono się na hybrydowych hydrożelach poli(ciecz jonowa) - poli(akrylamid) (PIL-PAM) jako matrycy do pułapkowania lipazy z *Pseudomonas fluorescens*. Spektroskopia węglowego magnetycznego rezonansu jądrowego (<sup>13</sup>C NMR) potwierdziła polimeryzację poprzez zanik charakterystycznych sygnałów grup

winylowych ( $\delta = 5,5-6,5$  ppm). W przypadku PIL stopień polimeryzacji wzrasta z 44,1% w temperaturze 30°C do 63,5% w temperaturze 70°C, a w przypadku PAM z 60,1% do 90,9% w tym samym zakresie temperatur (Tabela 5). Te tendencje sugerują, że wyższe temperatury sprzyjają polimeryzacji obu materiałów, przy czym PAM wykazuje wyraźniejszy wzrost. Analiza procesu polimeryzacji wykazała, że najkorzystniejszą strukturę przestrzenną uzyskano poprzez ogrzewanie mieszaniny reakcyjnej w temperaturze 70°C przez 30 minut, osiągając stopień polimeryzacji na poziomie 63,5% dla PIL i 90,9% dla PAM.

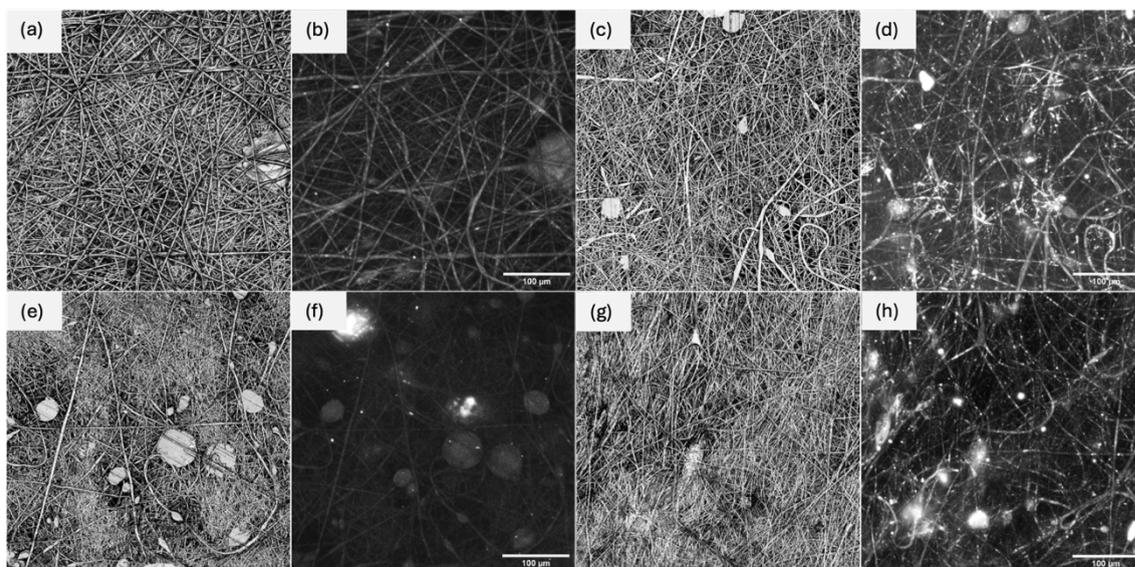
**Tabela 5.** Wpływ temperatury i czasu na polimeryzację IL do PIL i AA do PAM.

Przedstawione wyniki zaprezentowano jako wartość średnią, dla której odchylenie standardowe (wartość błęd) nie przekracza 5%.

Próbka	Stopień polimeryzacji [%]			
	IL monomer	PIL	AA	PAM
30°C, 30 min	55,9	44,1	39,9	60,1
30°C, 60 min	50,8	49,2	26,0	74,0
40°C, 30 min	49,4	50,6	25,9	74,1
40°C, 60 min	51,3	48,7	27,7	72,3
50°C, 30 min	54,0	46,0	29,6	70,3
50°C, 60 min	52,6	47,4	25,5	74,5
60°C, 30 min	55,3	44,7	35,4	64,6
60°C, 60 min	48,7	51,3	19,2	80,8
70°C, 30 min	36,5	63,5	9,1	90,9

System biokatalityczny oparty o polimerowe matryce opracowano także w **Publikacji 5**, przy czym w tych badaniach skonstruowano elektroprzędzony system nanowłókien domieszkowanych szkieletem metalo-organicznym (MOF, ang. metal-organic frameworks), który wykorzystano do immobilizacji lipazy *Candida* sp. Nanowłókna wytworzono z roztworów poli(chlorku winylu) (PVC) o różnych masach cząsteczkowych (niskiej (LOW PVC) i wysokiej (HIGH PVC)) domieszkowanych cyrkonowym MOF UiO-66-NH<sub>2</sub> oraz cieczami jonowymi na bazie choliny. Dodatek MOF miał za zadanie zwiększenie powierzchni właściwej i ilości grup funkcyjnych zdolnych do wiązania enzymu na powierzchni materiału (zwiększając wydajność immobilizacji), a ciecze jonowe dodatkowo tworzyły mikrośrodowisko sprzyjające wysokiej aktywności katalitycznej i stabilności immobilizowanej lipazy. Parametry elektroprzędzenia, w tym stężenie polimeru, przyłożone napięcie i czas przędzenia zoptymalizowano w celu uzyskania włókien o średniej średnicy w zakresie 300-500 nm.

Zastosowanie MOF-ów znacząco zwiększyło nie tylko powierzchnię właściwą ale także wytrzymałość mechaniczną nanowłóknien dodatkowo wprowadzając centra aktywne zdolne do związania enzymu, co znacznie poprawiło wydajność adsorpcji lipazy i zagwarantowało równomierny rozkład cząstek MOF i lipazy wzdłuż włóknien, co potwierdzają obrazy CLSM (Rys. 15).



**Rysunek 15.** Zdjęcia CLSM mat elektroprzędzonych wytworzonych z PVC o małej masie cząsteczkowej (LOW PVC): (a), (b) w stanie nienaruszonym i (c), (d) z dodatkiem MOF; oraz z PVC o dużej masie cząsteczkowej (HIGH PVC): (a), (b) w stanie nienaruszonym i (c), (d) z dodatkiem MOF; zdjęcia wykonane w trybie materiałowym (a), (c), (e), (g) i trybie fluorescencyjnym (b), (d), (f), (h).

Analiza porównawcza wszystkich immobilizowanych układów podkreśla odrębne zalety każdej z zastosowanych metody immobilizacji oraz testowanych nośników. Adsorpcja fizyczna (**Publikacja 1**) zapewniła prostotę i wysoką aktywność katalityczną podczas gdy metody kowalencyjne i oparte na pułapkowaniu enzymu (**Publikacje 2-4**) zapewniły lepszą stabilność strukturalną i możliwość ponownego wykorzystania. Z kolei materiał hybrydowy MOF-nanowłókna (**Publikacja 5**) zapewnił najlepszy balans między wydajnością katalityczną a długoterminową stabilnością dzięki synergistycznemu efektowi architektury nanowłóknien i mikrośrodowiska biokatalizatora wspomaganego cieczą jonową. We wszystkich badanych układach zaobserwowano pożądaną morfologię wytworzonych nośników oraz efektywną immobilizację, jednak dopiero pogłębione

analizy charakterystyki i funkcjonalności umożliwią pełną ocenę ich potencjalnej przydatności aplikacyjnej.

## 5.2. Ocena stabilności wytworzonych układów

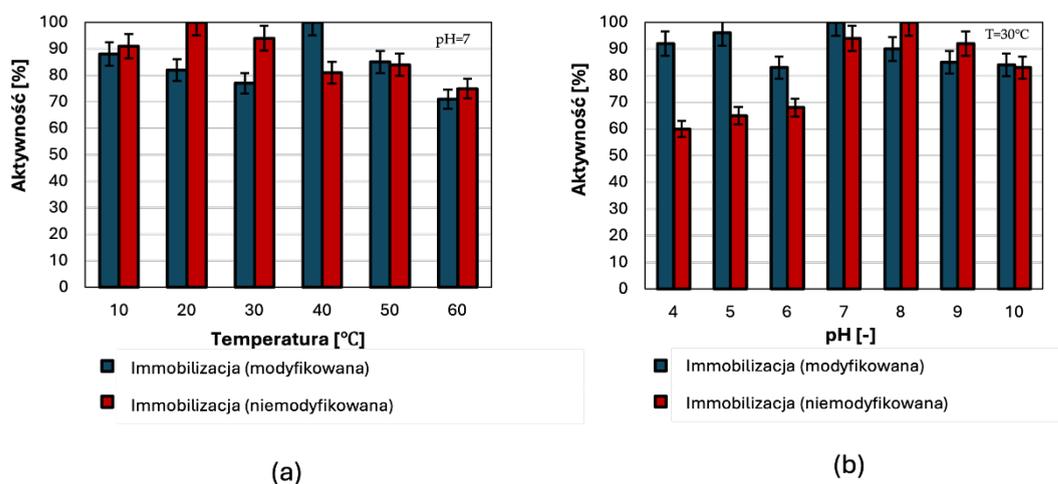
Stabilność operacyjna i możliwość ponownego wykorzystania to kluczowe parametry służące ocenie praktyczności i opłacalności stosowania immobilizowanych układów enzymatycznych. Parametry te pozwalają zrozumieć, jak strategie immobilizacji, rodzaj nośnika, charakter oddziaływań oraz czynniki środowiskowe wpływają na długoterminową wydajność i trwałość enzymów w warunkach wielokrotnego lub długotrwałego użytkowania.

Środowisko reakcji ma kluczowe znaczenie dla aktywności enzymów, które są wrażliwe na zmiany temperatury i pH. W badaniach określono wpływ tych parametrów na aktywność lipazy immobilizowanej różnymi metodami na powierzchni krzemionki (**Publikacja 1**) (Rys. 16). W szerokim zakresie temperatur (30-80°C) wyższą aktywność uzyskano dla lipazy immobilizowanej na modyfikowanej krzemionce (aktywacja międzyfazowa i wymiana jonowa), a jedynie w 20°C i 40°C lipaza unieruchomiona przez adsorpcję i częściową aktywację międzyfazową wykazywała wyższą aktywność. Dodatkowo oba immobilizowane systemy wykazywały ponad 80-proc. aktywność w zakresie temperatur 10-50°C, co potwierdza ich wysoką stabilność termiczną wynikającą z ochronnego działania nośnika.

Wartym odnotowania jest, że optymalne pH dla lipazy immobilizowanej przez adsorpcję i częściową aktywację międzyfazową wynosiło 7, natomiast dla lipazy immobilizowanej metodą mieszaną było to pH 8 co wskazuje na większe zmiany w mikrośrodowisku enzymu na skutek unieruchomienia drugą z tych metod. Co więcej, w zakresie pH 7-10 aktywność obu biokatalizatorów utrzymywała się powyżej 85%, co wskazuje na poprawę stabilności enzymu po immobilizacji. W przypadku wolnej lipazy obserwowano gwałtowny spadek aktywności przy odchyleniach od optymalnych warunków, którymi były pH 7 i temperatura 30°C.

Z kolei testy stabilności termicznej wytworzonych układów wykazały, że najwyższą aktywność w 30°C oraz utrzymanie około 80% aktywności nawet w 80°C, dzięki ochronnemu działaniu nośnika krzemionkowego. W badaniach możliwości wielokrotnego wykorzystania, po ośmiu cyklach reakcji biokatalizator immobilizowany

metodą mieszaną zachował ponad 80-proc. aktywność, a układ otrzymany na drodze adsorpcji zachował ponad 60-proc. aktywność. Spadek aktywności po wielu cyklach wiąże się z częściową dezaktywacją enzymu lub jego wymywaniem z nośnika. Uzyskane wyniki potwierdzają jednak, że immobilizacja znacząco zwiększa stabilność i trwałość lipazy, umożliwiając jej praktyczne zastosowanie.



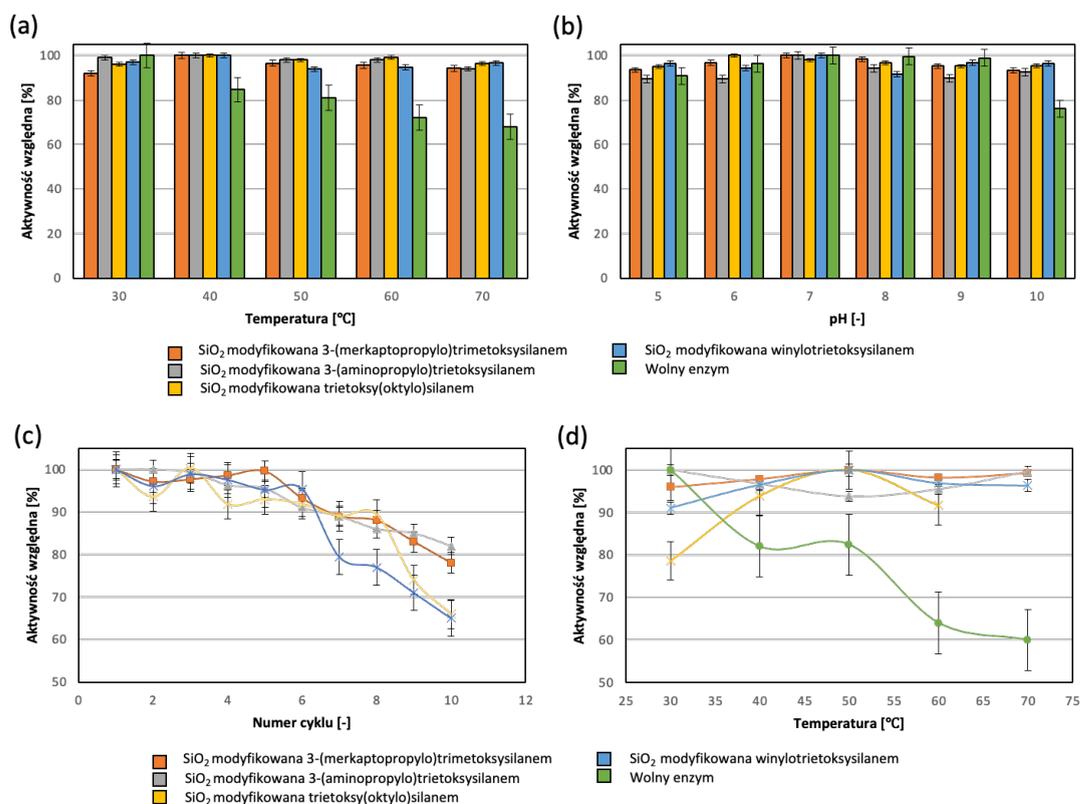
**Rysunek 16.** Porównanie wpływu temperatury (a) i pH (b) na aktywność enzymu immobilizowanego na modyfikowanej i niemodyfikowanej nanokrzemionce.

Przedstawione wyniki zaprezentowano jako wartość średnią, dla której odchylenie standardowe (wartość błędu) nie przekracza 5%.

W **Publikacji 2** również dowiedziono, że unieruchomienie enzymu zwiększa jego stabilność w zmiennych warunkach temperaturowych. Wolna lipaza wykazywała spadek aktywności poniżej 70%, względem początkowej wartości w 70°C (100% w 30°C). Natomiast enzymy unieruchomione zachowały wysoką aktywność, osiągając maksimum aktywności w 40°C. Z kolei w badaniu wpływu pH na aktywność katalityczną, wszystkie biokatalizatory w tym wolna lipaza, miały najwyższą aktywność przy pH 7, co potwierdza brak istotnych zmian strukturalnych po immobilizacji. Enzymy unieruchomione wykazywały jednak znacznie większą tolerancję na zmiany pH utrzymując aktywność powyżej 90% w szerokim zakresie pH, podczas gdy wolna lipaza była znacznie bardziej wrażliwa na zmiany tego parametru.

Testy możliwości ponownego wykorzystania wykazały, że aktywność enzymów immobilizowanych stopniowo spadała wraz z kolejnym cyklem reakcyjnym, jednakże

biokatalizator osadzony na nośniku modyfikowanym APTES zachował ponad 80% aktywności po dziesięciu cyklach (Rys. 17). Dzieje się tak dlatego, że unieruchomienie stabilizuje strukturę enzymu, bowiem przyłączenie lipazy do nośnika ogranicza jej swobodę konformacyjną, dzięki czemu białko mniej podatne jest na denaturację oraz utratę prawidłowej konformacji centrum aktywnego. Dodatkowo nośnik chroni enzym przed niekorzystnymi warunkami reakcji oraz ułatwia jego separację, co zapobiega mechanicznym lub chemicznym stratom aktywności. Wolna lipaza nie nadawała się do ponownego wykorzystania, ze względu na ograniczone metody separacji z medium reakcyjnego oraz potencjalną utratę aktywności katalitycznej. Enzym w formie wolnej nie jest w żaden sposób stabilizowany, dlatego szybciej ulega denaturacji, agregacji oraz działaniu czynników środowiskowych, co prowadzi do wyraźnego spadku aktywności.



**Rysunek 17.** Charakterystyka wolnej lipazy i lipazy unieruchomionej na modyfikowanych nośnikach nanokrzemionki obrazujące wpływ: (a) temperatury, (b) pH; (c) możliwość ponownego użycia oraz (d) stabilność termiczną. Przedstawione wyniki zaprezentowano jako wartość średnią, dla której odchylenie standardowe (wartość błędów) nie przekracza 5%.

Badania stabilności termicznej także potwierdziły, że unieruchomione enzymy utrzymywały wysoką aktywność w zmiennych temperaturach, podczas gdy aktywność wolnej lipazy gwałtownie malała, szczególnie w temperaturze 70°C (spadek o ponad 40%). Można zatem stwierdzić, że immobilizacja na modyfikowanych nośnikach krzemionkowych znacznie poprawia stabilność i trwałość lipazy dzięki ochronnemu działaniu nośnika i stabilnym wiązaniom enzym-nośnik, które ograniczają denaturację enzymu. Spośród analizowanych próbek najlepsze właściwości wykazał biokatalizator z lipazą unieruchomioną na krzemionce modyfikowanej APTES, dlatego został wybrany do dalszego wykorzystania w procesie konwersji 3H3P, gwarantując najwyższą wydajność syntezy API.

Z kolei w **Publikacji 3** silny nacisk położono na zdefiniowanie wpływu cieczy jonowej na stabilność i wydajność enzymu oraz odpowiedni dobór IL ([BMIM]Cl i [BMIM]PF<sub>6</sub>) pod kątem przyszłego zastosowania. Próby te wykonano ze względu na fakt, że ILs mogą stabilizować strukturę enzymu i pozytywnie wpływać na jej aktywność. Na wstępie zbadano wpływ IL na efektywność immobilizacji, uzyskując jednoznaczne wyniki, iż prawidłowo dobrana ciecz jonowa potrafi wielokrotnie zwiększyć ilość unieruchomionego enzymu oraz podnieść wydajność immobilizacji (Tabela 6). Korzyści te wynikają z właściwości fizykochemicznych zastosowanych ILs. Ciecze jonowe na bazie imidazoli wykazują zdolność do stabilizacji struktury trzeciorzędowej lipazy, ograniczając jej niekorzystną denaturację podczas kontaktu z powierzchnią nośnika. Dodatkowo mogą one modyfikować mikrośrodowisko enzymu, zmniejszając napięcie międzyfazowe i poprawiając zwilżalność nośnika, co ułatwia jego równomierne pokrycie białkiem. [BMIM]Cl jako hydrofilowa IL sprzyja utrzymaniu „otwartej” konformacji lipazy, zwiększając dostępność centrum aktywnego, natomiast bardziej hydrofobowa [BMIM]PF<sub>6</sub> ogranicza agregację cząsteczek enzymu i stabilizuje je poprzez oddziaływania hydrofobowe. W efekcie obecność IL nie tylko zwiększa ilość efektywnie zimmobilizowanej lipazy, ale także poprawia jej aktywność katalityczną oraz odporność na warunki reakcyjne.

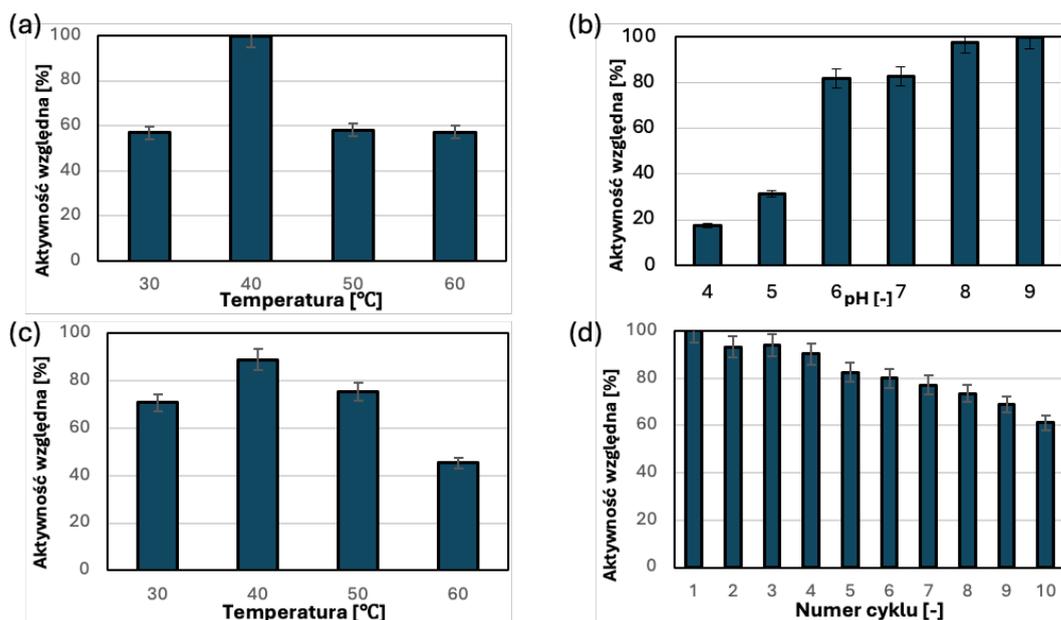
Na podstawie uzyskanych rezultatów, w dalszych działaniach wykorzystano ciecz jonową [BMIM]PF<sub>6</sub> i dla układu z zastosowaniem tej cieczy przeprowadzono szczegółową ocenę jego stabilności w różnych temperaturach i pH, a także oceniono możliwość ponownego wykorzystania oraz stabilność termiczną.

**Tabela 6.** Ilość enzymu unieruchomionego na hydrożelach PAM z dodatkiem i bez dodatku ILs. Przedstawione wyniki zaprezentowano jako wartość średnią, dla której odchylenie standardowe (wartość błęd) nie przekracza 5%.

Typ biokatalizatora	Ilość unieruchomionego enzymu [mg/g]	Wydajność immobilizacji [%]
Z [BMIM]Cl	215	86
Z [BMIM]PF <sub>6</sub>	217	87
Bez IL	79	32

Najwyższą aktywność unieruchomiona lipaza wykazywała w temperaturze 40°C, co wynika ze specyfiki lipazy pozyskanej z grzybów, a czego potwierdzeniem jest fakt, że natywna forma tego enzymu również osiąga maksymalną aktywność w tej temperaturze (Rys. 18). Lipaza ta bowiem, należy do grupy lipaz o umiarkowanej termostabilności i jest znana z wysokiej aktywności w zakresie temperatur 35-45°C, co związane jest z jej naturalnym pochodzeniem. W podanym zakresie temperatur struktura białka zachowuje optymalną elastyczność, umożliwiając prawidłową ekspozycję centrum aktywnego i skuteczną katalizę reakcji hydrolizy lub syntezy estrów. Z tego względu w prezentowanych badaniach, w niższych temperaturach wolny enzym ulega dezaktywacji, a w wyższych denaturacji, zachowując ok. 30% aktywności w 60°C. Z kolei analizując wpływ pH można odnotować, że największą aktywność natywna lipaza wykazuje w pH 7, natomiast biokatalizator unieruchomiony charakteryzuje się większą stabilnością i szerszym zakresem działania z wysoką aktywnością w różnych temperaturach i pH. Katalizator hydrożelowy osiąga wyższą aktywność w środowisku zasadowym, co może wynikać ze zmian konformacji enzymu po unieruchomieniu. W przypadku hydrożelu poliakrylamidowego (PAM) zasadowe środowisko może dodatkowo wpływać na jego właściwości fizykochemiczne. Choć PAM sam w sobie nie ulega znaczącej jonizacji, w pH zasadowym może dochodzić do częściowej hydrolizy grup amidowych do karboksylanów. Powstawanie naładowanych ujemnie grup karboksylowych zwiększa zdolność hydrożelu do wiązania wody, prowadząc do jego intensywniejszego pęcznienia. Rozszerzenie sieci polimerowej poprawia dyfuzję substratów i ułatwia dostęp do unieruchomionej lipazy. Jednocześnie zmieniający się ładunek hydrożelu może redukować zbyt silne oddziaływania pomiędzy matrycą a enzymem, co sprzyja zachowaniu bardziej aktywnej konformacji białka. W efekcie zarówno poprawiona dyfuzja, jak i korzystniejsze mikrośrodowisko w obrębie hydrożelu

poliakrylamidowego mogą dodatkowo wzmacniać aktywność katalizatora w warunkach zasadowych.



**Rysunek 18.** Względna aktywność biokatalizatora w zależności od: (a) temperatury i (b) pH; (c) stabilność termiczna; oraz (d) możliwość ponownego wykorzystania lipazy unieruchomionej na materiale hydrożelowym z dodatkiem [BMIM]PF<sub>6</sub>. Przedstawione wyniki zaprezentowano jako wartość średnią, dla której odchylenie standardowe (wartość błęd) nie przekracza 5%.

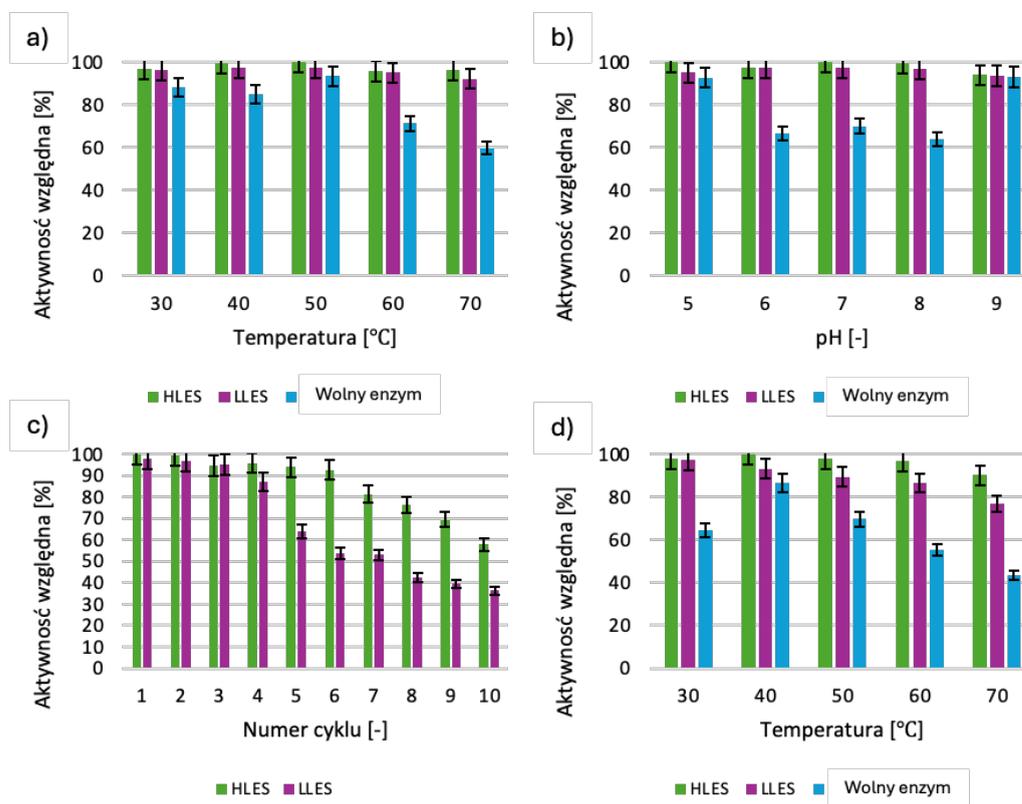
Profil stabilności termicznej unieruchomionej lipazy potwierdził wcześniejsze obserwacje. Wykazano bowiem, że po 2 godzinach inkubacji w wysokiej temperaturze enzym unieruchomiony zachowuje 70-90% aktywności dzięki ochronnemu działaniu nośnika i IL oraz usztywnieniu struktury biokatalizatora. W testach obrazujących możliwość wielokrotnego wykorzystania system wykazał dużą trwałość, utrzymując ponad 60-proc. aktywność nawet po dziesiątym cyklu. Kompatybilność nośnika i cieczy jonowej z lipazą odpowiada za wysoką stabilność biokatalizatora, który dodatkowo można łatwo oddzielić od mieszaniny reakcyjnej dzięki zwartej strukturze hydrożelu.

Dla otrzymanych z dodatkiem IL systemów biokatalitycznych zdefiniowano także parametry kinetyczne, a więc stałą Michaelisa ( $K_M$ ) i maksymalną szybkość reakcji ( $V_{max}$ ), celem określenia w jaki sposób zmianie ulega kinetyka lipazy po dodatku IL. Rezultaty wykonanych badań wykazały, że obecność [BMIM]PF<sub>6</sub> w systemie po

immobilizacji znacząco poprawia powinowactwo lipazy do substratu i szybkość reakcji. W porównaniu z wolnym enzymem, układ z dodatkiem IL charakteryzował się bowiem niższą wartością  $K_M$  ( $0,475 \pm 0,014$ ) i wyższą wartością  $V_{max}$  ( $1,519 \pm 0,068$ ), co świadczy o poprawionych właściwościach katalitycznych. Wynika to prawdopodobnie z bardziej hydrofobowego środowiska wokół centrum aktywnego oraz lepszej rozpuszczalności substratów i mniejszych ograniczeń dyfuzyjnych. Z kolei enzym unieruchomiony bez stabilizatora w postaci IL wykazuje spadek powinowactwa do substratu z powodu zmian konformacyjnych i barier dyfuzyjnych.

W **Publikacji 4** porównano właściwości katalityczne i stabilność systemów biokatalitycznych po immobilizacji enzymu lipaza z *Pseudomonas fluorescens* techniką pułapkowania w matrycy hydrożelowej poli(akrylamid)-poli(ciecz jonowa) (PAM-PIL) z enzymem w formie natywnej.

Wytworzono dwa układy biokatalityczne: HLES (ang. *high-loaded enzyme system*) z 120 mg enzymu w układzie i LLES (ang. *low-loaded enzyme system*) z 50 mg enzymu w układzie. W pracy badaniom poddano wpływ ilości immobilizowanego enzymu na aktywność katalityczną, ponieważ jego nadmiar może prowadzić do wysycenia nośnika i występowania ograniczeń w dyfuzji substratu, a zarazem obniżenia aktywności. System HLES wykazał 107% odzysku aktywności w porównaniu z enzymem natywnym, co wskazuje, że zastosowane warunki immobilizacji oraz nośnik z cieczą jonową korzystnie wpłynęły na aktywność enzymu. Dane zaprezentowane na Rys. 16. jasno wskazują, że immobilizacja zwiększyła odporność enzymu na działanie temperatury i pH. Enzym w formie immobilizowanej (szczególnie HLES) zachował wysoką aktywność w szerokim zakresie temperatur ( $30-70^\circ\text{C}$ ) i pH (5-9), w przeciwieństwie do wolnej lipazy, której aktywność znacznie spadała w wyższych temperaturach i ekstremalnych warunkach pH (Rys. 19). Oznacza to, że immobilizacja zwiększa sztywność strukturalną enzymu i chroni go przed denaturacją. Zwiększona stabilność termiczna i pH oraz możliwość wielokrotnego wykorzystania wskazują, że immobilizowany enzym jest też odporniejszy na degradację i utratę aktywności w czasie. System HLES utrzymywał ok. 80-proc. aktywność po 7 cyklach reakcji i 60-proc. po 10 cyklach.

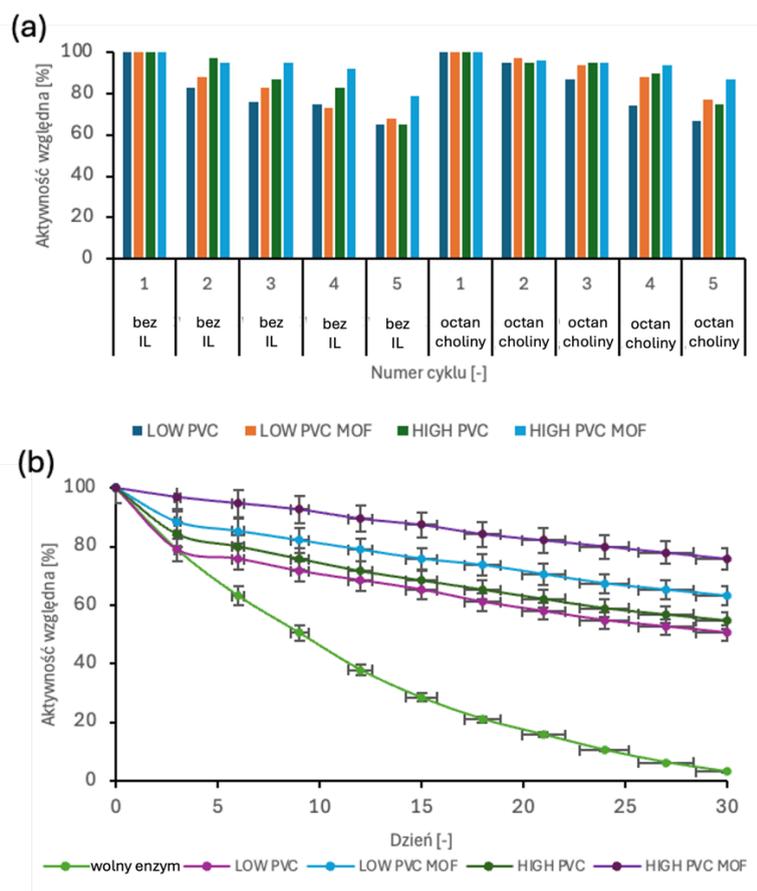


**Rysunek 19.** Wpływ a) temperatury, b) pH na względną aktywność, c) możliwość ponownego wykorzystania i d) stabilność termiczną wytworzonych układów biokatalitycznych. Przedstawione wyniki zaprezentowano jako wartość średnią, dla której odchylenie standardowe (wartość błędów) nie przekracza 5%.

Dodatkowo, zastosowanie cieczy jonowej VBIMBr poprawiło dyspersję enzymu w matrycy polimerowej i wpłynęło korzystnie na jego konformację, chroniąc białko przed degradacją i wzmacniając jego aktywność katalityczną. Testy wymywania potwierdziły wysoką stabilność systemu i znikomą elucję lipazy, ponieważ po 24 godzinach w buforze PBS o pH 7 ubytek enzymu wyniósł zaledwie 1,26%, co wskazuje na skuteczną i trwałą immobilizację.

W celu dalszego zbadania wpływu rodzaju nośnika na aktywność enzymu, biokatalizator z elektroprzędzonych nanowłókien z dodatkiem MOF (**Publikacja 5**) został poddany analizie i wykazał najwyższą długoterminową stabilność spośród wszystkich badanych układów (Rys. 20). Jak już wspomniano wcześniej wyprodukowano cztery rodzaje mat elektroprzędzonych, które wykorzystano jako nośnik organiczny w procesie immobilizacji oraz poddano dalszej analizie aktywności, wykonanych

z (i) roztworu poli(chlorku winylu) o małej masie cząsteczkowej (LOW PVC), (ii) roztworu poli(chlorku winylu) o małej masie cząsteczkowej z dodatkiem UiO-66-NH<sub>2</sub> (LOW PVC MOF), (iii) roztworu poli(chlorku winylu) o dużej masie cząsteczkowej (HIGH PVC) oraz (iv) roztworu poli(chlorku winylu) o dużej masie cząsteczkowej z dodatkiem MOF UiO-66-NH<sub>2</sub> (HIGH PVC MOF). W obrębie każdego nośnika testowano 2 systemy: PVC-lip oraz PVC-lip-CA (dodatek octanu choliny; CA).



**Rysunek 20.** (a) Zależność względnej aktywności wytworzonych biokatalizatorów podczas ponownego użycia; (b) zachowanie aktywności katalitycznej podczas długiego przechowywania. Przedstawione wyniki zaprezentowano jako wartość średnią, dla której odchylenie standardowe (wartość błędu) nie przekracza 5%.

Struktura kompozytowa, złożona z włókien PVC o dużej masie cząsteczkowej domieszkowanych MOF UiO-66-NH<sub>2</sub> i stabilizowana octanem choliny pozwoliła na zachowanie ok. 80% początkowej aktywności katalitycznej (wolna forma enzymu

wykazywała zaledwie ~3%) po 30 dniach przechowywania w temperaturze otoczenia i ponad 90% aktywności po dziesięciu cyklach katalitycznych. Połączenie sztywnych nieorganicznych domen MOF z elastycznymi włóknami polimerowymi PVC zapewniło zarówno trwałość mechaniczną, jak i wydajne kanały dyfuzji substratu. Ponadto ciecz jonowa pełniła funkcję środka stabilizującego, utrzymując strukturę przestrzenną lipazy *Candida* sp. Z uzyskanych danych wynika też, że dodatek octanu choliny znacznie zwiększał aktywność enzymatyczną w porównaniu do układu bez IL. Wynika to zarówno z wyższej efektywności unieruchomienia lipazy w obecności octanu choliny, jak i z bardziej korzystnego pH, jakie ten związek zapewnia (pH lekko zasadowe, w którym lipaza wykazuje najwyższą aktywność). Chlorek choliny, będący bardziej kwaśny, prowadził do niższej aktywności enzymu.

### 5.3. Zastosowanie immobilizowanych enzymów w syntezie asymetrycznej API

Głównym celem badań zrealizowanych w ramach rozprawy doktorskiej było jednak enzymatyczne rozdzielenie i/lub asymetryczna synteza substancji farmaceutycznie aktywnych lub ich półproduktów. Każdy immobilizowany układ opracowany w ramach pięciu etapów prac został specjalnie dostosowany do potrzeb procesu oraz docelowego substratu, a warunki reakcji zoptymalizowano w celu maksymalizacji konwersji, enancjoselektywności i stabilności katalitycznej. W poniższym rozdziale przedstawiono szczegółową analizę wydajności enzymatycznej wszystkich pięciu badanych układów, podkreślając synergistyczny wpływ immobilizacji, chemii nośnika i modyfikacji cieczy jonowej na wyniki reakcji syntezy API.

W celu weryfikacji hipotezy badawczej w **Publikacji 1** do enancjoselektywnej hydrolizy (R)-ketoprofenu z racemicznej mieszaniny estru etylowego (R,S)-ketoprofenu wykorzystano wolną i unieruchomioną na krzemionce lipazę z *Aspergillus niger* (Tabela 7). Enzym ten wykazuje większą specyficzność wobec formy (R)- niż (S)-, co było pożądanym i co potwierdziły uzyskane wyniki. Najwyższą wydajność reakcji (51,1%) uzyskano dla lipazy unieruchomionej fizycznie poprzez adsorpcję i częściową aktywację międzyfazową w buforze PBS o pH 7, przy zastosowaniu 20 mg enzymu i czasie reakcji 96 h. Zbliżoną wydajność (46,3%) otrzymano także przy mniejszej ilości biokatalizatora (15 mg). Około 45-proc. wydajność uzyskano także dla lipazy unieruchomionej metodą mieszaną (aktywacja międzyfazowa i wymiana jonowa).

**Tabela 7.** Wydajność procesu po enzymatycznej konwersji estru metylowego ketoprofenu oraz nadmiar enancjomeryczny (ee) (R)-ketoprofenu w stosunku do (S)-ketoprofenu po 24 h i 96 h prowadzenia reakcji. Przedstawione wyniki zaprezentowano jako wartość średnią, dla której odchylenie standardowe (wartość błędu) nie przekracza 5%.

Typ immobilizacji	Ilość enzymu [mg]	Rozpuszczalnik	Czas [h]	Wydajność [%]	(R)-ketoprofen ee (%)
Wolna lipaza	50	PBS 7	96	21,7	99,7
Niemodyfikowany nośnik	10	PBS 7	96	27,4	99,7
Niemodyfikowany nośnik	15	PBS 7	96	46,3	99,9
Niemodyfikowany nośnik	20	PBS 7	96	51,1	97,1
Modyfikowany nośnik	10	PBS 7	96	21,7	98,6
Modyfikowany nośnik	15	PBS 7	96	32,3	100,0
Modyfikowany nośnik	20	PBS 7	96	44,1	100,0
Niemodyfikowany nośnik	10	PBS 7	24	23,3	99,5
Niemodyfikowany nośnik	15	PBS 7	24	38,0	99,7
Niemodyfikowany nośnik	20	PBS 7	24	45,4	98,8
Modyfikowany nośnik	10	PBS 7	24	20,2	100,0
Modyfikowany nośnik	15	PBS 7	24	29,7	99,8
Modyfikowany nośnik	20	PBS 7	24	40,3	98,1
Niemodyfikowany nośnik	10	heksan	24	46,0	98,9
Modyfikowany nośnik	10	heksan	24	6,6	95,4
Niemodyfikowany nośnik	10	eter diizopropylowy	24	19,8	98,8
Modyfikowany nośnik	10	eter diizopropylowy	24	9,9	96,9
Niemodyfikowany nośnik	10	izopropanol	24	12,4	98,6
Modyfikowany nośnik	10	izopropanol	24	6,5	100,0

Dodatkowo wydłużenie czasu reakcji z 24 do 96 godzin nie spowodowało istotnego wzrostu wydajności, dlatego z ekonomicznego punktu widzenia korzystniejszy jest proces trwający 24 godziny. W środowisku czysto organicznym wydajności były niższe, a wyjątkiem był proces prowadzony w heksanie (wydajność 46%), gdyż rozpuszczalniki organiczne mogą zaburzać strukturę centrum aktywnego enzymu. Co więcej, prowadzenie procesu w środowisku wodnego buforu wpisuje się w paradygmat zrównoważonej i zielonej chemii, umożliwiając eliminację

rozpuszczalników organicznych i redukcję obciążenia środowiskowego. We wszystkich przypadkach uzyskano za to bardzo wysoką enancjomeryczną czystość produktu ( $ee > 98\%$ ). Wyniki potwierdzają, że wydajność i enancjoselektywność zależą od rodzaju zastosowanej lipazy, której właściwości (np. optimum pH, temperatura, specyficzność) różnią się w zależności od źródła enzymu.

W **Publikacji 2**, po ocenie właściwości otrzymanych układów, zastosowano je do rozdzielania racemicznej mieszaniny 3H3P (będącej kluczowym związkiem pośrednim w procesie syntezy fluoksetyny) w różnych rozpuszczalnikach i przy udziale różnych cieczy jonowych (ILs), które miały na celu poprawę stabilności i aktywności enzymu (Tabela 8). Wyniki wskazują, że lipaza wykazywała wysoką aktywność w środowisku organicznym, natomiast w buforze PBS wydajność reakcji transestryfikacji była niska i wyniosła maksymalnie 31,6%. Wysoka zawartość wody może przesunąć równowagę w stronę hydrolizy oraz ograniczać efektywność transestryfikacji.

**Tabela 8.** Wpływ rodzaju rozpuszczalnika oraz rodzaju i stężenia cieczy jonowej na nadmiar enancjomeryczny i wydajność rozdziału mieszaniny racemicznej 3H3P. Przedstawione wyniki zaprezentowano jako wartość średnią, dla której odchylenie standardowe (wartość błędów) nie przekracza 5%.

Typ IL	Ilość IL [% w/v]	Typ rozpuszczalnika	Wydajność [%]	ee [%] S-alkoholu
[BMIM]Cl	1	heksan	97,4	79,5
[BMIM]Cl	5	heksan	75,6	64,3
[BMIM]Cl	10	heksan	72,4	52,0
[BMIM]NTf <sub>2</sub>	1	heksan	82,5	61,2
[BMIM]NTf <sub>2</sub>	5	heksan	56,0	74,1
[BMIM]NTf <sub>2</sub>	10	heksan	52,0	73,3
[BMIM]Cl	1	PBS	12,7	68,5
[BMIM]Cl	5	PBS	3,9	27,9
[BMIM]Cl	10	PBS	3,9	26,4
[BMIM]NTf <sub>2</sub>	1	PBS	31,6	58,2
[BMIM]NTf <sub>2</sub>	5	PBS	26,3	74,1
[BMIM]NTf <sub>2</sub>	10	PBS	14,5	83,0
[BMIM]Cl/wolny enzym	1	heksan	91,2	78,1
[BMIM]Cl/wolny enzym	1	PBS	22,7	32,7
[BMIM]NTf <sub>2</sub> /wolny enzym	1	heksan	77,1	68,3
[BMIM]NTf <sub>2</sub> /wolny enzym	1	PBS	25,4	43,7

Najlepsze rezultaty uzyskano w heksanie przy dodatku 1% (w/v) [BMIM]Cl w których to warunkach osiągnięto wydajność 97,4% i ee równy 79,5%. W przypadku IL z anionem Cl<sup>-</sup> wzrost stężenia cieczy jonowej powodował spadek zarówno wydajności, jak i nadmiaru enancjomerycznego pożądanego związku, niezależnie od rozpuszczalnika. Odwrotną zależność zaobserwowano dla IL z anionem NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>, gdzie ee wzrastał wraz ze stężeniem IL (do 73,3% w heksanie), choć ogólna wydajność malała. Spadek wydajności przy wyższych stężeniach IL przypisano zwiększonej sile jonowej i lepkości środowiska reakcji, które ograniczają aktywność enzymu. W przypadku wolnej lipazy najlepsze wyniki (91,2% wydajności, ee wynoszący 78,1%) uzyskano również w heksanie z dodatkiem [BMIM]Cl. Korzystniejsze działanie biokatalizatorów w obecności IL wynika z aktywacji międzyfazowej lipazy oraz stabilizującego, hydrofobowego wpływu cieczy jonowych, które pomagają utrzymać odpowiednią konformację enzymu i mogą pełnić jednocześnie rolę środowiska reakcyjnego oraz modyfikatora stosowanego do immobilizacji nośnika.

W badaniach zaprezentowanych w **Publikacji 3** przeprowadzono enzymatyczne rozdzielanie racemicznego estru metylowego ibuprofenu z wykorzystaniem lipazy z *Candida rugosa* (immobilizowanej na hydrożelu poli(akrylamidowym)). Proces polegał na enancjoselektywnej hydrolizie prowadzącej do powstania (S)-ibuprofenu i (R)-estru metylowego ibuprofenu. Badania wykonano w reaktorze okresowym w dwóch trybach, którymi był rozdział kinetyczny oraz dynamiczny rozdział kinetyczny. W klasycznym rozdziale kinetycznym reakcję prowadzono w środowisku o niższym pH i bez dodatku DMSO, natomiast w rozdziale dynamicznym proces prowadzono w środowisku zasadowym z dodatkiem DMSO, który zwiększał racemizację niepożądanego enancjomeru (R), co skutkowało wyższą konwersją i większą efektywnością otrzymywania (S)-ibuprofenu (Tabela 9). Zastosowanie enzymów immobilizowanych z dodatkiem cieczy jonowej [BMIM]PF<sub>6</sub> zwiększyło aktywność i stabilność biokatalizatora, bowiem bez dodatku IL uzyskano niskie wartości konwersji (<35%) i czystości enancjomerycznej (<60%). W procesach prowadzonych w buforze fosforanowym o pH 7 z dodatkiem izooktanu i heksanu uzyskano konwersję wynoszącą odpowiednio 48% i 36% po 144 godzinach procesu co odpowiada wartościom granicznym dla rozdziału kinetycznego. Z kolei kinetyczny rozdział dynamiczny w środowisku zasadowym pozwolił osiągnąć znacznie wyższe wydajności, które

wyniosły 83% (z dodatkiem izooktanu) i 59% (z dodatkiem heksanu), a po dodaniu DMSO odpowiednio nawet 95% i 71%.

**Tabela 9.** Nadmiar enancjomeryczny i wydajność reakcji otrzymywania estru metylowego (S)-ibuprofenu po enzymatycznej asymetrycznej hydrolizie racemicznego estru metylowego ibuprofenu z zastosowaniem układów biokatalitycznych z dodatkiem [BMIM]PF<sub>6</sub>. Przedstawione wyniki zaprezentowano jako wartość średnią, dla której odchylenie standardowe (wartość błędu) nie przekracza 5%.

Medium reakcyjne	Czas reakcji [h]	Wydajność reakcji [%]	Nadmiar enancjomeryczny [%]
Izooktan/PBS pH 7	48	27	89
	96	35	95
	144	48	96
Izooktan/Bufor NaHCO <sub>3</sub> -NaOH pH 9,5	48	37	97
	96	68	98
	144	83	99
Izooktan/Bufor NaHCO <sub>3</sub> -NaOH pH 9,5/DMSO	48	54	98
	96	77	98
	144	95	98
Heksan/PBS pH 7	48	24	88
	96	26	94
	144	36	94
Heksan/Bufor NaHCO <sub>3</sub> -NaOH pH 9,5	48	35	95
	96	43	96
	144	59	97
Heksan/Bufor NaHCO <sub>3</sub> -NaOH pH 9,5/DMSO	48	33	96
	96	45	97
	144	71	98

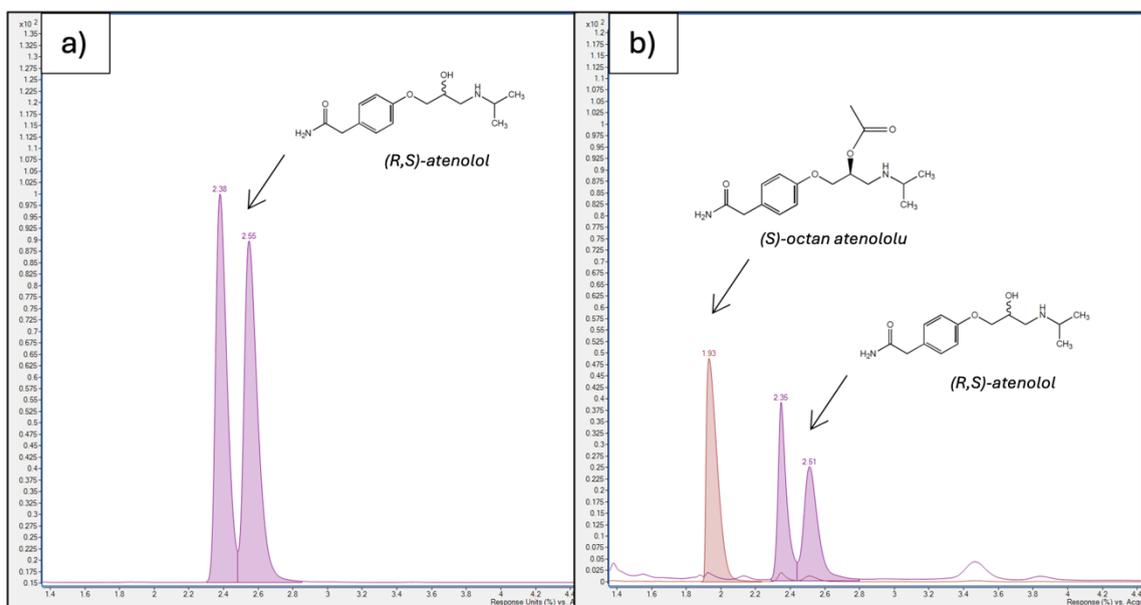
Izooktan okazał się korzystniejszym rozpuszczalnikiem niż heksan, a wydajność reakcji rosła wraz z czasem trwania procesu. Wysoką czystość enancjomeryczną (powyżej 90%) uzyskano niezależnie od zastosowanych warunków, co potwierdza wysoką stereospecyficzność lipazy z *Candida rugosa*.

W **Publikacji 4** natomiast przeprowadzono reakcje syntezy estru atenololu w reaktorach przepływowym oraz wsadowym, co stanowiło przejście do bardziej zaawansowanych prac i próbę opracowania reaktora do syntez API katalizowanych immobilizowanymi enzymami. Ze względu na niską rozpuszczalność atenololu

przeprowadzono dobór odpowiedniego rozpuszczalnika reakcyjnego. Spośród wielu rozpuszczalników organicznych (toluen, heksan, DMF, DMSO, izooktan) jedynie DMF okazał się odpowiedni i zapewniał dobrą rozpuszczalność substratu i dostateczną stabilność katalizatora. Roztwór atenololu w DMF wprowadzono do reaktora wsadowego wraz z octanem winylu, pełniącym rolę donora grupy acylowej, oraz biokatalizatorem odpowiedzialnym za katalizę reakcji transestryfikacji. Proces prowadzono przez 48 godzin, aby określić wpływ czasu reakcji na stopień konwersji substratu.

Wyniki wykazały, że immobilizowany enzym znacznie przewyższa aktywnością enzym wolny, osiągnięto bowiem ponad czterokrotny wzrost wydajności konwersji w obecności układów po immobilizacji (55,48% wobec 13,99% po 48 h), przy zachowaniu pełnej enancjomerycznej czystości produktu ( $ee=100\%$ ). Wysoka selektywność wynika z zastosowania lipazy pochodzącej z *Pseudomonas fluorescens*, która katalizuje syntezę (S)-estru atenololu (Rys. 21). Pomimo że DMF nie jest typowym środowiskiem dla biokatalizy, odpowiedni dobór nośnika hydrożelowego umożliwił skuteczną immobilizację enzymu, zwiększając zarazem stabilność i aktywność w rozpuszczalniku organicznym. Użyty materiał hydrożelowy (po uprzedniej liofilizacji) ograniczał ilość wody w układzie, której tylko niewielkie ilości są niezbędne do wykazania aktywności lipaz na granicy faz, gdzie zachodzi akt katalityczny. Zjawisko aktywacji międzyfazowej w środowisku hydrofobowym powoduje otwieranie „pokrywy” nad miejscem aktywnym lipazy i zarazem zwiększa jego aktywność. Dodatkowo kontrolowana zawartość wody mogła wspomagać powstawanie dimetyloaminy z DMF, podnosząc pH i sprzyjając dynamicznemu rozdziałowi kinetycznemu (DKR), co tłumaczy  $ee$  na poziomie 100%.

Obecność nośnika opartego na imidazoliowych cieczach jonowych mogła dodatkowo wspierać proces racemizacji, co tłumaczy wyraźnie wyższą konwersję po procesie z udziałem immobilizowanego układu enzymatycznego. Stała wartość  $ee$  (100%) wskazuje, że enzym zachował selektywność, mimo częściowej dezaktywacji. Dodatkowo wysokie pH sprzyjało racemizacji wolniej reagującego enancjomeru, zapewniając ciągły dopływ preferowanego izomeru do reakcji. Spadek konwersji przypisano możliwej dezaktywacji enzymu, jego wymyciu z nośnika, a także zmianom strukturalnym lub inhibicji biokatalizatora przez produkty reakcji.



**Rysunek 21.** Chromatogram (a) racemicznego substratu atenololu, (b) mieszaniny po reakcji z octanem S-atenololu (po lewej) i racemicznym atenololem (po prawej).

W warunkach reakcji w reaktorze wsadowym zaobserwowano wyraźne różnice w aktywności pomiędzy wolnym a immobilizowanym enzymem. Wolna lipaza wykazywała niską konwersję, osiągając jedynie 13,99% po 48 godzinach, przy stałym, maksymalnym nadmiarze enancjomerycznym produktu (100% ee) (Tabela 10).

**Tabela 10.** Konwersja i nadmiar enancjomeryczny reakcji enzymatycznej rozdziału racemicznego atenololu. Przedstawione wyniki zaprezentowano jako wartość średnią, dla której odchylenie standardowe (wartość błędów) nie przekracza 5%.

Wolny enzym (120 mg)		
Czas reakcji [h]	Konwersja [%]	Nadmiar enancjomeryczny [%]
12	7,75	100
24	8,58	100
36	10,35	100
48	13,99	100
Immobilizowany enzym (enkapsulacja 120 mg)		
Czas reakcji [h]	Konwersja [%]	Nadmiar enancjomeryczny [%]
12	28,93	100
24	46,89	100
36	54,49	100
48	55,48	100

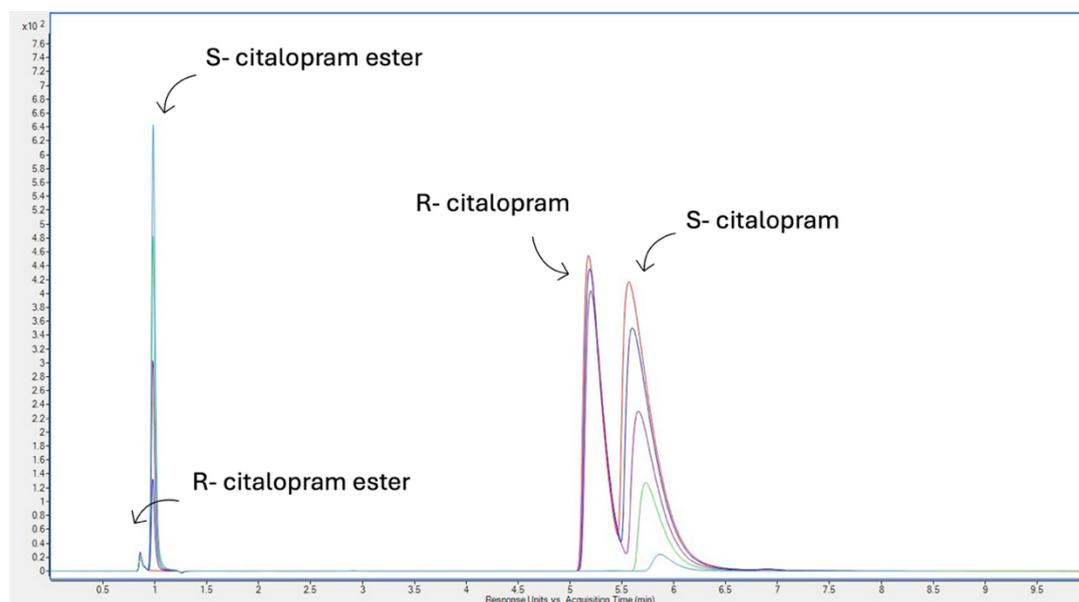
Immobilizacja enzymu istotnie zwiększała jego efektywność katalityczną - już po 12 godzinach konwersja wynosiła 28,93%, a po 48 godzinach osiągnęła 55,48%, również przy zachowaniu pełnej enancjoselektywności reakcji. Wyniki te potwierdzają, że enkapsulacja znacząco poprawia wydajność procesu transestryfikacji racemicznego atenololu. Po ocenie reakcji w reaktorze wsadowym proces przeniesiono do reaktora przepływowego w celu zwiększenia skali i oceny możliwości ciągłego i wielokrotnego wykorzystania biokatalizatora. Ze względu na niską aktywność enzymu wolnego badano wyłącznie układ po immobilizacji. W pierwszym cyklu uzyskano konwersję 56,08%, co potwierdza wysoką aktywność początkową enzymu. Przejście z reaktora wsadowego do układu przepływowego pozwoliło na dalszą poprawę wydajności procesu (Tabela 11).

**Tabela 11.** Wielokrotne wykorzystanie biokatalizatora w procesie przepływowym enzymatycznego rozdziału racemicznego atenololu. Przedstawione wyniki zaprezentowano jako wartość średnią, dla której odchylenie standardowe (wartość błędów) nie przekracza 5%.

Numer cyklu	Konwersja [%]	Nadmiar enancjomeryczny [%]
1	56,08	100
2	40,41	100
3	38,53	100
4	34,49	100
5	31,34	100
6	24,48	100

W pierwszym cyklu pracy reaktora przepływowego uzyskano konwersję 56,08%, porównywalną z maksymalną wartością osiąganą w reakcji wsadowej z immobilizowanym enzymem. Jednocześnie we wszystkich cyklach niezmiennie utrzymywał się nadmiar enancjomeryczny (S)-atenololu równy 100%, co świadczy o wysokiej stabilności i utrzymaniu enancjoselektywności biokatalizatora. W kolejnych cyklach pracy reaktora przepływowego odnotowano stopniowy spadek konwersji - od 40,41% w drugim cyklu do 24,48% w szóstym cyklu. Spadek ten można wiązać z częściową dezaktywacją biokatalizatora podczas długotrwałej pracy w warunkach przepływowych. Niemniej jednak enancjoselektywność pozostała niezmienna, co wskazuje, że proces degradacji enzymu wpływa głównie na jego aktywność, a nie na stereochemiczny przebieg reakcji.

W **Publikacji 5**, po wnikliwej charakterystyce, do dalszych badań w reaktorze membranowym pracującym w trybie ciągłym, wybrano jeden układ biokatalityczny, którym, ze względu na wysoką aktywność oraz znaczną stabilność, był system HIGH PVC MOF-lip-CC. Celem prac było określenie jego aktywności katalitycznej w reakcji rozdzielania racemicznego citalopramu w celu uzyskania enancjomerycznie czystego produktu, a więc estru S-citalopramu. W wyniku reakcji enzymatycznej uzyskano oczekiwany produkt, co potwierdzono analizą chromatograficzną (Rysunek 22).



**Rysunek 22.** Chromatogram wygenerowany po analizie HPLC mieszaniny racemicznej citalopramu i produktu estru S-citalopramu. Kolory na chromatogramie odpowiadają poszczególnym próbkom pobranym po określonym czasie (licząc od góry): czerwony - 0 h, granatowy - 1 h, fioletowy - 8 h, zielony - 12 h, jasnoniebieski - 24 h.

Wraz z postępowaniem reakcji obserwowano spadek stężenia S-citalopramu i wzrost stężenia S-estru, co dowodzi skutecznej konwersji substratu w produkt. Chromatogramy wykazały także, że po 1 h konwersja S-citalopramu wynosiła 19%, po 8 h 50%, a po 12 h 76%. Po 24 h osiągnięto 96-proc. konwersję S-citalopramu i nadmiar enancjomeryczny S-estru powyżej 93%. Jednocześnie konwersja R-citalopramu nie przekroczyła 8%, co potwierdza wysoką enancjo- i stereoselektywność zastosowanego systemu biokatalitycznego (Tabela 12). Oceniono również stabilność enzymu w trybie ciągłego przepływu i wykazano, że immobilizowana lipaza zachowała wysoką

aktywność, tracąc jedynie ok. 8% aktywności początkowej. Wynik ten potwierdza, że enzym pozostaje stabilny mimo obciążeń mechanicznych i dyfuzyjnych typowych dla reaktorów membranowych. Uzyskana trwałość wskazuje na skuteczną immobilizację i korzystne oddziaływanie z nośnikiem, co stanowi kluczowy czynnik dla przyszłych zastosowań przemysłowych, zapewniając powtarzalność, opłacalność i długotrwałą stabilność pracy układu biokatalitycznego.

**Tabela 12.** Konwersja racemicznego citalopramu w czasie prowadząca do otrzymania pożądanego (S)-estru citalopramu. Przedstawione wyniki zaprezentowano jako wartość średnią, dla której odchylenie standardowe (wartość błędów) nie przekracza 5%.

Czas [h]	Konwersja [%]	
	R-citalopram	S-citalopram
1	3	19
8	7	50
12	8	76
24	8	<b>96</b>

Enzymatyczna konwersja racemicznego citalopramu w reaktorze membranowym prowadziła do powstawania pożądanego produktu, a więc S-estru citalopramu. Jak pokazuje chromatogram, stężenie S-citalopramu malało, podczas gdy stężenie S-estru wzrastało, co potwierdza skuteczną konwersję substratu. Istotnym spostrzeżeniem była także niewielka utrata R-citalopramu oraz śladowa ilość R-estru w próbce końcowej, co świadczy o wysokiej enancjo- i stereoselektywności zastosowanego układu biokatalitycznego.

## 6. Podsumowanie, wnioski i przyszłe badania

Rezultaty zebrane w trakcie realizacji dysertacji doktorskiej jasno pokazują, że racjonalne projektowanie systemów immobilizowanych lipaz, w połączeniu z zastosowaniem cieczy jonowych jako stabilizatorów/aktywatorów enzymów, może znacząco poprawić wydajność katalityczną, enancjoselektywność i możliwość ponownego wykorzystania enzymów w syntezie/rozdziale substancji farmaceutycznie aktywnych. Wszystkie otrzymane i analizowane systemy biokatalityczne obejmujące nośniki nieorganiczne, hybrydowe hydrożele polimerowe i zaawansowane nanokompozyty MOF-polimer, pozwoliły na poprawę aktywności enzymów, polepszenie ich odporności strukturalnej oraz wydajności katalizowanych procesów w zróżnicowanych warunkach syntezy. Niniejsza dyskusja integruje i interpretuje te odkrycia, umieszczając je w szerszych ramach inżynierii enzymów i zrównoważonej biokatalizy.

Sukces immobilizacji polega przede wszystkim na jej zdolności do modyfikacji lokalnego mikrośrodowiska enzymu przy jednoczesnym zachowaniu, a nawet wzmocnieniu funkcji katalitycznej. Na przykład, lipaza z *Aspergillus niger* immobilizowana na nośnikach krzemionkowych wykazała zachowanie znacznej aktywności katalitycznej i enancjoselektywności w rozdziale racemicznego ketoprofenu. Mechanizm adsorpcji fizycznej i aktywacji międzyfazowej wykorzystywał naturalne zjawisko otwierania się pokrywy centrum aktywnego lipazy, co odsłaniało hydrofobową kieszeń i zwiększało dostępność miejsca aktywnego dla substratów. Proces ten nie tylko stabilizował konformację enzymu, ale także zmniejszał prawdopodobieństwo dysocjacji struktury enzymu pod wpływem stresu termicznego lub wywołanego działaniem rozpuszczalnika. Te obserwacje odzwierciedlają fundamentalną zasadę stabilizacji enzymów, że sztywność strukturalna nadana poprzez immobilizację może tłumić fluktuacje konformacyjne enzymu prowadzące do dezaktywacji, bez nadmiernego uszczerbku elastyczności białka niezbędnej do prawidłowego przeprowadzenia katalizy. Dobrym przykładem ilustrującym opisywane zjawisko są przedstawione wyniki **(P1)** uzyskane przy użyciu biokatalizatora na bazie krzemionki i lipazy, który zachował aktywność katalityczną na poziomie 80-90% w szerokim zakresie pH i temperatur, w połączeniu z ponad 99-proc. nadmiarem enancjomerycznym (S)-ketoprofenu.

Dla porównania, kowalencyjna immobilizacja lipazy z *Pseudomonas fluorescens* na nanocząstkach krzemionki funkcjonalizowanych np. grupami aminowymi pozwoliła uzyskać układ o wyższej stabilności w środowisku niewodnym. Dodatkowe wprowadzenie imidazoliowych cieczy jonowych podczas immobilizacji zapewniło mikrośrodowisko sprzyjające fałdowaniu enzymów i ochronie triady katalitycznej w centrum aktywnym. Ciecze jonowe, takie jak [BMIM]Cl i [BMIM]NTf<sub>2</sub>, tworzyły domeny hydrofobowe, które naśladowały naturalne oddziaływania międzyfazowe, promując w ten sposób aktywację międzyfazową nawet w rozpuszczalnikach organicznych. Powstały system osiągnął 97,4% konwersji przy 79,5-proc. ee pożądanego (S)- produktu, co stanowi unikalny wynik w przypadku reakcji prowadzonej w środowisku niewodnym, jasno pokazując, jak znacznie IL rozszerzają okno operacyjne immobilizowanych lipaz m.in. poprzez zachowanie powłoki hydrofobowej. Odkrycie to jest zgodne z doniesieniami literaturowymi sugerującymi, że IL mogą obniżać entropię konformacyjną enzymów i redukować agregację, utrzymując w ten sposób poziom katalityczny nawet w warunkach wysokich temperatur lub niskiej zawartości wody [153,154].

Z kolei systemy oparte na hydrożelach, zaprojektowane do syntezy (S)-ibuprofenu i (S)-atenololu, uwydatniają uzupełniające się zalety techniki pułapkowania enzymów. W przeciwieństwie do adsorpcji lub wiązania kowalencyjnego, uwięzienie biokatalizatora wewnątrz struktury enzymu zapewnia uwodnioną i elastyczną matrycę, która pozwala na ograniczoną mobilność enzymu zapobiegając jednocześnie jego wypłukiwaniu. Hydrożel przygotowany z kopolimerów poli(akrylamidu) i poli(cieczy jonowej) (PIL-PAM) nie tylko zachował integralność strukturalną, ale także umożliwił zachowanie wysokiej aktywności po kilku cyklach katalitycznych. W przypadku hydrożelu PAM w szczególności, dodatek 5% wag. cieczy jonowej [BMIM]Pf<sub>6</sub>, zwiększył zarówno procent osadzenia enzymu podczas jego immobilizacji, jak i jego stabilność strukturalną, prowadząc do 95-proc. konwersji i >98-proc. ee w syntezie (S)-ibuprofenu. Ciecze jonowe działały jako plastyfikatory, moderując polarność matrycy polimerowej i ułatwiając dyfuzję substratu. Jednocześnie hydrożel PIL-PAM z unieruchomionym enzymem wykorzystany w rozdziale atenololu zapewnił strukturę przestrzenną, która promowała prawidłowe osadzenie enzymu, skutkując uzyskaniem 55-proc. konwersji i 100-proc. ee w syntezie tego związku. Obserwacje te

podkreślają, że skuteczność systemów pułapkowych zależy od osiągnięcia optymalnej równowagi między sztywnością matrycy a występowaniem oporów dyfuzyjnych. Nadmierne usieciowane hydrożelu może bowiem utrudniać transport substratu, a niewystarczająca sztywność może powodować wyciek enzymu lub jego denaturację.

Membrana elektroprzędzona MOF-PVC zawierająca MOF typu UiO-66-NH<sub>2</sub> i IL na bazie cholicy reprezentuje najbardziej zaawansowany nośnik stosowany w badaniach. System ten umożliwił osiągnięcie konwersji rzędu 96% i 93% ee dla (S)-citalopramu. Aktywność układu można przypisać połączeniu porowatości w skali nano, regulowanej hydrofilowości i stabilności mechanicznej. Metalo-organiczna struktura stanowiła rusztowanie o dużej powierzchni do przyłączania enzymów, a elektroprzędzona matryca polimerowa zapewniała sprężystość i przepuszczalność strukturalną. Synergiczne włączenie cieczy jonowych dodatkowo poprawiło dyspersję i stabilność enzymu, o czym świadczy zachowanie ponad 80-proc. aktywności katalitycznej nawet po 30 dniach przechowywania. Mechanistycznie, ta konfiguracja minimalizowała zarówno ograniczenia dyfuzyjne, jak i dezaktywację enzymu poprzez równomierne rozmieszczenie miejsc katalitycznych w całej sieci włókien. Ciecz jonowa stabilizowała oddziaływania wiązań wodorowych między resztami enzymu a grupami MOF, utrzymując niezmienną strukturę przestrzenną lipazy podczas powtarzających się cykli katalitycznych. Taka hybrydyzacja składników nieorganicznych, organicznych i cieczy jonowych stanowi przykład projektowania biokatalizatorów nowej generacji, w którym złożoność strukturalna przekłada się bezpośrednio na wszechstronność funkcjonalną.

Z punktu widzenia porównawczego, ocena wszystkich pięciu systemów łącznie ujawnia kilka kluczowych zależności. Po pierwsze, immobilizacja powszechnie zmniejszała podatność enzymów na zmiany pH i temperatury, odzwierciedlając ochronną rolę nośników w buforowaniu zmian mikrośrodowiska. Po drugie, rodzaj immobilizacji silnie determinował zachowanie katalityczne i tak np. nośniki nieorganiczne sprzyjały długotrwałej stabilności. Po trzecie, wprowadzenie cieczy jonowych konsekwentnie zwiększało zarówno początkową aktywność, jak i trwałość biokatalizatorów, niezależnie od techniki immobilizacji. Wyniki te potwierdzają, że ILs działają nie tylko jako rozpuszczalniki, ale także jako integralne modyfikatory strukturalne, które pośredniczą w interakcjach enzym-nośnik na poziomie molekularnym, a immobilizowane enzymy zachowują wysoką aktywność katalityczną, górując nad wolnymi enzymami.

Immobilizacja ogranicza również zmiany konformacyjne enzymów na dużą skalę, podczas gdy IL zachowują lokalną elastyczność i hydratację biokatalizatorów. Ten podwójny mechanizm stabilizacji pozwala enzymom na wydajne działanie w środowiskach, które w przeciwnym razie indukowałyby denaturację, takich jak rozpuszczalniki organiczne lub podwyższone temperatury. Wyniki niniejszego badania potwierdzają zatem słuszność ram koncepcyjnych inżynierii mikrośrodowiska otrzymywanego biokatalizatora, w których wydajność enzymów jest determinowana nie tylko przez medium reakcyjne, ale także przez oddziaływania nośnika z enzymem.

Z perspektywy przemysłowej, wykazana w niniejszej pracy stabilność operacyjna i możliwość wielokrotnego wykorzystania mają istotne implikacje dla biokatalitycznej produkcji API na dużą skalę. Zdolność unieruchomionych enzymów do zachowania ok. 80-proc. aktywności po wielu cyklach reakcyjnych przekłada się na znaczne oszczędności kosztów poprzez zmniejszenie zużycia enzymów. Ponadto wysokie wartości enancjoselektywności (>95% ee w większości testowanych systemów) spełniają rygorystyczne wymagania dotyczące czystości dla półproduktów farmaceutycznych i API, zmniejszając potrzebę zwracania produktów reakcji czy dalszej separacji chiralnej. Stabilność wytworzonych biokatalizatorów umożliwia również ciągłą lub półciągłą pracę w reaktorach ze złożem stałym lub w reaktorze membranowym, gdzie stabilność w warunkach przepływu jest niezbędna. Wśród badanych systemów, kompozyt MOF-PVC jest szczególnie obiecujący w zastosowaniach z przepływem ciągłym ze względu na swoją trwałość mechaniczną i minimalne wymywanie enzymów.

Przedstawione wyniki torują drogę kilku obiecującym kierunkom badań, które powinny być intensywnie rozwijane w przyszłości. Jednym z nich jest koimmobilizacja wielu enzymów na jednym nośniku w celu ułatwienia reakcji kaskadowych, umożliwiając bezpośrednią, wieloetapową syntezę chiralnych leków z wykorzystaniem jednego systemu biokatalitycznego. Innym rozwiązaniem jest integracja opracowanych biokatalizatorów z mikroreaktorami przepływowymi, w których immobilizowane enzymy mogą pracować przy ściśle kontrolowanych czasach retencji i stężeniach substratu. Zastosowanie bardziej ekologicznych, tanich cieczy jonowych pochodzących ze źródeł naturalnych, takich jak ciecze jonowe na bazie choliny zaprezentowane w **Publikacji 5**, mogłoby dodatkowo zwiększyć zgodność prowadzonych procesów z normami środowiskowymi. Wreszcie, połączenie optymalizacji eksperymentalnej

z metodami obliczeniowymi, takimi jak predykcja interakcji enzym-nośnik, otwiera drogę do racjonalnego projektowania wysoce wydajnych biokatalizatorów dostosowanych do konkretnych procesów przemysłowych.

Podsumowując, niniejsze badania dowodzą, że strategiczne połączenie immobilizacji enzymów i stabilizacji za pomocą cieczy jonowych stanowi skuteczne i wszechstronne podejście do poprawy wydajności biokatalitycznej wielu procesów przemysłowych, w tym syntezy API. Systemy opracowane w ramach niniejszego cyklu badań osiągnęły wysoką wydajność katalityczną, wysoką stabilność oraz satysfakcjonująca enancjoselektywność w odniesieniu do szeregu substratów. Przeprowadzone prace i ich rezultaty jednoznacznie potwierdziły i zweryfikowały postawione hipotezy badawcze, zgodnie z którymi immobilizowane enzymy, w szczególności lipazy, wykazują zdolność do katalizowania reakcji syntezy i konwersji substancji farmaceutycznie aktywnych (API).

Wykazano, że właściwości i efektywność uzyskanych układów zależą w dużej mierze od rodzaju nośnika, metody immobilizacji oraz od warunków środowiska reakcji. Odpowiedni dobór parametrów procesu takich jak temperatura, pH, rodzaj rozpuszczalnika, obecność cieczy jonowych czy stopień uwodnienia układu ma kluczowy wpływ na wydajność konwersji, aktywność enzymatyczną oraz enancjomeryczną czystość otrzymywanych produktów. Kontrola mikrośrodowiska biokatalizatora umożliwia ponadto zachowanie natywnej konformacji enzymu i ograniczenie jego denaturacji, co przekłada się na wysoką aktywność i długoterminową stabilność. Osiągnięte wysokie wartości konwersji i nadmiaru enancjomerycznego potwierdzają, że właściwe zaprojektowanie środowiska reakcji oraz systemu enzymatycznego pozwala na pełne wykorzystanie potencjału katalitycznego lipaz.

Najważniejszymi zagadnieniami badawczymi, które rozwiązano w toku tych prac było opracowanie aktywnych układów immobilizowanych enzymów o zachowanej aktywności i stabilności, ustalenie zasad ich praktycznego wykorzystania w syntezie farmaceutycznie aktywnych związków chiralnych oraz określenie korzystnych warunków procesowych zapewniających uzyskanie pożądaných produktów o wysokiej czystości enancjomerycznej (Tabela 13). Opracowane systemy biokatalityczne wykazały, że integracja enzymów z odpowiednio zaprojektowanymi nośnikami, zarówno nieorganicznymi, polimerowymi, jak i hybrydowymi umożliwia uzyskanie trwałych

i wydajnych biokatalizatorów, zdolnych do pracy w szerokim zakresie warunków procesowych.

**Tabela 13.** Wytworzone w trakcie badań układy biokatalityczne oraz ich zastosowanie w reakcjach rozdziału mieszanin racemicznych substancji farmaceutycznie aktywnych, realizowane w ramach cyklu prac rozprawy doktorskiej.

Publikacja	Biokatalizator	Aktywność [%]	Produkt	Konwersja [%]	ee [%]
P1	Immobilizowana lipaza z <i>Aspergillus niger</i> na nanokrzemionce	100 (40°C)	(S)-ketoprofen	51	99,85
P2	Lipaza <i>P. fluorescens</i> immobilizowana kowalencyjnie na funkcjonalizowanej krzemionce + IL ([BMIM]Cl, [BMIM]NTf <sub>2</sub> )	100 (40°C)	(S)-3H3P	97,4	79,5
P3	Hydrożel PAM + 5% IL [BMIM]PF <sub>6</sub> z immobilizowaną lipazą	100 (40°C)	Octan (S)-ibuprofenu	95	>98
P4	Hydrożel PIL-PAM z pułapkowaną lipazą	107 (50°C)	Octan (S)-atenololu	55	100
P5	Membrana MOF-PVC (UiO-66-NH <sub>2</sub> + IL na bazie choliny) z immobilizowaną lipazą	100 (50°C)	Octan (S)-citalopramu	96	93

Wyjaśniając zależności między strukturą materiału, zachowaniem enzymów i efektami katalitycznymi, niniejszy cykl prac przyczynił się nie tylko do rozwoju biokatalizy, ale również do pogłębienia wiedzy o jej zastosowaniach w syntezie API. Wyniki te mają istotne znaczenie dla przyszłych aplikacji biokatalizy w syntezie związków farmaceutycznych, wpisując się w szersze dążenie do zrównoważonej, bezpiecznej i przyjaznej środowisku syntezy chemicznej. Ostatecznie uzyskane zależności podkreślają, że przyszłość biokatalizy przemysłowej leży w projektowaniu układów, w których enzymy są nie tylko wspomagane, ale synergicznie integrowane z funkcjonalnymi materiałami, co pozwala w pełni uwolnić ich potencjał katalityczny i nadać nowy wymiar zielonej chemii w przemyśle farmaceutycznym.

## 7. Bibliografia

- [1] S.M. Jung, H.-J. Zhu, Regulation of Human Hydrolases and Its Implications in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, *Drug Metab Dispos* 52 (2024) 1139-1151. <https://doi.org/10.1124/dmd.123.001609>.
- [2] E. Shukla, A.D. Bendre, S.M. Gaikwad, E. Shukla, A.D. Bendre, S.M. Gaikwad, Hydrolases: The Most Diverse Class of Enzymes, in: *Hydrolases*, IntechOpen, 2022. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102350>.
- [3] F. Ozhelvaci, K. Steczkiewicz,  $\alpha/\beta$  Hydrolases: Toward Unraveling Entangled Classification, *Proteins* 93 (2025) 855-870. <https://doi.org/10.1002/prot.26776>.
- [4] M. Farhan, I.W. Hasani, D.S.R. Khafaga, W.M. Ragab, R.N. Ahmed Kazi, M. Aatif, G. Muteeb, Y.A. Fahim, Enzymes as Catalysts in Industrial Biocatalysis: Advances in Engineering, Applications, and Sustainable Integration, *Catalysts* 15 (2025) 891. <https://doi.org/10.3390/catal15090891>.
- [5] D. Sutay Kocabaş, J. Lyne, Z. Ustunol, Hydrolytic enzymes in the dairy industry: Applications, market and future perspectives, *Trends in Food Science & Technology* 119 (2022) 467-475. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.013>.
- [6] X. Liu, C. Kokare, Chapter 11 - Microbial Enzymes of Use in Industry, in: G. Brahmachari (Ed.), *Biotechnology of Microbial Enzymes*, Academic Press, 2017: pp. 267-298. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X>.
- [7] J.J. Garrido-González, E. Sánchez-Santos, A. Habib, Á.V. Cuevas Ferreras, F. Sanz, J.R. Morán, Á.L. Fuentes de Arriba, Transesterification of Non-Activated Esters Promoted by Small Molecules Mimicking the Active Site of Hydrolases, *Angewandte Chemie* 134 (2022) e202206072. <https://doi.org/10.1002/ange.202206072>.
- [8] L. Porto de Souza Vandenberghe, S.G. Karp, M.G. Binder Pagnoncelli, M. von Linsingen Tavares, N. Libardi Junior, K. Valladares Diestra, J.A. Viesser, C.R. Soccol, Chapter 2 - Classification of enzymes and catalytic properties, in: S.P. Singh, A. Pandey, R.R. Singhanian, C. Larroche, Z. Li (Eds.), *Biomass, Biofuels, Biochemicals*, Elsevier, (2020) pp. 11-30. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819820-9.00002-8>.
- [9] H. Treichel, D. de Oliveira, M.A. Mazutti, M. Di Luccio, J.V. Oliveira, A Review on Microbial Lipases Production, *Food Bioprocess Technol* 3 (2010) 182-196. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0202-2>.
- [10] K. Geoffry, R.N. Achur, Screening and production of lipase from fungal organisms, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 14 (2018) 241-253. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.009>.
- [11] F. Hasan, A.A. Shah, A. Hameed, Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme and Microbial Technology* 39 (2006) 235-251. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016>.
- [12] S. Javed, F. Azeem, S. Hussain, I. Rasul, M.H. Siddique, M. Riaz, M. Afzal, A. Kouser, H. Nadeem, Bacterial lipases: A review on purification and characterization, *Prog Biophys Mol Biol* 132 (2018) 23-34. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014>.
- [13] S. Verma, R.N. Choudhary, A.P. Kanadje, U.C. Banerjee, Diversifying Arena of Drug Synthesis: In the Realm of Lipase Mediated Waves of Biocatalysis, *Catalysts* 11 (2021) 1328. <https://doi.org/10.3390/catal11111328>.
- [14] J.-Y. Park, K.-M. Park, Lipase and Its Unique Selectivity: A Mini-Review, *Journal of Chemistry* 2022 (2022) 7609019. <https://doi.org/10.1155/2022/7609019>.
- [15] Santos L., Trends in the Use of Lipases: A Systematic Review and Bibliometric Analysis, (2023), 12(16), 3058 <https://doi.org/10.3390/foods12163058>.

- [16] S. Seth, An insight into plant lipase research - Challenges encountered, *Protein Expression and Purification* (2014) 95. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.11.006>
- [17] H. Chahinian, L. Sarda, Distinction between esterases and lipases: comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases, *Protein Pept Lett* 16 (2009) 1149-1161. <https://doi.org/10.2174/092986609789071333>.
- [18] J. Zhang, Amphiphilic Nanointerface: Inducing the Interfacial Activation for Lipase, *Applied Materials & Interfaces*, (2022). <https://doi.org/10.1021/acsami.2c11500>.
- [19] S. Arana-Peña, N.S. Rios, D. Carballares, L.R.B. Gonçalves, R. Fernandez-Lafuente, Immobilization of lipases via interfacial activation on hydrophobic supports: Production of biocatalysts libraries by altering the immobilization conditions, *Catalysis Today* 362 (2021) 130-140. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.03.059>.
- [20] C. Cheng, T. Jiang, Y. Wu, L. Cui, S. Qin, B. He, Elucidation of lid open and orientation of lipase activated in interfacial activation by amphiphilic environment, *International Journal of Biological Macromolecules* 119 (2018) 1211-1217. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.158>.
- [21] C. Ortiz, M.L. Ferreira, O. Barbosa, J.C.S. dos Santos, R.C. Rodrigues, Á. Berenguer-Murcia, L.E. Briand, R. Fernandez-Lafuente, Novozym 435: the “perfect” lipase immobilized biocatalyst?, *Catal. Sci. Technol.* 9 (2019) 2380-2420. <https://doi.org/10.1039/C9CY00415G>.
- [22] 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). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00016>.
- [23] M. Qiu, S. Dong, Q. Cui, Y. Feng, J. Xuan, Recent Progress in the Mechanism and Engineering of  $\alpha/\beta$  Hydrolases for Chiral Chemical Production, *Catalysts* 13 (2023) 288. <https://doi.org/10.3390/catal13020288>.
- [24] P. Villeneuve, N. Barouh, B. Baréa, G. Piombo, M.C. Figueroa-Espinoza, F. Turon, M. Pina, R. Lago, Chemoenzymatic synthesis of structured triacylglycerols with conjugated linoleic acids (CLA) in central position, *Food Chemistry* 100 (2007) 1443-1452. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.018>.
- [25] Y.H. Chew, L.S. Chua, K.K. Cheng, M.R. Sarmidi, R.A. Aziz, C.T. Lee, Kinetic study on the hydrolysis of palm olein using immobilized lipase, *Biochemical Engineering Journal* 39 (2008) 516-520. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.10.019>.
- [26] V. Dubois, S. Breton, M. Linder, J. Fanni, M. Parmentier, Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential, *European Journal of Lipid Science and Technology* 109 (2007) 710-732. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700040>.
- [27] C.F. Moffat, A.S. McGill, Variability of the composition of fish oils: significance for the diet, *Proceedings of the Nutrition Society* 52 (1993) 441-456. <https://doi.org/10.1079/PNS19930085>.
- [28] M. Kapoor, M.N. Gupta, Lipase promiscuity and its biochemical applications, *Process Biochemistry* 47 (2012) 555-569. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.011>.
- [29] L. Vaysse, A. Ly, G. Moulin, E. Dubreucq, Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous medium, *Enzyme and Microbial Technology* 31 (2002) 648-655. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00166-7](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00166-7).
- [30] M. Berger, M.P. Schneider, Lipases in organic solvents: The fatty acid chain length profile, *Biotechnol Lett* 13 (1991) 641-645. <https://doi.org/10.1007/BF01086319>.
- [31] M. Buchgraber, F. Ulberth, H. Emons, E. Anklam, Triacylglycerol profiling by using chromatographic techniques, *European Journal of Lipid Science and Technology*

- 106 (2004) 621-648. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200400986>.
- [32] The Nomenclature of Lipids, *European Journal of Biochemistry* 79 (1977) 11-21. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11778.x>.
- [33] R.D. Schmid, R. Verger, Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications, *Angewandte Chemie International Edition* 37 (1998) 1608-1633. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19980703\)37:12<1608::AID-ANIE1608>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19980703)37:12<1608::AID-ANIE1608>3.0.CO;2-V).
- [34] Y. Choi, P.-S. Chang, Kinetic modeling of lipase-catalysed hydrolysis of triacylglycerol in a reverse micelle system for the determination of integral stereoselectivity, *Catal. Sci. Technol.* 12 (2022) 2819-2828. <https://doi.org/10.1039/D1CY02182F>.
- [35] J.A. Rodriguez, L.D. Mendoza, F. Pezzotti, N. Vanthuyne, J. Leclaire, R. Verger, G. Buono, F. Carriere, F. Fotiadu, Novel chromatographic resolution of chiral diacylglycerols and analysis of the stereoselective hydrolysis of triacylglycerols by lipases, *Analytical Biochemistry* 375 (2008) 196-208. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.11.036>.
- [36] P. Chandra, Enespa, R. Singh, P.K. Arora, Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review, *Microbial Cell Factories* 19 (2020) 169. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>.
- [37] M.J. Dröge, R. Bos, H.J. Woerdenbag, W.J. Quax, Chiral gas chromatography for the determination of 1,2-O-isopropylidene-sn-glycerol stereoisomers, *Journal of Separation Science* 26 (2003) 771-776. <https://doi.org/10.1002/jssc.200301509>.
- [38] K.N. Ingenbosch, A. Rousek, D.S. Wunschik, K. Hoffmann-Jacobsen, A fluorescence-based activity assay for immobilized lipases in non-native media, *Analytical Biochemistry* 569 (2019) 22-27. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.01.005>.
- [39] P. Borowiecki, D. Paprocki, M. Dranka, First chemoenzymatic stereodivergent synthesis of both enantiomers of promethazine and ethopropazine, *Beilstein J. Org. Chem.* 10 (2014) 3038-3055. <https://doi.org/10.3762/bjoc.10.322>.
- [40] P. Choudhury, Industrial application of lipase: a review, *BioPharm* 1 (2015) 41-47. [https://www.researchgate.net/profile/Payel\\_Choudhury\\_nit\\_Agartala/publication/293133846\\_Industrial\\_application\\_of\\_lipase\\_a\\_review/links/6049b1efa6fdcc4d3e56078f/Industrial-application-of-lipase-a-review.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Payel_Choudhury_nit_Agartala/publication/293133846_Industrial_application_of_lipase_a_review/links/6049b1efa6fdcc4d3e56078f/Industrial-application-of-lipase-a-review.pdf)
- [41] A.L. Reyes-Reyes, F. Valero Barranco, G. Sandoval, Recent Advances in Lipases and Their Applications in the Food and Nutraceutical Industry, *Catalysts* 12 (2022) 960. <https://doi.org/10.3390/catal12090960>.
- [42] I.V. Wolf, C.A. Meinardi, C.A. Zalazar, Production of Flavour Compounds from Fat During Cheese Ripening by Action of Lipases and Esterases, *Protein and Peptide Letters* 16 (2009) 1235-1243. <https://doi.org/10.2174/092986609789071289>.
- [43] W. Alkhalaf, J.-C. Piard, M. El Soda, J.-C. Gripon, M. Desmazeaud, L. Vassal, Liposomes as Proteinase Carriers for the Accelerated Ripening of Saint-Paulin Type Cheese, *Journal of Food Science* 53 (1988) 1674-1679. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb07813.x>.
- [44] S. Li, X. Yang, S. Yang, M. Zhu, X. Wang, Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering, *Computational and Structural Biotechnology Journal* 2 (2012) e201209017. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209017>.
- [45] G.G. Haraldsson, P.A. Höskuldsson, S.Th. Sigurdsson, F. Thorsteinsson, S. Gudbjarnason, The preparation of triglycerides highly enriched with  $\omega$ -3 polyunsaturated

- fatty acids *via* lipase catalyzed interesterification, *Tetrahedron Letters* 30 (1989) 1671-1674. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)99550-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)99550-9).
- [46] J.D. Floros, R. Newsome, W. Fisher, G.V. Barbosa-Cánovas, H. Chen, C.P. Dunne, J.B. German, R.L. Hall, D.R. Heldman, M.V. Karwe, S.J. Knabel, T.P. Labuza, D.B. Lund, M. Newell-McGloughlin, J.L. Robinson, J.G. Sebranek, R.L. Shewfelt, W.F. Tracy, C.M. Weaver, G.R. Ziegler, Feeding the World Today and Tomorrow: The Importance of Food Science and Technology, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9 (2010) 572-599. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00127.x>.
- [47] M. Khodadadi, Optimization of Lipase-catalyzed Synthesis of Flaxseed Oil-Based Structured Lipids in Non-Conventional Media - ProQuest, (2012). <https://www.proquest.com/openview/4810a7a5e8132081b2b833cd0954c7c0/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750> (accessed November 1, 2025).
- [48] A. Pettersson, M. Adamsson, G. Dave, Toxicity and detoxification of Swedish detergents and softener products, *Chemosphere* 41 (2000) 1611-1620. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00035-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00035-7).
- [49] V.P. Lailaja, M. Chandrasekaran, Detergent compatible alkaline lipase produced by marine *Bacillus smithii* BTMS 11, *World J Microbiol Biotechnol* 29 (2013) 1349-1360. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1298-0>.
- [50] N.E. Ibrahim, K. Ma, Industrial Applications of Thermostable Enzymes from Extremophilic Microorganisms, *Current Biochemical Engineering (Discontinued)* 4 (2017) 75-98. <https://doi.org/10.2174/2212711904666170405123414>.
- [51] H.G. Hauthal, Types and Typical Ingredients of Detergents, in: *Handbook Of Detergents, Part C*, CRC Press, 2004.
- [52] A. Ben Bacha, A. Al-Assaf, N.M.S. Moubayed, I. Abid, Evaluation of a novel thermo-alkaline *Staphylococcus aureus* lipase for application in detergent formulations, *Saudi Journal of Biological Sciences* 25 (2018) 409-417. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.10.006>.
- [53] E. Vanleeuw, S. Winderickx, K. Thevissen, B. Lagrain, M. Dusselier, B.P.A. Cammue, B.F. Sels, Substrate-Specificity of *Candida rugosa* Lipase and Its Industrial Application, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 7 (2019) 15828-15844. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b03257>.
- [54] T.L. Volke-Sepúlveda, M. Gutiérrez-Rojas, E. Favela-Torres, Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentations by *Aspergillus niger*, *Bioresource Technology* 87 (2003) 81-86. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00207-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00207-9).
- [55] A.B. Al-Hawash, M.A. Dragh, S. Li, A. Alhujaily, H.A. Abbood, X. Zhang, F. Ma, Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment, *Egyptian Journal of Aquatic Research* 44 (2018) 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.001>.
- [56] K.C. Badgular, B.M. Bhanage, Lipase immobilization on hydroxypropyl methyl cellulose support and its applications for chemo-selective synthesis of  $\beta$ -amino ester compounds, *Process Biochemistry* 51 (2016) 1420-1433. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.008>.
- [57] A. Sadaf, J. Grewal, I. Jain, A. Kumari, S.K. Khare, Stability and structure of *Penicillium chrysogenum* lipase in the presence of organic solvents, *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 48 (2018) 977-982. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1525566>.
- [58] M.M. Fiume, B.A. Heldreth, W.F. Bergfeld, D.V. Belsito, R.A. Hill, C.D. Klaassen, D.C. Liebler, J.G. Marks Jr, R.C. Shank, T.J. Slaga, P.W. Snyder, F.A.

- Andersen, Safety Assessment of Alkyl Esters as Used in Cosmetics, *Int J Toxicol* 34 (2015) 5S-69S. <https://doi.org/10.1177/1091581815594027>.
- [59] R.N. Vadgama, A.A. Odaneth, A.M. Lali, Green synthesis of isopropyl myristate in novel single phase medium Part I: Batch optimization studies, *Biotechnology Reports* 8 (2015) 133-137. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.10.006>.
- [60] O. Thum, Enzymatic Production of Care Specialties Based on Fatty Acid Esters, *Tenside Surfactants Detergents* 41 (2004) 287-290. <https://doi.org/10.3139/113.100235>.
- [61] E.M. Anderson, K.M. Larsson, O. Kirk, One Biocatalyst-Many Applications: The Use of *Candida Antarctica B*-Lipase in Organic Synthesis, *Biocatalysis and Biotransformation* 16 (1998) 181-204. <https://doi.org/10.3109/10242429809003198>.
- [62] A. Mehta, S. Guleria, R. Sharma, R. Gupta, 6 - The lipases and their applications with emphasis on food industry, in: R.C. Ray (Ed.), *Microbial Biotechnology in Food and Health*, Academic Press, 2021: pp. 143-164. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819813-1.00006-2>.
- [63] B.H. Kim, J. Hwang, C.C. Akoh, Liquid microbial lipase — recent applications and expanded use through immobilization, *Current Opinion in Food Science* 50 (2023) 100987. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2023.100987>.
- [64] Y.A. Fahim, A.M. El-Khawaga, R.M. Sallam, M.A. Elsayed, M.F.A. Assar, A Review on Lipases: Sources, Assays, Immobilization Techniques on Nanomaterials and Applications, *BioNanoSci.* 14 (2024) 1780-1797. <https://doi.org/10.1007/s12668-024-01319-x>.
- [65] W. Shuai, A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, (2016). <https://doi.org/10.1002/bab.1515>.
- [66] Y.R. Maghraby, R.M. El-Shabasy, A.H. Ibrahim, H.M.E.-S. Azzazy, Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications, *ACS Omega* 8 (2023) 5184-5196. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>.
- [67] D. Brady, J. Jordaan, Advances in enzyme immobilisation, *Biotechnol Lett* 31 (2009) 1639-1650. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0076-4>.
- [68] B.D. Ribeiro, A.M. de Castro, M.A.Z. Coelho, D.M.G. Freire, Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production, *Enzyme Research* 2011 (2011) 615803. <https://doi.org/10.4061/2011/615803>.
- [69] M. Razzaghi, A. Homaei, F. Vianello, T. Azad, T. Sharma, A.K. Nadda, R. Stevanato, M. Bilal, H.M.N. Iqbal, Industrial applications of immobilized nanobiocatalysts, *Bioprocess Biosyst Eng* 45 (2022) 237-256. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02647-y>.
- [70] A.A. Homaei, R. Sariri, F. Vianello, R. Stevanato, Enzyme immobilization: an update, *J Chem Biol* 6 (2013) 185-205. <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9>.
- [71] S. Gao, Y. Wang, X. Diao, G. Luo, Y. Dai, Effect of pore diameter and cross-linking method on the immobilization efficiency of *Candida rugosa* lipase in SBA-15, *Bioresource Technology* 101 (2010) 3830-3837. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.023>.
- [72] V. Chauhan, D. Kaushal, V.K. Dhiman, S.S. Kanwar, D. Singh, V.K. Dhiman, H. Pandey, An Insight in Developing Carrier-Free Immobilized Enzymes, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10 (2022). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.794411>.
- [73] J. Qian, A. Huang, H. Zhu, J. Ding, W. Zhang, Y. Chen, Immobilization of lipase on silica nanoparticles by adsorption followed by glutaraldehyde cross-linking, *Bioprocess Biosyst Eng* 46 (2023) 25-38. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02810-z>.

- [74] N.R. Mohamad, N.H.C. Marzuki, N.A. Buang, F. Huyop, R.A. Wahab, An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes, *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 29 (2015) 205-220. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>.
- [75] E. Kurzbaum, Y. Raizner, M.E. Kuc, A. Kulikov, B. Hakimi, L.I. Kruh, O. Menashe, Phenol biodegradation by bacterial cultures encapsulated in 3D microfiltration-membrane capsules, *Environmental Technology* 41 (2020) 2875-2883. <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1587005>.
- [76] H. Hu, W. Lu, S. Li, X. Zhou, C. Zhu, X. Wang, H. Dai, H. Geng, Hydrogel-based materials for microbial/enzyme immobilization: Advanced applications in wastewater treatment, *Chemical Engineering Journal* 511 (2025) 161878. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2025.161878>.
- [77] C. Rother, B. Nidetzky, Enzyme Immobilization by Microencapsulation: Methods, Materials, and Technological Applications, in: *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, John Wiley & Sons, Ltd, 2014: pp. 1-21. <https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib275>.
- [78] Y.-K. Cen, Y.-X. Liu, Y.-P. Xue, Y.-G. Zheng, Immobilization of Enzymes in/on Membranes and their Applications, *Advanced Synthesis & Catalysis* 361 (2019) 5500-5515. <https://doi.org/10.1002/adsc.201900439>.
- [79] M.S. Robescu, T. Bavaro, A Comprehensive Guide to Enzyme Immobilization: All You Need to Know, *Molecules* 30 (2025) 939. <https://doi.org/10.3390/molecules30040939>.
- [80] J.M. Guisan, New Opportunities for Immobilization of Enzymes, in: J.M. Guisan (Ed.), *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition*, Humana Press, Totowa, NJ, 2013: pp. 1-13. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_1).
- [81] T. Jesionowski, J. Zdarta, B. Krajewska, Enzyme immobilization by adsorption: a review, *Adsorption* 20 (2014) 801-821. <https://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y>.
- [82] S.N.H. Ishak, A.H.M. Saad, W. Latip, R.N.Z.R.A. Rahman, A.B. Salleh, N.H.A. Kamarudin, A.T.C. Leow, M.S.M. Ali, Enhancing industrial biocatalyst performance and cost-efficiency through adsorption-based enzyme immobilization: A review, *Int J Biol Macromol* 316 (2025) 144278. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.144278>.
- [83] Q. Hanniet, C. Mateos, L. Onillon, A. Maccow, T. Gefflaut, M. Hall, T. Reiter, M. Bordeaux, N. Brun, J. Drone, Innovative carrier materials for advancing enzyme immobilization in industrial biocatalysis, *Comptes Rendus. Chimie* 28 (2025) 543-559. <https://doi.org/10.5802/crchim.397>.
- [84] F.L.C. Almeida, A.S. Prata, M.B.S. Forte, Enzyme immobilization: what have we learned in the past five years?, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 16 (2022) 587-608. <https://doi.org/10.1002/bbb.2313>.
- [85] A.M. Girelli, M.L. Astolfi, F.R. Scuto, Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review, *Chemosphere* 244 (2020) 125368. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125368>.
- [86] G. Modi, D. Gupta, Polymer-Based Strategies for Enzyme Immobilization: A Comprehensive Review, *Tuijin Jishu/Journal of Propulsion Technology* 44 (2023) 792-802.
- [87] A.H. Rather, R.S. Khan, T.U. Wani, M.A. Beigh, F.A. Sheikh, Overview on immobilization of enzymes on synthetic polymeric nanofibers fabricated by electrospinning, *Biotechnology and Bioengineering* 119 (2022) 9-33. <https://doi.org/10.1002/bit.27963>.

- [88] S.B. Sigurdardóttir, J. Lehmann, S. Ovtar, J.-C. Grivel, M.D. Negra, A. Kaiser, M. Pinelo, Enzyme Immobilization on Inorganic Surfaces for Membrane Reactor Applications: Mass Transfer Challenges, Enzyme Leakage and Reuse of Materials, *Advanced Synthesis & Catalysis* 360 (2018) 2578-2607. <https://doi.org/10.1002/adsc.201800307>.
- [89] J. Kujawa, M. Głodek, G. Li, S. Al-Gharabli, K. Knozowska, W. Kujawski, Highly effective enzymes immobilization on ceramics: Requirements for supports and enzymes, *Science of The Total Environment* 801 (2021) 149647. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149647>.
- [90] W. Tang, H. Li, W. Zhang, T. Ma, J. Zhuang, P. Wang, C. Chen, Site-Specific and Covalent Immobilization of Lipase on Natural Polyphenol-Modified Magnetic Nanoparticles for Effective Biodiesel Production, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 10 (2022) 5384-5395. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c07881>.
- [91] A. Costantini, V. Califano, Lipase Immobilization in Mesoporous Silica Nanoparticles for Biofuel Production, *Catalysts* 11 (2021) 629. <https://doi.org/10.3390/catal11050629>.
- [92] O. Degórska, J. Zdarta, K. Synoradzki, A. Zgoła-Grzeškowiak, F. Ciesielczyk, T. Jesionowski, From core-shell like structured zirconia/magnetite hybrid towards novel biocatalytic systems for tetracycline removal: Synthesis, enzyme immobilization, degradation and toxicity study, *Journal of Environmental Chemical Engineering* 9 (2021) 105701. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105701>.
- [93] Y.A. Fahim, A.M. El-Khawaga, R.M. Sallam, M.A. Elsayed, M.F.A. Assar, Immobilized lipase enzyme on green synthesized magnetic nanoparticles using Psidium guava leaves for dye degradation and antimicrobial activities, *Sci Rep* 14 (2024) 8820. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58840-y>.
- [94] M.V. Ratnam, S. Narasimha Reddy, K. Senthil Kumar, K. Nagamalleswara Rao, N. Rajpal, Exploring the potential of magnetic nanoparticles in lipase immobilization for enhanced biodiesel production: a comprehensive review, *Biofuels* 0 (n.d.) 1-23. <https://doi.org/10.1080/17597269.2025.2528320>.
- [95] A. Badoei-dalfard, A. Shahba, F. Zaare, G. Sargazi, B. Seyedalipour, Z. Karami, Lipase immobilization on a novel class of Zr-MOF/electrospun nanofibrous polymers: Biochemical characterization and efficient biodiesel production, *International Journal of Biological Macromolecules* 192 (2021) 1292-1303. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.106>.
- [96] H. Suo, H. Geng, L. Zhang, G. Liu, H. Yan, R. Cao, J. Zhu, Y. Hu, L. Xu, Covalent immobilization of lipase on an ionic liquid-functionalized magnetic Cu-based metal-organic framework with boosted catalytic performance in flavor ester synthesis, *Journal of Materials Chemistry B* 11 (2023) 1302-1311. <https://doi.org/10.1039/D2TB02246J>.
- [97] V.G. Matveeva, L.M. Bronstein, Magnetic Nanoparticle-Containing Supports as Carriers of Immobilized Enzymes: Key Factors Influencing the Biocatalyst Performance, *Nanomaterials* 11 (2021) 2257. <https://doi.org/10.3390/nano11092257>.
- [98] J. Bié, B. Sepodes, P.C.B. Fernandes, M.H.L. Ribeiro, Enzyme Immobilization and Co-Immobilization: Main Framework, Advances and Some Applications, *Processes* 10 (2022) 494. <https://doi.org/10.3390/pr10030494>.
- [99] N.A. Mohidem, M. Mohamad, M.U. Rashid, M.N. Norizan, F. Hamzah, H. bin Mat, Recent Advances in Enzyme Immobilisation Strategies: An Overview of Techniques and Composite Carriers, *Journal of Composites Science* 7 (2023) 488. <https://doi.org/10.3390/jcs7120488>.

- [100] M. Chalella Mazzocato, J.-C. Jacquier, Recent Advances and Perspectives on Food-Grade Immobilisation Systems for Enzymes, *Foods* 13 (2024) 2127. <https://doi.org/10.3390/foods13132127>.
- [101] L. Ji, M. Chen, W. Zhang, B. Nian, Y. Hu, Comprehensive applications of ionic liquids in enzyme immobilization: Current status and prospects, *Molecular Catalysis* 552 (2024) 113675. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2023.113675>.
- [102] M. Tadesse, Y. Liu, Recent Advances in Enzyme Immobilization: The Role of Artificial Intelligence, Novel Nanomaterials, and Dynamic Carrier Systems, *Catalysts* 15 (2025) 571. <https://doi.org/10.3390/catal15060571>.
- [103] J.M. Bolivar, J.M. Woodley, R. Fernandez-Lafuente, Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization, *Chem. Soc. Rev.* 51 (2022) 6251-6290. <https://doi.org/10.1039/D2CS00083K>.
- [104] J. Boudrant, J.M. Woodley, R. Fernandez-Lafuente, Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation, *Process Biochemistry* 90 (2020) 66-80. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.026>.
- [105] D.S. Rajendran, S. Venkataraman, P.S. Kumar, G. Rangasamy, T. Bhattacharya, D.-V. Nguyen Vo, V.K. Vaithyanathan, H. Cabana, V.V. Kumar, Coimmobilized enzymes as versatile biocatalytic tools for biomass valorization and remediation of environmental contaminants - A review, *Environmental Research* 214 (2022) 114012. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114012>.
- [106] E.L. Bell, W. Finnigan, S.P. France, A.P. Green, M.A. Hayes, L.J. Hepworth, S.L. Lovelock, H. Niikura, S. Osuna, E. Romero, K.S. Ryan, N.J. Turner, S.L. Flitsch, *Biocatalysis*, *Nat Rev Methods Primers* 1 (2021) 46. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00044-z>.
- [107] A. Kinner, P. Nerke, R. Siedentop, T. Steinmetz, T. Classen, K. Rosenthal, M. Nett, J. Pietruszka, S. Lütz, Recent Advances in Biocatalysis for Drug Synthesis, *Biomedicines* 10 (2022) 964. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10050964>.
- [108] N. Zhang, P. Domínguez de María, S. Kara, Biocatalysis for the Synthesis of Active Pharmaceutical Ingredients in Deep Eutectic Solvents: State-of-the-Art and Prospects, *Catalysts* 14 (2024) 84. <https://doi.org/10.3390/catal14010084>.
- [109] R. Buller, S. Lutz, R.J. Kazlauskas, R. Snajdrova, J.C. Moore, U.T. Bornscheuer, From nature to industry: Harnessing enzymes for biocatalysis, *Science* 382 (2023) eadh8615. <https://doi.org/10.1126/science.adh8615>.
- [110] J.M. Woodley, New Horizons for Biocatalytic Science, *Front. Catal.* 2 (2022). <https://doi.org/10.3389/ftcls.2022.883161>.
- [111] The Role of Chirality in Drug Design and Delivery: A Comprehensive Review - *Acta Pharma Reports | Journal* |, (n.d.). <https://pharma.researchfloor.org/the-role-of-chirality-in-drug-design-and-delivery-a-comprehensive-review/> (accessed October 31, 2025).
- [112] S. Peng, Y. Zhu, C. Luo, P. Zhang, F. Wang, R. Li, G. Lin, J. Zhang, Chiral drugs: Sources, absolute configuration identification, pharmacological applications, and future research trends, *LabMed Discovery* 1 (2024) 100008. <https://doi.org/10.1016/j.lmd.2024.100008>.
- [113] A.D. Woolf, Chapter 2.4 - Thalidomide tragedy, 1950s, in: A.D. Woolf (Ed.), *History of Modern Clinical Toxicology*, Academic Press, 2022: pp. 165-175. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822218-8.00058-2>.
- [114] P. Beninger, Thalidomide: Following Tragedy, a Repurposed Molecule With

- Continuing Opportunities for Clinical Benefit, *Clinical Therapeutics* 47 (2025) 249-251. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2025.01.011>.
- [115] A. Witczyńska, Ł. Fijałkowski, D. Mirowska-Guzel, K. Blecharz-Klin, A. Nowaczyk, Structural and Pharmacological Insights into Propranolol: An Integrated Crystallographic Perspective, *International Journal of Molecular Sciences* 26 (2025) 10080. <https://doi.org/10.3390/ijms262010080>.
- [116] J. Liu, K.E. Smith, R.R. Riker, W.Y. Craig, D.J. McKelvy, H.D. Kemp, S.D. Nichols, G.L. Fraser, Methadone bioavailability and dose conversion implications with intravenous and enteral administration: A scoping review, *Am J Health Syst Pharm* 78 (2021) 1395-1401. <https://doi.org/10.1093/ajhp/zxab166>.
- [117] S. Mahaboob, G.N.K. Ganesh, K.P. Arun, S.D. Rajendran, Various Factors Influencing the Enantiomers of Warfarin Pharmacokinetics: A Systematic Review of Population Pharmacokinetics, *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* 14 (2023) 178-186. <https://doi.org/10.1177/0976500X231211401>.
- [118] V.K. Vashistha, S. Sethi, I. Tyagi, D.K. Das, Chirality of antidepressive drugs: an overview of stereoselectivity, *Asian Biomedicine* 16 (2022) 55-69. <https://doi.org/10.2478/abm-2022-0008>.
- [119] A. Calcaterra, I. D'Acquarica, The market of chiral drugs: Chiral switches versus *de novo* enantiomerically pure compounds, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 147 (2018) 323-340. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.008>.
- [120] A. Gaucherand, E. Yen-Pon, A. Domain, A. Bourhis, J. Rodriguez, D. Bonne, Enantioselective synthesis of molecules with multiple stereogenic elements, *Chemical Society Reviews* 53 (2024) 11165-11206. <https://doi.org/10.1039/D3CS00238A>.
- [121] F. Hollmann, D.J. Opperman, C.E. Paul, Biocatalytic Reduction Reactions from a Chemist's Perspective, *Angewandte Chemie International Edition* 60 (2021) 5644-5665. <https://doi.org/10.1002/anie.202001876>.
- [122] C.K. Winkler, J.H. Schrittwieser, W. Kroutil, Power of Biocatalysis for Organic Synthesis, *ACS Cent Sci* 7 (2021) 55-71. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01496>.
- [123] Y. Ding, Redesigning Enzymes for Biocatalysis: Exploiting Structural Understanding for Improved Selectivity, (2022). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.908285>.
- [124] R. Mu, Application of Enzymes in Regioselective and Stereoselective Organic Reactions, (2020). <https://doi.org/10.3390/catal10080832>.
- [125] D. Yi, T. Bayer, C.P. S. Badenhorst, S. Wu, M. Doerr, M. Höhne, U. T. Bornscheuer, Recent trends in biocatalysis, *Chemical Society Reviews* 50 (2021) 8003-8049. <https://doi.org/10.1039/D0CS01575J>.
- [126] R.A. Sheldon, D. Brady, Green Chemistry, Biocatalysis, and the Chemical Industry of the Future, *ChemSusChem* 15 (2022). <https://doi.org/10.1002/cssc.202102628>.
- [127] A. Cabre, Recent Advances in the Enantioselective Synthesis of Chiral Amines via Transition Metal-Catalyzed Asymmetric Hydrogenation, *Chemical Reviews*, (2021). <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.1c00496>.
- [128] S. Mao, J. Jiang, K. Xiong, Y. Chen, Y. Yao, L. Liu, H. Liu, X. Li, Enzyme Engineering: Performance Optimization, Novel Sources, and Applications in the Food Industry, *Foods* 13 (2024) 3846. <https://doi.org/10.3390/foods13233846>.
- [129] A. Sen, J. Oswalia, S. Yadav, M. Vachher, A. Nigam, Recent trends in nanozyme research and their potential therapeutic applications, *Current Research in Biotechnology* 7 (2024) 100205. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2024.100205>.

- [130] G. Rossino, M.S. Robescu, E. Licastro, C. Tedesco, I. Martello, L. Maffei, G. Vincenti, T. Bavaro, S. Collina, Biocatalysis: A smart and green tool for the preparation of chiral drugs, *Chirality* 34 (2022) 1403-1418. <https://doi.org/10.1002/chir.23498>.
- [131] X.-E. Guan, R.-P. Miao, X. Hua, X. Jin, G.-Z. Deng, B.-D. Cui, W.-Y. Han, N.-W. Wan, Y.-Z. Chen, Biocatalytic Enantioselective Synthesis of Chiral  $\beta$ -Hydroxy Nitriles Using Cyanohydrins as Cyano Sources, *ACS Catal.* 13 (2023) 13597-13606. <https://doi.org/10.1021/acscatal.3c03173>.
- [132] G. de Gonzalo, A.R. Alcántara, P. Domínguez de María, J.M. Sánchez-Montero, Biocatalysis for the asymmetric synthesis of Active Pharmaceutical Ingredients (APIs): this time is for real, *Expert Opinion on Drug Discovery* 17 (2022) 1159-1171. <https://doi.org/10.1080/17460441.2022.2114453>.
- [133] F.M.W.G. Silva, J. Szemes, A. Mustashev, O. Takács, A.O. Imarah, L. Poppe, Immobilization of Lipase B from *Candida antarctica* on Magnetic Nanoparticles Enhances Its Selectivity in Kinetic Resolutions of Chiral Amines with Several Acylating Agents, *Life* 13 (2023) 1560. <https://doi.org/10.3390/life13071560>.
- [134] O. Verho, J.-E. Bäckvall, Chemoenzymatic Dynamic Kinetic Resolution: A Powerful Tool for the Preparation of Enantiomerically Pure Alcohols and Amines, *J Am Chem Soc* 137 (2015) 3996-4009. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b01031>.
- [135] M.L. Foresti, M. Galle, M.L. Ferreira, L.E. Briand, Enantioselective esterification of ibuprofen with ethanol as reactant and solvent catalyzed by immobilized lipase: experimental and molecular modeling aspects, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 84 (2009) 1461-1473. <https://doi.org/10.1002/jctb.2200>.
- [136] S.-Z. Wang, J.-P. Wu, G. Xu, L.-R. Yang, Chemo-enzymatic asymmetric synthesis of S-citalopram by lipase-catalyzed cyclic resolution and stereoinversion of quaternary stereogenic center, *Bioprocess Biosyst Eng* 36 (2013) 1031-1037. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0855-5>.
- [137] C.A. Martinez, S. Hu, Y. Dumond, J. Tao, P. Kelleher, L. Tully, Development of a Chemoenzymatic Manufacturing Process for Pregabalin, *Org. Process Res. Dev.* 12 (2008) 392-398. <https://doi.org/10.1021/op7002248>.
- [138] R.-C. Zheng, L.-T. Ruan, H.-Y. Ma, X.-L. Tang, Y.-G. Zheng, Enhanced activity of *Thermomyces lanuginosus* lipase by site-saturation mutagenesis for efficient biosynthesis of chiral intermediate of pregabalin, *Biochemical Engineering Journal* 113 (2016) 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.05.007>.
- [139] A. Schülé, A. Merschaert, C. Szczepaniak, C. Maréchal, N. Carly, J. O'Rourke, C. Ates, A Biocatalytic Route to the Novel Antiepileptic Drug Brivaracetam, *Org. Process Res. Dev.* 20 (2016) 1566-1575. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.6b00094>.
- [140] J.-W. Shen, J.-M. Qi, X.-J. Zhang, Z.-Q. Liu, Y.-G. Zheng, Significantly increased catalytic activity of *Candida antarctica* lipase B for the resolution of cis-( $\pm$ )-dimethyl 1-acetylpiperidine-2,3-dicarboxylate, *Catal. Sci. Technol.* 8 (2018) 4718-4725. <https://doi.org/10.1039/C8CY01340C>.
- [141] J.-W. Shen, J.-M. Qi, X.-J. Zhang, Z.-Q. Liu, Y.-G. Zheng, Efficient Resolution of cis-( $\pm$ )-Dimethyl 1-Acetylpiperidine-2,3-dicarboxylate by Covalently Immobilized Mutant *Candida antarctica* Lipase B in Batch and Semicontinuous Modes, *Org. Process Res. Dev.* 23 (2019) 1017-1025. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.9b00066>.
- [142] D. Estrada-Valenzuela, V.H. Ramos-Sánchez, G. Zaragoza-Galán, J.C. Espinoza-Hicks, A. Bugarin, D. Chávez-Flores, Lipase Assisted (S)-Ketoprofen Resolution from Commercially Available Racemic Mixture, *Pharmaceuticals* 14 (2021) 996. <https://doi.org/10.3390/ph14100996>.

- [143] S. Salgın, M. Çakal, U. Salgın, Kinetic resolution of racemic naproxen methyl ester by magnetic and non-magnetic cross-linked lipase aggregates, *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 50 (2020) 148-155. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1679178>.
- [144] S. Takaç, M. Bakkal, Impressive effect of immobilization conditions on the catalytic activity and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase toward S-Naproxen production, *Process Biochemistry* 42 (2007) 1021-1027. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.03.013>.
- [145] M.B. Hansen, A.L. Tennfjord, F.H. Blindheim, L.H.Y. Bocquin, E.E. Jacobsen, Synthesis of Enantiopure (S)-Atenolol by Utilization of Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of a Key Intermediate, *International Journal of Molecular Sciences* 25 (2024) 3497. <https://doi.org/10.3390/ijms25063497>.
- [146] S. Soni, B.P. Dwivedee, U.C. Banerjee, Facile fabrication of a recyclable nanobiocatalyst: immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase on carbon nanofibers for the kinetic resolution of a racemic atenolol intermediate, *RSC Adv.* 8 (2018) 27763-27774. <https://doi.org/10.1039/C8RA05463K>.
- [147] A. Sikora, D. Chelminiak-Dudkiewicz, M. Ziegler-Borowska, M.P. Marszał, Enantioseparation of (RS)-atenolol with the use of lipases immobilized onto newly synthesized magnetic nanoparticles, *Tetrahedron: Asymmetry* 28 (2017) 374-380. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2017.01.012>.
- [148] O. Barbosa, C. Ariza, C. Ortiz, R. Torres, Kinetic resolution of (*R/S*)-propranolol (1-isopropylamino-3-(1-naphthoxy)-2-propanolol) catalyzed by immobilized preparations of *Candida antarctica* lipase B (CAL-B), *New Biotechnology* 27 (2010) 844-850. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.07.015>.
- [149] M. Rajin, A. Zulkifli, S. Abang, S.M. Annissuzzaman, A.H. Kamaruddin, Effect of Reaction Parameters on the Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of (RS)-Metoprolol, *ASEAN Journal of Chemical Engineering* (2020) 20-30.
- [150] H. Fazlena, A.H. Kamaruddin, M.M.D. Zulkali, Dynamic kinetic resolution: alternative approach in optimizing S-ibuprofen production, *Bioprocess Biosyst Eng* 28 (2006) 227-233. <https://doi.org/10.1007/s00449-005-0024-1>.
- [151] 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 Biochemistry* 95 (2020) 174-185. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.02.007>.
- [152] A.A. Khachatrian, T.A. Mukhametzhanov, R.Z. Salikhov, A.E. Klimova, D.G. Yakhvarov, B.F. Garifullin, O.S. Terenteva, P.L. Padnya, I.I. Stoikov, B.N. Solomonov, Cholinium-Based Ionic Liquids Modulate Protein Stability: A Comparative Study of Enzymes and Albumins, *Molecules* 30 (2025) 1574. <https://doi.org/10.3390/molecules30071574>.
- [153] T.E. Harrar, B. Frieg, M.D. Davari, K.-E. Jaeger, U. Schwaneberg, H. Gohlke, Aqueous ionic liquids redistribute local enzyme stability via long-range perturbation pathways, *Computational and Structural Biotechnology Journal* 19 (2021) 4248-4264. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.07.001>.

## 8. Opis osiągnięć naukowych

Efektom realizacji studiów doktoranckich jest dorobek naukowy obejmujący 14 artykułów naukowych opublikowanych w renomowanych czasopismach międzynarodowych (łączny IF: 84,9) oraz 13 wystąpień konferencyjnych na konferencjach krajowych i zagranicznych. Publikacje obejmowały zarówno zagadnienia bezpośrednio związane z tematyką pracy doktorskiej, jak i projekty realizowane poza jej zakresem, ale w bezpośrednim kontekście tematyki doktoratu. Badania koncentrowały się na zastosowaniu biokatalizatorów w syntezie farmaceutycznie aktywnych substancji, procesach środowiskowych oraz opracowywaniu innowacyjnych materiałów nośnikowych dla enzymów. Efektom tych działań są artykuły naukowe opublikowane w czasopismach takich jak *International Journal of Biological Macromolecules*, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *Pharmaceutics*, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *Molecules* czy *International Journal of Molecular Sciences*.

Wyniki zrealizowanych badań zostały także szeroko zaprezentowane na konferencjach naukowych o zasięgu krajowym i międzynarodowym. Autorka prezentowała swoje osiągnięcia m.in. podczas Green Technology for Sustainable Environment, 6th Symposium on Biotransformations for Pharmaceutical and Cosmetic Industry (Kraków, 2024), 7th International Conference on Ionic Liquid-Based Materials (Porto, 2023), International Caparica Conference on Pollutant Toxic Ions and Molecules (Lizbona, 2021), a także na licznych konferencjach krajowych, takich jak Enzymos, BioOrg, czy PUTChemikon. Prezentacje, zarówno ustne, jak i posterowe, dotyczyły zagadnień biokatalizy, stabilizacji enzymów, syntezy substancji leczniczych oraz nowoczesnych technologii środowiskowych.

Doświadczenie badawcze zostało wzbogacone poprzez udział w licznych stażach naukowych w kraju i za granicą. W ramach programów Erasmus+, ORBIS i NAWA STER odbyto m.in. staże na University of Ljubljana (Słowenia) (łącznie 6 miesięcy), University of Technology Sydney (Australia) (3 miesiące) oraz w firmie farmaceutycznej APC Ltd w Dublinie (Irlandia) (2,5 miesiąca), gdzie realizowano projekty związane z opracowywaniem biokatalizatorów i syntezą substancji czynnych farmaceutycznie. Dodatkowe doświadczenie zdobyto również na Poznańskim Uniwersytecie Medycznym

(1 miesiąc), pracując nad nowoczesnymi systemami dostarczania leków, w tym z zastosowaniem druku 3D oraz modeli biologicznych.

Aktywność naukowa obejmowała także udział w projektach badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, takich jak SONATA 15 („Biodegradacja estrogenów z wykorzystaniem zaawansowanych systemów biokatalitycznych opartych o immobilizowane oksydoreduktazy”) oraz PRELUDIUM 22 („Synteza substancji farmaceutycznie aktywnych z użyciem biokatalizatorów wspomaganych cieczami jonowymi”). Uczestnictwo w projekcie POLS („Designing of peroxidases-based biocatalytic system for a bio-mitigation of emerging contaminants”), dotyczącym opracowania systemów biokatalitycznych opartych na peroksydazach do remediacji zanieczyszczeń środowiskowych, pozwoliło dodatkowo rozwinąć kompetencje w zakresie innowacyjnych technologii biokatalitycznych.

Na całkowity dorobek naukowy składa się też współautorstwo dwóch rozdziałów w książkach wydanych przez Elsevier, poświęconych wykorzystaniu nanobiokatalizatorów w remediacji zanieczyszczeń środowiskowych.

Za działalność naukową i innowacyjne podejście do badań przyznano liczne wyróżnienia, w tym 2. miejsce w konkursie BASF Drive Innovation (Warszawa, 2024) za prezentację „Biomateriały dla zielonych technologii. Biokataliza. Aktywność. Stabilność. Funkcjonalność”. Wystąpienie to koncentrowało się na przedstawieniu wszechstronności enzymów oraz korzyści płynących z ich zastosowania jako biokatalizatorów w różnych gałęziach przemysłu, podkreślając ich znaczenie w rozwoju zrównoważonych technologii. Kolejne wyróżnienie dotyczyło 1. miejsca w europejskim hackathonie EU Sparks for Climate jako członkini zespołu Allium. Projekt zespołu dotyczył globalnego problemu generowania odpadów żywności oraz nadmiernego wykorzystywania tworzyw sztucznych. Zaproponowane innowacyjne rozwiązanie polegało na przetwarzaniu odpadów z obierek cebuli w biodegradowalne materiały opakowaniowe, które mogłyby przyczynić się do ograniczenia stosowania plastikowych opakowań i zmniejszenia ich negatywnego wpływu na środowisko. Całość osiągnięć naukowych potwierdza interdyscyplinarny charakter prowadzonych badań, łączących chemię, biotechnologię i inżynierię materiałową w duchu zrównoważonego rozwoju i zielonej chemii.

## 9. Aktywność naukowa

### Publikacje:

- 1) **Degórska O**, Zasada N, Badzińska W, Fu Q, Jesionowski T, Zdarta Z, Targeted biocatalyst design for asymmetric citalopram conversion in a membrane reactor (2025), *Pharmaceutics*, 17, 1497. IF: 5,5.
- 2) **Degórska O**, Zasada N, Jesionowski T, Zdarta Z. Immobilized lipase in the resolution of racemic atenolol - a possible key to sustainable pharmaceuticals synthesis (2025), *International Journal of Biological Macromolecules*, 318, 3. IF: 8,5.
- 3) **Degórska O**, Szada D, Fu Q, Nghiem LD, Biadasz A, Jesionowski T, Zdarta Z. Ionic liquid supported hydrogel-lipase biocatalytic systems in asymmetric synthesis of enantiomerically pure (S)-ibuprofen (2024), *International Journal of Biological Macromolecules*, 281, 136221. IF: 8,5.
- 4) Bilal M, **Degórska O**, Szada D, Rybarczyk A, Zdarta A, Kaplon M, Zdarta J, Jesionowski T. Support materials of organic and inorganic origin as platforms for horseradish peroxidase immobilization: Comparison study for high stability and activity recovery (2024), *Molecules*, 29, 710. IF: 4,6.
- 5) **Degórska O**, Szada D, Jesionowski T, Zdarta Z. A biocatalytic approach for resolution of 3-hydroxy-3-phenylpropanonitrile with the use of immobilized enzymes stabilized with ionic liquids (2023), *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 1593-1597. IF: 4,4.
- 6) **Degórska O**, Szada D, Zdarta A, Smulek W, Jesionowski T, Zdarta J. Immobilized lipase in resolution of ketoprofen enantiomers: examination of biocatalysts properties and process characterization (2023), *Pharmaceutics*, 14 (7), 1443. IF: 5,4.
- 7) Zdarta J, Ciesielczyk F, Bilal M, Jankowska K, Bachosz K, **Degórska O**, Rybarczyk A, Jesionowski T, Meyer AS. Inorganic oxide systems as platforms for synergistic adsorption and enzymatic conversion of estrogens from aqueous solutions: Mechanism, stability and toxicity studies (2023), *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11 (2), 109443. IF: 7,2.
- 8) Zdarta J, **Degórska O**, Jankowska K, Rybarczyk A, Piasecki A, Ciesielczyk F, Jesionowski T. Removal of persistent sulfamethoxazole and carbamazepine from

water by horseradish peroxidase encapsulated into poly(vinyl chloride) electrospun fibers (2022), *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 272. IF: 4,9.

- 9) **Degórska O**, Zdarta J, Synoradzki K, Zgoła-Grześkowiak A, Ciesielczyk F, Jesionowski T. From core-shell like structured zirconia/magnetite hybrid towards novel biocatalytic systems for tetracycline removal: Synthesis, enzyme immobilization, degradation and toxicity study (2021), *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), 105701. IF: 7,2.
- 10) Zdarta J, Jankowska K, Bachosz K, **Degórska O**, Kaźmierczak K, Nguyen L.N., Nghiem L.D., Jesionowski T. Enhanced wastewater treatment by immobilized enzymes (2021), *Current Pollution Reports*, 7, 167-179. IF: 8,1.
- 11) Zdarta J, Machałowski T, **Degórska O**, Bachosz K, Fursov A, Ehrlich H, Jesionowski T. 3D chitin scaffolds from the marine demosponge *Aplysina archeri* as a support for laccase immobilization and its use in the removal of pharmaceuticals (2020), *Biomolecules*, 10(4), 646. IF: 4,9.
- 12) Zdarta J, Staszak M, Jankowska K, Kaźmierczak K, **Degórska O**, Nguyen L.N., Kijeńska-Gawrońska E., Pinelo M., Jesionowski T. The response surface methodology for optimization of tyrosinase immobilization onto electrospun polycaprolactone-chitosan fibers for use in bisphenol A removal (2020), *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2049-2059. IF: 8,5.
- 13) Jankowska K, Zdarta J, Grzywaczyk A, **Degórska O**, Kijeńska-Gawrońska E, Pinelo M, Jesionowski T. Horseradish peroxidase immobilised onto electrospun fibres and its application in decolourisation of dyes from model sea water (2020), *Process Biochemistry*, 102, 10-21. IF: 4,2.
- 14) Zdarta J, Bachosz K, **Degórska O**, Zdarta A, Kaczorek E, Pinelo M, Meyer AS, Jesionowski T. Co-immobilization of glucose dehydrogenase and xylose dehydrogenase as a new approach for simultaneous production of gluconic and xylonic acid (2019), *Materials*, 12(19), 3167. IF: 3,0.

### **Rozdziały w książkach:**

- 1) Rybarczyk A, Szada D, Badzińska W, **Degórska O**, Jesionowski T, Zdarta J. Nanobiocatalysts as efficient tools for wastewater pollutants remediation, *Advances in Chemical Pollution, Environmental Management and Protection*, Elsevier, Volume 10, 2024, s. 57-82
- 2) Zdarta J, Kaźmierczak K, Jankowska K, Bachosz K, **Degórska O**, Bilal M, Iqbal HMN, Nguyen LN, Nghiem LD, Jesionowski T. Nanobiocatalysts for wastewater remediation and redefining of pollutants, *Nano-Bioremediation: Fundamentals and Applications, Micro and Nano Technologies*, Elsevier, 2022, s. 313-336.

### **Konferencje:**

- 1) Fourth Forum for the EU Mission on Adaptation to Climate Change, Wrocław, 19/05/2025 - poster, zespół Allium (Burlaga N, Degórska O, Grzywaczyk A, Trudić B)
- 2) Green Technology for Sustainable Environment 2024, Poznań, 23/09/2024 - wystąpienie ustne („Green approach of active pharmaceutical ingredients synthesis”)
- 3) Eunice Conference, Catania, 03/07/2024 - poster („Enzymatic membrane reactor supported with ionic liquid as an efficient platform for removal of estrogens”)
- 4) 6th Symposium on Biotransformations for Pharmaceutical and Cosmetic Industry, Kraków, 06/2024 - poster („Unconventional API synthesis - Biocatalytic processes in flow reactors”)
- 5) II Ogólnopolska Konferencja Naukowa PUTChemikon, Poznań, 05/2024 - poster („Zastosowanie biokatalizatorów stabilizowanych cieczami jonowymi w produkcji kluczowych substancji leczniczych”)
- 6) 7th International Conference on Ionic Liquid-Based Materials, Porto, 11/2023 - wystąpienie ustne („Immobilization of lipases with hydrophobic ionic liquids...”)
- 7) 7th International Conference on Ionic Liquid-Based Materials, Porto, 11/2023 - poster („Removal of estrogens in an enzymatic membrane reactor using ionic liquids...”)
- 8) ORBIS Final Conference, Poznań, 07/2023 - poster („The binary mixture of ritonavir and ketoprofen as a co-amorphous system for enhanced solubility”)

- 9) BioOrg IV Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów, Poznań, 12/2022 - poster („Zastosowanie lipaz w rozdziale racemicznym estrów ketoprofenu”)
- 10) VIII Konferencja Naukowa Enzymos, 09/2022 - wystąpienie ustne („Immobilizowane lipazy w rozdziale enancjomerów ketoprofenu”)
- 11) 5th Symposium on Biotransformations for Pharmaceutical and Cosmetic Industry, Kroczyce, 06/2022 - wystąpienie ustne („Application of hydrolases during synthesis of active pharmaceutical ingredients”)
- 12) VII Konferencja Naukowa Enzymos, 02/2022 - wystąpienie ustne („Zastosowanie immobilizowanych hydrolaz w syntezie substancji farmaceutycznie aktywnych”)
- 13) International Caparica Conference on Pollutant Toxic Ions and Molecules (PTIM 2021), Lizbona, 11/2021 - wystąpienie ustne („Simultaneous adsorption and enzymatic conversion of pharmaceuticals using inorganic oxide systems”).

#### **Staże naukowe:**

- 1) 05/2025 - 09/2025: Staż naukowy - University of Ljubljana, Wydział Farmacji; badania nad innowacyjnymi doustnymi systemami dostarczania leków
- 2) 04/2025: Staż naukowy - Uniwersytet Medyczny w Poznaniu; rozwój systemów dostarczania leków, praca z komórkami ludzkimi i zarodkami kurzymi
- 3) 01/07/2024 - 05/07/2025: EU Erasmus+ Szkoła letnia, Katania, Włochy
- 4) 02/2024 - 03/2024: Staż naukowy - University of Ljubljana, Wydział Farmacji, Słowenia; badania nad nanomateriałami elektroprzewodzącymi (Erasmus+)
- 5) 04/2023 - 06/2023: Staż przemysłowy - APC Ltd, Dublin, Irlandia; prace nad syntezą substancji farmaceutycznie aktywnych (projekt ORBIS)
- 6) 08/2022 - 11/2022: Staż naukowy - University of Technology Sydney, Faculty of Engineering and IT, Australia; rozwój nowych biokatalizatorów (NAWA, STER).

#### **Projekty badawcze:**

- 1) Projekt PRELUDIUM 22: Synteza substancji farmaceutycznie aktywnych z użyciem biokatalizatorów wspomaganych cieczami jonowymi (NCN, **kierownik projektu**)

- 2) Projekt POLS: Designing of peroxidases-based biocatalytic system for a bio-mitigation of emerging contaminants (2023), (NCN, wykonawca)
- 3) Projekt SONATA 15: Biodegradacja estrogenów z wykorzystaniem zaawansowanych systemów biokatalitycznych opartych o immobilizowane oksydoreduktazy (2020-2023), (NCN, wykonawca).

**Nagrody, wyróżnienia i pozostałe aktywności:**

- 1) EU Sparks for Climate - 1. miejsce w europejskim hackathonie (zespół Allium: Burlaga N, **Degórska O**, Grzywaczyk A, Trudić B)
- 2) BASF Drive Innovation - 2. miejsce w konkursie przemysłowym, prezentacja: „Biomateriały dla zielonych technologii. Biokataliza. Aktywność. Stabilność. Funkcjonalność” (Warszawa, 03/2024)
- 3) Stypendium naukowe Rektora Politechniki Poznańskiej dla wyróżniających się doktorantów (2021-2025)
- 4) Stypendium naukowe z Własnego Funduszu Stypendialnego Politechniki Poznańskiej (2024)
- 5) Udział w Komitecie organizacyjnym międzynarodowej konferencji GTSE24 (Green Technology for Sustainable Environment 2024), (Poznań, 22-26.09.2024)
- 6) Medal „Wyróżniającemu się Absolwentowi Politechniki Poznańskiej” (2021).

## **10. Teksty publikacji naukowych stanowiących monotematyczny cykl prac (P1-P5)**

### **Publikacja 1**

[P1] Degórska O\*, Szada D, Zdarta A, Smulek W, Jesionowski T, Zdarta J\*. Immobilized lipase in resolution of ketoprofen enantiomers: examination of biocatalysts properties and process characterization (2023), *Pharmaceutics*, 14 (7), 1443.

## Article

# Immobilized Lipase in Resolution of Ketoprofen Enantiomers: Examination of Biocatalysts Properties and Process Characterization

Oliwia Degórska \*, Daria Szada, Agata Zdarta , Wojciech Smulek , Teofil Jesionowski  and Jakub Zdarta \* 

Institute of Chemical Technology and Engineering, Faculty of Chemical Technology, Poznan University of Technology, Berdychowo 4, 60965 Poznan, Poland; dariaszada@gmail.com (D.S.); agata.zdarta@put.poznan.pl (A.Z.); wojciech.smulek@put.poznan.pl (W.S.); teofil.jesionowski@put.poznan.pl (T.J.)

\* Correspondence: oliwia.degorska@doctorate.put.poznan.pl (O.D.); jakub.zdarta@put.poznan.pl (J.Z.)

**Abstract:** In this study, lipase from *Aspergillus niger* immobilized by physical immobilization by the adsorption interactions and partially interfacial activation and mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange was used in the kinetic resolution of the ketoprofen racemic mixture. The FTIR spectra of samples after immobilization of enzyme-characteristic signals can be seen, and an increase in particle size diameters upon immobilization is observed, indicating efficient immobilization. The immobilization yield was on the level of 93% and 86% for immobilization unmodified and modified support, respectively, whereas activity recovery reached around 90% for both systems. The highest activity of immobilized biocatalysts was observed at pH 7 and temperature 40 °C and pH 8 and 20 °C for lipase immobilized by physical immobilization by the adsorption interactions and partially interfacial activation and mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange, respectively. It was also shown that over a wide range of pH (from 7 to 10) and temperature (from 20 to 60 °C) both immobilized lipases retained over 80% of their relative activity, indicating improvement of enzyme stability. The best solvent during kinetic resolution of enantiomers was found to be phosphate buffer at pH 7, which obtained the highest efficiency of racemic ketoprofen methyl ester resolution at the level of over 51%, followed by enantiomeric excess 99.85% in the presence of biocatalyst obtained by physical immobilization by the adsorption interactions and partially interfacial activation.

**Keywords:** biocatalysis; ketoprofen; lipase; enzyme immobilization; active pharmaceutical ingredients



**Citation:** Degórska, O.; Szada, D.; Zdarta, A.; Smulek, W.; Jesionowski, T.; Zdarta, J. Immobilized Lipase in Resolution of Ketoprofen Enantiomers: Examination of Biocatalysts Properties and Process Characterization. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1443. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071443>

Academic Editor: Romána Zelkó

Received: 15 May 2022

Accepted: 8 July 2022

Published: 11 July 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

A significant number of active pharmaceutical ingredients (APIs) are chiral molecules. It often happens that different enantiomeric forms of a given compound exhibit various pharmacological properties and effects. A common reason for the use of racemic mixtures is mostly the cost of separation of the enantiomers, which exceeds the advantages of a possible increase in the activity [1]. There are substances where one of the enantiomers exerts a healing effect and the second one is toxic to the body [2]. The turning point of increasing the amount of toxicity tests before releasing the drug on the market was after a well-known tragedy that occurred in the late 1950s and early 1960s, where thalidomide was used for treatment of nausea during pregnancy. Use of this medication by pregnant women led to the deformation of the fetus, causing, among other effects, malformation of the correct limbs, heart disease, and malformations of inner and outer ear, due to the teratogenic liability of the drug. This resulted in the aggravation of toxicity tests and increased the systematicity of testing pharmaceutical active substances before they are approved for sale [3].

One of the groups of API containing drugs composed of chiral substances are non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) [4]. NSAIDs are the most commonly used group of drugs for inflammation and pain relief. One of them is ketoprofen (2-(3-benzoylphenyl)-propionic acid), which has an analgesic and anti-inflammatory effect and is still sold as a racemic mixture, even though both enantiomers show different activities. Enantiomer (S)- shows an anti-inflammatory effect, whereas (R)- enantiomer can prevent periodontal disease but also is analgesic and antipyretic [5,6].

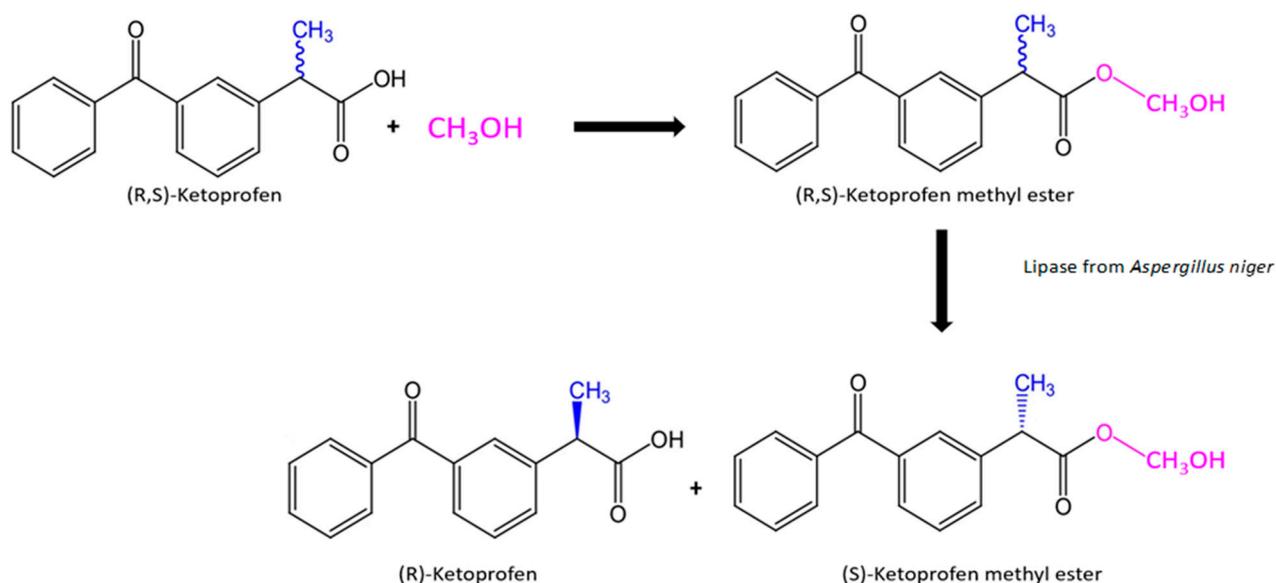
Due to the increase in the importance of the synthesis of API in enantiomerically pure form, new ways of asymmetric synthesis are being sought [7]. At present, considering the published scientific papers, biocatalysis is a promising technique that allows the obtainment of enantiomerically pure products. On an industrial scale, enzymes such as *Candida antarctica* lipase type B can be used in the synthesis of chiral alcohols or amines [8]. This is dictated primarily by the pharmacological profile of individual forms of therapeutic compounds, as the main aim is to achieve the most favorable bioavailability while reducing side effects. Enzymes, especially hydrolases, can be successfully used during the synthesis of APIs, due to their properties, because stereo-, regio-, and chemoselectivity of the biocatalysts play the key role in this type of synthesis [7,9]. Additionally, enzymes are also non-toxic and fit into the assumptions of green chemistry, due to the lack of toxic solvents and mild process conditions [10]. Among other biocatalysts, hydrolases are readily used in asymmetric synthesis, mainly due to their availability and relatively low costs of their production. It is also important that the hydrolases do not require the presence of a cofactor to maintain high activity [11]. Among hydrolases, lipases are enzymes that are of particular importance because they show activity both in water and in organic solvents due to a feature characteristic of lipases, called interfacial activation. For lipases, the change of lid conformation during inhibition of helical lid, which rolls back from the active side, exposes a large hydrophobic surface, expanding the surface around active side [12]. This non polar surface is stabilized by the lipid environment, which is called interfacial activation. The interfacial activation occurs in the hydrophobic medium. Due to the presence of interfacial activation, lipases show high efficiency in the hydrolysis of particles containing carboxylic ester groups and which are aggregated in water [13,14]. Furthermore, lipases can not only carry out hydrolysis reactions in aqueous solvents but are also able to catalyze reactions such as acylation or esterification in nonaqueous conditions [15,16]. Due to these features, lipases are often used to obtain enantiomerically pure API [17,18]. The lipases most widely used for esterification of NSAIDs are lipases from *Candida rugosa* and *Rhizomucor miehei*, which catalyze the esterification of, for example, S-ibuprofen [19,20]. By contrast, lipase B from *Candida antarctica*, which catalyzes the reaction with a preference for (R)-enantiomer can be also used for the production of (S)-enantiomer, because it allows the direct synthesis of the (S)-enantiomer as an unreacted substrate of the enzymatic esterification [21]. Piacentini et al. used a multiphase reactor with lipase from *Candida rugosa* for kinetic resolution of (S,R)-naproxen methyl ester to obtain (S)-naproxen acid. The membrane emulsification technology was used for the production of a microstructured emulsion bioreactor using lipase as a catalyst and as a surfactant simultaneously. Enzyme loaded at the stable emulsion interface showed 100% of enantioselectivity and conversion rate, whereas during the classic stirring method the conversion was lower, reaching around 40–60%, and the enantiomeric excess fluctuated around 75% to 96% [22].

Despite having many advantages, enzymes are susceptible to the influence of the external environment, which can significantly interfere with their activity. Depending on the type of the enzyme, extreme operational conditions, which differ significantly from the optimal one, may change the biocatalyst structure, leading to its inhibition or inactivation. Hence, the immobilization process is widely used to stabilize the enzyme particle and extend the spectrum of its activity under various conditions [23]. Thanks to immobilization, the enzyme can also be removed more easily from the reaction medium, making it possible to skip the process of purifying the product from catalyst residues and enhancing the reusability of the catalyst [24]. Due to the fact that different immobilization techniques can

be distinguished, the immobilization process should be chosen carefully to directly meet the process needs, because random immobilization processes can even cause a decrease of enzyme activity. Moreover, during immobilization, proper process conditions should be selected, such as pH, temperature, solvent, inhibitors, or different protein protectors, as these factors also influence enzymatic activity and stability [25]. Immobilization improves enzyme stabilization and limits diffusional limitations in different reaction media. In organic medium, insoluble enzymes tend to agglomerate and form clusters, whereas, due to the immobilization process, enzymes that are dispersed on the support surface are unable to agglomerate, creating active biocatalyst. Enzymes can be purified due to the immobilization process [26,27]. Additionally, proper immobilization process can tune enzyme selectivity, specificity, and activity, due to the conformational changes taking place in the enzyme molecule [28]. Finally, immobilization results in significant enzyme stabilization, especially when the enzyme is multipointly immobilized, as well as when a favorable environment for the enzyme is generated upon immobilization [29].

A very important part of preparing the immobilization process is choosing the right support. The use of nanoparticles has many advantages but it also has some boundaries. Nanoparticles have high specific surface area, nanometric particle size, and a large amount of space for the enzyme to attach. Nanoparticles tend to agglomerate and are hard to use on a large scale, so they need to be modified with, for example, magnetite to separate them easily from the reaction medium. Immobilization also depends on the porosity of the material. If the material is porous, pores can be contaminated with solid particles and the enzyme immobilized inside the pores will be unable to meet the substrates during reaction, creating biocatalyst of low activity. In choosing the support it is important to pay attention to obtaining a suitable enzyme orientation and high activity [30]. It should also be added that immobilization can be successfully performed on nanoparticles via adsorption (ionic exchange, hydrophobic adsorption, and affinity adsorption), covalent binding (via covalent attachment, anionic exchange, and interfacial activation), or entrapment, improving enzymes stability, its selectivity, and simplicity of mixture purifying after reaction [31]. Additionally immobilized enzymes usually show greater thermal stability than the native form, due to the protective effect of the support [32]. For instance, Foresti et al. used the commercial product Novozym 435 (*Candida antarctica* lipase B immobilized on the acrylic resin) and Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei* lipase immobilized on a macroporous ion-exchange resin) for the synthesis of S-ibuprofen and obtained an enantiomeric excess of 54% and 63%, respectively. They investigated the addition of water to the ethanol during the reaction and the most suitable water content, which was a compromise between good efficiency and enantiomeric excess, was found to be 4.8% v/v [33]. Further, Wang et al. obtained (S)-citalopram, which is a selective serotonin reuptake inhibitor for treating depression, anxiety, and panic disorder. During the chemoenzymatic reaction, supported by Novozym 435, they conducted the kinetic and cyclic resolution of racemic diol. An enantiomeric excess of 98% was obtained and the efficiency of the reaction reached 97.8% [34].

In this study, a novel attempt has been made concerning the use lipase from *Aspergillus niger* immobilized onto silica surface in the synthesis of enantiomerically pure (R)-ketoprofen in aqueous medium from a racemic mixture of ketoprofen. The most suitable process parameters including temperature or pH for the highest enzyme activity have been examined, as well as the effect of storage time, thermal stability, and reusability. To verify the possible practical application of the produced biosystems, tests were performed in buffer solution and organic solvents using various amounts of biocatalyst to examine the efficiency of kinetic resolution of the ketoprofen racemic mixture. The obtained results of the enantiomeric excess and the efficiency of the process indicate the high application potential of the biocatalysts produced during the separation reaction of the racemic mixture of ketoprofen. The reaction path conducted during this research is presented in Scheme 1 below. However, future research is still required to further increase the yield of the reaction and improvement of process control.



**Scheme 1.** Reaction path of chemical synthesis and enzymatic enantioselective resolution of ketoprofen methyl ester.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals and Materials

Lipase from *Aspergillus niger*, racemic ketoprofen, para-nitrophenyl palmitate, *p*-nitrophenol (pNPP), (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES), Bradford reagent used for examination of the quantity of immobilized enzyme, N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA), phosphate, acetate and TRIS buffers at various pH, and silica nanoparticles were acquired from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Hexane, sodium carbonate, sodium hydrogencarbonate, and methanol were purchased from Chempur, whereas chloroform was acquired from POCH.

### 2.2. Lipase Immobilization by Physical Immobilization by the Adsorption Interactions and Partially Interfacial Activation and Mixed Physical Immobilization via Interfacial Activation and Ion Exchange

The first stage of the research was lipase physical immobilization by the adsorption interactions and partially interfacial activation and mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange. In the physical immobilization by the adsorption interactions and partially interfacial activation, the lipase enzyme was immobilized on the support without its modification. Immobilization was performed in a 100 mL flat bottom flask closed with parafilm. For immobilization, 2 g of silica was weighed into the flask, to which 45 mL of 5 mg/mL lipase solution in 100 mM phosphate buffer at pH 7 was added. The sealed system was then shaken at 30 °C, 200 rpm, for 1 h and 24 h in a shaking incubator (IKA KS 4000i Control, Warsaw, Poland). To further separate the carrier with immobilized lipase from the reaction medium, the sample was transferred to a conical tube and centrifuged for 15 min at 4000 × *g* rpm in a centrifuge (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Hamburg, Germany). The immobilized enzyme was separated from the remainder of the mixture and left to dry in the open air. The solutions obtained after centrifugation were kept for further analysis.

In the mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange, prior to immobilization, the support was modified with APTES solution. For this reason, 0.6 g of APTES was diluted in 20 mL of the solution of methanol/water (4/1 *v/v*). Then, 2 g of the carrier was moistened with a sprayer that contained APTES solution. Afterwards the support was dried in an oven in temperature of 80 °C for 6 h. The next step was the immobilization process. For immobilization, 2 g of modified silica was weighed into the flask, to which 45 mL of 5 mg/mL lipase solution in 100 mM phosphate buffer at pH 7

was added. The sealed system was then shaken at 30 °C, 200 rpm, for 1 h and 24 h in a shaking incubator (IKA KS 4000i Control). After immobilization, samples were centrifuged for 15 min at 4000× *g* rpm in a centrifuge (Eppendorf Centrifuge 5810 R). The immobilized enzyme was separated from the remainder of the mixture and left to dry in the open air. The solutions obtained after centrifugation were kept for further analysis.

### 2.3. Effect of Reaction Parameters (pH, T), Storage Stability, Thermal Stability, and Reusability

In order to select the suitable process parameters for the immobilized lipase, the influence of temperature and pH on the activity of the produced biocatalytic systems prepared by immobilization by physical immobilization by the adsorption interactions and partially interfacial activation and mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange was examined. For pH investigation, 2 mL of buffer at specific pH was added to Eppendorf tubes containing 50 mg of biocatalyst, followed by addition of 1 mL of para-nitrophenyl palmitate solution at the concentration of 15 mM and reacted for 5 min at pH values: 4, 5, 6, 7, 8, 9, and 10 in an Eppendorf ThermoMixer C (Hamburg, Germany). For the specific pH value different buffers were used: acetate buffer for pH 4 and 5, phosphate buffer for pH from 6 to 8, and TRIS buffer to reach pH 9 and 10. Reactions were conducted in the temperature of 30 °C.

For the hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate at varying temperatures, 50 mg of the immobilized enzyme prepared by physical immobilization by the adsorption interactions and partially interfacial activation and mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange methods was placed in Eppendorf tubes and the 2 mL of phosphate buffer at pH 7 was added to the tubes containing 50 mg of biocatalyst, followed by addition of 1 mL of 15 mM para-nitrophenyl palmitate solution, and reacted for 5 min at temperatures: 10, 20, 30, 40, 50, 60 °C. For both analyzed parameters the reactions were terminated with 1 mL of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution at the concentration 0.5 M and centrifuged afterwards.

The thermal stability was investigated to determine the activity of the biocatalysts prepared by physical immobilization by the adsorption interactions and partially interfacial activation and mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange, under heat stress. Briefly, 50 mg of biocatalyst with 2 mL of buffer phosphate at pH 7 was incubated for 2 h in 6 different temperatures: 30, 40, 50, 60, 70, and 80 °C. Likewise in the previous steps, after this time to each Eppendorf tube 1 mL of 15 mM *p*-nitrophenyl palmitate was added and the reaction was conducted for 5 min. Afterwards the termination of reaction was performed with 1 mL of 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution and centrifuged.

For the reusability study, 10 reaction cycles were performed at the temperature of 30 °C. Then, 2 mL of phosphate buffer at pH 7, 1 mL of 15 mM para-nitrophenyl palmitate and 50 mg of biocatalyst was added to the Eppendorf tube and the reaction was conducted for 5 min in Eppendorf ThermoMixer C. After this time, samples were centrifuged in a centrifuge (Eppendorf Centrifuge 5810 R) for 15 min at 4000× *g* rpm and obtained precipitate was washed several times by phosphate buffer and was used in the next reaction. In these experiments, initial enzyme activity was defined as 100% activity.

Storage stability of free lipase and biocatalysts after immobilization were examined based on above-described model reaction of para-nitrophenyl palmitate hydrolysis over 30 days of storage at 4 °C in phosphate buffer at pH 7. The relative activity was measured every day. In these experiments, initial enzyme activity was defined as 100% activity.

All of the experiments performed with immobilized enzymes were also performed using free lipase, for comparison. The solutions obtained after the processes were examined using UV-vis spectroscopy in order to check the efficiency of para-nitrophenyl palmitate conversion at particular temperatures and pH values as well as over study. The increase in absorbance was measured at 410 nm and is caused by the release of *p*-nitrophenol during enzymatic hydrolysis. A standard curve prepared based on solutions of *p*-nitrophenol of known concentration was used to determine the final concentration of the substrate/product in the solution. One unit of the enzyme activity was defined as the re-

lease of 1 mmol of pNP per one minute under the measurement conditions. In tests on effect of pH and temperature, the highest noticed activity was defined as 100% relative activity.

#### 2.4. Immobilization Yield, Amount of Immobilized Enzyme, and Specific Activity

The amount of the immobilized enzyme was calculated based on the spectrophotometric measurements using the Bradford method [35]. In a quartz cuvette, 4 mL of the Bradford reagent was mixed with 800  $\mu$ L of the analyzed protein solution and 100  $\mu$ L water, and the analysis was performed 10 min after the preparation of the mixture. UV/vis measurements were made at wavelength 595 nm, using a JASCO V650 spectrophotometer (Jasco, Tokyo, Japan). The amount of immobilized enzyme (mg/g) was determined as the difference between the initial amount of lipase and the final enzyme amount in the mixture after immobilization, relative to the mass of the silica nanoparticles. Immobilization yield (%) was calculated following Equation (1), whereas activity recovery was calculated using Equation (2):

$$\text{immobilization yield (\%)} = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{Activity recovery (\%)} = \frac{A_t}{A_i} \times 100\% \quad (2)$$

where  $A_i$  denotes the initial activity of lipase added to the immobilization medium,  $A_f$  denotes the total activity of the enzyme in the supernatant and washing solution after the immobilization, and  $A_t$  denotes the activity of the immobilized lipase.

To determine specific activity and relative activity of free and immobilized lipase, spectrophotometric measurements were performed, based on a model pNP reaction. The reaction was carried out for 5 min at 30 °C. Using the standard calibration curve for pNP, the specific activity of the free and immobilized enzyme (U/mg) was calculated as the initial enzyme activity retained per unit mass of enzyme and per unit mass of enzyme and support. The activity retention (%) of immobilized lipase is presented as the percentage activity of the immobilized lipase, relative to the catalytic activity of the free enzyme.

#### 2.5. Synthesis of Racemic Ketoprofen Methyl Ester

For racemic ketoprofen methyl ester production, 1 g of racemic ketoprofen was diluted in the mixture of 30 mL of methanol and 300 mL of chloroform with addition of a few drops of sulfuric acid(VI) as catalyst of the reaction. The mixture was heated and refluxed in 60 °C for 3 h in the bathwater. The obtained product was washed three times alternately with 1 M NaHCO<sub>3</sub> and distilled water. Afterwards, the obtained product was left to dry in ambient conditions and used in further reactions.

#### 2.6. Enzymatic Resolution of Racemic Ketoprofen Methyl Ester

The hydrolysis reactions were performed in phosphate buffer at pH 7 but also in hexane and isopropyl alcohol in batch reaction system. The amount of 10.7 mg of ketoprofen methyl ester and 10 mg of free enzyme or amount of biocatalytic systems produced that contains 10 mg of immobilized lipase was placed in the Eppendorf tubes and 2 mL of the buffer or organic solvent was added. For comparison, 15 mg and 20 mg of immobilized lipase was tested. The processes were performed for 24 h and 96 h for each sample, regardless of the type of solvent or biocatalyst and its amount. To confirm the effective obtaining of ketoprofen enantiomers, racemic resolution and determination of the enantiomeric excess and the efficiency of the enzymatic conversion, gas chromatography coupled with mass-spectrometry (GC-MS) was used. Initially, the samples were concentrated to evaporate the solvent. Afterwards, the samples were derivatized by adding 300  $\mu$ L of BSTFA and heated at 60 °C for 2 h. Subsequently, samples were subjected to GC-MS analysis (Pegasus 4D from Leco, Vouersweg, The Netherlands). Quantitative analysis was performed with a Capillary GC Column Cydex-B, GC Column 0.22 mm ID 0.25  $\mu$ m Film 25 mL, Ea from Phenomenex. The analysis was performed with the oven temperature programmed as follows: 40 °C for one minute, increased to 120 °C with a rate 5 °C/min, then 120 °C for 50 min.

### 2.7. Physicochemical Characterisation

The particle size distribution was obtained on a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK). The analyzer measures particle sizes in the range 0.6–6000 nm and operates based on the non-invasive backscattering (NIBS) technique. For sample preparation, the material was dispersed in isopropanol in a Sonic-3 ultrasonic bath (Polsonic, Warsaw, Poland) for 15 min.

The FTIR spectroscopy was used to identify functional groups present in the resulting systems. The obtained samples were analyzed by FTIR-ATR technique. The ATR (Attenuated Total Reflectance) technique uses the phenomenon of weakened total infrared radiation. The adapter is equipped with a diamond, which is responsible for the multiple reflection of infrared radiation. The analysis of the obtained materials was carried out using the Vertex 70 device from Bruker with a resolution of  $0.4\text{ cm}^{-1}$ .

The effect of Triton X-100 1%, NaCl solutions at different concentrations (0.1 and 0.5 M) and mixture of TX-100 1% + NaCl 0.1 M on the relative activity and amount of immobilized lipase from *Aspergillus niger* was evaluated for 6 h. During this experiment, the immobilized enzyme was dispersed in sodium chloride, Triton X-100 or mixture solution. After each hour, the relative activity of the immobilized enzyme was evaluated based on the hydrolysis reaction of the enzyme substrate, whereas the amount of immobilized lipase retained on the support was determined using Bradford method.

### 2.8. Efficiency and Enantiomeric Excess of the Kinetic Resolution Process of the Racemic Mixture

In order to determine the efficiency of the enzymatic conversion of the ketoprofen methyl ester racemate to (S)- and (R)-ketoprofen, Equation (3) was used:

$$W = \frac{C_p}{C_{pr}} \times 100\% \quad (3)$$

where  $W$  denotes efficiency of the enzymatic conversion process of the racemic mixture of ketoprofen methyl ester,  $C_p$  is concentration of products obtained in the sample after enzymatic conversion (mg/mL), and  $C_{pr}$  is concentration of products obtained as a result of enzymatic conversion resulting from the stoichiometry of the reaction (mg/mL).

To determine the enantiomeric excess ( $ee$ , %) of (R)-ketoprofen over (S)-ketoprofen, Equation (4) was used:

$$ee = \frac{R - S}{R + S} \times 100\% \quad (4)$$

where  $S$  represents concentration of enantiomer (S)-ketoprofen (mg/mL) and  $R$  denotes concentration of enantiomer (R)-ketoprofen (mg/mL).

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Characterisation of the Produced Biocatalytic Systems

The process performed as well as the resulting biocatalytic systems were characterized in terms of the process yield and the activity of the immobilized enzymes. From Table 1 it can be seen that after 24 h of lipase physical immobilization by adsorption interactions and partially interfacial activation (immobilization with nonmodified support) and mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange (immobilization with modified support), relatively high immobilization yields of 93% and 86%, respectively, were achieved, resulting in a high amount of immobilized lipase of 205 mg/g and 187 mg/g. These data suggest that immobilization on nonmodified support could be partially multi-layered which explains the higher amount of immobilized lipase. It is also evident from the data that 90% and 87% activity was retained by the lipase immobilized on nonmodified and modified support respectively, as its specific activity was 53 and 49 U/mg, compared with 57 U/mg for the free enzyme. Lower activity retention for the mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange may be related to the interference in the structure of the enzyme and changes in enzyme structure upon immobilization related to

the formation of chemical bonds between the enzyme and the carrier, which could reduce its activity and partially block the enzyme active sites due to spontaneous and uncontrolled immobilization [36].

**Table 1.** Enzyme characteristic before and after immobilization process.

Analyzed Parameter	Free Enzyme	Immobilization (Nonmodified)	Immobilization (Modified)
Immobilization yield (%)	-	93	86
Amount of immobilized enzyme (mg/g)	-	205	187
Specific activity (U/mg)	57	53	49
Activity recovery (%)	100	90	87

These results prove the successful immobilization of the enzyme and suggest the high activity of the produced biocatalysts. In another study, it was reported that lipase from *Rhizopus oryzae* immobilized on the silica aerogel by adsorption results in 95% of immobilization yield, mainly due to the presence of numerous hydroxyl groups on the aerogel surface [37].

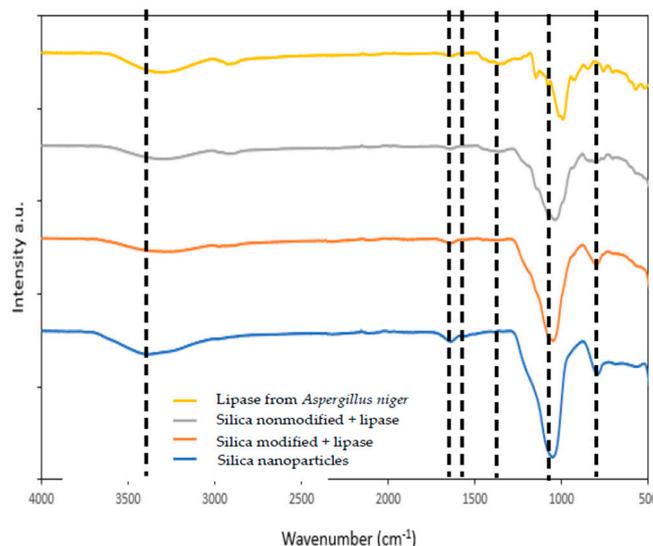
Particle size distribution is an analysis that enables the changes in the support properties upon immobilization to be followed (Table 2). The obtained data show that the pure silica nanoparticles are in the size range typical for nanomaterials, from 59 to 220 nm and the PDI value is low (0.225), which indicates the uniformity of the support. For the samples after lipase physical immobilization by adsorption interactions and partially interfacial activation, particle size ranges from 91 to 1106 nm with maximum volume contributions of 31.4% and 25.4% coming from diameters of 164 nm and 141 nm, respectively. Particle sizes from 1484 nm to 6439 nm were noticed for silica with lipase immobilized by mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange, whereas the maximum volume contributions of 18% and 18.5% for particles at diameters of 3580 and 4145 nm were noticed. A significant increase in the particle size diameters after immobilization indicates that the immobilization processes were conducted successfully and lipase molecules were deposited onto the silica surface. Further, this increase might be due to the fact that enzyme particles are bigger and may create clusters with silica support [38]. Nevertheless, significantly higher particle size after mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange indicates that the presence of surface modifier affects the size of the formed biocatalyst. To additionally confirm the effective immobilization of the lipase from *Aspergillus niger* and to characterize the individual functional groups in the analyzed materials, FTIR spectroscopy was used (Figure 1).

**Table 2.** Particle size distribution of the pure silica and biocatalyst with lipase immobilized by physical immobilization by the adsorption interactions and partially interfacial activation and mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange on silica nanoparticles.

Type of Sample	PdI	Particle Size Range
Silica nanoparticles	0.225	59–220 nm
Immobilized lipase (nonmodified)	0.805	91–1106 nm
Immobilized lipase (modified)	0.935	1484–6439 nm

Figure 1 shows the FTIR spectra with bands characteristic of vibrations of different functional moieties assigned to the silica and lipase functional groups (grey and red lines). In the FTIR spectrum of SiO<sub>2</sub>, in the wavenumber range 900–500 cm<sup>-1</sup>, signals characteristic of the asymmetric and symmetric bending and stretching vibrations of Si–O groups are visible. At 1100 cm<sup>-1</sup> band of the stretching, vibrations of Si–O–Si groups occur, whereas at a wavenumber of around 1630 cm<sup>-1</sup> the signal assigned to the stretching vibrations of H<sub>2</sub>O occurs, indicating the presence of physically adsorbed water. At a wavelength of approx.

3400  $\text{cm}^{-1}$ , a wide band of stretching vibrations of hydroxyl groups occurs, proving the presence of these groups on the silica surface and suggesting that mainly these moieties are responsible for enzyme binding.



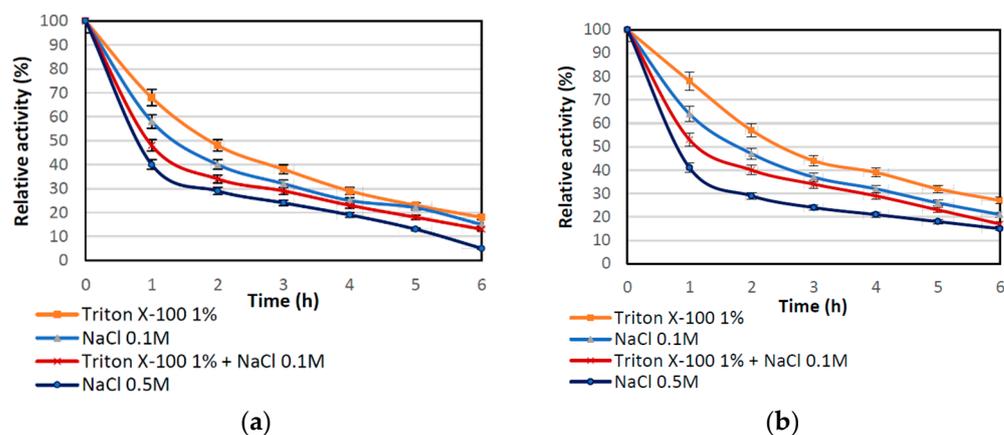
**Figure 1.** FTIR spectra of nanosilica (blue line), lipase from *Aspergillus niger* (yellow line), and nanosilica with immobilized lipase by physical immobilization by the adsorption interactions and partially interfacial activation and mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange.

The FTIR spectrum of free lipase (yellow line) below 1000  $\text{cm}^{-1}$  shows a few signals assigned to the stretching and bending vibrations of C–C bonds that form the enzyme skeleton [39]. The signal of stretching vibrations of C–O bonds appears in the spectrum at 1020  $\text{cm}^{-1}$ . The signals at 1250  $\text{cm}^{-1}$ , 1545  $\text{cm}^{-1}$ , and 1650  $\text{cm}^{-1}$  are characteristic of the stretching vibrations of amide I, amide II, and amide III bands, respectively. The band at around 2900  $\text{cm}^{-1}$  is assigned to the stretching C–H vibrations. Finally, a band between 3600 and 3200  $\text{cm}^{-1}$  also occurs, which might be assigned to the stretching vibrations of –OH and –NH groups. Analysis of the FTIR spectrum of the lipase confirmed the presence of a number of functional groups in the enzyme structure, which can be employed for binding the enzyme to the support.

Both spectra of silica with immobilized lipase show signals from silica and enzyme, which confirms successful enzyme immobilization. The most important are signals generated by the amide I, II, and III bands observed in FTIR spectra upon immobilization at 1640  $\text{cm}^{-1}$ , 1540  $\text{cm}^{-1}$ , and 1250  $\text{cm}^{-1}$ . A slight shift in wavenumber maxima of these signals (of around 10  $\text{cm}^{-1}$ ), as compared to the free enzyme, indicates successful immobilization and changes in the chemical environment of the enzyme after its deposition onto the silica surface and suggests the creation of interactions between nanosilica and the enzyme [40,41]. These changes are more visible for the silica with lipase immobilized by mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange, because this type of immobilization tends to create more changes in the enzyme structure, due to the formation of chemical bonds between enzyme and support.

To verify type of enzyme-support interaction, elution tests were performed using various eluents. Figure 2 shows the correlation that the relative activity of the immobilized lipase treated with 1% Triton X-100 (TX-100), NaCl solutions at different molar concentrations, and combination of TX-100 and NaCl declined gradually during the 6 h treatment, which suggests elution of the enzyme from the matrix. However, partial inactivation of the immobilized enzyme by the eluent could not be excluded as both compounds might negatively affect lipase activity. The lowest drop of relative activity, for both biocatalysts produced, were obtained for TX-100, indicating that surfactant has the lowest effect on

enzyme elution. After incubation in NaCl solutions, a more significant drop of activity was observed. This might be due to the ion exchange that occurs between enzyme immobilized by ion exchange and sodium chloride ions. Higher relative activities occurring for immobilization with modified support may be related to the fact that introduction of amine groups in modification process leads to formation of stronger interactions between enzyme and the support and immobilization, not only via interfacial activation by also via ion exchange. Furthermore, in Table 3 the amount of immobilized enzyme that remained after 6 h of desorption tests on the surface of support is presented. These data show a gradual drop of the amount of immobilized lipase on both supports; however, a more pronounced decrease was noticed for samples obtained using unmodified support. These results correspond with the data on relative activity after desorption experiments. The highest amount of lipase retained on the support (around 52 mg/g) was obtained for modified support after leaching using TX-100, which corresponds to the relative activity of around 30%. By contrast, more than 75% of the enzyme (over 150 mg of the lipase from 1 g of the support) was eluted from nonmodified silica after 0.5 M NaCl treatment. The collected results clearly show that support modification provides more stable enzyme-support interactions, mainly via interfacial activation and ion exchange.



**Figure 2.** Effect of Triton X-100 and NaCl solution on the relative activity of immobilized enzyme: (a) by the adsorption interactions and partially interfacial activation (b) by mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange. All experiments were performed in duplicate and the results presented in each of the graphs are shown as a mean value, for which standard deviation (error value) does not exceed 5%.

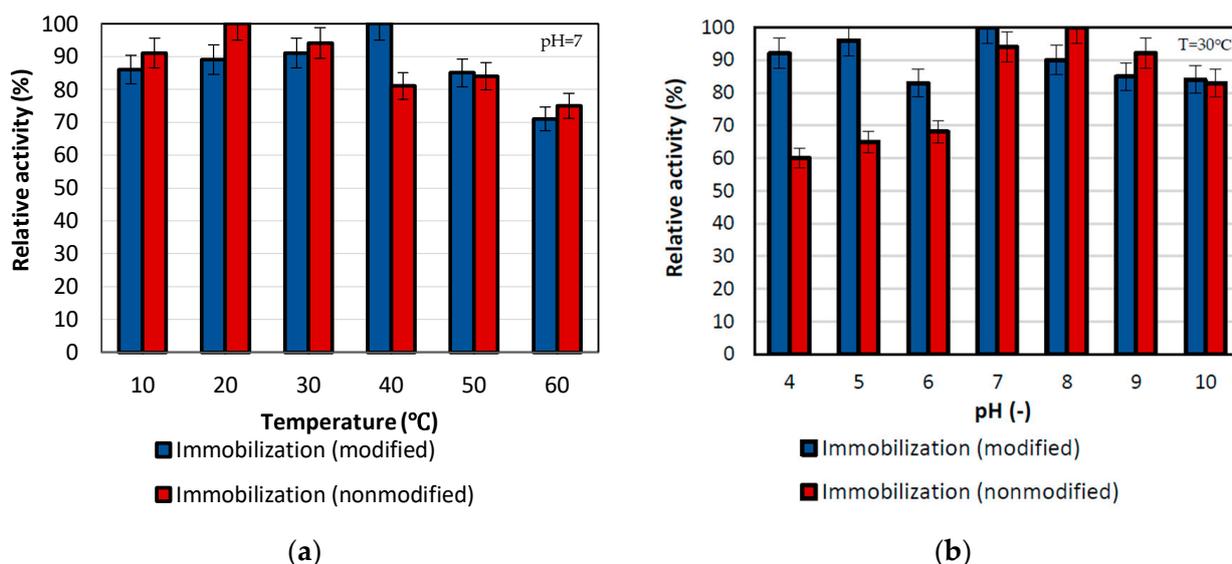
**Table 3.** Amount of the immobilized lipase by two different methods remaining after desorption process, at different conditions, after 6 h. All experiments were performed in duplicate and the results presented in each of the graphs are shown as a mean value, for which standard deviation (error value) does not exceed 5%.

Type of Eluent	Amount of Immobilized Enzyme (mg/g)	
	Nonmodified Support	Modified Support
Triton X-100	42.3	51.9
NaCl 0.1 M	29.7	32.4
Triton X-100 1% + NaCl 0.1 M	17.3	20.7
NaCl 0.5 M	8.3	10.1

### 3.2. Parameters Affecting Enzymes Activity

The reaction environment is very important for enzymes to obtain the highest possible activity. Due to their nature, enzymes are sensitive to pH and temperature and these parameters stimulate the enzyme's inhibition and inactivation. Taking into account the aforementioned dependencies, the temperature and pH were tested over a wide scale to select the most suitable process conditions for immobilized lipase.

The effect of temperature was determined during *p*-nitrophenyl palmitate conversion over a wide temperature range from 30 °C to 80 °C (Figure 3). The highest activity for the performed reaction was obtained for lipase immobilized by mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange with maximum activity at 20 °C. By contrast, for the temperature of 40 °C, the maximum relative activity of the enzyme immobilized by the adsorption interactions and partially interfacial activation method was obtained. Additionally, high activities, of around 85% were noticed for both samples at the temperature of 50 °C. Nevertheless, over the temperature range from 10 °C to 50 °C, the activity of both types of biocatalysts exceeded 80%, which indicates considerable thermal stability of both immobilized lipases. This is related to the protective effect of the support on the enzyme structure [42]. Additionally, it is not possible to unequivocally determine which of the biocatalysts is the most stable in the analyzed temperature range. This is due to many dependencies, including the shift of the optimum temperature of the enzyme operation and changes in the enzyme structure. Nevertheless, taking into account the obtained results, both techniques are effective in improving the stability of the enzyme to temperature exposure. Immobilization is a way of improving enzymes properties; an examples is found in a study by Pinheiro et al. They immobilized lipase B from *Candida antarctica* on the chitosan-divinyl sulfone and also obtained high relative activity in a wide range of pH and temperature [43].



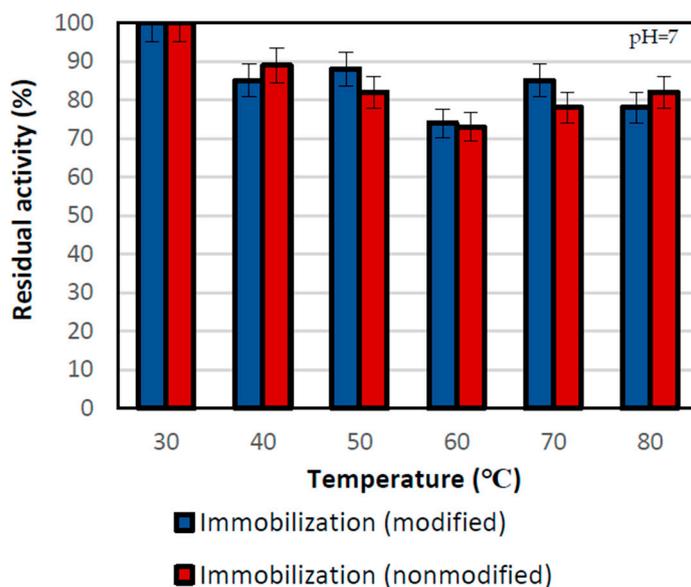
**Figure 3.** Effect of (a) temperature and (b) pH on immobilized lipase activity. All experiments were performed in duplicate and the results presented in each of the graphs are shown as a mean value, for which standard deviation (error value) does not exceed 5%. During investigation in varying temperature, reactions were performed in 100 mM phosphate buffer at pH 7, while reactions conducted in different pH were performed in the temperature of 30 °C.

To determine the optimum pH, the tests were performed in the pH range of 4–10 using a 15 mM substrate solution in buffer at specific pH, at the temperature of 30 °C (Figure 3b). It can be seen that the highest activity of immobilized lipase is observed at pH 7 for enzyme deposited on the SiO<sub>2</sub> by immobilization by the adsorption interactions and partially interfacial activation, whereas for mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange the highest relative activity of the enzyme was noticed at pH 8. After that pH value, the relative activity for both biocatalysts slightly decreased, but the drop in activity was not greater than 20%. The shift of the pH maximum in the case of the sample obtained as a result of mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange was associated with the formation of interactions between the carrier and the enzyme, which affects lipase structure and results in shifting of pH optima. Nevertheless,

both of the biocatalysts obtained show high relative activity over a broad range of pH from 7 to 10, where the activity was at a level above 85%. This strictly indicates the improvement of the stability of the enzyme after immobilization at different pH, which is caused by rigidization of the enzyme structure upon immobilization [44].

For the native form of the enzyme (data not presented), even the smallest changes in process parameters determine a rapid drop in relative activity. The highest activity was observed at pH 7 and temperature 30 °C, which are optimum work parameters for lipase from *Aspergillus niger* [45]. When changing the process parameters, the activity of free lipase decreases sharply and is even lower than 30% at pH ranges from 4 to 5 and from 9 to 10. Similar values were obtained for the temperatures 10, 50, and 60 °C, where the relative activity fluctuated from 20 to 50%. Low relative activity is related to the enzyme's sensitivity to external factors, which can significantly inhibit its activity or even irreversibly degrade its structure [46]. Zdarta et al. investigated immobilization processes of lipase B from *Candida antarctica* (CALB) on the 3D spongin-based scaffolds from *Hippospongia communis* marine demosponge. The obtained data also confirmed a significant improvement in the stability of the enzyme over a wide range of temperatures and pH. During the tests performed over a wide temperature range, the obtained biocatalysts retained over 80% of activity over temperature from 30 °C to 60 °C and pH from 6 to 9 [47].

The thermal stability of the biocatalyst was also one of the key analyses in this study. It was examined after a 2 h incubation of immobilized lipases at the desired temperature ranging from 30 °C to 80 °C (Figure 4).

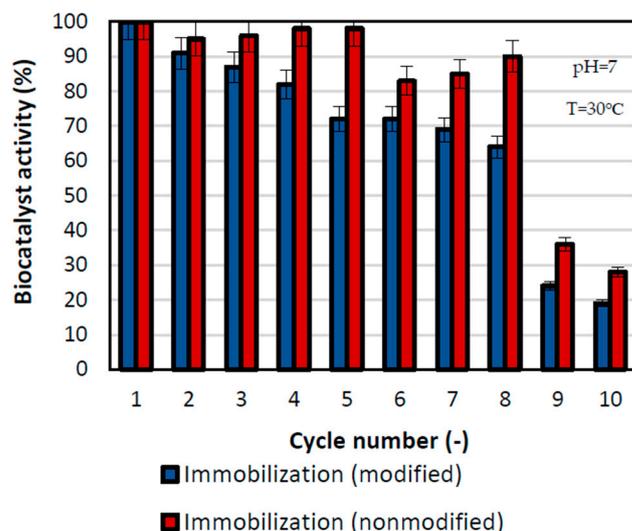


**Figure 4.** Thermal stability of lipase immobilized by two physical techniques: by the adsorption interactions and partially interfacial activation and mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange. All experiments were performed in duplicate and the results presented in each of the graphs are presented as a mean value with standard deviation (error value). The thermal stability test was performed in the 100 mM phosphate buffer at pH 7 in different temperatures.

The highest thermal stability of the biocatalyst was noticed at the lowest temperature of 30 °C, where both immobilized lipases showed the highest residual activity. Above that temperature, the residual activities for both samples varied but were lower as compared to 30 °C due to partial lipase inactivation. At the temperature of 50 °C, the relative activities were at the level of around 88% for the sample performed with nonmodified support and 81% for the modified support immobilization one. However, even at the temperature of 80 °C, both types of biocatalysts retained about 80% of their relative activity. At the high temperature, silica support acts as a heat absorber and provides a protective effect for immobilized enzymes. This results in significant thermal stability of biocatalyst supported

by the stabilization of the enzyme structure, and its protection against denaturation and defragmentation [48].

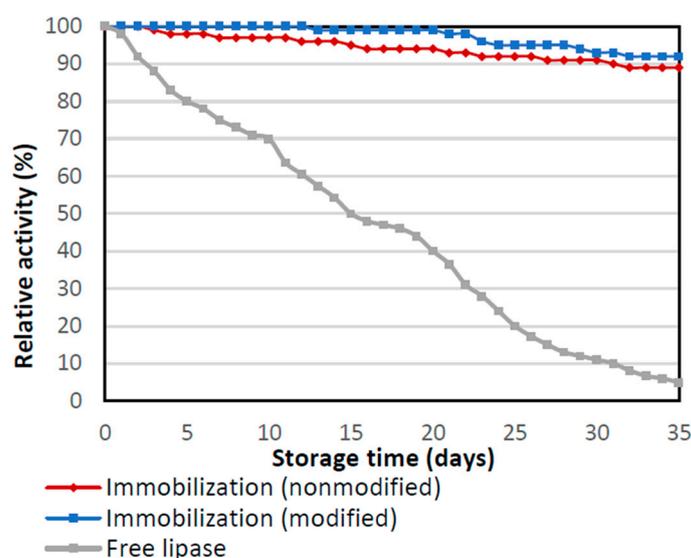
One of the most crucial parameters for practical application of produced biocatalysts is the possibility of biocatalyst reuse, which is why during this research a series of replications of the reactions were performed (Figure 5). Reusability is an important aspect of enzymes used in a practical way that reduces the costs of their exploitation. After the first cycle, the biocatalyst's activities were at the level of 100%, and after that, the activity slightly decreased. For the sample prepared by immobilization with modified support, the activity was higher, in all reaction cycles, than in the case of immobilization with nonmodified support. The rapid drop in activity was visible after the 9th cycle, where the relative activity of the biocatalyst prepared by the physical immobilization by adsorption interactions was at the level of 26% and the one by mixed physical immobilization was at the level of 38%. Nevertheless, over eight repeated cycles, more than 60% of relative activity was retained by the lipase immobilized on nonmodified support, whereas over 80% of activity was preserved by the biocatalyst made by the mixed physical immobilization method. The greater decrease in the activity of biocatalysts immobilized on nonmodified support may be related to the greater inhibition of the enzyme by the substrates and reaction products. Beyond inhibition, the observed decrease may also be related to enzyme deactivation and its partial washing out. During immobilization on modified support, the enzyme is strongly attached to the support's surface by chemical bonds, whereas the enzyme immobilized on nonmodified support is attached with the use of weak hydrogen bonds and van der Waals forces, leading to faster enzyme elution. Nevertheless, preservation of high activity over the following catalytic cycles indicates a stable binding of the enzyme to the support.



**Figure 5.** Reusability of the biocatalyst obtained by physical immobilization by the adsorption interactions and partially interfacial activation and mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange. All experiments were performed in duplicate and the results presented in each of the graphs are presented as a mean value, for which standard deviation (error value) does not exceed 5%. The reusability tests were performed in the temperature of 30 °C and in phosphate buffer at pH 7.

Storage stability was also investigated for native and immobilized forms of lipase during performing of storage stability. Obtained biocatalysts were stored in PBS 7, at the temperature of 4 °C for 35 days (Figure 6). It is noticeable that for native enzyme relative activity decreased from the first day of storage and after 35 days showed less than 12% of its activity. On the other hand, for enzymes immobilized by physical immobilization by the adsorption interactions and partially interfacial activation and mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange, the relative activity was very

high even at the end of the storage test. After 35 days both immobilized biocatalysts remained highly active with relative activity above 90%. Slightly higher activity for lipase immobilized by mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange is related to the higher stabilization of enzyme structure due to stronger chemical bonds and limited enzyme leaching. Thus, enzyme immobilization determines the greater stabilization of the enzyme structure, thanks to which the enzyme maintains high activity even after a long incubation time. High activity and stability under various process conditions of the biocatalysts, which consist of lipase immobilized enzymes on a silica support, are important because during API synthesis the process conditions are variable. Often a higher temperature is needed during the process to successfully obtain an intermediate or final product with therapeutic properties. Therefore, it is important to improve the stability of immobilized biocatalysts, so they can preserve higher catalytic properties than free biocatalysts under changing conditions.



**Figure 6.** Storage stability of the native enzyme and lipase immobilized by physical immobilization by the adsorption interactions and partially interfacial activation (immobilization nonmodified) and mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange (immobilization modified). All experiments were performed in duplicate and the results presented in each of the graphs are shown as a mean value, for which standard deviation (error value) does not exceed 5%.

It might also be concluded that the biocatalytic systems obtained in this study should be considered promising for resolution of racemic mixture of ketoprofen methyl ester to obtain needed (R)-enantiomer of ketoprofen.

### 3.3. Enzymatic Resolution of Racemic Ketoprofen

To verify the above-stated hypothesis, the free and immobilized fungi lipase from *Aspergillus niger* was used for enzymatic conversion to catalyze enantioselective hydrolysis of (R)-ketoprofen from (R, S)-ketoprofen ethyl ester racemic mixture (Table 4). This type of lipase is more specific towards (R)- form than (S)- and it is related to the origin of the enzyme [49]. This is reflected in the obtained data. The highest efficiency of the reaction (51.1%) was obtained for the lipase immobilized by physical immobilization by the adsorption interactions and partially interfacial activation in PBS 7 and the process was conducted for 4 days, whereas 20 mg of immobilized enzyme was used. Similar results were obtained for a lower amount of the biocatalyst, where the efficiency equaled 46.3%. Around 45% process efficiency was reached using 20 mg of lipase mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange.

**Table 4.** The efficiency of the process after enzymatic conversion of ketoprofen methyl ester and enantiomeric excess (ee%) of (R)-ketoprofen over (S)-ketoprofen after 24 h and 96 h.

Immobilization Type	Amount of Enzyme (mg)	Solvent	Time (h)	Efficiency (%)	(R)-Ketoprofen ee (%)
Free lipase	50	PBS 7	96	21.7	99.7
Nonmodified support	10	PBS 7	96	27.4	99.7
Nonmodified support	15	PBS 7	96	46.3	99.9
Nonmodified support	20	PBS 7	96	51.1	97.1
Modified support	10	PBS 7	96	21.7	98.6
Modified support	15	PBS 7	96	32.3	100.0
Modified support	20	PBS 7	96	44.1	100.0
Nonmodified support	10	PBS 7	24	23.3	99.5
Nonmodified support	15	PBS 7	24	38.0	99.7
Nonmodified support	20	PBS 7	24	45.4	98.8
Modified support	10	PBS 7	24	20.2	100.0
Modified support	15	PBS 7	24	29.7	99.8
Modified support	20	PBS 7	24	40.3	98.1
Nonmodified support	10	hexane	24	46.0	98.9
Modified support	10	hexane	24	6.6	95.4
Nonmodified support	10	diisopropyl ether	24	19.8	98.8
Modified support	10	diisopropyl ether	24	9.9	96.9
Nonmodified support	10	isopropanol	24	12.4	98.6
Modified support	10	isopropanol	24	6.5	100.0

These data correspond to the values of activity retention, which showed that lipase immobilized by physical immobilization by the adsorption interactions and partially interfacial activation retained higher activity than lipase mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange. Interestingly, only a slight increase in process yield, as compared to 24 h of process time, was observed when the reaction duration was prolonged to 96 h. From an economical perspective, the 24 h process is more suitable for this reaction due to the fact that the efficiencies for most of the performed reactions are higher and take a shorter time. Thus, the next tests were performed for 24 h. In the pure organic solvent, efficiencies were relatively low: for lipase immobilized by physical immobilization by the adsorption interactions and partially interfacial activation, where the process was conducted for 24 h in hexane as a solvent, the efficiency was at the level of 46%. For most of the samples conducted in organic solvents, the drop in efficiency is visible, because the organic solvent interferes with the enzyme active site resulting in lower values of process efficiency. For all processes, the enantiomeric excess was very high and mostly exceeded 98% and more. As shown in the literature, the efficiencies but also enantiomeric excess is very much related to the type of enzyme used in the process. Lipases may differ from each other with the parameters like optimal temperature range, pH, or specificity in synthesis processes.

Lipase from *Candida antarctica* (CALB) has the same enantioselectivity toward (R)-ketoprofen, exactly like lipase from *Aspergillus niger*. These properties, on the other hand, can be used in an unconventional way to obtain (S)-ketoprofen. For example, Ong et al. used lipase in the esterification of the racemic mixture of ketoprofen in order to obtain a pure (S)-enantiomer [50]. They obtained enantiomeric excess of the product at the level of 66.4%. In another study, Xiang et al. used lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized on polymeric resin for ketoprofen resolution. Due to the enantioselectivity of the enzyme toward the (R)-enantiomer, during the esterification process mainly the (R)-ketoprofen ester was obtained; however, traces of (S)-ketoprofen were also detected. Enantioselectivity varied from 1.06 to 1.91, depending on the type of alcohol used in the esterification reaction [51].

#### 4. Conclusions

In the presented study, lipase was immobilized using silica nanoparticles to catalyze the process of kinetic resolution of ketoprofen methyl ester. During this research two biocatalytic systems were obtained, with the use of physical immobilization by the adsorption interactions and partially interfacial activation and mixed physical immobilization via interfacial activation and ion exchange. Lipase from *Aspergillus niger* immobilization resulted in production of highly stable and active biocatalysts that retained over 80% of their activity over a wide range of process conditions, mainly due to the protecting effect of the support material and irrespective of the immobilization approach used. The highest activity of lipase physical immobilization by the adsorption interactions and partially interfacial activation was observed at temperature of 40 °C and pH 7, whereas for the second used technique the most suitable reactions conditions were 20 °C and pH 8. These results indicate the obtainment of biocatalysts suitable for application in API synthesis due to their great stability. Taking into account the obtained results of enantiomeric excess, it is noticeable that lipase from *Aspergillus niger* has a preference over directing the reaction towards creation of (R)-ketoprofen. The efficiencies and enantiomeric excess obtained during biocatalytic reactions were at the level of around 46% and above 98%, respectively, irrespective of the type of the immobilized lipase and solvent use, suggesting that selected lipase is effective in this type of reaction and can be successfully used during production of (R)-enantiomer of ketoprofen. The highest process efficiency and enantiomeric excess were obtained for the biocatalyst obtained by physical immobilization by the adsorption interactions and partially interfacial activation, where 51.1% and 97.1% were obtained, respectively. The presented biocatalytic approach can significantly reduce the use of organic solvents by allowing reactions to be carried out using only aqueous solutions such as buffers. Furthermore, thanks to the use of immobilized enzymes, it is possible to obtain the desired product, omitting a number of additional chemical reactions and harmful reagents. The conducted research proves the advantages of immobilized lipase in practice and makes it possible to obtain the desired products in a simple way. In the future, the presented systems might be used at the stage of ketoprofen ester production in order to obtain pure (S)-enantiomer.

**Author Contributions:** Conceptualization, O.D. and J.Z.; methodology, O.D. and J.Z.; formal analysis, O.D. and D.S.; investigation, O.D.; D.S. and A.Z.; resources, O.D. and J.Z.; data curation, A.Z. and W.S.; writing—original draft preparation, O.D.; A.Z. and W.S.; writing—review and editing, J.Z. and T.J.; visualization, O.D. supervision, J.Z.; project administration, J.Z. and T.J.; funding acquisition, J.Z. and T.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was partially supported by the National Science Centre, Poland under the research grant no. 2019/35/D/ST8/02087 (J.Z.). This work was supported by the Foundation for Polish Science (FNP) (A.Z.). This work was also supported by the Ministry of Education and Science, Poland (O.D. and T.J.).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors thank Adam Grzywaczyk from Institute of Chemical Technology and Engineering, Faculty of Chemical Technology, PUT for his help in conducting the GC-MS analysis.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interests.

#### References

1. Vonkeman, H.E.; van de Laar, M.A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Adverse effects and their prevention. *Semin. Arthritis Rheum.* **2010**, *39*, 294–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Patel, R. Biocatalysis: Synthesis of Key Intermediates for Development of Pharmaceuticals. *ACS Catal.* **2011**, *1*, 1056–1074. [[CrossRef](#)]

3. Kim, J.H.; Scialli, A.R. Thalidomide: The Tragedy of Birth Defects and the Effective Treatment of Disease. *Toxicol. Sci.* **2011**, *122*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Brune, K.; Patrignani, P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pain Res.* **2015**, *8*, 105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Dhokchawle, B.; Tauro, S.; Bhandari, A. Ester prodrugs of ketoprofen: Synthesis, hydrolysis kinetics and pharmacological evaluation. *Drug Res.* **2015**, *66*, 46–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Ong, A.L.; Kamaruddin, A.H.; Bhatia, S.; Aboul-Enein, H.Y. Enantioseparation of (R,S)-ketoprofen using *Candida antarctica* lipase B in an enzymatic membrane reactor. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 2476–2485. [[CrossRef](#)]
7. Truppo, M.D. Biocatalysis in the pharmaceutical industry: The Need for Speed. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 476–480. [[CrossRef](#)]
8. Wu, S.; Snajdrova, R.; Moore, J.C.; Baldenius, K.; Bornscheuer, U. Biocatalysis: Enzymatic synthesis for industrial applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *60*, 88–119. [[CrossRef](#)]
9. Burke, A.J.; Marques, C.S.; Turner, N.J.; Hermann, G.J. *Active Pharmaceutical Ingredients in Synthesis Catalytic Processes in Research and Development*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2018.
10. Bezborodov, A.M.; Zagustina, N.A. Enzymatic biocatalysis in chemical synthesis of pharmaceuticals. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2016**, *52*, 237–249. [[CrossRef](#)]
11. Simon, R.C.; Mutti, F.G.; Kroutil, W. Biocatalytic synthesis of enantiopure building blocks for pharmaceuticals. *Drug Discov. Today Technol.* **2014**, *10*, e37–e44. [[CrossRef](#)]
12. Derewenda, Z.S.; Sharp, A.M. News from the interface: The molecular structures of triacylglyceride lipases. *Trends Biochem. Sci.* **1993**, *18*, 20–25. [[CrossRef](#)]
13. Brzozowski, A.M.; Derewenda, U.; Derewenda, Z.S.; Dodson, G.G.; Lawson, D.M.; Turkenburg, J.P.; Thim, L. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* **1991**, *351*, 491–494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Verger, R. Interfacial activation of lipases: Facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 32–38. [[CrossRef](#)]
15. Contesini, F.J.; Davanço, M.G.; Borin, G.P.; Vanegas, K.G.; Cirino, J.P.; Melo, R.R.; Mortensen, U.H.; Hildén, K.; Campos, D.R.; Carvalho, P.D. Advances in recombinant lipases: Production, engineering, immobilization and application in the pharmaceutical industry. *Catalysts* **2020**, *10*, 1032. [[CrossRef](#)]
16. Adham, N.Z.; Ahmed, E.M. Extracellular lipase of *Aspergillus niger* NRRL3; Production, partial purification and properties. *Indian J. Microbiol.* **2009**, *49*, 77–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Nikalje, A.P.; Tathe, A.C.; Ghodke, M.S. Biocatalysis: A brief review. *Asian J. Chem.* **2011**, *4*, 1355–1360.
18. Bornscheuer, U.T.; Kazlauskas, R.J. *Hydrolases in Organic Synthesis*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2006.
19. Estrada-Valenzuela, D.; Ramos-Sánchez, V.H.; Zaragoza-Galán, G.; Espinoza-Hicks, J.C.; Bugarin, A.; Chávez-Flores, D. Lipase assisted (S)-ketoprofen resolution from commercially available racemic mixture. *Pharmaceutics* **2021**, *14*, 996. [[CrossRef](#)]
20. Mohammadi, M.; Ramazani, A.; Garmroodi, M.; Yousefi, M.; Yazdi, A.; Esfahani, K. Resolution of ibuprofen enantiomers by *Rhizomucor miehei* lipase (RML) immobilized via physical and covalent attachment. *Modares J. Biotechnol.* **2019**, *10*, 351–361.
21. Grunwald, P. *Pharmaceutical Biocatalysis: Chemoenzymatic Synthesis of Active Pharmaceutical Ingredients*; Jenny Stanford Publishing: Singapore, 2019.
22. Piacentini, E.; Mazzei, R.; Giorno, L. Comparison between Lipase Performance Distributed at the O/W Interface by Membrane Emulsification and by Mechanical Stirring. *Membranes* **2021**, *11*, 137. [[CrossRef](#)]
23. Thangaraj, B.; Solomon, P.R. Immobilization of lipases—A review. Part I: Enzyme immobilization. *ChemBioEng Rev.* **2019**, *5*, 157–166. [[CrossRef](#)]
24. Shuai, W.; Das, R.K.; Naghdi, M.; Brar, S.K.; Verma, M. A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2017**, *64*, 496–508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Mateo, C.; Palomo, J.M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451–1463. [[CrossRef](#)]
26. Khan, A.A.; Akhtar, S.; Husain, Q. Simultaneous purification and immobilization of mushroom tyrosinase on an immunoaffinity support. *Process Biochem.* **2005**, *40*, 2379–2386. [[CrossRef](#)]
27. Akhtar, S.; Khan, A.A.; Husain, Q. Simultaneous purification and immobilization of bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidases on bioaffinity support. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2005**, *80*, 198–205. [[CrossRef](#)]
28. Rodrigues, R.C.; Berenguer-Murcia, Á.; Carballares, D.; Morellon-Sterling, R.; Fernandez-Lafuente, R. Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other stabilization strategies. *Biotechnol. Adv.* **2021**, *52*, 107821. [[CrossRef](#)]
29. Rodrigues, R.C.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, Á.; Torres, R.; Fernández-Lafuente, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6290–6307. [[CrossRef](#)]
30. Garcia-Galan, C.; Berenguer-Murcia, Á.; Fernandez-Lafuente, R.; Rodrigues, R.C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2885–2904. [[CrossRef](#)]
31. Contesini, F.J.; Lopes, D.B.; Macedo, G.A.; da Graça Nascimento, M.; de Oliveira Carvalho, P. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2010**, *67*, 163–171. [[CrossRef](#)]
32. Kavitha, K.; Shankari, K.; Meenambiga, S.S. A review on extraction of lipase from *aspergillus* species and its applications. *Res. J. Pharm. Technol.* **2021**, *14*, 4471–4475.

33. Foresti, M.L.; Galle, M.; Ferreira, M.L.; Briand, L.E. Enantioselective esterification of ibuprofen with ethanol as reactant and solvent catalyzed by immobilized lipase: Experimental and molecular modeling aspects. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2009**, *84*, 1461–1473. [[CrossRef](#)]
34. Wang, S.-Z.; Wu, J.-P.; Xu, G.; Yang, L.-R. Chemo-enzymatic asymmetric synthesis of S-citalopram by lipase-catalyzed cyclic resolution and stereoinversion of quaternary stereogenic center. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2012**, *36*, 1031–1037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)]
36. Barbosa, O.; Torres, R.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, Á.; Rodrigues, R.C.; Fernandez-Lafuente, R. Heterofunctional Supports in Enzyme Immobilization: From Traditional Immobilization Protocols to Opportunities in Tuning Enzyme Properties. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 2433–2462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kharrat, N.; Ali, Y.B.; Marzouk, S.; Gargouri, Y.-T.; Karra-Châabouni, M. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. *Process Biochem.* **2011**, *46*, 1083–1089. [[CrossRef](#)]
38. Tan, Z.; Bilal, M.; Li, X.; Ju, J.; Teng, Y.; Iqbal, H.M.N. Nanomaterial-immobilized lipases for sustainable recovery of biodiesel—A review. *Fuel* **2022**, *123429*, 316. [[CrossRef](#)]
39. Zdarta, J.; Sałek, K.; Kołodziejczak-Radzimska, A.; Siwińska-Stefańska, K.; Szwarc-Rzepka, K.; Norman, M.; Jesionowski, T. Immobilization of Amano Lipase A onto Stöber silica surface: Process characterization and kinetic studies. *Open Chem.* **2014**, *13*, 138–148. [[CrossRef](#)]
40. Collins, S.E.; Lassalle, V.; Ferreira, M.L. FTIR-ATR characterization of free *Rhizomucor meihei* lipase (RML), Lipozyme RM IM and chitosan-immobilized RML. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2011**, *72*, 220–228. [[CrossRef](#)]
41. Foresti, M.L.; Valle, G.; Bonetto, R.; Ferreira, M.L.; Briand, L.E. FTIR, SEM and fractal dimension characterization of lipase B from *Candida antarctica* immobilized onto titania at selected conditions. *Appl. Surf. Sci.* **2010**, *256*, 1624–1635. [[CrossRef](#)]
42. Bódalo, A.; Bastida, J.; Máximo, M.F. A comparative study of free and immobilized soybean and horseradish peroxidases for 4-chlorophenol removal: Protective effects of immobilization. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2008**, *31*, 587–593. [[CrossRef](#)]
43. Pinheiro, B.B.; Rios, N.S.; Aguado, E.R.; Fernandez-Lafuente, R.; Freire, T.M.; Fehine, P.B.; Dos Santos, J.C.; Goncalves, L.R. Chitosan activated with divinyl sulfone: A new heterofunctional support for enzyme immobilization. Application in the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *130*, 798–809. [[CrossRef](#)]
44. Ismail, A.R.; Baek, K.-H. Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *163*, 1624–1639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ma, X.; Kexin, Z.; Yonggang, W.; Ebadi, A.; Toughani, M. Optimization of low-temperature lipase production conditions and study on enzymatic properties of *Aspergillus Niger*. *Iran. J. Chem. Chem. Eng.* **2021**, *40*, 1364–1374.
46. Zdarta, J.; Jankowska, K.; Bachosz, K.; Kijeńska-Gawrońska, E.; Zgoła-Grzeškowiak, A.; Kaczorek, E.; Jesionowski, T. A promising laccase immobilization using electrospun materials for biocatalytic degradation of tetracycline: Effect of process conditions and catalytic pathways. *Catal. Today* **2019**, *348*, 127–136. [[CrossRef](#)]
47. Zdarta, J.; Norman, M.; Smulek, W.; Moszyński, D.; Kaczorek, E.; Stelling, A.; Jesionowski, T. Spongin-based scaffolds from *Hippospongia communis* demosponge as an effective support for lipase immobilization. *Catalysts* **2017**, *7*, 147. [[CrossRef](#)]
48. Jiang, Y.; Zhai, J.; Zhou, L.; He, Y.; Ma, L.; Gao, J. Enzyme-silica hybrid nanoflowers shielding in polydopamine layer for the improvement of enzyme stability. *Biochem. Eng. J.* **2018**, *132*, 196–205. [[CrossRef](#)]
49. Toledo, M.V.; Briand, L.E. Relevance and bio-catalytic strategies for the kinetic resolution of ketoprofen towards dexketoprofen. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2017**, *38*, 778–800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Ong, A.L.; Kamaruddin, A.H.; Bhatia, S.; Long, W.S.; Lim, S.T.; Kumari, R. Performance of free *Candida antarctica* lipase B in the enantioselective esterification of (R)-ketoprofen. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 924–929. [[CrossRef](#)]
51. Li, X.; Liu, T.; Xu, L.; Gui, X.; Su, F.; Yan, Y. Resolution of racemic ketoprofen in organic solvents by lipase from *Burkholderia cepacia* G63. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2012**, *17*, 1147–1155. [[CrossRef](#)]

## **Publikacja 2**

**[P2] Degórska O\***, Szada D, Jesionowski T, Zdarta J\*. A biocatalytic approach for resolution of 3-hydroxy-3-phenylpropanonitrile with the use of immobilized enzymes stabilized with ionic liquids (2023), Computational and Structural Biotechnology Journal, 21, 1593-1597.



## Short Communication

# A biocatalytic approach for resolution of 3-hydroxy-3-phenylpropanonitrile with the use of immobilized enzymes stabilized with ionic liquids



Oliwia Degórska\*, Daria Szada, Teofil Jesionowski, Jakub Zdarta\*

Faculty of Chemical Technology, Institute of Chemical Technology and Engineering, Poznan University of Technology, Berdychowo 4, 60965 Poznan, Poland

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 14 December 2022

Received in revised form 10 February 2023

Accepted 14 February 2023

Available online 15 February 2023

## Keywords:

Biocatalysis

Active pharmaceutical ingredients

Hydrolases

Immobilized enzymes

## ABSTRACT

Due to the growing importance of synthesizing active pharmaceutical ingredients (APIs) in enantiomerically pure form, new methods of asymmetric synthesis are being sought. Biocatalysis is a promising technique that can lead to enantiomerically pure products. In this study, lipase from *Pseudomonas fluorescens*, immobilized on modified silica nanoparticles, was used for the kinetic resolution (via transesterification) of a racemic mixture of 3-hydroxy-3-phenylpropanonitrile (3H3P), where the obtaining of a pure (S)-enantiomer of 3H3P is a crucial step in the fluoxetine synthesis pathway. For additional stabilization of the enzyme and enhanced process efficiency, ionic liquids (ILs) were used. It was found that the most suitable IL was [BMIM]Cl; a process efficiency of 97.4 % and an enantiomeric excess (ee%) of 79.5 % were obtained when 1 % (w/v) of that IL in hexane was applied and the process was catalyzed by lipase immobilized on amine-modified silica.

© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of Research Network of Computational and Structural Biotechnology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introduction

Biocatalysis has become increasingly important as an alternative to conventional methods of organic synthesis, providing processes that are sustainable and in line with the principles of Green Chemistry [1]. Today, the rapidly growing pharmaceutical industry is becoming the main area in which enzymes are used. Enzymes are suitable candidates for catalyzing the synthesis of active pharmaceutical ingredients (APIs) and their key intermediates [2]. The most important features of enzymes are high stereoselectivity, regioselectivity and chemoselectivity. These are particularly important for the synthesis of chiral APIs, which represent most commercially available drugs (e.g., fluoxetine, naproxen) [3,4]. They have many advantages over classic chemical synthesis, due to the high enantioselectivity that is required in pharmaceutical industry. Moreover, using biocatalysts, also costs reduction is possible.

Despite the many benefits of enzyme catalysis, there are certain limitations relevant to the use of their free forms, as enzymes in native form have limited stability under harsh reaction conditions

[5]. To improve the properties of free enzymes, immobilization – the binding of an enzyme to a solid carrier – is frequently used [6]. The use of immobilized enzymes facilitates the separation of the biocatalyst from the product, improves downstream processing and reduces enzyme losses, and improves the stability (a solid carrier often has a protective effect on the enzyme) and reusability of the immobilized enzymes, which is economically advantageous [7].

Among many groups of enzymes, lipases are the most widely applied in the synthesis of APIs. A common example is the enantioselective synthesis of (S)-propranolol, a drug used to treat high blood pressure [8]. Duloxetine, sertraline, fluoxetine (antidepressants) and pregabalin (antipsychotic agent) are significant examples of substances successfully synthesized via an enzymatic approach [9,10]. One of the most important APIs in psychiatry is fluoxetine, a drug with antidepressant and anxiety-reducing properties. Fluoxetine (Prozac) is commercially available as a racemic mixture of (R)-fluoxetine and (S)-fluoxetine, as both enantiomers have a similar effect on serotonin reuptake inhibition, which is reflected in the pharmacological effect [11]. However, the metabolites of (S)-fluoxetine and (R)-fluoxetine – (S)-norfluoxetine and (R)-norfluoxetine, respectively – exhibit striking discrepancy in activity; indeed, (S)-norfluoxetine has an approximately 20-fold higher capacity to inhibit serotonin reuptake than (R)-norfluoxetine [12].

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [oliwia.degorska@doctorate.put.poznan.pl](mailto:oliwia.degorska@doctorate.put.poznan.pl) (O. Degórska), [jakub.zdarta@put.poznan.pl](mailto:jakub.zdarta@put.poznan.pl) (J. Zdarta).

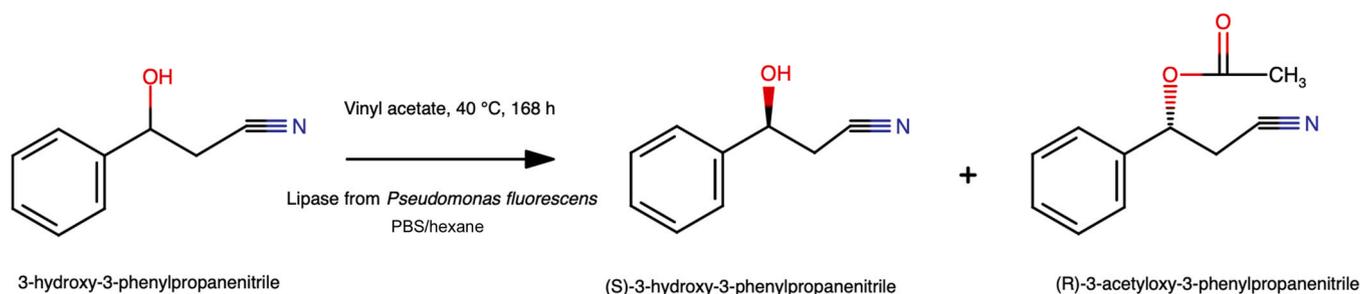


Fig. 1. Enzymatic resolution of 3H3P with the use of immobilized lipase.

In this study, lipase from *Pseudomonas fluorescens*, immobilized on modified silica nanoparticles, was used for the kinetic resolution of a racemic mixture of 3-hydroxy-3-phenylpropanenitrile (3H3P) to obtain a pure (S)-enantiomer of 3H3P. Transesterifications were carried out with the use of a novel approach based on the application of imidazolium ionic liquids with Cl<sup>-</sup> and NTF<sub>2</sub> anions to stabilize the enzymes and to increase their activity and stereoselectivity. A detailed analysis of enzyme stability and the results of tests of reaction performance indicate that this is a promising approach in fluoxetine synthesis.

## 2. Experimental

### 2.1. Support modification, enzyme immobilization and biocatalyst characterization

The silica support was modified according to the methodology presented previously [13] using 3-(aminopropyl)triethoxysilane (APTES), 3-(mercaptopropyl)trimethoxysilane, triethoxy(octyl)silane and vinyltrimethoxysilane. Modification has been conducted with use of 2 g of silica, which was placed in the crystallizer. Then, solution consisting of 40 mL of methanol:water (4:1) mixture was prepared in volumetric flasks, to which 0.6 g of the appropriate modifier was added. The next step was to evenly wet the silica weighing with a specific modifier solution, which was sprayed over the material using an atomizer. The final step in the modification process was to dry the obtained samples at 80 °C for 24 h. The dried material was transferred to falcons and stored at room temperature. Next, lipase from *Pseudomonas fluorescens* was immobilized (5 mg/mL, pH 7, T = 30 °C, t = 24 h) on the surface of the modified supports.

The resulting biocatalysts were characterized with the use of a 15 mM solution of *para*-nitrophenyl palmitate (pNPP) according to the methodology reported previously [14], to determine the relative activity of the immobilized enzymes. Biocatalysts were tested in appropriate buffer solution over a range of pH values (5–10) and temperatures (30–70 °C), and reusability (10 cycles) and thermal stability (3 h incubation at 30–70 °C) were also determined [15]. To each of the reaction system 25 mg of free lipase or corresponding amount of the system after immobilization containing 25 mg of the biocatalyst was used. The biocatalysts activities is presented as relative activity, where 100 % relative activity is defined as the highest optimal activity for tests showing effect of pH, temperature and thermal stability, whereas for reusability test, 100 % relative activity is defined as the initial value of enzyme activity at the beginning of the test.

### 2.2. Racemic mixture resolution: biocatalysts with the addition of ILS

The produced biocatalysts were used in the resolution of two enantiomers of 3H3P that were obtained according to a previously published method [16]. Kinetic resolution of 3H3P (Fig. 1) was conducted with the addition of two ionic liquids separately, [BMIM]Cl and [BMIM]NTf<sub>2</sub>, to test how the amount and type of ILS affect the enzymes' activity and process efficiency. At this stage, a proper amount of freshly prepared biocatalyst with APTES-modified support containing 25 mg of the immobilized lipase was added to the mixture containing 0.1 g of 3H3P racemic mixture, 0.26 g of vinyl acetate, 1 %, 5 % and 10 % (w/v, relative to the solvent) of each ionic liquid separately, and 10 mL of phosphate buffer at pH 7 or 10 mL of hexane, for comparison. Each process was continued for 7 days (168 h) at a temperature of 40 °C. All samples were analyzed using High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry (HPLC-MS) according to the methodology presented in the Supplementary materials.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Characterization of the biocatalyst

Surface modifiers with various functional groups were tested to determine their effect on the activity and stability of the immobilized biocatalysts over a wide range of process conditions. The effect of temperature and pH, thermal stability, and reusability were evaluated for all of the obtained systems, and for free lipase as a control. The tests were performed to evaluate which biocatalyst had the highest tolerance to the process conditions to be used in API synthesis.

#### 3.1.1. Catalytic activity recovery

The main parameter tested was catalytic activity recovery (Table 1). The highest catalytic activity recovery of immobilized lipase was obtained for the support modified with APTES, where 93 % of catalytic activity was retained. This result may be related to the presence of the most suitable functional groups on the surface of modified silica (-NH<sub>2</sub>), which are most compatible with enzyme surface groups, creating stable bonds between the material and the lipase. For the other modified materials, the catalytic activity was lower, at around 90%. Additionally, the amount of immobilized enzyme was also investigated. As it's been shown in the table the amount of immobilized enzyme corresponds with the activity recovery for each biocatalyst.

**Table 1**  
Catalytic activity recovery of lipase immobilized on modified silica nanoparticles.

Modifier	Activity recovery (%)	Amount of immobilized enzyme (mg/g)
3-(aminopropyl)triethoxysilane	93	105
3-(mercaptopropyl)trimethoxysilane	91	98
triethoxy(octyl)silane	88	94
vinyltrimethoxysilane	89	97

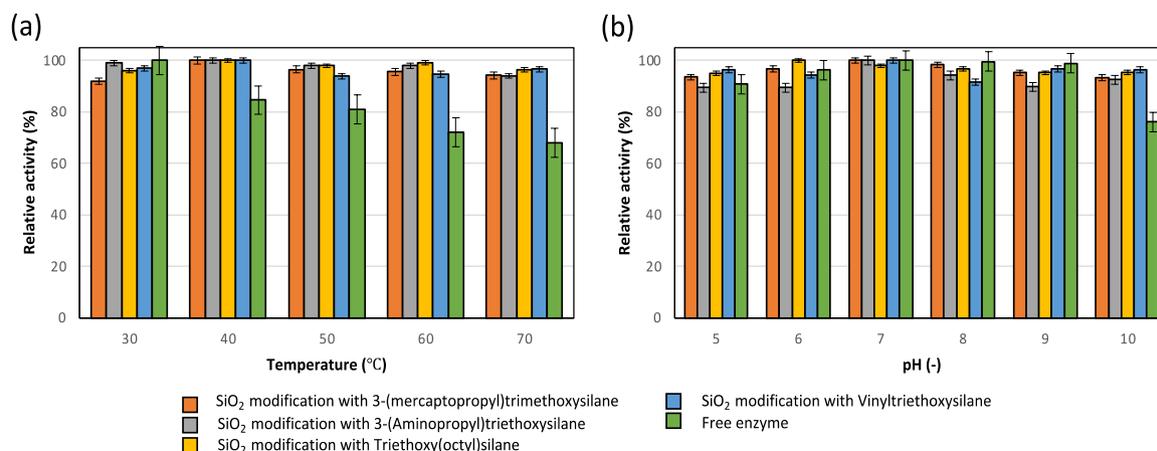


Fig. 2. Characterization of free lipase and lipase immobilized on modified silica supports effect of: (a) temperature, (b) pH.

The great amount of deposited enzyme on the silica surface did not lead to creation of the diffusional limitations resulting in high relative activity of the developed biocatalyst.

### 3.1.2. Effect of pH and temperature

It was found that immobilization increased the enzyme's stability under varying temperature. The native enzyme was characterized by decreased relative activity in harsh conditions, exhibiting less than 70% activity at 70 °C, whereas all immobilized enzymes showed over 90% relative activity at the same conditions (Fig. 2a). Further, at 40 °C, where all immobilized enzymes achieved their highest activity, the free enzyme retained around 85% relative activity.

The highest relative activity for all biocatalysts, including free lipase, was obtained at pH 7 (Fig. 2b). This is related to the optimal conditions for the strain of lipase used and suggests that no significant changes in enzyme structure occurred during immobilization [20]. However, all immobilized samples showed improved pH tolerance and retained higher activity over a wide pH range. For the enzyme immobilized on a support modified with APTES, the highest relative activity was observed at 40 °C and pH 7; nevertheless, at different temperatures and pH values the relative activity remained higher than 90%. In the case of native lipase, the highest activity was observed at a temperature of 30 °C and pH 7, but the relative activities were much lower (65–90%) when broad ranges of process parameters were applied. This confirms the stabilizing effect of the support on the enzyme's structure; the free enzyme is directly exposed to the process conditions and is more sensitive to them, as the results clearly show.

### 3.1.3. Reusability and thermal stability

Tests of reusability showed that the relative activity dropped continuously with repeated use (Fig. 3a). The best performance was recorded for the biocatalyst on a support modified with APTES, where after the 10th cycle the relative activity was above 80%. By contrast, the reuse of free lipase is impossible. Further, a study of thermal stability (Fig. 3b) showed that for all immobilized biocatalysts the relative activity was similar over a range of temperatures, but the activity of the native enzyme fell significantly at higher temperatures. For example, a decrease in activity by more than 40% was observed at 70 °C.

The results show that immobilization significantly increases the enzyme's stability and durability in changing process conditions, due to the protective effect of the support on the enzyme's structure, and the formation of stable enzyme–support interactions that rigidize the enzyme structure and limit its denaturation in harsh conditions and with repeated use [17].

Based on the collected data, the biocatalyst obtained by immobilizing lipase on silica modified with APTES was selected for use in the process of 3H3P conversion, as it exhibited the highest relative activity and durability, which were expected to result in the highest possible efficiency of API synthesis [18].

### 3.2. Resolution of racemic mixture

After evaluation of their properties, the system based on APTES-modified silica was applied in the resolution of a racemic mixture of 3H3P in various solvents and in the presence of various ionic liquids. The latter served to improve the enzyme's stability and activity, due to the protective and activation effect of ILs on the enzyme structure (Table 2). The addition of ionic liquids to the reaction medium supports enzyme recovery and allows the interfacial activation to occur. Because of the hydrophobic property of the IL, enzyme is more stable and its performance in terms of efficiency and enantiomeric excess is increased [19]. Nevertheless, in synthesis of various compounds, the high viscosity of ILs might be a problem when they are used as main solvents, that's why only an addition of ionic liquids that did not exceed 10% w/v, was performed in our study [20].

Different reaction media were used to test the enzyme's performance in aqueous and aprotic solvents. As predicted, in the presence of organic solvent the lipase catalyzed the transesterification reaction required in the tested process, whereas in the buffer medium low efficiencies of transesterification were obtained (the highest efficiency did not exceed 31.6%). For reactions conducted in hexane the highest efficiency (97.4%) and an ee% of 79.5% were obtained when 1% (w/v) of [BMIM]Cl was added to the reaction medium. It was found that for the IL with a chlorine anion, with an increase in the concentration of the IL the efficiency and ee% decreased by more than 20%, irrespective of whether the reaction was performed in aquatic or organic solvent. The enantiomeric excess followed an opposite trend with the addition of an IL with the NTf<sub>2</sub> anion, where the ee% increased with increasing concentrations of the ionic liquid, reaching 73.3% for reactions conducted in hexane. Further, significant differences in process efficiency were observed when increasing amounts of ILs, irrespectively by the type, were added to the system: with higher amounts of ILs the efficiencies were lower.

This may be related to the increased ionic strength and viscosity of the reaction medium, which reduce enzyme activity. By contrast, in the tests with free lipase the best performance was obtained using the IL with the Cl<sup>-</sup> anion and hexane as solvent; in this case the efficiency and ee% were 91.2% and 78.1%, respectively. In case of

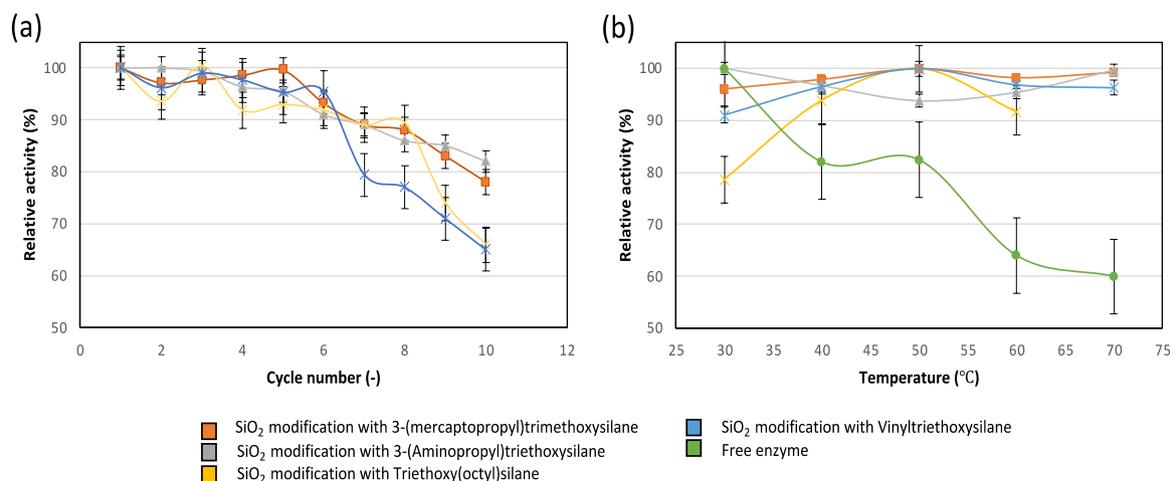


Fig. 3. Characterization of free lipase and lipase immobilized on modified silica nanoparticle supports: (a) reusability, (b) thermal stability.

Table 2

Effect of type of solvent and type and concentration of ionic liquid on the enantiomeric excess and efficiency of resolution of a racemic mixture of 3H3P.

Type of IL	Amount of IL (% w/v)	Type of solvent	Efficiency (%)	ee (%) of S-alcohol
[BMIM]Cl/immobilized enzyme	1	hexane	97.4	79.5
[BMIM]Cl/immobilized enzyme	5	hexane	75.6	64.3
[BMIM]Cl/immobilized enzyme	10	hexane	72.4	52.0
[BMIM]NTf <sub>2</sub> /immobilized enzyme	1	hexane	82.5	61.2
[BMIM]NTf <sub>2</sub> /immobilized enzyme	5	hexane	56.0	74.1
[BMIM]NTf <sub>2</sub> /immobilized enzyme	10	hexane	52.0	73.3
[BMIM]Cl/immobilized enzyme	1	PBS	12.7	68.5
[BMIM]Cl/immobilized enzyme	5	PBS	3.9	27.9
[BMIM]Cl/immobilized enzyme	10	PBS	3.9	26.4
[BMIM]NTf <sub>2</sub> /immobilized enzyme	1	PBS	31.6	58.2
[BMIM]NTf <sub>2</sub> /immobilized enzyme	5	PBS	26.3	74.1
[BMIM]NTf <sub>2</sub> /immobilized enzyme	10	PBS	14.5	83.0
[BMIM]Cl/free enzyme	1	hexane	91.2	78.1
[BMIM]Cl/free enzyme	1	PBS	22.7	32.7
[BMIM]NTf <sub>2</sub> /free enzyme	1	hexane	77.1	68.3
[BMIM]NTf <sub>2</sub> /free enzyme	1	PBS	25.4	43.7
-	-	hexane	68.2	53.7
-	-	PBS	21.3	41.4

samples without ILs addition, lower efficiency and ee% were reached. The better performance of the biocatalysts in the presence of ILs is related to the interfacial activation of lipases occurring at the boundary of two phases (aprotic–aqueous). Ionic liquids also strongly influence enzyme activity due to their over-stabilizing

action. This is related to the protective effect and hydrophobic environment that promote activity [21]. Using ILs it is possible to maintain the enzyme's conformation in the ionic net, and the addition of ionic liquid can be considered as providing both a reaction medium and an immobilization support.

Table 3

Comparison of chemical synthesis and biocatalysis in the synthesis/resolution of 3-hydroxy-3-phenylpropanonitrile.

Type of reaction	Catalyst	Reaction medium	Time (h)	S-alcohol		R-acetate		Ref.
				Yield (%)	ee (%)	Yield (%)	ee (%)	
Chemical synthesis	RuCl[(S,S)-N-(p-toluenesulfonyl)-1,2-diphenylethylenediamine](p-cymene)	formic acid/ triethylamine (3.1:2.6)	24	100	98	-	-	[21]
	RuCl[(S,S)-N-(p-toluenesulfonyl)-1,2-diphenylethylenediamine](p-cymene)	2-propanol	24	< 1	-	-	-	[21]
	RuCl[(S,S)-N-(p-toluenesulfonyl)-1,2-diphenylethylenediamine](p-cymene)	water	18	< 3	-	-	-	[22]
Free lipase	Lipase from <i>Pseudomonas cepacia</i>	diisopropyl ether	67	53	61	39	73	[23]
	Lipase from <i>Pseudomonas cepacia</i>	diisopropyl ether	180	46	> 99	44	> 99	[24]
	<i>Candida rugosa</i> lipase	diisopropyl ether	139	65	33	28	78	[24]
Immobilized lipase	<i>Pseudomonas</i> sp. lipase immobilized on Hyflo Super-Cel	diisopropyl ether	19	42	> 99	45	> 99	[23]
	<i>Pseudomonas cepacia</i> lipase immobilized on modified ceramic particles	diisopropyl ether	13	46	> 99	46	> 99	[24]
This study	<i>Pseudomonas cepacia</i> lipase immobilized on diatomite	diisopropyl ether	75	45	> 99	46	> 99	[24]
	Lipase from <i>Pseudomonas fluorescens</i> immobilized on modified silica nanoparticles	hexane [BMIM]Cl	168	97.4	79.5	-	-	-

## 4. Conclusions

It has been demonstrated that immobilized enzymes can be successfully used in the kinetic resolution of 3H3P. The influence of ionic liquids on the stabilization and improvement of lipase activity in this process has been proved for the first time. It was shown that the most suitable IL was [BMIM]Cl; in this case a process efficiency of 97.4% and an ee% of 79.5% were obtained when 1% (w/v) of IL in organic solvent was used and the process was catalyzed by lipase immobilized on APTES-modified silica. Studies without addition of ILs show that enzymes' activity is improved only in the presence of ionic liquids. These studies confirm the highly important role that enzymes can play in the pharmaceutical industry, due to high efficiency and enantioselectivity and the reduction of reaction steps. Nevertheless, the use of ionic liquids with immobilized enzymes for the resolution of APIs or their intermediates is still a novel and ongoing field of research, and further tests are very much needed. Below (Table 3) we also present the comparison of three different techniques applied for the synthesis/resolution of 3-hydroxy-3-phenylpropanonitrile. It is clear that enzymatic conversion allows the synthesis of specific enantiomers, without the need of using harmful catalysts. What is more yield of reaction after biocatalysis is relatively high comparing to chemical synthesis, showing key benefits of using enzymes. In our study, reactions conducted in hexane with the addition of ionic liquids proves the great advantage of immobilized lipases in enzymatic resolutions, by not only the high yield (above 97%) of reaction but also high enantiomeric excess (almost 80%). It is worth mentioning that comparing to the chemical synthesis enzymes are much safer for the environment and processes can be designed to obtain specific enantiomer.

## CRedit authorship contribution statement

**Oliwia Degórska:** Conceptualization, Investigation, Visualization, Writing – original draft. **Daria Szada:** Investigation, Formal analysis, Visualization. **Teofil Jesionowski:** Writing – review & editing, Supervision. **Jakub Zdarta:** Conceptualization, Writing – review & editing, Supervision, Project administration.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

This work was supported by the National Science Centre, Poland, under research Grant no. 2019/35/D/ST8/02087.

## Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.csbj.2023.02.026](https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.02.026).

## References

- [1] Abdelraheem EMM, Busch H, Hanefeld U, Tonin F. Biocatalysis explained: from pharmaceutical to bulk chemical production. *React Chem Eng* 2019;4:18781894.
- [2] Singu B, Annappure U. Role of enzymes in pharmaceutical and biotechnology industries. In: Kuddus M, editor. *Enzymes in food technology*. Singapore: Springer; 2018. p. 167–85.
- [3] Meghwanshi GK, Kaur N, Verma S, Dabi NK, Vashishtha A, Charan PD, et al. Enzymes for pharmaceutical and therapeutic applications. *Biotechnol Appl Biochem* 2020;67:586–601.
- [4] Dev A, Srivastava AK, Karmakar S. New generation hybrid nanobiocatalysts: the catalysis redefined. In: Hussain CM, editor. *Handbook of nanomaterials for industrial applications*. New Jersey: Elsevier; 2018. p. 217–31.
- [5] Hassan ME, Yang Q, Xiao Z, Liu L, Wang N, Cui X, et al. Impact of immobilization technology in industrial and pharmaceutical applications. *Biotech* 2019;3(9):440.
- [6] Sharma T, Xia C, Sharma A, Raizada P, Singh P, Sharma S, et al. Mechano-chemical and biological energetics of immobilized enzymes onto functionalized polymers and their applications. *Bioengineered* 2022;13:10518–39.
- [7] Shen J, Zhang S, Fang X, Salmon S. Advances in 3D gel printing for enzyme immobilization. *Gels* 2022;8:460.
- [8] Burke AJ, Marques CS, Tuner N, Hermann GJ. Active pharmaceutical ingredients in synthesis: catalytic processes in research and development. Weinheim: Wiley-VCH; 2018. p. 20–4.
- [9] Grunwald P. Chemoenzymatic synthesis of active pharmaceutical ingredients. Singapore: Jenny Stanford Publishing; 2020. p. 143–67.
- [10] Marx L, Ríos-Lombardía N, Süß P, Höhne M, Moris F, González-Sabín J, et al. Chemoenzymatic synthesis of sertraline. *Eur J Org Chem* 2019;2020:510–3.
- [11] Carvalho PS, Diniz LF, Mazon Cardoso TF, Silva CCP, Ellena J. Spontaneous resolution of R5-fluoxetine to a racemic conglomerate upon salt formation with oxalic acid. *Cryst Growth Des* 2022;22:5966–73.
- [12] Wang ZR, Hsieh MM. Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction coupled with field-amplified capillary electrophoresis for sensitive and quantitative determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in biological fluids. *Anal Bioanal Chem* 2020;412:5113–23.
- [13] Degórska O, Szada D, Zdarta A, Smulek W, Jesionowski T, Zdarta J. Immobilized lipase in resolution of ketoprofen enantiomers: examination of biocatalysts properties and process characterization. *Pharmaceutics* 2022;14:1443.
- [14] Alagöz D, Toprak A, Yildirim D, Tükel SS, Fernández-Lafuente R. Modified silicates and carbon nanotubes for immobilization of lipase from *Rhizomucor miehei*: effect of support and immobilization technique on the catalytic performance of the immobilized biocatalysts. *Enzym Microb Technol* 2021;144:109739.
- [15] Bastida A, Sabuquillo P, Armisen P, Fernández-Lafuente R, Hugué J, Guisán JM. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol Bioeng* 1998;58(5):486–93.
- [16] Zdarta J, Meyer AS, Jesionowski T, Pinelo M. Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: a comprehensive review. *Adv Colloid Interface Sci* 2018;258:1–20.
- [17] Kaar JL, Jesionowski AM, Berberich JA, Moulton R, Russell AJ. Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability. *J Am Chem Soc* 2003;125(14):4125–31.
- [18] Zhang YT, Zhi TT, Zhang L, Huang H, Chen H. Immobilization of carbonic anhydrase by embedding and covalent coupling into nanocomposite hydrogel containing hydroxycitrate. *Polymer* 2009;50:5693–700.
- [19] Elgharabawy AA, Riyadi FA, Alam MZ, Moniruzzaman M. Ionic liquids as a potential solvent for lipase-catalysed reactions: a review. *J Mol Liq* 2018;251:150–66.
- [20] Basso A, Cantone S, Linda P, Ebert C. Stability and activity of immobilised penicillin G amidase in ionic liquids at controlled aw. *Green Chem* 2005;7(9):671.
- [21] Watanabe M, Murata K, Ikariya T. Practical synthesis of optically active amino alcohols via asymmetric transfer hydrogenation of functionalized aromatic ketones. *J Org Chem* 2002;67:1712–5.
- [22] Wang W, Li Z, Mu W, Su L, Wang Q. Highly efficient asymmetric transfer hydrogenation of ketones in emulsions. *Catal Commun* 2010;11:480–4830.
- [23] Sakai T, Takayama T, Ohkawa T, Yoshio O, Ema T, Utaka M. Lipase-catalyzed efficient kinetic resolution of 3-hydroxy-3-(pentafluorophenyl)propionitrile. *Tetrahedron Lett* 1997;38:1987–90.
- [24] Kamal A, Ramesh Khanna GB, Ramu R. Chemoenzymatic synthesis of both enantiomers of fluoxetine, tomoxetine and nisoxetine: lipase-catalyzed resolution of 3-aryl-3-hydroxypropanenitriles. *Tetrahedron Asymmetry* 2002;13:2039–51.

# **A biocatalytic approach for resolution of 3-hydroxy-3-phenylpropanonitrile with the use of immobilized enzymes stabilized with ionic liquids**

**Oliwia Degórska<sup>1\*</sup>, Daria Szada<sup>1</sup>, Teofil Jesionowski<sup>1</sup>, Jakub Zdarta<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Faculty of Chemical Technology, Institute of Chemical Technology and Engineering,  
Poznan University of Technology, Berdychowo 4, 60965 Poznan, Poland

\*oliwia.degorska@doctorate.put.poznan.pl; jakub.zdarta@put.poznan.pl

## **Supplementary materials**

### **Chemicals and Materials**

Lipase from *Pseudomonas fluorescens*, para-nitrophenyl palmitate (pNPP), (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES), 3-(mercaptopropyl)trimethoxysilane, triethoxy(octyl)silane, vinyltrimethoxysilane, phosphate, acetate and TRIS buffers at various pH, [BMIM]Cl, [BMIM]NTf<sub>2</sub>, high purity methanol (hypergrade for LC-MS LiChrosolv), acetic acid (for LC-MS LiChropur) and silica nanoparticles were acquired from Sigma-Aldrich. Acetonitrile, sodium carbonate, sodiumhydrogen carbonate, were purchased from Chempur. Water with a resistivity of 18.2 MΩ was collected from an ELGA PureLab Classic UV purification system.

### **Racemic mixture resolution: biocatalysts with the addition of ILs**

After the reaction was completed, the samples were centrifuged to separate the products from the biocatalyst and diluted five times with methanol, then filtered through 0.2 μm pore-size filters and tested with the use of High Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometry (HPLC-MS) for enantiomer estimation. The chiral HPLC-MS analysis was performed using an Agilent Technologies 1290 Infinity II chromatography system, equipped with diode array detector. The mobile phase was composed of methanol and water, both containing 0.1% acetic acid. Separation was performed with the InfinityLab Poroshell 120 Chiral-V (2.7 μm, 2.1 x 150 mm) column maintained at 35°C. Chromatographic separation of analytes was achieved in gradient mode (from 5% to 100% of methanol in 12 min), with the flow rate set to 0.2 ml/min and the injection volume at 0.5 μl. Detection of analytes was carried out at a wavelength of 254 nm.

### Calculation of efficiency of racemic mixture resolution

After performed HPLC-MS analysis in order to determine the efficiency of the process of enzymatic conversion of 3-hydroxy-3-phenylpropanonitrile racemate to (S)-3-hydroxy-3-phenylpropanenitrile equation (1) was used:

$$W (\%) = \frac{C_p}{C_{pr}} \cdot 100\% \quad (1)$$

$W (\%)$  denotes efficiency of the enzymatic conversion of the racemic mixture of 3-hydroxy-3-phenylpropanenitrile,  $C_p$  denotes concentration of products obtained in the sample after enzymatic conversion (mg/mL) and  $C_{pr}$  denotes concentration of products obtained as a result of enzymatic conversion resulting from the stoichiometry of the reaction (mg/mL)

### Characterization of 3-hydroxy-3-phenylpropanonitrile

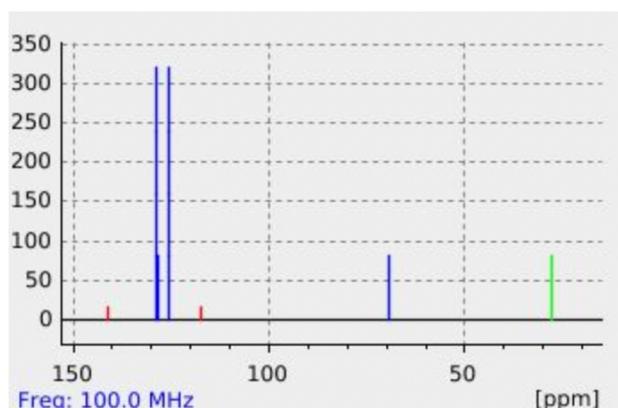


Fig. S1. H-NMR spectra of 3H3P

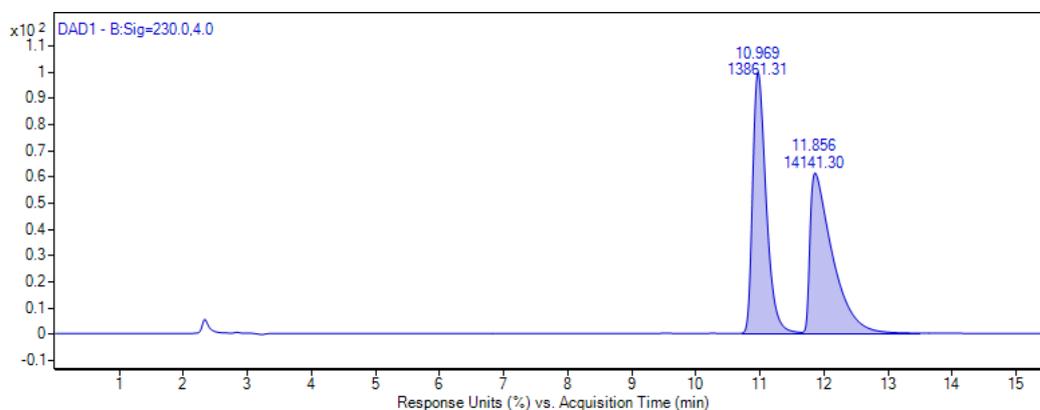
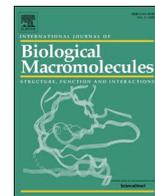


Fig. S2. HPLC-MS chromatogram of 3H3P

### **Publikacja 3**

**[P3] Degórska O\***, Szada D, Fu Q, Nghiem LD, Biadasz A, Jesionowski T, Zdarta J\*. Ionic liquid supported hydrogel–lipase biocatalytic systems in asymmetric synthesis of enantiomerically pure S-ibuprofen (2024), *International Journal of Biological Macromolecules*, 281, 136221.



# Ionic liquid supported hydrogel–lipase biocatalytic systems in asymmetric synthesis of enantiomerically pure S-ibuprofen

Oliwia Degórska<sup>a,\*</sup>, Daria Szada<sup>a</sup>, Qiang Fu<sup>b</sup>, Long Duc Nghiem<sup>b</sup>, Andrzej Biadasz<sup>c</sup>, Teofil Jesionowski<sup>a</sup>, Jakub Zdarta<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Chemical Technology and Engineering, Faculty of Chemical Technology, Poznan University of Technology, Berdychowo 4, PL-60965 Poznan, Poland

<sup>b</sup> Centre for Technology in Water and Wastewater Treatment, University of Technology Sydney, Ultimo, NSW 2007, Australia

<sup>c</sup> Institute of Physics, Faculty of Materials Engineering and Technical Physics, Poznan University of Technology, Piotrowo 3, PL-60965 Poznan, Poland

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Biocatalysis  
API synthesis  
Enzyme immobilization  
Hydrogel  
Lipase  
Ibuprofen  
Ionic liquids

## ABSTRACT

Novel hydrogel biocatalysts with immobilized lipase, stabilized by ionic liquids (ILs) of different hydrophobicity, were synthesized and evaluated. Variations of the time of immobilization and ratio of substrates during hydrogel synthesis were considered to obtain the most stable biocatalyst with the highest activity. Physicochemical characterization proved the success of the hydrogel synthesis and enzyme deposition on the surface of the support. Nevertheless, the key objective was to produce a biocatalyst for further application in ibuprofen methyl ester resolution, with the aim of obtaining an enantiomerically pure product. The hydrogel biocatalysts obtained in the presence of 5 wt% ILs after 8 h of immobilization achieved the highest activity recovery of 62 %. After 10 reaction cycles, enzymatic activity was still above 60 %, and the negative effect of pH and temperature on the activity of immobilized lipase was much lower than in the case of the free enzyme. After application of the catalyst in the resolution of ibuprofen methyl ester, the enantiomeric excess and conversion rate of the process were obtained for the dynamic kinetic resolution in isooctane. A conversion rate of 95 % was achieved due to the stabilization of the biocatalyst with IL and its resulting high catalytic activity. The study thus provides the pharmaceutical industry with a new potential approach with a strong scientific foundation.

## 1. Introduction

Hydrogels are water-insoluble polymeric networks with hydrophilic properties, and may be made from one or more monomer units, polymers, or cross-linking agents. Hydrogels exhibit multiple unique features, depending on the compounds used for their preparation. Their important advantages include the possibility of designing the composition, pore size, or surface groups. Due to their three-dimensional structure, they have the tendency to retain high amounts of fluid, such as water. They offer the desired functionality, stability, and biocompatibility for a variety of applications in science and industry [1,2]. The characteristics of hydrogels enable their use in the immobilization of enzymes, to improve operational stability and reusability and to reduce the cost of using enzymatic catalysts [3]. In the aqueous environment of hydrogels, enzymes are protected from denaturation and their catalytic activity is significantly enhanced. Additionally, hydrogel materials offer an intelligent response to environmental factors such as temperature or pH, allowing their physicochemical properties to be adjusted [4]. The

addition of appropriate chemical groups enables further improvement of the properties of the hydrogel, such as the degree of swelling and stiffness [5].

With a three-dimensional porous structure, hydrogels are permeable to metabolites or small molecules forming as products of an enzymatic reaction. Moreover, hydrogels can immobilize a variety of enzymes using different methods (e.g. entrapment, absorption, covalent binding). Hydrogels for immobilization are currently synthesized using a variety of synthetic, semi-synthetic, and natural polymers [4]. Alginate and chitosan are two natural polymers that are commonly used in the production of hydrogels. Pirozzi et al. [6] immobilized lipase from *Candida rugosa* on chitosan hydrogel by adsorption and entrapment, achieving immobilization yields of 48 % and 65 %, respectively. In polyacrylamide-based gels, on the one hand charges may form, while on the other the side chains of the acrylamide units may react with the environment to form acrylic acid, which is sufficient to produce ionized carboxyl groups. It has been demonstrated that encapsulating an enzyme in a structure that is strongly chemically charged enhances its activity

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [oliwia.degorska@doctorate.put.poznan.pl](mailto:oliwia.degorska@doctorate.put.poznan.pl) (O. Degórska), [jakub.zdarta@put.poznan.pl](mailto:jakub.zdarta@put.poznan.pl) (J. Zdarta).

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136221>

Received 7 July 2024; Received in revised form 30 September 2024; Accepted 30 September 2024

Available online 1 October 2024

0141-8130/© 2024 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

[7].

Over the past few years, biocatalysis has gained increasing interest as an alternative to traditional organic chemistry, particularly in the pharmaceutical industry, for synthesizing active pharmaceutical ingredients (API). Notably, biocatalysis meets the growing demand for sustainable, eco-friendly and safe industry [8,9], and aligns with the principles of Green Chemistry [10]. For instance, enzymes facilitate and accelerate biochemical reactions, eliminating the need to raise the reaction temperature, thereby enhancing energy efficiency [11]. The chemo-, regio- and stereoselectivity of enzymes enable the elimination of certain reaction steps, reducing energy consumption and by-product formation. This characteristic makes biocatalysis an environmentally friendly process, highlighting its superiority over the traditional synthesis methods of organic chemistry [12].

Biocatalysis also offers a range of possibilities for asymmetric synthesis of pharmaceutically active compounds, since a large number of drugs contain chiral active pharmaceutical ingredients. Chiral compounds are those with two enantiomers (R- and S-) that are identical in chemical formula but cannot be superimposed on each other. These enantiomers often have different biological and pharmaceutical properties. For example, (S)-ibuprofen is 160 times more pharmaceutically active than the (R)-enantiomer [13].

Ionic liquids are becoming increasingly popular as means of supporting the immobilization of enzymes on hydrogels. Low volatility, chemical stability, and biocompatibility are just a few of the many features of ionic liquids. It is possible to improve enzyme-carrier bonding by adding a suitable ionic liquid during enzyme immobilization, due to the formation of bridges on the surface of the carrier. Additionally, ionic liquids can be used as additives during the immobilization process in order to extend enzyme life [14]. Moreover, hydrophobic ionic liquids facilitate modification of the conformation of the enzyme's active center, by promoting the opening of the lipase lid via interfacial activation to increase its activity [15]. A study by Cabrera-Padill et al., who used various hydrophobic ionic liquids in the immobilization of lipase from *Candida rugosa*, also confirmed improved functional properties such as thermal stability and the retention of activity for a longer period of time [16].

The main goal of the present study was to develop a novel biocatalyst composed of lipase immobilized using polymeric hydrogels, supported by ionic liquids characterized by different hydrophobicity to enhance enzyme activity for the asymmetric synthesis of (S)-ibuprofen. The work consisted of three major stages: synthesis of the hydrogel support platform, production of biocatalysts through immobilization and their characterization, and the resolution of racemic ibuprofen methyl ester. Physicochemical analyses were carried out to provide a detailed characterization of the materials and biocatalytic systems, and the products were analyzed using HPLC to evaluate the enantioselectivity and conversion rate under varying process conditions. This study had the aim of determining novel protocols for the efficient, sustainable and eco-friendly production of API compounds.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and chemicals

Ibuprofen methyl ester was purchased from Chemat. Organic solvents such as hexane and isoctane were supplied by POCH. Lipases from *Candida rugosa*, the ionic liquids [BMIM]Cl and [BMIM]PF<sub>6</sub>, ammonium persulfate (APS), acrylamide (AM), *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED), *N,N'*-methylenebisacrylamide (MBAm), *para*-nitrophenyl palmitate (pNPP), sodium carbonate, and buffers (acetate, phosphate and TRIS buffers at various pH and a molarity of 50 mM) were purchased from Sigma Aldrich (Merck Group, Poland).

### 2.2. Hydrogel synthesis

The first experimental stage included the synthesis of a polyacrylamide (PAM) hydrogel via free radical polymerization of acrylamide and the cross-linking reagent *N,N'*-methylenebisacrylamide (MBAm) (Fig. 1). PAM hydrogels with four different ratios of AM to MBAm were obtained and examined: 8:1 (15 wt%), 8:1 (20 wt%), 9:1 (15 wt%), and 9:1 (20 wt%). Two solutions were prepared for this purpose. For the 9:1 ratio (15 wt%), mixture A was prepared by mixing 38.84 mg of MBAm (crosslinking reagent) with 1.9 mL of water and adding 161.16 mg of AM (monomer) and 0.01 mL of *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED), which acts as a catalyst for the polymerization. Mixture B was prepared by adding 0.03 g of ammonium persulfate (APS, radical initiator) to 0.1 mL of water and placing the mixture in an ultrasonic bath for 30 s. Then mixture B was added to mixture A with vigorous stirring for about 10 s. After a 10 min reaction time, the resulting hydrogel was kept for 24 h at a temperature of -20 °C. The water present in the hydrogel increases in volume when it freezes, which favors the formation of a porous structure. The hydrogel samples were then freeze-dried using a Martin Christ Alpha 1-2 LD Plus freeze dryer to remove water residues.

### 2.3. Enzyme immobilization

The next step involved immobilization of the enzyme on the hydrogel support. Enzyme screening using different strains of lipase, such as *Pseudomonas cepacia*, *Aspergillus oryzae*, *Pseudomonas fluorescens* and *Candida rugosa*, was performed during preliminary studies. Because lipase derived from *Candida rugosa* displayed the highest catalytic activity, it was applied in the further experiments. An enzyme solution was prepared for immobilization at a concentration of 5 mg/mL in 50 mM phosphate buffer at pH 7. 5 mL of lipase solution. This was transferred to falcons, and then a certain amount of ionic liquid, [BMIM]Cl or [BMIM]PF<sub>6</sub> (1, 5, 10 wt% calculated based on the volume of the enzyme solution) was added to each falcon to test the effect of the amount of IL on immobilization performance and activity recovery. For comparison, control samples without ILs were also produced. The last step was to add approximately 30 mg of hydrogel to each falcon. The immobilization process was carried out in an Eppendorf Thermomixer laboratory incubator for 8 h at a temperature of 40 °C and a mixing speed of 200 rpm. The samples obtained were assayed using pNPP (see Section 2.4.1) to determine the immobilization yield (Eq. (1)). The post-immobilization filtrates were tested with Bradford reagent to calculate the amount of immobilized enzyme, taking into account the amount of the support material used.

$$\text{Immobilization yield (\%)} = \frac{A_i - A_f}{A_i} \cdot 100\% \quad (1)$$

$A_i$  – initial activity of lipase added to the immobilization medium,

$A_f$  – total activity of the enzyme in the supernatant and washing solution after immobilization.

### 2.4. Characterization of the biocatalyst produced

#### 2.4.1. Activity recovery, effect of process conditions and thermal stability

To select suitable process parameters for the immobilized lipase with the addition of ILs (samples without addition of ILs were found to have significantly lower activity recovery, hence were not analyzed in detail), the effect of temperature and pH on the activity was investigated. For specific pH values, different buffers were used: 50 mM acetate buffer for pH 4 and 5, 50 mM phosphate buffer for pH from 6 to 8, and 50 mM TRIS buffer for pH 9 and 10. For investigation of the effect of pH, 2 mL of buffer at a specific pH was added to Eppendorf tubes containing 30 mg of biocatalyst (mass of hydrogel with immobilized enzyme; the mass of immobilized enzyme was 6.5 mg), followed by addition of 1 mL of pNPP

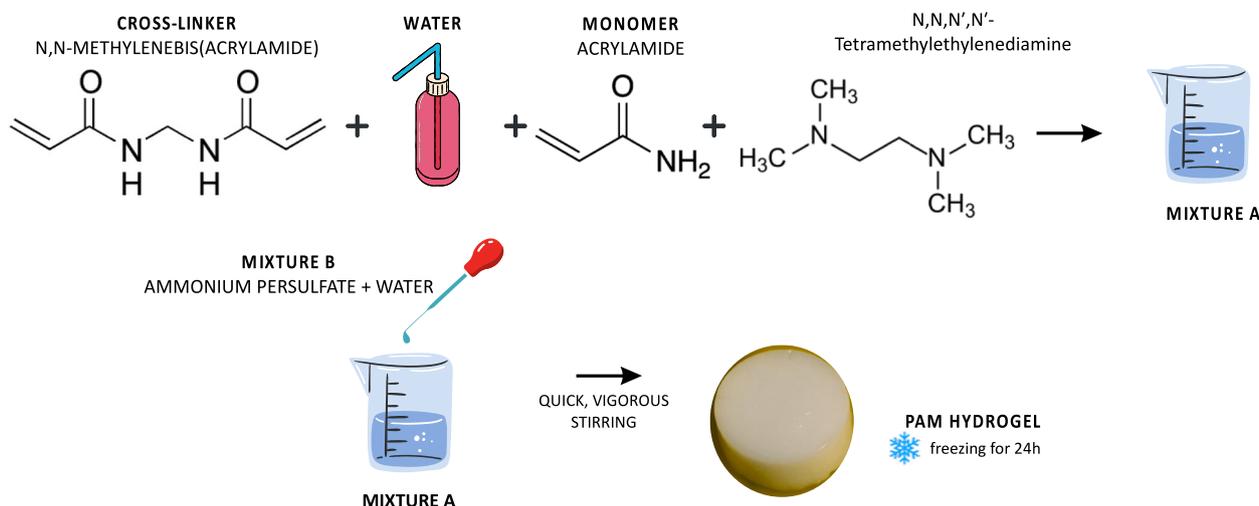


Fig. 1. Scheme of polyacrylamide (PAM) hydrogel synthesis.

solution at a concentration of 15 mM and reaction for 5 min at pH values 4, 5, 6, 7, 8 and 9, in an Eppendorf ThermoMixer C (Hamburg, Germany). Reactions were conducted at a temperature of 40 °C. To determine the influence of temperature on enzymatic activity, processes were conducted as described previously, in a buffer solution at pH 7 in varying temperatures: 30, 40, 50, 60 °C. Thermal stability was investigated under heat stress. At first the samples were incubated at a specific temperature (30, 40, 50, 60 °C) at pH 7 for 2 h. Afterwards the relative activity was measured according to the model reaction described above. After 5 min of model pNPP reaction, samples were subjected to UV–Vis measurements at  $\lambda = 410$  nm and the concentration of the product was determined based on the calibration curves of para-nitrophenol. Lipase activity recovery was calculated according to Eq. (2).

$$\text{Activity recovery (\%)} = \frac{A_t}{A_i} \cdot 100\% \quad (2)$$

$A_i$  – initial activity of lipase added to the immobilization medium,  
 $A_t$  – activity of the immobilized lipase.

All measurements were repeated three times and the results are presented as mean value  $\pm$  standard deviation.

#### 2.4.2. Reusability

For the reusability study, 10 reaction cycles of pNPP hydrolysis were performed at pH 7 and a temperature of 40 °C, where 30 mg of the biocatalyst, 2 mL of 50 mM phosphate buffer at pH 7 and 1 mL of 15 mM pNPP were added to an Eppendorf tube. The reaction was continued for 5 min in an Eppendorf ThermoMixer C; afterwards, the biocatalyst was washed a few times with the use of phosphate buffer (pH 7) and used in the next reaction. After the samples were collected, UV–Vis spectroscopy was performed and absorbance was measured at  $\lambda = 410$  nm. Based on the results, the activity was calculated. In these experiments, initial enzyme activity was defined as 100 % activity. All measurements were repeated three times, and the results are presented as mean value  $\pm$  standard deviation.

#### 2.4.3. Kinetic parameters

Kinetic parameters – the Michaelis–Menten constant ( $K_M$ ) and maximum reaction rate ( $V_{max}$ ) – of the free lipase and lipase immobilized with and without ILs were evaluated based on the hydrolysis reaction of pNPP described in Section 2.4.1, by measuring the initial reaction rates, using various concentrations of pNPP (0.1–1 mM). The progress of the reaction was followed spectrophotometrically at  $\lambda = 410$  nm (Jasco V750, Jasco, Japan). The kinetic parameters were calculated using Hanes–Woolf plots under optimum assay conditions. A double

reciprocal chart for all tested samples is given in the Supplementary Materials as Fig. S2. All measurements were repeated three times and the results are presented as mean value  $\pm$  standard deviation.

#### 2.5. Analytical procedures

To characterize the hydrogel material before and after immobilization, the FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) technique was used in attenuated total reflectance (ATR) mode (Bruker, Vertex 70) in the wavenumber range 400–4000  $\text{cm}^{-1}$ . The morphologies of the hydrogels before and after lipase immobilization were evaluated based on confocal laser scanning microscopy (CLSM) photographs (LSM710, Zeiss, Germany), and SEM photographs were obtained using an EVO40 scanning electron microscope (SEM, Zeiss, Germany). During the characterization of the products, the parameters of their porous structure were also assessed. The specific surface area of the tested material was determined using the BET (Brunauer–Emmett–Teller) algorithm (ASAP 2020 porosimetry analyzer, Micromeritics Instrument Co.), while the pore volume and pore size were determined based on the BJH (Barett–Joyner–Halenda) algorithm. X-ray energy dispersion microanalysis (EDS) was used to verify the effectiveness of the enzyme immobilization and to characterize the biocatalytic systems before and after reaction; this was done using the EDS analyzer in the scanning electron microscope. Before the analysis, samples were attached to the base with a carbon tape. A thermogravimetric analyzer (TGA) (Jupiter STA 449F3, Netzsch, Germany) was used to investigate the thermal stability of samples. The measurements were carried out under liquid nitrogen (10 mL/min) at a heating rate of 10 °C/min over a temperature range of 25–1000 °C, with an initial sample weight of approximately 5 mg. Wetting angle was determined using a KRÜSS DSA100 Drop Shape Analyzer with a micropipette for applying droplets of constant volume and a system for drop image analysis. The parameter was determined for drops applied to the hydrogel surface using two liquids: polar (water –  $\Theta_w$ ) and dispersive (diiodomethane –  $\Theta_d$ ). The determination of the wetting angle was based on the average of ten successively recorded values. Further, TLC was used to determine progress in the asymmetric synthesis of (*S*)-ibuprofen, using silica gel plates with fluorescent indicator (Sigma Aldrich) and a combination of toluene:ethyl acetate:acetic acid (17:13:1) as a developing solvent. The chromatographic separation process (HPLC) was carried out using the 1290 Infinity II LC System from Agilent. To separate the enantiomers of ibuprofen, a chiral Poroshell 120 Chiral-T column with dimensions of 4.6  $\times$  150 mm and a packing particle size of 2.7  $\mu\text{m}$  was used. The separation of analytes was carried out in a reversed phase system – the mobile phase was a 15 mM solution of ammonium formate in water (A), adjusted to pH = 4 with formic acid,

and methanol (B). The analysis was performed for 12 min in isocratic conditions with a mobile phase composition of 40:60 (A:B) and a flow of 0.4 mL/min. The chromatographic column was maintained at 22 °C during the analysis, and the injection volume was 0.25 µL. The detection of analytes was enabled by a diode array detector (DAD) using a wavelength of 220 nm. To determine the concentrations of ibuprofen enantiomers and ibuprofen methyl ester racemate, standard curves were prepared for each of these compounds. Three injections were made for each test sample and for the standard solutions to evaluate the repeatability of the results.

## 2.6. Resolution of ibuprofen – batch process

### 2.6.1. Kinetic enzymatic resolution of ibuprofen methyl ester

An appropriate amount of the prepared biocatalytic system consisting of a hydrogel carrier and 5 mg or 25 mg of immobilized lipase was introduced into a conical flask. Next, 5 mL of 50 mM phosphate buffer at pH 7 and 5 mL of a solution of ibuprofen methyl ester in isooctane with a concentration of 45.45 mM (10 mg/mL) were added to the system. To determine the influence of the type of organic solvent on the process conversion rate, additional hydrolysis reactions of ibuprofen ester were carried out in the presence of hexane. The reaction medium formed two phases – an organic phase containing an ibuprofen ester solution, and an aqueous phase. The flask was tightly closed and then placed in the Eppendorf Thermomixer laboratory incubator. The kinetic resolution process was carried out for 144 h (6 days) at a temperature of 40 °C and a mixing speed of 200 rpm. The hydrolysis reaction of ibuprofen methyl ester took place only at the interface of the two phases. During the process, 0.1 mL samples were taken from the organic phase at specified intervals, and the course of the reaction was monitored using chiral HPLC methods. Preparation of reaction samples for chromatographic analysis involved evaporation of the organic solvents hexane and isooctane. For this purpose, samples were placed in chromatographic vials, and an Eppendorf concentrator (Concentrator plus/Vacufuge®-plus) was used. The evaporation process was carried out at 30 °C and under reduced pressure. Complete evaporation of hexane was achieved after 3 h, while 6 h was needed for the evaporation of isooctane. After evaporation of hexane and isooctane, 1 mL of methanol was added to the chromatography vials to redissolve their contents, and then each solution was further diluted.

### 2.6.2. Dynamic kinetic enzymatic resolution of ibuprofen methyl ester

To increase the conversion rate of the process, an attempt was also made to carry out dynamic kinetic separation of ibuprofen methyl ester, in which the enantioselective hydrolysis of the (S)-ester occurs simultaneously with the racemization of the unreacted substrate (R)-ester. In this process, the reaction medium was NaHCO<sub>3</sub>-NaOH buffer at pH 9.5 without any addition or with the addition of 3 mL of DMSO as an in situ racemization agent and isooctane/hexane as an organic solvent. The remaining process conditions, including the amount of immobilized enzyme, were the same as in the case of kinetic enzymatic separation. A list of the prepared samples with an indication of the process conditions is given in Table S1 in the Supplementary Materials. Afterwards, the samples were analyzed with HPLC to determine the conversion rate and the enantiomeric excess of the conversion process. The degree of conversion of the racemic mixture of ibuprofen methyl ester was determined based on the results of HPLC analysis using Eq. (3):

$$c = 1 - \frac{[E_1]}{[E_2]} \cdot 100\% \quad (3)$$

c – degree of conversion of ibuprofen methyl ester (%),

[E<sub>1</sub>] – ibuprofen methyl ester concentration at t = 0 h (mg/mL),

[E<sub>2</sub>] – concentration of ibuprofen methyl ester after the reaction (mg/mL).

The enantiomeric excess of the obtained (S)-ibuprofen over (R)-

ibuprofen was calculated from Eq. (4):

$$ee = \frac{|[S] - [R]|}{[S] + [R]} \cdot 100\% \quad (4)$$

ee – enantiomeric excess (%),

[S] – concentration of (S)-ibuprofen obtained (mg/mL),

[R] – concentration of (R)-ibuprofen obtained (mg/mL).

## 3. Results

### 3.1. Characterization of hydrogels and selection for further experiments

Prior to the synthesis of the biocatalyst, various hydrogel materials underwent characterization. Initially, four different ratios of monomer to cross-linker in PAM hydrogel were investigated: 8:1 (15 wt%), 8:1 (20 wt%), 9:1 (15 wt%), and 9:1 (20 wt%).

After the synthesis, platforms were lyophilized and their stabilities in phosphate buffers were established. The evaluation of hydrogel stability in PBS, with accompanying photographs, is given in the Supplementary Materials (Fig. S1). Since the stability of the support material is crucial for a successful immobilization process, the selection of a suitable hydrogel was determined by this factor. The lyophilization process can significantly change the material's structure and durability, hence all of the hydrogels produced using different ratios were subjected to freeze-drying. The most suitable hydrogel for further use in enzyme deposition was found to be the 9:1 (15 wt%) product, due to its stable structure after lyophilization and lack of defragmentation during incubation. SEM and CLSM photographs were taken to establish the structure and possible deposition of the enzyme on the surface and in the materials' pores (Figs. 2 and 3, respectively). From the images, it can be concluded that the porous structure of the hydrogel material is well-developed, which increases the likelihood of enzyme deposition because of the larger surface area of the material. What is more, clusters of enzymes adsorbed on the material are visible (Fig. 2b). Fig. 3b shows a cross-section of hydrogel after immobilization, illustrating the deposition of the lipase inside the hydrogel bulk. The biocatalysts' penetration through the pores, deeper into the porous hydrogel, is visible in the CLSM photographs taken in fluorescence mode (Fig. 3b), which confirm the successful deposition of enzyme not only on the surface but also inside the hydrogel's pores.

The prepared hydrogel materials are used as supports in the enzyme immobilization process. Thus, following characterization of the materials, the influence of ionic liquids on the immobilization process and on the properties of the materials themselves was investigated. The produced biocatalytic systems were tested for activity to determine the most suitable anions and the amount of IL to be used. Table 1 contains values of the activity recovery of the produced systems. It is seen that the addition of 1 wt% IL during the immobilization process leads to no significant difference in the activity of the enzyme compared with

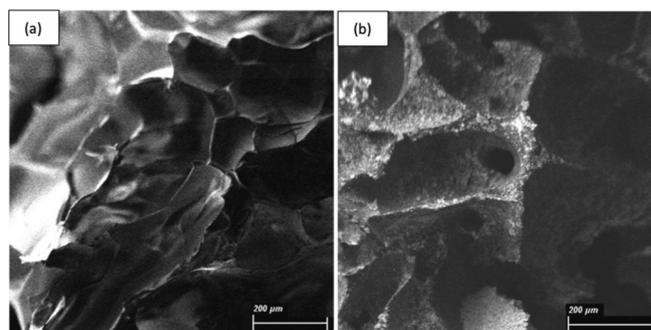
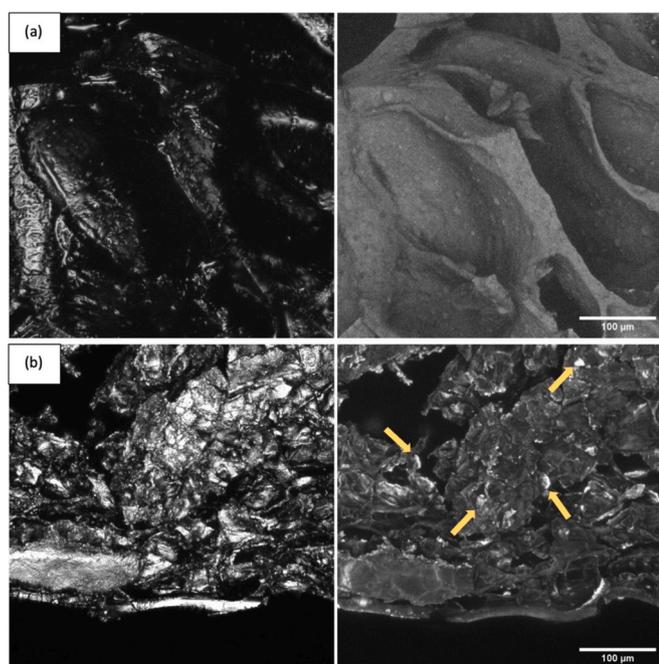


Fig. 2. SEM photographs of: (a) pristine hydrogel material, (b) hydrogel with deposited enzymes. Both images show PAM hydrogels at an AM to MBAm ratio of 9:1 (15 wt%).



**Fig. 3.** CLSM photographs of (a) pristine hydrogel material and (b) hydrogel with deposited enzymes in reflection mode (left) and fluorescence mode (right). Yellow arrows indicate enzyme molecules. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

**Table 1**

Activity recovery of immobilized enzyme depending on immobilization time and the type and dosage of IL.

Immobilization time (h)	Activity recovery without IL (%)	Activity recovery with [BMIM]Cl (%)	Activity recovery with [BMIM]PF <sub>6</sub> (%)
1 wt% of IL			
2	28 ± 0.85	43 ± 1.6	47 ± 1.2
8	39 ± 1.7	26 ± 1.2	45 ± 0.9
16	35 ± 0.05	32 ± 0.7	18 ± 0.3
24	32 ± 1.5	28 ± 1.3	32 ± 0.4
5 wt% of IL			
2	28 ± 1.1	43 ± 0.1	49 ± 1
8	39 ± 1.2	57 ± 0.4	62 ± 0.3
16	35 ± 0.8	34 ± 0.3	43 ± 0.1
24	32 ± 0.75	33 ± 0.7	32 ± 0.15
10 wt% of IL			
2	28 ± 0.12	34 ± 1	36 ± 0.05
8	39 ± 1.4	39 ± 0.1	45 ± 1
16	35 ± 0.7	35 ± 1.4	41 ± 0.9
24	32 ± 0.3	33 ± 0.3	27 ± 0.1

immobilization without IL. With the addition of greater amounts of IL, the changes are more significant. The highest activity recovery (62 %) was obtained for the system immobilized for 8 h with 5 wt% of [BMIM]PF<sub>6</sub>. Based on the presented data on immobilization efficiency and activity recovery, this system was applied in further experiments. There are several reasons why ILs may improve an enzyme's properties. First, the proposed amount of IL may have a stabilizing effect on the biocatalyst's structure, resulting in increased activity recovery [17]. It is notable that anions have a large impact on structure stability. Through the use of two different ILs, hydrophobic [BMIM]PF<sub>6</sub> and hydrophilic [BMIM]Cl, we found that the PF<sub>6</sub><sup>-</sup> anion is more favorable to lipase activity, due to the hydrophobic environment it creates. [BMIM]Cl also

increases the amount of deposited enzyme on the hydrogel, but the catalytic activity is inhibited [18]. What is more, a mechanism specific to lipases is lid opening, called interfacial activation. This phenomenon occurs in a less polar environment, for instance in the presence of hydrophobic ILs, and ensures easier access of the substrate to the active enzyme center, which translates directly into a higher activity recovery. The lipase structure contains a mobile polypeptide chain known as the lid. When the lid is closed, it isolates the active center from the surrounding medium. Movement of the lid exposes a large hydrophobic pocket and the active center to the medium, causing strong adsorption on any hydrophobic surface.

Consequently, lipases can target insoluble substrate droplets. This type of catalytic process is referred to as interfacial activation, because lipase activity generally increases as the substrate forms insoluble droplets. Since [BMIM]PF<sub>6</sub> is much more hydrophobic, the interfacial activation phenomenon may be intensified in comparison with the other tested ionic liquid. The hydrophobic nature of the ILs can mimic the lipid-water interface, promoting lid opening and thus increasing the activity of the lipase, determined as the activity recovery of immobilized lipase in a tested sample [19]. Moreover, in hydrophobic environments, besides classic adsorption interactions, hydrophobic interactions were also reported. This phenomenon, also observed in our study, is referred to as immobilization via interfacial activations, and improves both the catalytic activity of the immobilized lipase and its binding to the support. The applied immobilization conditions ensure strong interactions, and the enzyme's relatively large lid leads to robust hydrophobic interactions, resulting in the enzyme being embedded with an open lid and maintaining high activity. On the other hand, in samples immobilized with 10 wt% of IL, the viscosity of the additive may influence the free transfer of a substrate to the active center of the enzyme, resulting in a system with slightly lower activity [20].

The influence of ionic liquids was clearly visible for the deposited enzyme (Table 2). The addition of the ionic liquid increased the amount of immobilized enzyme almost threefold. Irrespective of the type of ionic liquid added, the efficiency of enzyme immobilization is significantly greater, at over 50 %, compared with the system without ILs. A possible explanation is that the enzyme might be dissolved partially in the ionic liquid, which additionally improves the efficiency of binding to the material's surface [21].

In Fig. 4, a broad band with a maximum at a wavenumber of approximately 3100–3500 cm<sup>-1</sup> corresponds to stretching vibrations characteristic of the N–H group, indicating the presence of repeating acrylamide units in the hydrogel. The chemical structure of the obtained hydrogel is also confirmed by an intense band with a maximum at 1650 cm<sup>-1</sup>, resulting from the stretching vibrations of the C=O moiety present in the amide group of acrylamide. Moreover, the band at 1537 cm<sup>-1</sup> corresponding to N–H deformation vibrations is also characteristic of the amide group. Further, a band of low intensity is observed, with a maximum at 2930 cm<sup>-1</sup>, resulting from C–H stretching vibrations in the aliphatic chain of the hydrogel. The effectiveness of the polymerization process is also confirmed by the presence of bands in the range 1410–1450 cm<sup>-1</sup> resulting from deformation vibrations of C–N bonds. The analyzed spectrum confirms the successful synthesis of a hydrogel platform that possesses functional groups capable of forming bonds and reacting with different compounds – for example, bonding with enzymes.

**Table 2**

Amount of enzyme immobilized on PAM hydrogels with and without addition of ILs.

Type of biocatalyst	Amount of immobilized enzyme (mg/g)	Immobilization yield (%)
With [BMIM]Cl	215 ± 6	86 ± 2.8
With [BMIM]PF <sub>6</sub>	217 ± 3	87 ± 1.2
Without IL	79 ± 3	32 ± 3.8

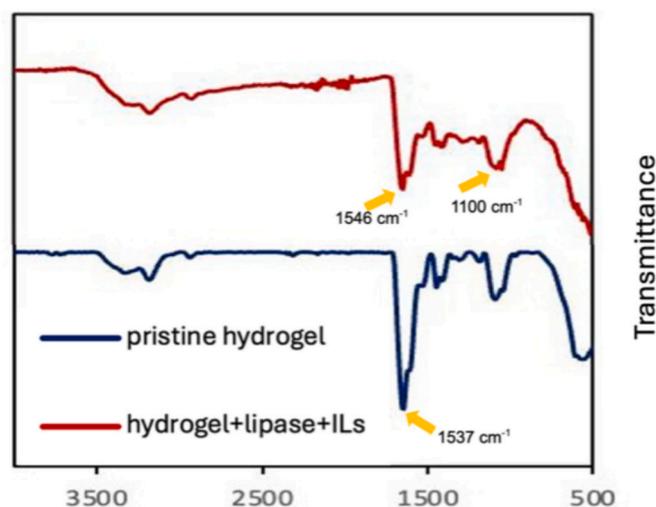


Fig. 4. FTIR spectra of pristine hydrogel and hydrogel with immobilized lipase with the addition of [BMIM]PF<sub>6</sub> IL.

In the spectrum of hydrogel with immobilized lipase, in addition to the bands characteristic of the polyacrylamide hydrogel, there is an intense absorption band at approximately 1100 cm<sup>-1</sup>, resulting from stretching vibrations of the C–O–C bridge, which is characteristic of the lipase structure. Additionally, the success of immobilization is confirmed by deformation bands with maxima at 844 cm<sup>-1</sup>, 752 cm<sup>-1</sup> and 619 cm<sup>-1</sup>, which are characteristic of proteins rich in amide bonds and were not visible in the spectrum of the pure hydrogel [22]. The fact that the hydrogel and lipase have common functional groups (e.g., C=O, N–H) results in similarity of the FTIR spectra of the hydrogel before and after immobilization. Nevertheless, subtle but important differences in shape, intensity and the maxima of the signals for C–O–C bonds (peak maximum at 1100 cm<sup>-1</sup>) and a slight shift of the signal characteristic for amide II bonds (from 1537 cm<sup>-1</sup> in pristine hydrogel to 1546 cm<sup>-1</sup> in the spectrum of the material after immobilization) allow us to conclude that the lipase from *Candida rugosa* was immobilized efficiently on the polymer hydrogel, as reported previously [23].

TGA (Fig. 5) and BET analyses were performed to understand better the changes resulting from enzyme immobilization and the addition of the ionic liquid. The measurements showed that the mass loss for all tested samples exceeded 60 %, and the TGA curves of the hydrogel before and after immobilization follow a similar trend. The 15 % mass loss at around 100 °C is attributed to the evaporation of water present on the surface and in the pores of the samples [24]. At higher temperatures,

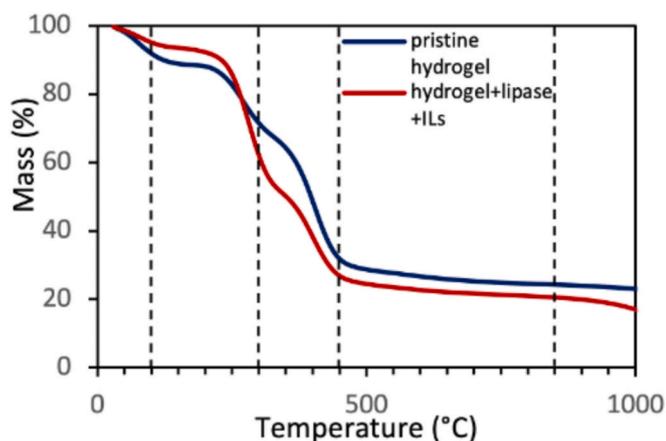


Fig. 5. TGA curves of pristine hydrogel and biocatalytic systems with the addition of [BMIM]PF<sub>6</sub> ILs.

the biocatalytic systems exhibit greater decomposition than the pristine hydrogel due to the enzyme present within the material. In the range 300–450 °C there is a rapid mass loss related to the partial decomposition of the hydrogel material [25]. A slight reduction in mass above 850 °C is attributed to the breakdown of the enzyme's carbon structure [26]. To investigate the structural properties of the prepared materials, nitrogen physisorption analysis was used. For the pristine hydrogel, the surface area is 3.98 m<sup>2</sup>/g with an average pore size of 15.04 nm. Following immobilization of the enzyme, the surface area of the material decreased to 2.22 m<sup>2</sup>/g, and the pore size fell to 12.78 nm. The lowest surface area (1.61 m<sup>2</sup>/g) was obtained for the material following enzyme immobilization with an IL, which may indicate greater deposition of the enzyme on the surface and in the pores of the material [27]. The results show a close correlation with the amount of enzyme deposited (Table 3). Enzyme deposition increased threefold with the addition of IL, resulting in a decrease in pore size (10.58 nm) compared with the pristine hydrogel and the biocatalyst obtained without IL support.

EDS analysis provided information about the elemental composition of the surfaces of the produced systems. Fig. 6a shows the spectrum revealing the elemental composition of the PAM-based hydrogel. It is characteristic of this type of carrier that the contents of carbon, oxygen and nitrogen result from the functional groups of the substrates used in the hydrogel synthesis process, indicating the successful synthesis of a hydrogel material that should possess amino or carbonyl surface groups, for example, capable of enzyme binding [28]. For the hydrogel after enzyme immobilization (Fig. 6b) there were changes in the percentages of elements on the surface. The carbon-to-nitrogen ratio decreased, which provides confirmation of the success of the immobilization process. What is more, successful immobilization is indicated by the increase in the percentages of carbon and oxygen present in the sample, as these are among the main components of the functional groups of the enzyme [29]. Additionally, the immobilization of the enzyme on the hydrogel surface is confirmed by the increase in the percentage of sulfur, which results from the presence of cysteine bridges in the enzyme structure. The elemental composition of the enzyme–hydrogel system surface after the enzymatic process (Fig. 6c) differs significantly from the composition of the system before that process. The high oxygen content may indicate the adsorption of substrates and/or products of the enzymatic reaction of the racemic mixture of ibuprofen methyl ester. Additionally, the high sulfur content is related to the use of DMSO in selected process samples.

The wetting angle of the synthesized hydrogel and post-immobilization materials was also tested. The results gave the contact angle of all tested materials as 0°, which reflects the very high hydrophilicity of the hydrogel material. This property is directly related to the structure of the material. While the addition of ionic liquids has an impact on lipase activity, increasing the catalytic properties, the support itself retains the properties of the original material. It can be concluded that the amounts of deposited enzyme and ionic liquid may be too small to produce a significant change in the material's properties. Thus the ionic liquid has a direct impact on the enzyme, while not significantly altering the carrier material's surface.

### 3.2. Biocatalytic characterization

The resulting biocatalytic systems were analyzed to determine the

**Table 3**  
Kinetic parameters of free enzymes and of enzymes immobilized without and with the addition of [BMIM]PF<sub>6</sub>.

Sample	K <sub>M</sub> (mM)	V <sub>max</sub> (mM/mg·min)
Free enzyme	0.572 ± 0.029	0.927 ± 0.032
Without IL	0.665 ± 0.027	0.173 ± 0.008
[BMIM]PF <sub>6</sub>	0.475 ± 0.014	1.519 ± 0.068

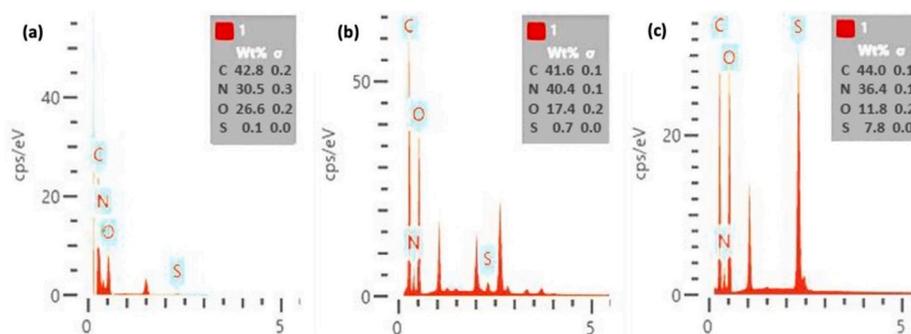


Fig. 6. Elemental composition of the surface of: (a) hydrogel, (b) the enzyme–hydrogel system, and (c) the enzyme–hydrogel system post-reaction.

effect of the use of ionic liquid, the immobilization efficiency, and the influence of process parameters on the enzyme's relative activity and stability.

After immobilization, a thorough characterization of the biocatalyst produced with the addition of [BMIM]PF<sub>6</sub> was performed to determine relative activity at different temperatures and pH, as well as its reusability and thermal stability. Fig. 7a shows that the most suitable temperature was 40 °C, where the enzyme displayed 100 % relative activity – this is linked to the properties of this strain of lipase, and similar results are obtained for its native form. Nevertheless, at lower temperatures, the free enzyme becomes inactive, and at higher temperatures it is more susceptible to denaturation, retaining only around 30 % of its activity at 60 °C (data not shown). As regards the pH parameter (Fig. 7b), the native form of the enzyme remains most active at pH 7. On the other hand, immobilized biocatalysts can offer increased stability and prolonged activity over a broad temperature and pH range. The hydrogel-based catalyst has higher relative activity at more basic pH values, which may be related to the slight change in the conformation of the

enzyme's structure upon immobilization [30]. The hydrophobic IL provides a suitable environment for the lid opening mechanism in the lipase structure, leading to greater activity and easier access to the active center of the enzyme over a wide pH range. What is more, the addition of ionic liquids reduces the deteriorating effect of organic solvents on the enzyme structure, resulting in increased catalytic performance. Qiu et al. noticed a significant improvement in biocatalyst performance after applying amino-functionalized ionic liquid as a surface modifier. In their study, not only did the IL prevent magnetite particles from agglomerating in aqueous systems, but more importantly, it enhanced the affinity of the immobilized enzyme toward the substrate [31].

The thermal stability profiles obtained for the immobilized enzymes are in agreement with the results on the effect of temperature on enzyme activity (Fig. 7c). The native form of the enzyme becomes inactive at higher temperatures after incubation for 2 h (data not shown) due to thermal dissociation followed by denaturation. On the other hand, immobilized enzymes remain active, with relative activity mostly above 70 % and sometimes up to 90 %, due to the protective influence of the

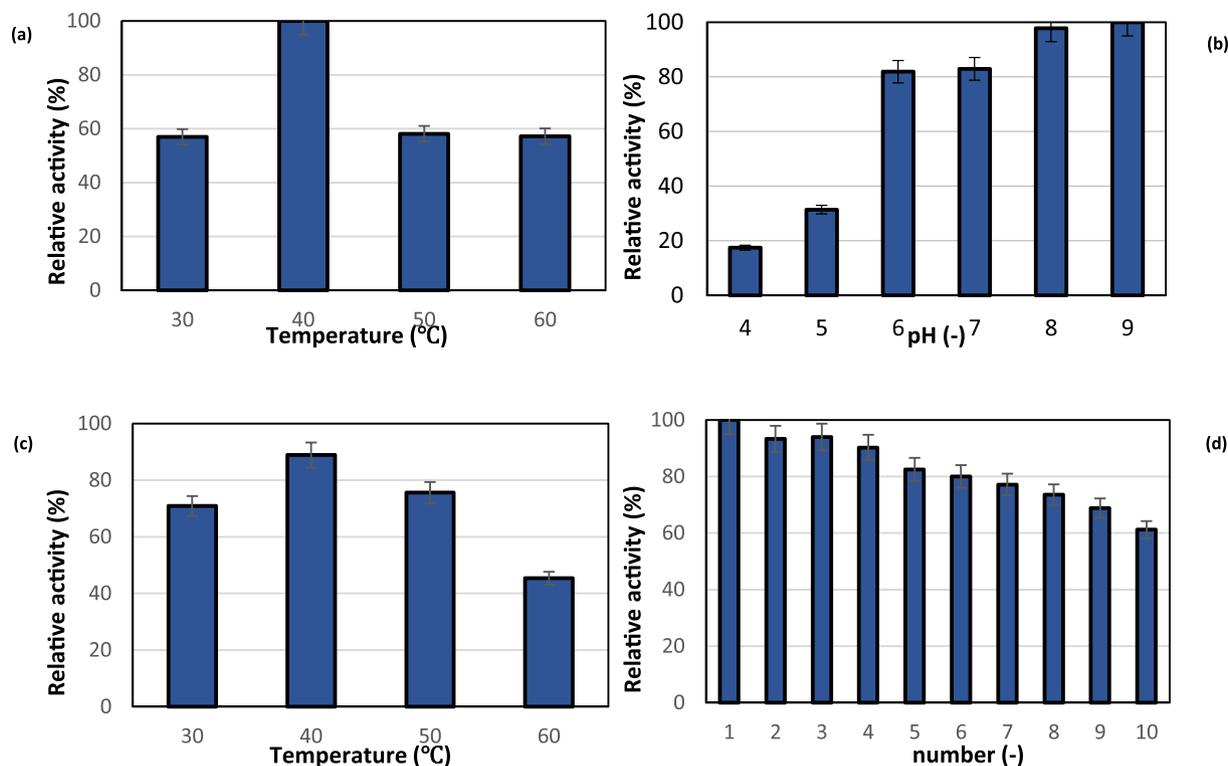


Fig. 7. Relative activity of the biocatalyst at varying (a) temperature and (b) pH; (c) thermal stability; and (d) reusability of lipase immobilized on hydrogel material with the addition of [BMIM]PF<sub>6</sub>. For pH and temperature effects 100 % relative activity is defined as the highest activity obtained during the tests; for thermal stability 100 % activity is defined as the starting activity before incubation; for reusability, 100 % activity is defined as the activity of immobilized lipase in the first cycle. The error bars represent the mean value  $\pm$  standard deviation from three measurements.

support material and IL. In the tests of reusability, the system with immobilized enzyme exhibited high durability, retaining over 60 % relative activity after the 10th cycle. The protective effect and the compatibility of the support and the ILs with the immobilized lipase results in the observed high stability of the biocatalytic system produced.

Interactions occurring between the material, the IL and the enzyme might limit the elution and reduce the inactivation of the enzyme, resulting in higher activity. Another advantage of the system produced is the possibility of its fast and easy removal from the reaction medium. Due to the solid one-piece structure of the hydrogel, it can be removed by separation using, for example, simple filtration or centrifugation. In another study, Quin et al. obtained comparable reusability for hydrogel biocatalytic systems, recording around 60 % and 70 % relative activity after the 10th cycle [32].

The Michaelis-Menten constant ( $K_M$ ) and maximum reaction rate ( $V_{max}$ ) of the free lipase and enzymes immobilized with and without ILs were determined and compared, as they reflect the substrate affinity and its changes upon immobilization (Table 3). When comparing the kinetic parameters of tested lipases, it is clear that the presence of ILs in the system strongly improves lipase-substrate affinity, also resulting in the higher activity of this system when compared with free lipase or lipase immobilized without ILs. For the system with the addition of 5 wt% [BMIM]PF<sub>6</sub> during immobilization,  $K_M$  is lower than in the case of the native form of the enzyme, while  $V_{max}$  is higher, suggesting a greater affinity toward the substrate and improved reaction rate [33]. The improved affinity may be related to the increased hydrophobicity of the environment around the lipase's active center, increasing the catalytic activity [20]. The introduction of ionic liquid into the system may also increase the solubility of the substrates, as well as reducing the probability of a reduction in diffusion resistance or limitations in accessing active sites. On the other hand, the performance of the system after immobilization without any stabilizers indicates a significant drop in enzyme affinity toward the substrate compared with the native enzyme, which may be due to changes in the conformation of the enzyme structure and to diffusional limitations [34].

### 3.3. Resolution/hydrolysis of racemic ibuprofen ester in batch reactor

The enzymatic resolution of ibuprofen methyl ester racemate included enantioselective hydrolysis of that compound in the presence

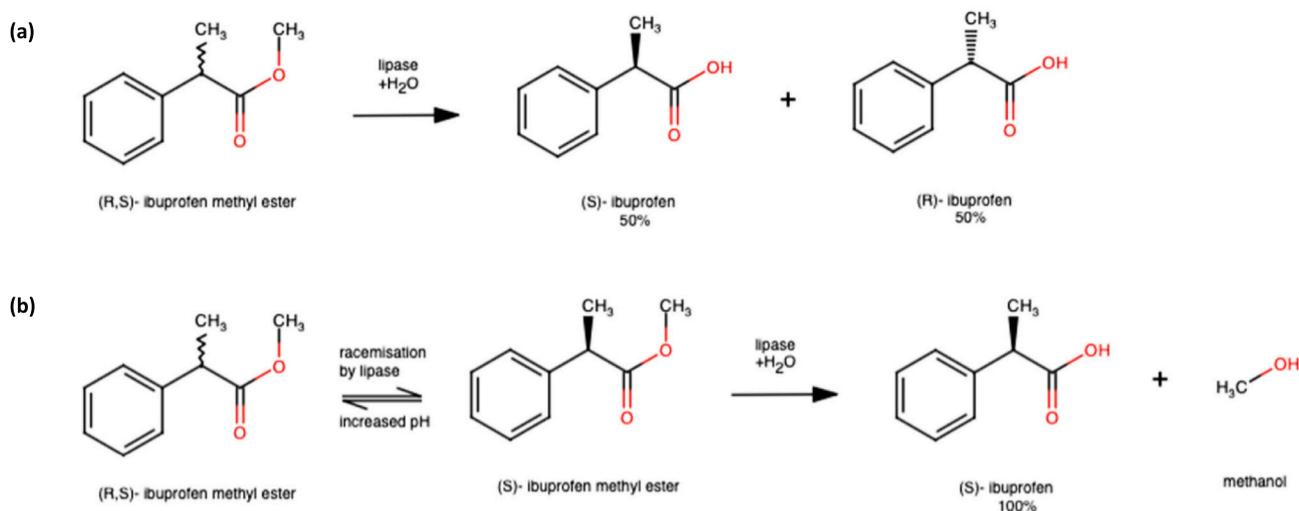
of lipase from *Candida rugosa*. The reaction products were (*S*)-ibuprofen and (*R*)-ibuprofen methyl ester. The resolution of the racemic ester mixture was conducted in two different modes in a batch reactor. To increase the racemization of the sample, which is followed by a higher conversion rate and a greater amount of (*S*)-ibuprofen as the final product, the dynamic racemic resolution was performed with the addition of DMSO to increase the pH value for higher racemization of undesired (*R*)-ibuprofen methyl ester (Fig. 8b). Classic kinetic resolution was performed at a lower pH, without the addition of DMSO (Fig. 8a). The concentration of each sample according to HPLC analysis is presented in the Supplementary Material (Table S2).

Reactions using immobilized enzymes were conducted using biocatalysts produced with the addition of 5 wt% ionic liquid ([BMIM]PF<sub>6</sub>), but also without the addition of ILs, to investigate the IL's impact on the stabilization and activity of the enzyme in real reactions. For the samples with biocatalysts without added ionic liquid (data not shown), the conversion rates and enantiomeric excesses were significantly lower and did not exceed 35 % conversion (E) and 60 % enantiomeric excess (ee).

**Table 4**

Enantiomeric excess and conversion rate of the obtained (*S*)-ibuprofen methyl ester after enzymatic asymmetric hydrolysis of racemic ibuprofen methyl ester with the use of biocatalytic systems with the addition of [BMIM]PF<sub>6</sub>.

Sample designation	Process duration (h)	Conversion rate (%)	Enantiomeric excess (%)
Isooctane/PBS pH 7	48	27 ± 0.5	89 ± 0.7
	96	35 ± 0.3	95 ± 1
	144	48 ± 0.1	96 ± 1
Isooctane/Buffer NaHCO <sub>3</sub> -NaOH pH 9.5	48	37 ± 0.2	97 ± 1.1
	96	68 ± 0.2	98 ± 1.8
	144	83 ± 0.4	99 ± 0.05
Isooctane/Buffer NaHCO <sub>3</sub> -NaOH pH 9.5/DMSO	48	54 ± 1	98 ± 1
	96	77 ± 0.4	98 ± 1.3
	144	95 ± 0.1	98 ± 1
Hexane/PBS pH 7	48	24 ± 2.1	88 ± 0.05
	96	26 ± 3	94 ± 2
	144	36 ± 0.1	94 ± 2.5
Hexane/Buffer NaHCO <sub>3</sub> -NaOH pH 9.5	48	35 ± 0.7	95 ± 0.9
	96	43 ± 0.5	96 ± 0.4
	144	59 ± 2.1	97 ± 0.3
Hexane/Buffer NaHCO <sub>3</sub> -NaOH pH 9.5/DMSO	48	33 ± 1	96 ± 0.6
	96	45 ± 0.9	97 ± 1
	144	71 ± 0.4	98 ± 1



**Fig. 8.** Theoretical process of resolution of racemic ibuprofen methyl ester with the use of lipase as a catalyst: (a) kinetic resolution and (b) dynamic kinetic resolution.

Table 4 shows that the use of the kinetic separation process (process carried out in a phosphate buffer with pH 7) made it possible to obtain 48 % and 36 % conversion, respectively, for the reaction carried out in isooctane and hexane after 144 h. Since the maximum conversion rate of the kinetic separation process is 50 %, these values are satisfactory. Higher yields of the enzymatic process were achieved with dynamic kinetic enzymatic separation carried out in an alkaline environment. For processes carried out in the NaHCO<sub>3</sub>-NaOH buffer without the addition of DMSO, maximum yields of 83 % (in isooctane) and 59 % (in hexane) were obtained after 144 h of the enzymatic conversion process. This proves that the addition of a base to enable racemization of the unreacted R-enantiomer can increase the degree of substrate conversion. The use of a buffer with pH 9.5 and the addition of a small amount of DMSO made it possible to obtain even higher conversion rates for the process carried out in isooctane, at a level of 95 %, and for the process with the addition of hexane, at a level of 71 %. This is due to the nature of DMSO, which when added to the reaction medium increases the alkalinity of the mixture, this being necessary for racemization. Suo et al. also investigated the influence of IL on lipase performance and proved the increased affinity between lipase and substrate immobilized on the prepared supports [35]. In their studies, the specific activity of the immobilized lipase system PPL-IL-MCMC was 1.43 and 2.81 times higher than that of free PPL and PPL-MCMC, respectively. It should also be added that in the study low DMSO concentration was applied, resulting in negligible effect of this solvent on lipase activity (see Table S3).

Analyzing the effect of the solvent, it should be noted that the reaction carried out in isooctane leads to a higher degree of conversion than when hexane is used as an organic solvent, and this is observed regardless of the other process conditions. Analysis of control samples after 48 h or 96 h and after the end of the process at 144 h confirms that the time of the process affects the degree of conversion of ibuprofen methyl ester. For all samples, the degree of conversion increased with time. However, the most significant increase, between 48 h and 96 h, was observed for the process carried out in isooctane and at pH 9.5, as the conversion rate increased from 37 % to 83 %. In turn, between 96 h and 144 h of the process, the highest increase in the degree of conversion was obtained for the reaction sample with the addition of hexane, a buffer at pH 9, and DMSO (an increase from 45 % to 71 %). These results indicate that time is an important parameter that should be considered when designing enzymatic processes.

Referring in turn to the enantiomeric excess of the obtained (*S*)-ibuprofen (desired product) over (*R*)-ibuprofen in the tested samples, it should be noted that the excess is high (in most cases >90 %) regardless of the process variables used (organic solvent, buffer pH, presence of DMSO, process time). This indicates the high stereospecificity of the enzymatic separation process catalyzed by lipase obtained from *Candida rugosa*, and confirms the validity of using enzymes in the separation processes of racemic mixtures of pharmaceutically active substances. It should also be highlighted that in all cases, the produced immobilized lipase supported by the ILs showed robustness and should be considered a promising alternative for future applications in the pharmaceutical industry.

#### 4. Conclusions

In this study, the obtained PAM hydrogel support materials and the prepared biocatalyst were fully characterized. One of the main aims was to evaluate the effect of ILs on the lipase's catalytic performance and stability. The highest catalytic activity of the biocatalysts was obtained at a temperature of 40 °C and pH 7. What is more, the biocatalysts were catalytically effective and stable, and their activity remained above 60 % even after 10 reaction cycles. Biocatalysts produced with or without ILs were applied in the resolution of racemic methyl ibuprofen ester in two-phase systems using different organic solvents and two aqueous phases with different pH values. It was established that the highest conversion

rate and enantiomeric excess were obtained for the system supported by IL, in the presence of isooctane, NaHCO<sub>3</sub>-NaOH buffer at pH = 9.5 and DMSO, resulting in a conversion rate of 95 % and an enantiomeric excess of 98 %. The technologies proposed show good potential as a prospective solution, although in their present state they require further scientific testing and development. The results of the present research demonstrate significant applicability and can serve as a solid base for future studies. This study has confirmed that ionic liquids have a substantial impact on enzyme activity, leading to a desired improvement in lipase's catalytic performance.

#### CRedit authorship contribution statement

**Oliwia Degórska:** Writing – original draft, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Daria Szada:** Writing – original draft, Validation, Methodology. **Qiang Fu:** Writing – review & editing, Methodology, Funding acquisition. **Long Duc Nghiem:** Writing – review & editing. **Andrzej Biadasz:** Formal analysis, Data curation. **Teofil Jesionowski:** Writing – review & editing, Supervision, Resources. **Jakub Zdarta:** Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition, Conceptualization.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Data availability

Data will be made available on request.

#### Acknowledgements

This work was supported by the National Science Center, Poland, under research grant no. 2023/49/N/ST8/03038, and received funding support from the Australian Research Council Future Fellowship scheme (FT180100312). The authors also gratefully acknowledge support from the Mobility and Researcher Exchange Program between the University of Technology Sydney and Poznan University of Technology (Mobility Program, STER, NAWA).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136221>.

#### References

- [1] E.M. Ahmed, Hydrogel: preparation, characterization, and applications: a review, *J. Adv. Res.* 6 (2015) 105–121, <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>.
- [2] T.-C. Ho, et al., Hydrogels: properties and applications in biomedicine, *Molecules* 27 (2022) 2902, <https://doi.org/10.3390/molecules27092902>.
- [3] J. Meyer, L.-E. Meyer, S. Kara, Enzyme immobilization in hydrogels: a perfect liaison for efficient and sustainable biocatalysis, *Eng. Life Sci.* 22 (2022) 165–177, <https://doi.org/10.1002/elsc.202100087>.
- [4] L. Yavari Maroufi, M. Rashidi, M. Tabibiazar, M. Mohammadi, A. Pezeshki, M. Ghorbani, Recent advances of macromolecular hydrogels for enzyme immobilization in the food products, *Adv. Pharm. Bull.* 12 (2022) 309–318, <https://doi.org/10.34172/apb.2022.043>.
- [5] Z. Tan, M. Bilal, A. Raza, J. Cui, S.S. Ashraf, H.M.N. Iqbal, Expanding the biocatalytic scope of enzyme-loaded polymeric hydrogels, *Gels* 7 (2021) 194, <https://doi.org/10.3390/gels7040194>.
- [6] D. Pirozzi, A. Latte, F. Sannino, Immobilization of lipases on chitosan hydrogels improves their stability in the presence of the products of triglyceride oxidation, *Gels* 9 (2023) 776, <https://doi.org/10.3390/gels9100776>.
- [7] J.M. González-Sáiz, C. Pizarro, Polyacrylamide gels as support for enzyme immobilization by entrapment. Effect of polyelectrolyte carrier, pH and temperature on enzyme action and kinetics parameters, *Eur. Polym. J.* 37 (2001) 435–444, [https://doi.org/10.1016/S0014-3057\(00\)00151-8](https://doi.org/10.1016/S0014-3057(00)00151-8).

- [8] M.D. Patil, G. Grogan, A. Bommaris, H. Yun, Oxidoreductase-catalyzed synthesis of chiral amines, *ACS Catal.* 8 (2018) 10985–11015, <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b02924>.
- [9] M.D. Truppo, Biocatalysis in the pharmaceutical industry: the need for speed, *ACS Med. Chem. Lett.* 8 (2017) 476–480, <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.7b00114>.
- [10] E.M.M. Abdelraheem, H. Busch, U. Hanefeld, F. Tonin, Biocatalysis explained: from pharmaceutical to bulk chemical production, *Chem. Eng.* 4 (2019) 1878–1894, <https://doi.org/10.1039/C9RE00301K>.
- [11] A. Kinner, P. Nerke, R. Siedentop, T. Steinmetz, T. Classen, K. Rosenthal, M. Nett, J. Pietruszka, S. Lütz, Recent advances in biocatalysis for drug synthesis, *Biomedicines* 10 (2022) 964, <https://doi.org/10.3390/biomedicines10050964>.
- [12] S. Simić, E. Zukić, L. Schermund, K. Faber, C.K. Winkler, W. Kroutil, Shortening synthetic routes to small molecule active pharmaceutical ingredients employing biocatalytic methods, *Chem. Rev.* (2023), <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00574>.
- [13] A.M. Bezborodov, N.A. Zagustina, Enzymatic biocatalysis in chemical synthesis of pharmaceuticals, *Appl. Biochem. Microbiol.* 52 (2016) 237–249, <https://doi.org/10.1134/S0003683816030030>.
- [14] D.H. Zhang, H.X. Xu, N. Chen, W.C. Che, The application of ionic liquids in enzyme immobilization and enzyme modification, *Austin J. Biotech. Bioeng.* 3 (2016) 1060–1064.
- [15] L. Ji, M. Chen, W. Zhang, B. Nian, Y. Hu, Comprehensive applications of ionic liquids in enzyme immobilization: current status and prospects, *Mol. Catal.* 552 (2024) 113675, <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2023.113675>.
- [16] R. Cabrera-Padilla, M.C. Lisboa, M.M. Pereira, Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto an eco-friendly support in the presence of ionic liquid, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38 (2014) 805–814, <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1322-2>.
- [17] Mu. Naushad, Z.A. Allothman, A.B. Khan, M. Ali, Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes: a review, *Int. J. Biol. Macromol.* 51 (2012) 555–560, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.06.020>.
- [18] M. Moniruzzaman, K. Nakashima, N. Kamiya, M. Goto, Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids, *Biochem. Eng. J.* 48 (2010) 295–314, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.10.002>.
- [19] S. Das, T. Karmakar, S. Balasubramanian, Molecular mechanism behind solvent concentration-dependent optimal activity of *Thermomyces lanuginosus* lipase in a biocompatible ionic liquid: interfacial activation through arginine switch, *J. Phys. Chem. B* 120 (2016) 11720–11732, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b08534>.
- [20] P. Hara, Immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase: kinetic resolution in organic solvents, ionic liquids and in their mixtures, *Ann. Univ. Turk. Chem. B* 120 (2016) 11720–11732, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b08534>.
- [21] B. Zou, Y. Yan, J. Xia, L. Zhang, I.O. Adesanya, Enhancing bio-catalytic activity and stability of lipase nanogel by functional ionic liquids modification, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 195 (2020) 111275, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111275>.
- [22] 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) 174–185, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.02.007>.
- [23] N.S. Mohammadi, M.S. Khiabani, B. Ghanbarzadeh, Enhancement of biochemical aspects of lipase adsorbed on halloysite nanotubes and entrapped in a polyvinyl alcohol/alginate hydrogel: strategies to reuse the most stable lipase, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36 (2020) 45, <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02817-2>.
- [24] A. Jędrzak, Advanced Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/lignin and ZrO<sub>2</sub>/lignin hybrid microplatforms for glucose oxidase immobilization: evaluation of biosensing properties by catalytic glucose oxidation, *Catalysts* 9 (2019), <https://doi.org/10.3390/catal9121044>.
- [25] A. Almohsin, F. Michal, E. Alsharaeh, M. Bataweel, M. Krishnan, Self-healing PAM Composite Hydrogel for Water Shutoff at High Temperatures: Thermal and Rheological Investigations, in: D021S013R001 Dubai, SPE, UAE, 2019, <https://doi.org/10.2118/198664-MS>.
- [26] A. Wolny, Supported ionic liquid phase facilitated catalysis with lipase from *aspergillus oryzae* for enhance enantiomeric resolution of racemic ibuprofen, *Environ. Technol. Innov.* 28 (2022) 102936, <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102936>.
- [27] H. Suo, M. Li, R. Liu, L. Xu, Enhancing bio-catalytic performance of lipase immobilized on ionic liquids modified magnetic polydopamine, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 206 (2021) 111960, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111960>.
- [28] X. Zhu, A highly stretchable cross-linked polyacrylamide hydrogel as an effective binder for silicon and sulfur electrodes toward durable lithium-ion storage, *Adv. Funct. Mater.* 28 (2018) 1705015, <https://doi.org/10.1002/adfm.201705015>.
- [29] A. Jamie, A.S. Alshami, Z.O. Maliabari, M. Ali Ateih, O.C.S. Al Hamouz, Immobilization and enhanced catalytic activity of lipase on modified MWCNT for oily wastewater treatment, *Environ. Prog. Sustain. Energy* 35 (2016) 1441–1449, <https://doi.org/10.1002/ep.12375>.
- [30] M.E. Hassan, Impact of immobilization technology in industrial and pharmaceutical applications, *3 Biotech* 9 (2019) 440, <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1969-0>.
- [31] X. Qiu, Y. Wang, Y. Xue, W. Li, Y. Hu, Laccase immobilized on magnetic nanoparticles modified by amino-functionalized ionic liquid via dialdehyde starch for phenolic compounds biodegradation, *Chem. Eng. J.* 391 (2020) 123564, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123564>.
- [32] Z. Qin, Hydrogen-bonded lipase-hydrogel microspheres for esterification application, *J. Colloid Interface Sci.* 606 (2022) 1229–1238, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.08.147>.
- [33] L. Mojovic, Z. Knezevic, R. Popadic, S. Jovanovic, Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on a polymer support, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50 (1998) 676–681, <https://doi.org/10.1007/s002530051350>.
- [34] G. Ma, Z. Zhang, M. Chen, Y. Zhang, B. Nian, Y. Hu, Ionic liquid modification reshapes the substrate pockets of lipase to boost its stability and activity in vitamin E succinate synthesis, *J. Sci. Food Agric.* 104 (2024) 2669–2678, <https://doi.org/10.1002/jsfa.13152>.
- [35] H. Suo, L. Xu, Y. Xue, X. Qiu, H. Huang, Y. Hu, Ionic liquids-modified cellulose coated magnetic nanoparticles for enzyme immobilization: improvement of catalytic performance, *Carbohydr. Polym.* 234 (2020) 115914, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115914>.

**Ionic liquid supported hydrogel-lipase biocatalytic systems in asymmetric synthesis of enantiomerically pure S-ibuprofen**

Oliwia Degórska<sup>1,\*</sup>, Daria Szada<sup>1</sup>, Qiang Fu<sup>2</sup>, Long Duc Nghiem<sup>2</sup>, Andrzej Biadasz<sup>3</sup>, Teofil Jesionowski<sup>1</sup>, Jakub Zdarta<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Chemical Technology and Engineering, Faculty of Chemical Technology, Poznan University of Technology, Berdychowo 4, PL-60965 Poznan, Poland

<sup>2</sup>Centre for Technology in Water and Wastewater Treatment (CTWW), School of Civil and Environmental Engineering, University of Technology Sydney, Ultimo, NSW 2007 Australia

<sup>3</sup>Institute of Physics, Faculty of Materials Engineering and Technical Physics, Poznan University of Technology, Piotrowo 3, PL-60965, Poznan, Poland

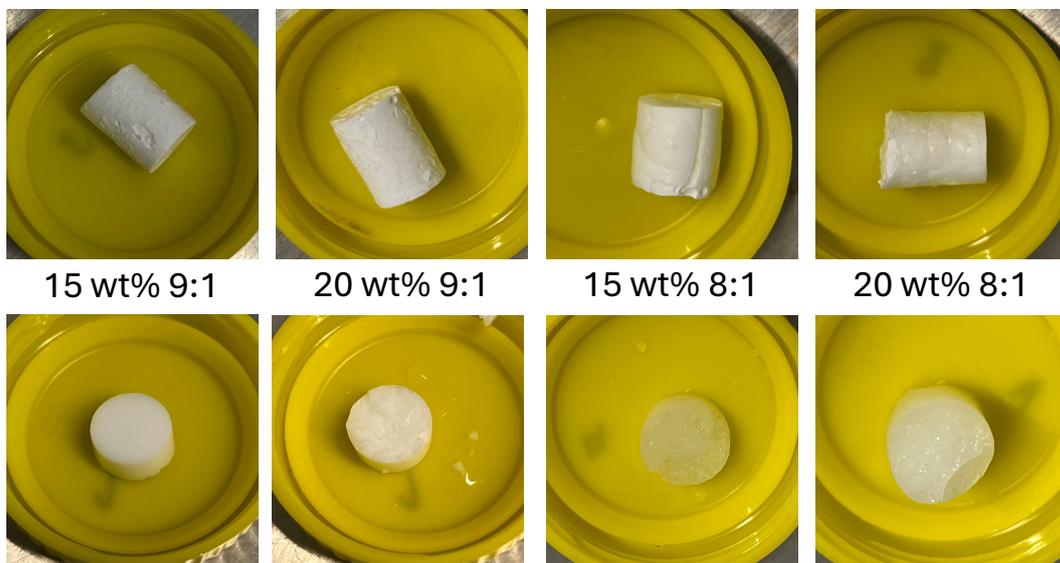
Corresponding authors: oliwia.degorska@doctorate.put.poznan.pl and jakub.zdarta@put.poznan.pl

**Supplementary materials**

## 1. Hydrogels stability assessment in the phosphate buffer

Four different ratios of monomer to cross-linker of PAM hydrogel were obtained and examined: 8:1 (15 wt%), 8:1 (20 wt%), 9:1 (15 wt%), 9:1 (20 wt%).

To establish the appropriate ratio and optimal stability of synthesized hydrogels, each material was at first lyophilized and further soaked in phosphate buffer for 12 hours. Based on performed tests material with the ratio 9:1 (15 wt%) material was applied in the following tests and processes.



**Figure S1.** Photos of fabricated hydrogels (different ratios of monomer to cross-linker) after lyophilization (upper row) and lyophilized hydrogels soaked in water (bottom row).

## 2. Dynamic kinetic enzymatic resolution of ibuprofen methyl ester

**Table S1.** List of samples and conditions of performed reactions of ibuprofen methyl ester resolution with the use of biocatalyst without and with the addition of [BMIM]PF<sub>6</sub> during immobilization process (for both system with and without ILs the applied conditions of racemic mixture resolution were identical).

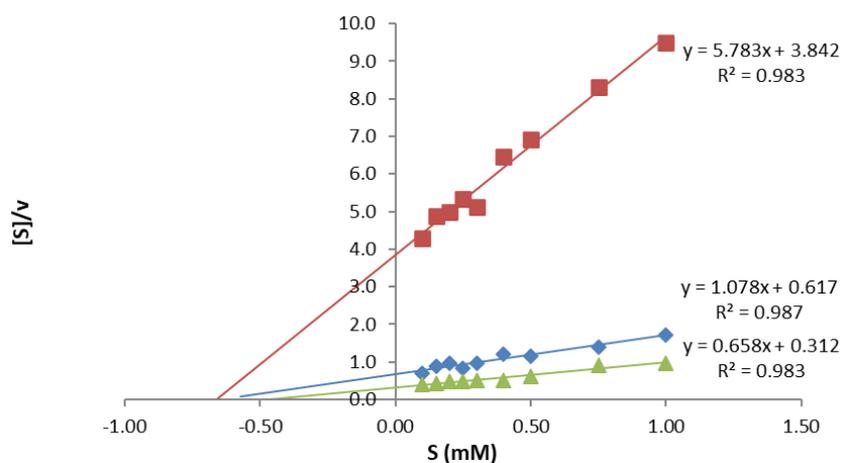
Organic solvent	Water phase	Lipase concentration (mg/mL)	ILs additive	DMSO additive	Process type
Isooctane	Phosphate buffer pH = 7	50	No	No	Kinetic resolution
Isooctane	Phosphate buffer pH = 7	50	Yes	No	Kinetic resolution
Hexane	Phosphate buffer pH = 7	50	No	No	Kinetic resolution
Hexane	Phosphate buffer pH = 7	50	Yes	No	Kinetic resolution
Isooctane	Phosphate buffer pH = 7	50	No	Yes	Kinetic resolution
Isooctane	Phosphate buffer pH = 7	50	Yes	Yes	Kinetic resolution
Hexane	Phosphate buffer pH = 7	50	No	Yes	Kinetic resolution
Hexane	Phosphate buffer pH = 7	50	Yes	Yes	Kinetic resolution
Isooctane	Buffer NaHCO <sub>3</sub> -NaOH pH = 9.5	50	No	No	Dynamic kinetic resolution
Isooctane	Buffer NaHCO <sub>3</sub> -NaOH pH = 9.5	50	Yes	No	Dynamic kinetic resolution
Hexane	Buffer NaHCO <sub>3</sub> -NaOH pH = 9.5	50	No	No	Dynamic kinetic resolution
Hexane	Buffer NaHCO <sub>3</sub> -NaOH pH = 9.5	50	Yes	No	Dynamic kinetic resolution
Isooctane	Buffer NaHCO <sub>3</sub> -NaOH pH = 9.5	50	No	Yes	Dynamic kinetic resolution
Isooctane	Buffer NaHCO <sub>3</sub> -NaOH pH = 9.5	50	Yes	Yes	Dynamic kinetic resolution
Hexane	Buffer NaHCO <sub>3</sub> -NaOH pH = 9.5	50	No	Yes	Dynamic kinetic resolution
Hexane	Buffer NaHCO <sub>3</sub> -NaOH pH = 9.5	50	Yes	Yes	Dynamic kinetic resolution

### 3. HPLC analysis results

**Table S2.** Concentration of each sample according to HPLC analysis after reaction with applied biocatalytic system supported with ILs as a reaction catalyst.

Sample designation	Process duration [h]	(S)-ibuprofen [mg/mL]	(R)-ibuprofen [mg/mL]	Ibuprofen methyl ester [mg/mL]
Isooctane/PBS pH = 7	48	1,150	0,068	6,389
	96	2,612	0,072	5,733
	144	3,936	0,079	4,582
Isooctane/Buffer NaHCO <sub>3</sub> -NaOH pH = 9.5	48	2,379	0,041	5,577
	96	5,237	0,042	2,812
	144	6,485	0,043	1,484
Isooctane/Buffer NaHCO <sub>3</sub> -NaOH pH = 9.5/DMSO	48	3,771	0,032	4,067
	96	5,989	0,062	1,994
	144	7,643	0,062	0,475
Hexane/PBS pH = 7	48	0,518	0,032	6,723
	96	1,426	0,045	6,484
	144	1,794	0,060	5,618
Hexane/Buffer NaHCO <sub>3</sub> -NaOH pH = 9.5	48	1,762	0,047	5,752
	96	2,643	0,055	5,027
	144	4,450	0,059	3,566
Hexane/Buffer NaHCO <sub>3</sub> -NaOH pH = 9.5/DMSO	48	2,140	0,039	5,892
	96	3,162	0,050	4,864
	144	5,615	0,052	2,577

### 4. Double reciprocal chart for Hanes-Woolf plot



**Figure S2.** Double reciprocal chart for Hanes-Woolf plot for free lipase (blue line), lipase without ILs (red line) and lipase with ILs (green line).

To establish the influence of DMSO on lipase activity, the stability tests in the presence of DMSO were performed.

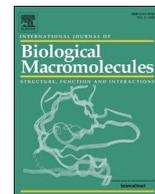
The experiment included 3 different biocatalytic systems, native enzyme, immobilized enzyme and immobilized enzyme in the presence of IL (Tab. S3). Immobilization parameters remained the same as for the preparation of biocatalytic systems used in this research. The stability tests in DMSO were conducted in the chamber with rotary shaker, under the temperature of 40°C (to imitate process conditions), where biocatalytic systems were soaked in the mixture of buffer solution/isooctane (1:1) and buffer solution/isooctane/DMSO (5:5:3), during 1 h and 24 h. After the set time, biocatalytic systems activities were established based on a model reaction with the use of para-nitrophenyl palmitate (lipase substrate). All the results were calculated based on the initial activities of each of the biocatalytic systems, where initial activities were established as 100% of activity.

**Table S3.** Influence of DMSO on the activity of the biocatalyst and native form of enzyme.

Sample	Relative activity (%)			
	1h		24h	
	No additive	Addition of DMSO	No additive	Addition of DMSO
immobilized enzyme	95±1	93±3	92±1	81±2
immobilized enzyme + ILs	98±1	98±2	97±1	95±1
Native enzyme	92±3	90±4	86±1	84±3

#### **Publikacja 4**

**[P4] Degórska O\***, Zasada N, Jesionowski T, Zdarta J\*. Immobilized lipase in the resolution of racemic atenolol – a possible key to sustainable pharmaceuticals synthesis (2025), *International Journal of Biological Macromolecules*, 318, 3.



# Immobilized lipase in the resolution of racemic atenolol – a possible key to sustainable pharmaceuticals synthesis

Oliwia Degórska<sup>\*</sup>, Natalia Zasada, Teofil Jesionowski, Jakub Zdarta<sup>\*</sup>

Institute of Chemical Technology and Engineering, Faculty of Chemical Technology, Poznan University of Technology, Berdychowo 4, PL-60965 Poznan, Poland

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Hydrolases  
Poly(ionic liquid)  
Enzymatic resolution  
Biocatalysis  
Active pharmaceutical ingredient

## ABSTRACT

This study focuses on the development of a biocatalytic system based on lipase from *Pseudomonas fluorescens* immobilized on a poly(acrylamide)- and poly(ionic liquid)-based hydrogel. It was established that temperature significantly impacts polymerization rate of the monomers used, leading to the application of 70 °C for 30 min for the most suitable hydrogel structure. Under these conditions, the polymerization of PIL and PAM reached 63.5 % and 90.9 %, respectively. The produced hydrogel with immobilized lipase was characterized by improved by around 30 % chemical and thermal stability as compared to native enzyme and provided a suitable environment for successful lipase deposition, proven by elution of <2 % of the enzyme from the support. What is more, it was established that a higher enzyme loading resulted in greater catalytic activity, providing over 30 % higher performance after 10 reusability cycles. High enzymatic activity and enantioselectivity demonstrated by the produced system was proved in dynamic kinetic resolution of atenolol reaching over 55 % reaction yield, that was over 40 % higher as free counterpart, and attaining 100 % enantiomeric excess for the final (S)-atenolol ester.

## 1. Introduction

Nowadays, hydrolases represent one of the most diverse and largest group of enzymes. Indeed, they are a key group of enzymes that play an extremely crucial role in biocatalysis, particularly in the pharmaceutical industry. One of the defining features that make hydrolases extremely relevant and suitable for applications such as the production of pharmaceutically active compounds is their remarkable specificity. Reactions with their participation are characterized by a high selectivity towards the desired products, controlling and reducing undesired by-products, minimizing chemical waste, as well as maximizing yields [1]. The pharmaceutical industry is using hydrolases to produce pharmaceuticals in a greener and more economical way [2]. Thus, the employment of hydrolases not only offers the possibility of cleaner and more efficient chemical synthesis, but also aligns with the concept of green chemistry, through which the environmental impact of industrial processes can be minimalized.

Nevertheless, despite the numerous benefits of hydrolases, the major factor limiting their wider deployment in the pharmaceutical industry lies in their reduced catalytic performance deriving from their structure and sensitivity to the conditions of the reaction. Consequently, one of the main priorities is to develop solutions for improving the efficiency of enzymes under harsh industrial conditions. Among potential strategies, immobilization of enzymes attracts particular attention. Not only does it enable the improvement of their stability, but also their multiple usage, contributing to lower production costs. The implementation of a suitable support further contributes to increased enzyme stability through a stable enzyme-substrate complex formation [3,4]. However, immobilization is not the only feasible pathway to improve the stability of hydrolases. Another alternative as well as highly promising method turns out to be the introduction of ionic liquid into the reaction medium. These unique solvents, characterized by variable properties such as polarity, viscosity and density, are attracting more and more attention and are increasingly being studied as enzyme-stabilizing additives [5].

**Abbreviations:** AA, acrylamide; API, active pharmaceutical ingredient; APS, ammonium persulfate; BET, Brunauer-Emmett-Teller; BJH, Barrett-Joyner-Halenda; BSA, bovine serum albumin; CLSM, confocal microscopy; DMF, dimethylformamide; DMSO, dimethyl sulfoxide; HLES, high-loaded enzyme system; HPLC, high-performance liquid chromatography; IL, ionic liquid; LLES, low-loaded enzyme system; NMR, nuclear magnetic resonance; PAM, poly(acrylamide); PBS, phosphate buffer; PIL, poly(ionic liquid); p-NP, para-nitrophenol; p-NPP, para-nitrophenyl palmitate; PR, polymerization rate; PVA, poly(vinyl alcohol); TGA, thermogravimetric analysis; VBIMBr, 3-butyl-1-vinyl-1H-imidazol-3-ium bromide.

<sup>\*</sup> Corresponding authors.

E-mail addresses: [oliwia.degorska@doctorate.put.poznan.pl](mailto:oliwia.degorska@doctorate.put.poznan.pl) (O. Degórska), [jakub.zdarta@put.poznan.pl](mailto:jakub.zdarta@put.poznan.pl) (J. Zdarta).

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.145174>

Received 3 April 2025; Received in revised form 25 May 2025; Accepted 9 June 2025

Available online 10 June 2025

0141-8130/© 2025 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Their introduction even in small amounts can significantly increase the stability and activity of hydrolases, leading to higher process yields. Moreover, their characteristic features, including low vapor pressure and minimal volatility, make them safer and more environmentally friendly alternatives to traditional organic solvents [6].

The application of hydrolases in the presence of ionic liquids in the pharmaceutical industry for API synthesis represents a relatively novel and rapidly expanding area of investigation. Researches that have been conducted so far demonstrate an increase in reaction efficiency, supporting a greener environmental perspective. Nonetheless, such studies mainly focus on laboratory trials, while industrial-scale application of such technology remains a grand challenge. This knowledge gap points out the need for further investigations as well as serves as motivation for developments that may contribute to the evolution of sustainable pharmaceutical synthesis technologies.

An example of just such a compound, for which biocatalysis is a promising alternative to classical chemical methods, is atenolol. This widely used beta-blocker, essentially applied in the treatment of hypertension and cardiovascular disorders, highlights the advantages of enzyme-driven processes. Traditional synthesis of such compounds typically relies on the use of toxic reactants, high quantities of organic solvents and employment of high-temperature conditions, all of which pose environmental and economic challenges [7,8]. By employing enzymes as catalysts, the need for harmful chemicals is reduced, allowing for the reaction to proceed under more environmentally friendly conditions. Moreover, incorporation of ionic liquids, enhances enzyme stability, and thus increasing the efficiency of the process and achieving a purer final product. This innovative approach not only addresses environmental concerns but also reduces operational costs, aligning with the broader goals of sustainable pharmaceutical development. Furthermore, it paves the way for cleaner, more efficient and economically profitable drug manufacturing processes.

The aim of this work was to synthesize a biocatalytic system by immobilizing *Pseudomonas fluorescens* lipase in a poly(ionic liquid) hydrogel for resolution of racemic atenolol. The obtained biocatalytic systems were subjected to physicochemical analyses to confirm the effectiveness of support functionalization and enzyme immobilization, prior to use as a catalyst in the resolution of an atenolol racemic mixture. The novelty of this study lies in the successful synthesis of a biocatalytic system using poly(ionic liquid) hydrogel as a support for *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization, which provides an enhanced micro-environment for enzyme activity and stability and its application in the resolution of racemic atenolol. Samples after enzymatic resolution were examined using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) to indicate the enantiomeric excess and efficiency of conducted reactions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and chemicals

Acrylamide (AA), ammonium persulfate (APS) and poly(vinyl alcohol) (PVA), lipase from *Pseudomonas fluorescens*, para-nitrophenyl palmitate (p-NPP), organic solvents, such as isopropanol, hexane, ethanol, methanol and isooctane and buffers (pH 5–9) were purchased from Sigma Aldrich (Merck Group, Poland). 3-Butyl-1-vinyl-1H-imidazol-3-ium bromide (VBIMBr) was provided by BLD pharma. Racemic atenolol was purchased from Chemat.

### 2.2. Analytical procedures for morphology evaluation

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy was employed to obtain detailed insights into the polymerization processes of AA and ionic liquid. The NMR measurements were conducted using a VNMR-S spectrometer (Varian) operating at 400 MHz. Deuterium oxide was used for all samples as a solvent for NMR analysis. Confocal microscopy

(CLSM) using a high-resolution confocal microscope was used to investigate the morphological structure of the fabricated enzyme-deposited material (LSM710, Zeiss, Germany), obtained using an argon laser (488 nm). In material mode (reflected light), the laser operated at 458 nm wavelength. In fluorescence mode, the laser operated at 488 nm and fluorescence was observed in the range 510–797 nm [9]. During the characterization of the produced materials, the parameters of their porous structure were also assessed. The specific surface area of the tested material was determined using the BET (Brunauer-Emmett-Teller) algorithm, while the volume and pore size of the analyzed material were determined based on the BJH (Barrett-Joyner-Halenda) algorithm. Before the measurement, the sample was degassed by placing it at 120 °C for 4 h in a vacuum chamber. The thermal stability of the analyzed materials was assessed using a thermogravimetric analysis (TGA) Jupiter STA 449F3 device from Netzsch GmbH (Germany). Measurements were conducted under flowing nitrogen (10 mL/min) at a heating rate of 283 K/min over a temperature range of 298–1273 K, with an initial sample weight of approximately 5 mg.

### 2.3. Synthesis of the material and biocatalyst

The synthesis of the biocatalyst began with the preparation of the initial mixture, referred to as mixture A. This mixture comprised 0.333 g (1.44 mmol) of VBIMBr, 0.333 g (4.68 mmol) of acrylamide, 0.013 g (0.06 mmol) of APS, and 1 g of deionized water. The components were stirred until a clear and homogeneous solution was formed. This solution was then maintained under a nitrogen atmosphere with continuous stirring for 15 min. Next, solution B was prepared by dissolving 2 g of PVA in 18 mL of deionized water. This solution was subjected to vigorous stirring at 95 °C for 24 h until it became homogeneous. Following this, after cooling to room temperature, mixture A and B were combined, with addition of 50 mg (LLES, *low-loaded enzyme system*) and 120 mg (HLES, *high-loaded enzyme system*) of *Pseudomonas fluorescens* lipase to the composition.

To ensure uniformity, the combined mixture was treated with ultrasound for 5 min in the water bath (Sonic-3 Polsonic), operated at ambient temperature. The resulting solution was poured into a mold and heated at varying conditions (temperature range 30–70 °C and time 30–60 min) to determine the optimum environment for the best properties and efficiency of the polymerization rate of AA and IL to form a poly(ionic liquid) and poly(acrylamide). The polymerization rates (PR) were calculated based on the obtained NMR spectra, where signals 9.1, 7.4–7.7, 6.2–6.4 and 1.9–2.4 ppm indicated IL, PIL, AM and PAM respectively. PR were determined as the ratio between the integrated areas under the peaks in <sup>1</sup>H NMR spectra, which correspond to carbon in the carbonyl groups in acrylamide and vinyl groups in the IL. Based on the intensity of the signals after polymerization, in comparison to the spectra of monomeric materials, rates of polymerization were calculated (Eq. (1)). Error values for the obtained results can be estimated around 1 %.

$$PR = \left( \frac{I_M - I_{Mx}}{S_M} + \frac{I_P - I_{Px}}{S_P} \right) \quad (1)$$

where:

PR – polymerization rate (%)

$I_M$  – intensity of the signal in spectrum (average) of the monomer of a specific compound

$I_P$  – intensity of the signal in spectrum (average) of the polymerized version of a specific compound

$I_{Mx}$  – intensity of further signals in spectrum (average) of the monomer of a specific compound

$I_{Px}$  – intensity of further signals in spectrum (average) of the polymerized version of a specific compound

$S_M$  – number of signals related to the monomer of a specific compound

$S_P$  – number of signals related to the polymerized version of a specific compound

Formed poly(ionic liquid) and PVA hydrogels material was subjected to 5 cycles of freezing at  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  for 6 h and thawing at room temperature for 2 h. The material was further freeze-dried for 2 h to obtain a porous structure. Thus, the final biocatalytic systems were prepared and ready for subsequent analysis.

Due to varying process conditions, the stabilities of biocatalytic system were tested in different organic and inorganic solvents. HLES was tested due to a higher enzyme loading and higher possibility of influencing the stability of the hydrogel. The samples were cut into uniform pieces, weighed on an analytical scale, and then placed for 24 h in 10 mL of different solvents, such as water, phosphate buffer, DMF, alcohols, vinyl acetate, isooctane and hexane. After this period, the hydrogels were weighed again to determine the mass loss. All measurements were repeated three times, and the results are presented as mean value  $\pm$  standard deviation.

#### 2.4. Characterization of obtained biocatalytic systems

To assess the catalytic activity of the developed biocatalytic systems, as well as the subsequent comparison with the activity of free enzymes, it was necessary to study the influence of parameters such as temperature and pH and to determine thermal stability and reusability. For this purpose, the model reaction of the hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate (p-NPP) to para-nitrophenol (p-NP) was utilized. The 15 mM solution of p-NPP in isopropanol was prepared by dissolving 0.56 g of p-NPP in 100 mL of the solvent. For these measurements, 50 mg and 120 mg of *Pseudomonas fluorescens* lipase or an equivalent amount of the immobilized enzyme consisting of a corresponding amount of the biocatalyst was applied. Spectrophotometric measurements were carried out at  $\lambda = 410\text{ nm}$ . All measurements were repeated three times, and the results are presented as mean value  $\pm$  standard deviation.

##### 2.4.1. Effect of reaction conditions

To study the effect of temperature, 10 mL of buffer (pH 7) was added to tubes containing the test material, followed by 5 mL of p-NPP solution. Reactions were carried out for 15 min at different temperatures (30, 40, 50, 60, 70  $^\circ\text{C}$ ) using a shaker. To complete the reactions, 5 mL of 0.5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution was added, followed by UV-Vis spectroscopy analysis.

To study the effect of pH, the test materials were placed in tubes with 10 mL of buffer with different pH values (5, 6, 7, 8, 9), to which 5 mL of p-NPP solution was then added. Reactions were carried out for 15 min at 30  $^\circ\text{C}$  in a shaker. The solutions were subsequently subjected to analysis after the addition of 5 mL of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution to terminate the reactions.

Thermal stability was assessed by incubating the test material for 2 h at 30, 40, 50, 60 and 70  $^\circ\text{C}$ . After incubation, 10 mL of buffer (pH 7) and 5 mL of p-NPP solution were added and the reaction was continued for 15 min. The reaction was terminated by adding 5 mL of 0.5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution, and thereafter the resulting sample solution was tested.

To assess reusability, 10 cycles of the model reaction were conducted. Each cycle involved adding the produced biocatalytic system, 10 mL of phosphate buffer (pH 7), and 5 mL of 15 mM p-NPP to a reaction vessel. The reactions were carried out for 15 min at 30  $^\circ\text{C}$  in a shaker. After each reaction, 5 mL of 0.5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution was added. The solution was analyzed in a spectrophotometer. After each cycle, the biocatalyst, after thorough rinsing, was placed in fresh substrate mixture and the procedure described above was repeated.

##### 2.4.2. Elution tests

Due to the type of immobilization (entrapment), elution of enzyme was examined. A piece of hydrogel with known amount of enzyme was

soaked in PBS 7 buffer for 24 h. Further 0.5 mL of the post soaking buffer was mixed with 0.5 mL of Bradford reagent and left for 5 min reaction. The amount of eluted protein was examined under the spectroscopy UV-Vis using the 595 nm wavelength. The amount of the eluted enzyme was calculated according to the absorbance measurements using the BSA standard calibration curve.

#### 2.5. Enzymatic conversion of atenolol

##### 2.5.1. Screening of solvents for racemic atenolol conversion

Atenolol solubility is highly limited. Due to enzyme activity and specificity of the reaction restrictions, available solvent possibilities are also limited. Atenolol is highly soluble in methanol, nevertheless it would have a negative impact on the reaction balance, competing with the substrate, decreasing the efficiency of reaction and activity of the enzyme. After taking into consideration multiple presented factors, five organic solvents were tested: toluene, hexane, DMF, DMSO and isooctane. 1 mg of the racemic atenolol was dissolved in a 1 mL of a particular solvent and put in the ultrasonic bath for 5 min, operated at ambient temperature. Further solutions were taken under the optic microscope for further check if no atenolol particles were left.

##### 2.5.2. Characterization of the processes in batch and continuous flow reactor

To determine the influence of process conditions on efficiency of the final reaction, two models were introduced in this study: batch reactor and continuous flow reactor. In the study with batch reactor the same amounts of free and immobilized biocatalyst were used, whereas for continuous reactor we scaled up the system tenfold to indicate possible performance of the process at the larger scale. In batch reactor magnetic stirring was applied to provide a uniform distribution of substrates whereas for the continuous flow reactor biocatalyst was placed in a porous basket to allow the continuous flow of reaction mixture through the biocatalyst.

##### 2.5.3. Asymmetric conversion of racemic atenolol to enantiopure atenolol ester

The final step of the study involved the enzymatic conversion of R,S-atenolol to S-atenolol ester. For the batch reactor 10 mL solution containing 3.75 mM racemic atenolol, dissolved in DMF, was mixed with 2  $\mu\text{L}$  of vinyl acetate. A piece of biocatalytic system (HLES) was introduced to the reaction mixture to start the catalytic process. Equivalent amount of the free enzyme was tested for activity comparison. Samples for analysis were collected every 12 h to select a proper time of reaction for further tests. After selecting a proper time of reaction, the upscaling process to the continuous flow reactor was investigated.

In the continuous flow reactor 100 mL of 3.75 mM racemic atenolol in DMF, 20  $\mu\text{L}$  of vinyl acetate and biocatalytic system containing 1.2 g of enzyme was treated for 48 h with the flow speed of 50 mL/min.

##### 2.5.4. Reusability of the biocatalytic system in the conversion of atenolol racemate

To evaluate the reusability of the biocatalytic systems beyond model reactions, the biocatalytic system was submitted to 6 reaction cycles of racemic atenolol conversion in a flow reactor. After each cycle, biocatalyst was thoroughly washed with DMF and applied to the next reaction cycle. Postreaction samples were collected for further HPLC analysis to estimate the biocatalyst's efficiency and enantioselectivity. Chromatographic separation was performed using the 1290 Infinity II LC System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). A chiral Poroshell 120 Chiral-V 4.6  $\times$  150 mm, 2.7  $\mu\text{m}$  column (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) was used to separate the enantiomers of atenolol and atenolol ester. An isocratic flow was used with the mobile phase consisting of 100 % methanol with 0.2 % acetic acid and 0.05 % ammonium hydroxide. The mobile phase flow rate was 0.4 mL/min, the analysis time was 10 min, the column was maintained at 22  $^\circ\text{C}$ , and 1  $\mu\text{L}$  sample injection was

used. Detection of compounds was performed using an infrared detector (DAD) at a wavelength of 274 nm. Additionally, to confirm the presence of atenolol ester, detection was performed using an Agilent Q-TOF 6546 mass spectrometer with a Dual AJS ESI source. The following mass spectrometer ion source parameters were used: drying gas temperature 350 °C; drying gas flow, 12 L/min; nebulizer pressure: 50 psi; shielding gas temperature: 350 °C; shielding gas flow: 11 L/min; capillary input voltage 4000 V.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Evaluation of the physicochemical parameters of the produced systems

The polymerization rate plays a crucial role in determining the stability and performance of the resulting hydrogels. To investigate how temperature and reaction time affect the polymerization of poly(ionic liquid) (PIL) and polyacrylamide (PAM) hydrogel, the NMR analysis was conducted to examine the polymerization rates (Table 1). The polymerization was performed at temperatures ranging from 30 °C to 70 °C, with reaction times of 30 and 60 min.

NMR analysis highlights that temperature plays a critical role in the polymerization of poly(ionic liquid) (PIL) and PAM hydrogel. As the temperature rises, the polymerization of both PIL and PAM increases.

For PIL, the polymerization rate rises from 44.1 % at 30 °C to 63.5 % at 70 °C. For PAM, the rate increases from 60.1 % to 90.9 % over the same temperature range. These trends suggest that higher temperatures promote the polymerization of both materials, with PAM demonstrating a more pronounced enhancement [10].

The impact of reaction time on polymerization differs between PIL and PAM. In the case of PIL formation, the polymerization shows variability with changes in temperature, and only minor improvements are noted with longer reaction times. For example, at 30 °C, the polymerization efficiency increases from 44.1 % to 49.2 % when the reaction time is extended from 30 to 60 min. In contrast, at 50 °C, the increase is minimal, going from 46 % to 47.4 %. In contrast, PAM exhibits a more consistent response to extended reaction time, with polymerization increasing from 60.1 % to 74 % at 30 °C and from 64.6 % to 80.8 % at 60 °C. These findings suggest that while reaction time contributes to polymerization, its effect is more pronounced for PAM than for PIL [11].

Altogether, temperature becomes the dominant factor affecting polymerization performance, especially at higher temperatures, where it significantly accelerates the process, reducing the need for longer reaction times. While time is important, particularly for PAM, optimizing temperature is key to maximizing the polymerization of both PIL and PAM. Based on the evaluated data, incubation in 70 °C for 30 min appears to be the most suitable environment, offering high polymerization efficiency while minimizing reaction time. This temperature provides optimal polymerization rate for both PIL and PAM, making it the preferred setting for efficient synthesis.

Table 2 illustrates the stability of the biocatalyst incubated in different solvents, in context of various solvent used in atenolol

**Table 1**  
Temperature and time effects on IL to PIL and AA to PAM polymerization.

Sample	Polymerization rate (%)			
	IL monomer	PIL	AA	PAM
30 °C, 30 min	55.9	44.1	39.9	60.1
30 °C, 60 min	50.8	49.2	26	74
40 °C, 30 min	49.4	50.6	25.9	74.1
40 °C, 60 min	51.3	48.7	27.7	72.3
50 °C, 30 min	54	46	29.6	70.3
50 °C, 60 min	52.6	47.4	25.5	74.5
60 °C, 30 min	55.3	44.7	35.4	64.6
60 °C, 60 min	48.7	51.3	19.2	80.8
70 °C, 30 min	36.5	63.5	9.1	90.9

**Table 2**  
Stability of biocatalyst in various solvents at different incubation temperatures.

Incubation	Percentage mass loss (%)	Solvent	
50 °C	4.0 ± 0.1	Water	
	74.0 ± 1	Isopropanol	
	20.3 ± 0.4	Isooctan	
	31.9 ± 0.2	Hexan	
	31.5 ± 0.1	PBS 7	
	85.4 ± 2.1	Etanol	
	32.1 ± 1.5	Vinyl acetate	
	3.4 ± 0.1	DMF	
	60 °C	4.0 ± 0.15	Water
		86.5 ± 0.9	Isopropanol
3.7 ± 0.05		Isooctan	
16.0 ± 1		Hexan	
32.9 ± 0.8		PBS 7	
87.6 ± 3		Etanol	
18.1 ± 1.5		Vinyl acetate	
4.2 ± 0.15		DMF	
70 °C		1.1 ± 0.05	Water
		87.9 ± 1.2	Isopropanol
	22.8 ± 1.1	Isooctan	
	25.6 ± 0.9	Hexan	
	20.1 ± 1	PBS 7	
	72.8 ± 0.6	Etanol	
	33.5 ± 4	Vinyl acetate	
	8.5 ± 0.3	DMF	

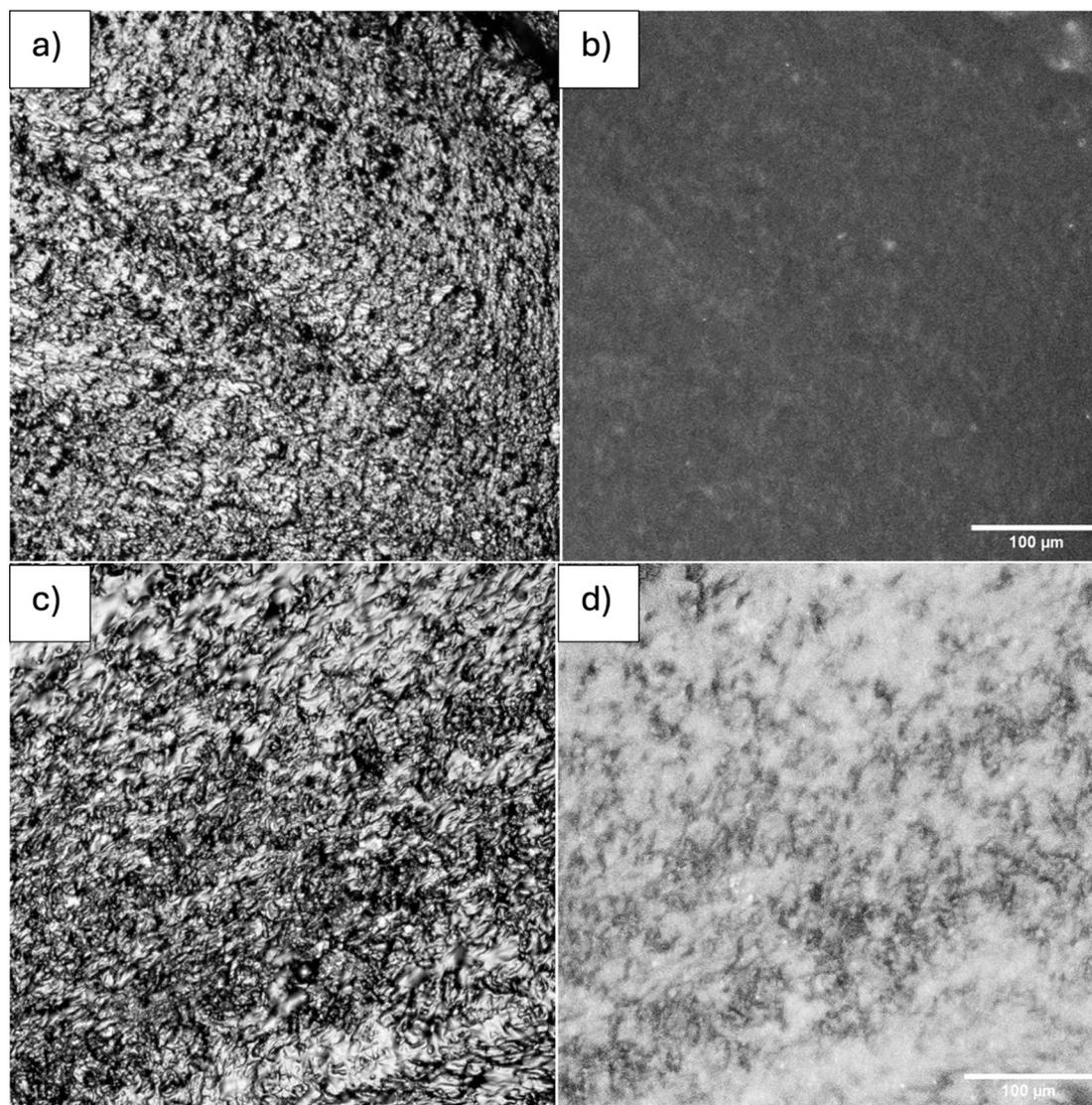
synthesis, showing the initial weight, dry weight and percentage weight loss for each solvent tested. The results demonstrate that the biocatalyst shows the highest stability in water and DMF, with mass loss consistently below 8.5 % among tested temperatures. Conversely, isopropanol and ethanol cause the highest mass loss at all temperatures, indicating that these solvents significantly interact with the biocatalyst. It might have a relationship with the polarity of solvent, interchanging the water for alcohol in the structure of hydrogel or possible solubility of PIL in alcohols, which leads to its washing out from the hydrogel network and, consequently, to the destabilization of the entire structure. Isooctane and hexane show a moderate effect, with weight loss increasing with temperature – the hydrogel remains insoluble under these conditions, but interactions with the ionic liquid can lead to a gradual weakening of the structure. PBS 7 and vinyl acetate similarly cause significant weight loss but are less damaging compared to isopropanol and ethanol.

The stability of the biocatalyst in water is largely independent of the incubation temperature, while other solvents show a marked susceptibility to temperature changes. At elevated temperatures, for instance, stability in isopropanol and ethanol decreases rapidly, with mass losses reaching 87.9 % and 87.6 %, respectively.

Such findings highlight that the type of solvent has a more pronounced effect on the stability of a biocatalyst than temperature over the range tested. To maintain the stability of the biocatalyst, water is recommended as the most suitable solvent, while isopropanol and ethanol should be avoided due to their significant negative effects.

Microscopic observations of the carrier were carried out to determine the morphology of the tested material as well as its changes because of the immobilization process. The figure shown (Fig. 1) contains images obtained by confocal laser scanning microscopy (CLSM) of the hydrogel before and after immobilization process.

In comparison to the material without enzyme in fluorescence mode (Fig. 1b), image of the material after immobilization process reveals numerous bright spots and clusters in fluorescence mode (Fig. 1d) indicating the presence of enzyme in the material and suggesting homogeneous distribution of the enzyme. These bright clusters, which are absent in pristine material clearly show the incorporation of the enzyme into the material. This hydrogel features a dense and fibrous texture, indicative of a complex and entangled structure. This structural feature is particularly favorable for enzyme immobilization, as it offers significant surface area and solid structural support, facilitating efficient enzyme entrapment. Fig. 1a shows the hydrogel's physical morphology



**Fig. 1.** CLSM photos depicting hydrogel: a), b): before immobilization; c), d): after immobilization; on the left in a material mode, on the right in the fluorescent mode.

before immobilization and Fig. 1c after immobilization in material mode. It is visible that the density seems higher for the material after immobilization, due to the enzyme deposition. In the previous study [12] a pure PAM hydrogel was applied for adsorption immobilization processes, being characterized with high immobilization efficiency (87 %) but slightly lower activity recovery (62 %). What is worth mentioning, in the present study the bright fluorescent areas indicate the presence and more uniform distribution of the enzyme throughout the hybrid hydrogel material. The even dispersion is essential for the functionality of the hydrogel, ensuring that the immobilized enzyme can interact effectively with substrates. It can be concluded that VBIMBr acts as a compatibilizer, possibly improving dispersion between PVC and PAM and tuning the hydrophilicity/hydrophobicity balance, allowing the even dispersion in the hybrid hydrogel bulk. The observed effects suggest that the enzyme has been effectively immobilized in the hydrogel structure and that the matrix structure does not interfere with the visibility and accessibility of the enzyme. Similar occurrence was proved by Cestari et al. with the use of compatibilizers to improve the mechanical properties of simulated marine environment plastic blends for enhancing the mechanical properties and recyclability of marine plastic waste by improving the compatibility of its mixed polymer components. In their work they tested three compatibilizers: maleic

anhydride-grafted polyethylene, styrene-butadiene block copolymer, and maleic anhydride-grafted polypropylene. The best results were achieved with maleic anhydride-grafted polypropylene (10 wt%), which significantly improved tensile strength by enhancing dispersion between PP and PET phases, improving dispersion and interfacial adhesion in immiscible plastic blends, making them more viable for recycling and reuse in sustainable applications [13]. As in our study, the addition of ionic liquid (VBIMBr) as compatibilizer improved the structural properties of the hydrogel and provides suitable microenvironment for enzymes, conditioning high activity retention of the biocatalytic system. The CLSM images confirm that the hydrogel serves as an effective and supportive environment for enzyme immobilization by entrapment, maintaining both the structural integrity of the hydrogel and the functional distribution of enzymes within it.

Thermogravimetric analysis (TGA) was performed to compare the thermal stability of the free enzyme and the enzyme immobilized in the support (HLES). The obtained curves show significant differences in the course of thermal decomposition of both samples (Fig. 2). In the case of the free enzyme (blue line), a rapid decrease in mass is observed in the temperature range of 25–200 °C, which is mainly related to the loss of water and low-molecular, volatile components. In the range of 200–400 °C, intensive decomposition of the protein structure, which is

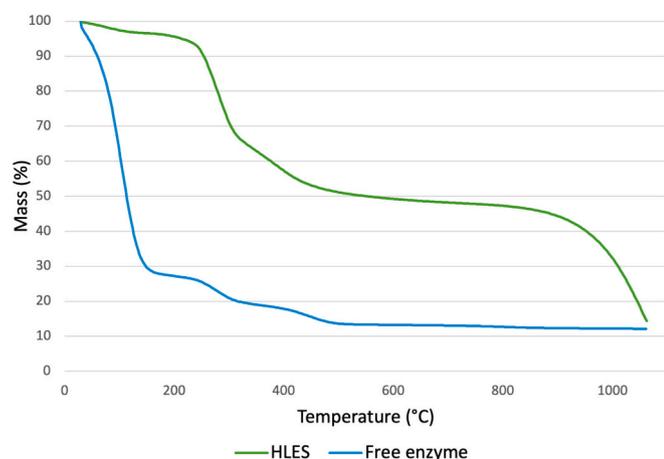


Fig. 2. Thermogravimetric analysis curves of a native enzyme and a biocatalytic system.

the main structure of the enzyme, occurs, resulting in a loss of over 70 % of mass. Above 400 °C, the process stabilizes, and the residual mass reaches a value of about 10–12 %, which may correspond to degraded products. In turn, the sample containing the enzyme immobilized on the HLES support (green line) shows significantly higher thermal resistance. The decomposition process is slower and in a wider temperature range. In the first stage (around 100–300 °C), a gradual loss of mass occurs, mainly attributed to water evaporation and degradation of easily volatile organic compounds. The second, more intensive stage of decomposition is observed in the range of 300–600 °C, where both the enzyme and the organic components present in the support structure decompose. It is worth noting that the final mass of the HLES sample is higher (~20 %) compared to the free enzyme, which indicates the presence of a thermally stable support material. The obtained results confirm that the immobilization of the enzyme on the HLES support significantly increases its thermal stability. Moreover, the support shows a clear protective effect on the enzyme structure, limiting its degradation in lower temperature ranges. Thus, the enzyme structure remains more resistant to elevated temperatures, which makes such a system advantageous in industrial applications requiring higher biocatalyst stability.

Further confirmation of the effective enzyme trapping is provided by the analysis of porous properties. These parameters were determined based on nitrogen adsorption at low temperature using the BET (Brunauer–Emmett–Teller) methods for specific surface area and the BJH (Barrett–Joyner–Halenda) for pore size distribution. After the enzyme trapping process, the specific surface area of the material decreased from 5.16 m<sup>2</sup>/g to 3.72 m<sup>2</sup>/g, while the average pore size decreased from 14.03 nm to 12.82 nm. Such changes indicate that the enzyme was effectively trapped in the pore network of the material, which led to their partial filling and a reduction of the available surface area. In contrast to typical adsorption, where the enzyme is located mainly on the surface of the material, here it was physically enclosed inside it, which additionally helps to protect its structure and functional stability [14].

### 3.2. Characterization of the biocatalytic systems

Post immobilization biocatalytic systems, HLES and LLES, were thoroughly examined in terms of catalytic activities and stability compared to the native form of enzyme. Checking two amounts of immobilized enzyme allows us to assess the effect of its amount on catalytic activity, because a larger amount of enzyme does not always mean higher reaction efficiency – it can lead to saturation of the support or limitation of substrate diffusion. Analysis of different amounts also allows us to assess the efficiency of immobilization, checking whether a larger amount of enzyme increases activity or leads to its loss or

inefficient binding [14]. Additionally, it allows us to optimize the enzyme to support ratio, which is crucial for obtaining maximum activity with the lowest consumption of raw materials [15]. As well known, immobilization can significantly improve the stability of the enzyme due to the suitable conditions provided by the support. It is important to check the stability of the enzyme, because its excess can cause aggregation or destabilization, which reduces the efficiency of catalysis. Thanks to this, it is possible to consciously design a biocatalysts, optimizing its efficiency and durability [16].

In this study activity recovery based on the activity of the native enzyme indicated 107 % of activity recovery for the enzyme after immobilization (HLES), pointing out that applied conditions and support material with ionic liquid included improved enzyme's performance. What is more, a key factor in developing an effective catalytic system after immobilization is ensuring that the immobilized protein maintains high catalytic activity over varying process conditions. To evaluate this, the hydrolysis of para-nitrophenol palmitate, catalyzed by immobilized lipase, was used as a model reaction (Fig. 3). The study examined the impact of several parameters on catalytic performance, including temperature, pH, thermal stability, and reusability of the biocatalyst.

The activity of free lipase remains consistently high across different temperatures (30–50 °C), with relative activity values close to 85 % (Fig. 3 a). However, at higher temperatures (60–70 °C), its activity significantly decreases. Immobilization in a poly(ionic liquid) hydrogel enhances thermal stability, particularly for HLES, which retains high activity across the entire temperature spectrum, though with a slight decline at 70 °C.

In contrast, LLES exhibits a more pronounced decrease, especially at elevated temperatures. Similar observations were made by Su et al., where lipase immobilized in an alginate hydrogel retained over 85 % of its activity at 60 °C, significantly outperforming free lipase, which lost nearly half of its activity at this temperature [17]. This suggests that in most high-loaded enzyme system (HLES) provides better structural stability, reducing activity loss due to thermal denaturation. Nevertheless, it is important to remember that too high loading may cause the enzyme steric hindrance, reducing the catalytic activity [18]. The effect of pH (Fig. 3b) on enzyme activity was examined over a pH range from 5 to 9. Free lipase maintains high activity at pH 5 and 9 but shows a significant decrease at other pHs. By contrast, HLES retains high activity across the entire pH spectrum, though minor reductions occur at pH 9. The LLES shows a more evident decrease of activity under these conditions due to a lower enzyme loading. These findings indicate that the amount of enzyme and its immobilization enhanced structural rigidity thus improving stability across varying pH levels. Chaudhary et al. (2024) investigated the stability and catalytic efficiency of urease immobilized in a poly(acrylamide)-co-poly(hydroxyethyl)methacrylate-co-poly(cyclohexyl methacrylate) hydrogel. Their study demonstrated that the immobilized enzyme retained high activity across a broad temperature range, with significant stability even at 70 °C, outperforming free urease. The enzyme also exhibited robust pH stability, maintaining catalytic efficiency across various pH levels, which suggests that immobilization preserved enzyme structure under diverse conditions [19]. From this data it is clear that immobilization highly improved pH and temperature tolerance of the lipase making it possible to perform reaction under a wide range of process conditions due to microenvironmental effects within the hybrid hydrogel matrix but also by protecting effect of the material towards the catalyst [20].

Reusability (Fig. 3c), a key parameter allowing the higher possibility for industrial applications, was assessed through 10 reaction cycles. The HLES demonstrates excellent reusability, maintaining 80 % of its initial activity after 7 cycles and retaining over 60 % by the 10th cycle. In contrast, the 50 mg immobilized enzyme shows a steady decline, with activity dropping below 40 % after 10 cycles. This suggests that higher enzyme loading enhances stability, reducing enzyme leaching or degradation during repeated use. Enzyme immobilization processes can

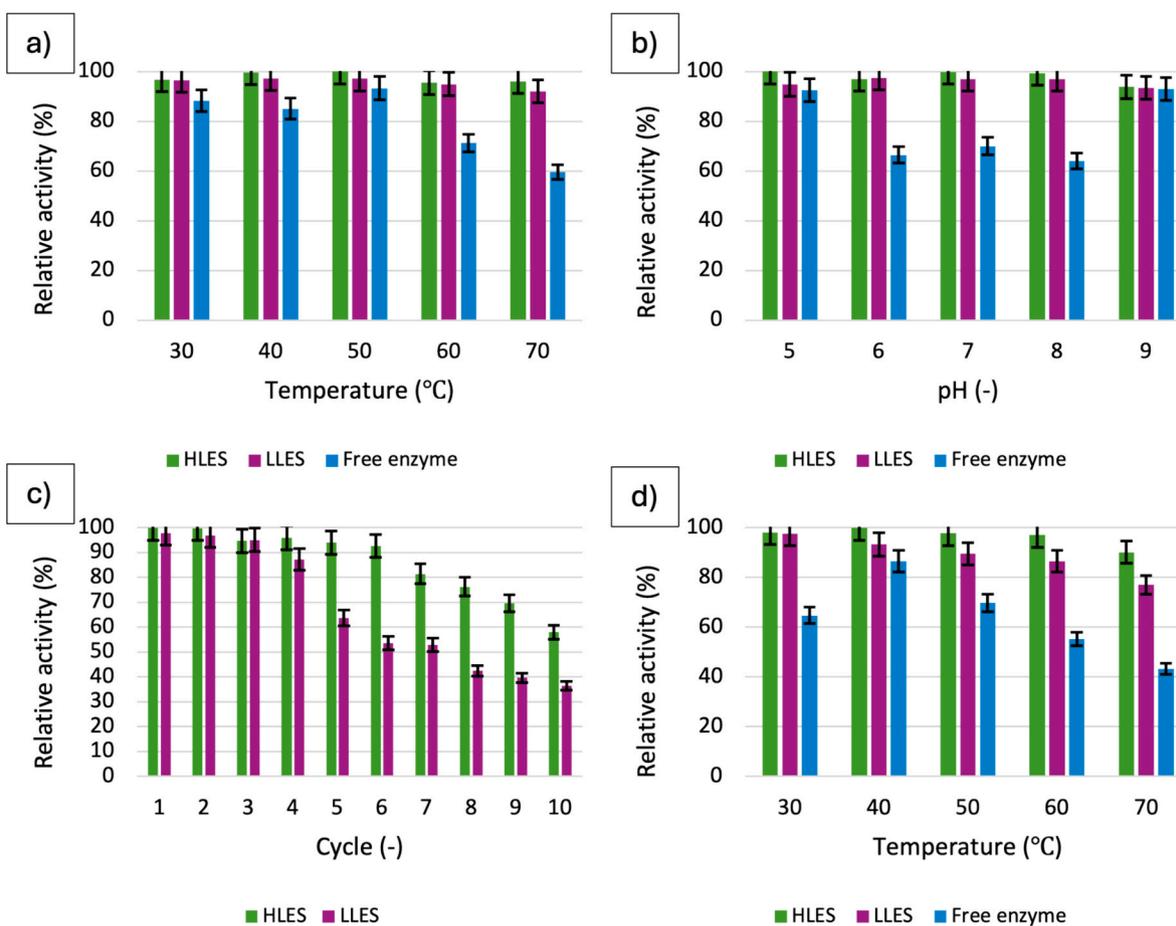


Fig. 3. Effect of a) temperature, b) pH on the relative activity, c) reusability and d) thermal stability of produced biocatalytic systems.

lead to lower costs of their use in industry and contribute to the increased use of environmentally friendly technologies.

While free lipase performs well at lower temperatures, its activity significantly drops at 70 °C, indicating poor resistance to heat (Fig. 3d). Similarly, the 50 mg immobilized enzyme loses more activity at 60 °C and 70 °C, suggesting that a lower enzyme loading does not provide sufficient structural support to maintain stability at higher temperatures. It is possible that at higher enzyme loading, the enzymes form a more stable structure with the carrier, allowing them to remain active for longer at higher temperatures. It may also indicate that the system has unique thermal properties that prevent enzyme activity loss due to high temperatures [21]. In contrast, HLES retains approximately 90 % of its activity even at 70 °C, proving that a higher enzyme loading enhances heat resistance, likely due to better protection against denaturation and structural degradation. These results reinforce the beneficial effects of enzyme immobilization, providing thermal protection and extending enzyme usability but also is crucial for applications where enzymes are exposed to elevated temperatures for extended periods.

Overall, enzyme immobilization in a poly(ionic liquid) hydrogel enhances stability and preserves high activity over multiple cycles. It should be stated the porous and 3-D structure of the hydrogel used as a support enhance the efficient transport of substrates and products to immobilized catalysts, but on the other hand provide also protective effect on the enzyme structure that improve its stability and prolonged activity. Additionally, the addition of VBIMBr ionic liquid to the mixture of PVC and PAM may have a beneficial effect on the enzyme in this system for several reasons. One of them may be the fact that ionic liquids, especially those of imidazolium character, can provide a favorable environment for enzymes, stabilizing their structure and protecting them from denaturation [22]. In particular, imidazolium ionic liquids

are known to be able to improve enzymatic activity by stabilizing the secondary structure of proteins. VBIMBr by changing the polarity of the enzyme environment affects its conformation and catalytic activity, while reducing enzyme degradation in the presence of difficult-to-process polymers [23]. As mentioned earlier, VBIMBr can also act as a compatibilizer between hydrophobic PVC and hydrophilic PAM, leading to better enzyme dispersion in the polymer matrix, which facilitates access of the substrate to its active site and improves catalytic efficiency. The degree of these benefits is influenced by the amount of immobilized enzyme, with high-loaded enzyme system offering superior stability compared to low-loaded enzyme system (50 mg), hence HLEC system was used for the further investigation. Summarizing, the synergistic effect of ILs used in the study and open structure and well developed surface area facilitate activity recovery resulting in even higher activity than free counterpart.

To further assess the stability of the biocatalyst, an elution test was performed. The biocatalyst was immersed in a phosphate buffer solution (PBS) at pH 7 and left for 24 h. After this time, absorbance measurements were performed, allowing the determination of the degree of enzyme elution. Calculations showed that the elution level was only 1.26 %, confirming the high stability of the obtained catalytic system. Elution tests proved the effectiveness of the immobilization method used. The obtained results indicate that the immobilized enzyme is well embedded in the structure and is not released into the environment, making it suitable for long-term used in biocatalytic processes.

### 3.3. Biocatalysis in the synthesis of atenolol ester in reactors

Due to a low solubility of atenolol screening of solvents as a reaction medium were required to provide suitable environment for the process.

Among many organic solvents, such as toluene, hexane, DMF, DMSO and isooctane, only DMF was found suitable. Other solvents, even though discussed in the literature, weren't found sufficient as solvents, providing very low solubility of the substrate. For further reactions DMF was used as a reaction medium, additionally providing a good catalyst's stereoselectivity. Even though the activity of native enzymes in organic solvents is moderate, the protective effect of support material after immobilization on the structure of the enzyme shows a great improvement in its' activity, as showed in our studies (conversion 4 times higher for the immobilized system compared to a native form). What is worth mentioning, atenolol is a poorly soluble compound, hence multiple solvent screenings were performed to find a compromise between solubility of atenolol and the highest activity of the biocatalyst. DMF provided good solubility of the substrate, allowing suitable performance of the enzyme, without impacting its' stereoselectivity [24,25].

Prepared atenolol solution was introduced to the batch reactor with vinyl acetate and produced biocatalyst. Reactions were conducted on a span of 48 h to investigate how time of the reaction influences the conversion of substrate.

The obtained results of the racemic atenolol-vinyl acetate esterification reaction (Table 3) clearly indicate a significant advantage of the immobilized enzyme over the free enzyme in terms of conversion efficiency, while maintaining full enantiomeric excess (100 %).

In the case of the native enzyme, after 12 h of reaction only 7.75 % conversion was obtained, and after 48 h this value increased to 13.99 %. For the reference, Sikora et al. [8] tried different strains of lipases and solvents to achieve high conversion rate of S- atenolol enantiomer. However, these solvents weren't suitable for our reaction as stated in the text. During their studies their highest conversion rate with a good enantioselectivity was at the level of 46.3 %, nevertheless due to the application of a native form of enzyme, they were unable to reuse it. In our studies on the other hand, for the immobilized enzyme, the conversion after 12 h was already 28.93 %, and after 48 h it reached 55.48 %. This means a more than four-fold increase in catalytic efficiency compared to the free enzyme. During the performed reaction enantiomeric excess occurred to be 100 % on every step of the process. This is due to the fact of use of *Pseudomonas fluorescens* strain of lipase shifts the balance towards synthesis of the (S)-enantiomer of atenolol ester. Even though DMF is not seen as a suitable environment for enzymatic reactions because it can influence the activity of the enzyme or question its' selectivity, during our research the support material was thoroughly sought and investigated to support the enzyme and its' selectivity [26]. As suggested earlier appropriate matching of the structure of polymer hydrogels to the required enzyme fraction allows for their effective immobilization, increased biocatalytic activity and exceptional stability [27]. Hydrogel based material used as an entrapment matrix for the enzyme was dehydrated via freeze-drying, decreasing significantly the amount of water in the system. Nevertheless, very small amounts are always needed for high activity of the lipase enzyme, due to its' morphology and occurring reaction on the border of two phases. Hudson

**Table 3**

Conversion and enantiomeric excess of the enzymatic reaction of resolution of racemic atenolol.

Reaction time (h)	Conversion (%)	Enantiomeric excess (%)
Native enzyme (120 mg)		
12	7.75 ± 0.12	100 ± 0
24	8.58 ± 0.31	100 ± 0
36	10.35 ± 0.15	100 ± 0
48	13.99 ± 0.05	100 ± 0
Immobilized enzyme (encapsulation of 120 mg)		
12	28.93 ± 0.36	100 ± 0
24	46.89 ± 0.21	100 ± 0
36	54.49 ± 1	100 ± 0
48	55.48 ± 0.10	100 ± 0

et al. used freeze-dried poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) hydrogels for encapsulating glucose oxidase (GOx), which maintained enzyme activity when trehalose/raffinose were added to mitigate dehydration damage. This highlights the importance of balance between water reduction and enzyme preservation [28]. Hydrophobic organic environment lets the interfacial activation mechanism to occur, enhancing lipases catalytic activity. Lipases have a hydrophobic "lid" over their active site that opens at oil-water interfaces, enabling substrate access, where minimal water facilitates this lid displacement [29]. As proved in Wehtje et.al lipase activity (e.g., *Pseudomonas* sp.) increases with controlled water activity in organic solvents. Excess water reduces esterification efficiency, but small amounts stabilize the enzyme's active conformation [30]. Additionally, small amounts of water may promote hydrolysis of small DMF amounts, where obtained dimethylamine might increase the pH of reaction mixture, factoring the dynamic kinetic resolution (DKR) of the substrate, resulting in the 100 % of enantiomeric excess [31,32]. What is more, imidazole-based IL support material may additionally support racemization, enhancing lipases' activity, what is significantly visible while comparing conversion rates of immobilized systems (55.48 %) and native enzyme (13.99 %).

#### 3.4. Reusability of the biocatalytic system in flow reactor

After evaluation of batch reactor, the esterification reaction was introduced to the continuous flow reactor for upscaling and estimation of conversion rate and possible reusability of the biocatalyst. Due to lack of possibility of easy reusability of the native enzyme and its' low initial activity in the reaction mixture, only the produced biocatalytic system was examined. The results presented in Table 4 indicate that in the first cycle the conversion reached 56.08 % (Fig. 4), indicating high initial activity of the enzyme in the immobilized form. What is worth mentioning, process upscale and switch from batch to continuous flow reactor resulted in a slightly higher conversion rate of the substrate. Compared to batch reactors, continuous flow reactors provide superior mixing and heat transfer. This ensures uniform reaction conditions, avoiding local concentration or temperature gradients that can limit reaction efficiency in batch systems [33]. However, in the second cycle a decrease to 40.41 % was noted, and in the subsequent stages the conversion efficiency gradually decreased, reaching 24.48 % in the sixth cycle.

Despite a clear decrease in the degree of conversion in the subsequent cycles, the enantiomeric excess of the process remained at a constant level of 100 %. This means that the enzyme did not lose the ability to preferentially convert one enantiomer, which is crucial in chiral processes. The elevated pH facilitates the racemization of the slower-reacting enantiomer by promoting deprotonation or nucleophilic attack mechanisms. This ensures that both enantiomers are continuously interconverted, maintaining a steady supply of the preferred enantiomer for enzymatic resolution [34]. The decrease in conversion efficiency may, however, result from partial deactivation of the enzyme, its washing out from the support, changes in the structure of the enzyme or accumulation of products inhibiting the catalyst.

**Table 4**

Reusability of the biocatalyst in the flow process of enzymatic resolution of racemic atenolol.

Number of the cycle	Conversion (%)	Enantiomeric excess (%)
1	56.08 ± 0.18	100 ± 0
2	40.41 ± 0.54	100 ± 0
3	38.53 ± 0.50	100 ± 0
4	34.49 ± 0.05	100 ± 0
5	31.34 ± 0.02	100 ± 0
6	24.48 ± 0.47	100 ± 0

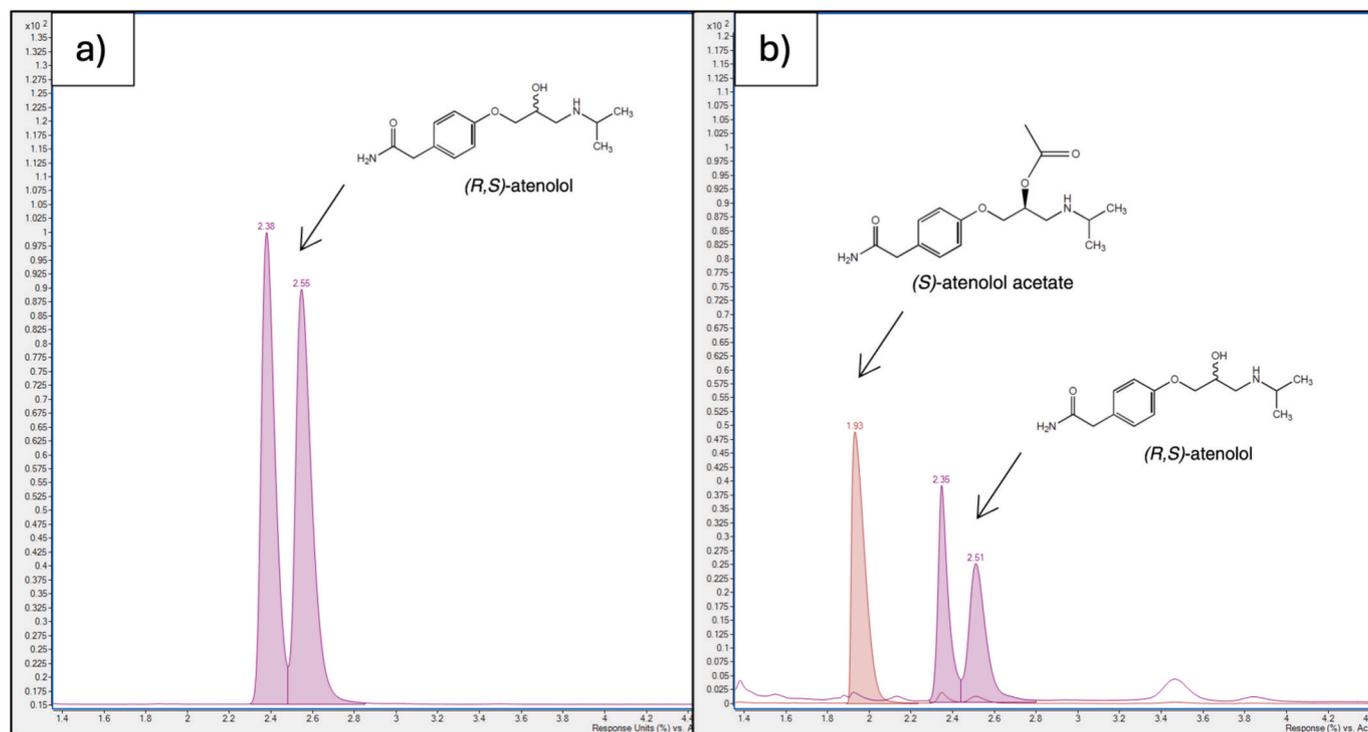


Fig. 4. Chromatogram of (a) racemic atenolol substrate, (b) post reaction mixture with *S*-atenolol acetate (on the left) and racemic atenolol (on the right) after first reaction cycle.

#### 4. Conclusions

The aim of the present research was to synthesize a poly(ionic liquid) hydrogel support with simultaneous immobilization of the enzyme, which in the subsequent steps served as a catalyst in the enzymatic conversion processes of atenolol in a continuous flow reactor. An important step in the development of this work was to perform a physicochemical evaluation of the material produced in order to confirm the successful execution and high activity of the immobilized biocatalysts. CLSM photos confirmed successful and well distributed enzyme deposition, one of the key factors for maintaining high activity after immobilization. Evaluation of the influence of process conditions on enzymatic activity, showed that HLES exhibited 107 % activity relative to the free enzyme. After a thorough examination, the synthesized HLES was subsequently applied for the enzymatic conversion of atenolol in batch and a continuous flow reactor, with provided conditions resulting in a dynamic kinetic resolution and enantiomeric excess of 100 %. It was established that immobilization process significantly influenced efficiency of the process resulting in 4 times higher substrate conversion (55.48 %) compared to a native form of lipase (13.99 %). What is more, process upscaling from batch reactor to continuous flow reactor gave higher substrate conversion (above 56 %), retaining 100 % of product enantiomeric excess. Despite the advantages resulting from immobilization, such as easier separation of the enzyme and its reuse, the obtained results suggest the need for further optimization of the system. Possible strategies to improve enzyme stability include modifying the immobilization method, using appropriate reaction conditions that limit enzyme deactivation or regenerating the biocatalyst between cycles. The produced system could potentially be applied to the synthesis of other pharmaceutical compounds, particularly those where the (*S*)-enantiomer exhibits desired biological activity. Given the enantioselectivity of the strain used, it is especially promising for the production of (*S*)-enantiomers of chiral intermediates or active pharmaceutical ingredients (APIs), where stereospecificity is critical for efficacy and safety.

#### CRedit authorship contribution statement

**Oliwia Degórska:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization, Writing – original draft. **Natalia Zasada:** Data curation, Writing – original draft. **Teofil Jesionowski:** Supervision, Resources, Funding acquisition, Writing – review & editing. **Jakub Zdarta:** Supervision, Funding acquisition, Conceptualization, Writing – review & editing.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Data availability

Data will be made available on request.

#### Acknowledgments

This work was supported by the National Science Centre, Poland, under research grant no. 2023/49/N/ST8/03038.

#### References

- [1] E. Shukla, A.D. Bendre, S.M. Gaikwad, Hydrolases: the most diverse class of enzymes, in: *Hydrolases*, 2022, <https://doi.org/10.5772/intechopen.102350> (London).
- [2] S. Verma, R.N. Choudhary, A.P. Kanadje, U.C. Banerjee, Diversifying arena of drug synthesis: in the realm of lipase mediated waves of biocatalysis, *Catalysts* 11 (11) (2021) 1328, <https://doi.org/10.3390/catal11111328>.
- [3] S. Datta, L.R. Christena, Y.R.S. Rajaram, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, *3 Biotech* 3 (2013) 1–9, <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>.
- [4] N.R. Mohamad, N.H.C. Marzuki, N.A. Buang, F. Huyop, R.A. Wahab, An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes, *Biotechnol. Equip.* 29 (2) (2015) 205–220, <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>.

- [5] H. Li, P.S. Bhadury, B. Song, S. Yang, Immobilized functional ionic liquids: efficient, green, and reusable catalysts, *RSC Adv.* 2 (33) (2012) 12525–12551, <https://doi.org/10.1039/C2RA21310A>.
- [6] S.J. Nara, J.R. Harjani, M.M. Salunkhe, Lipase-catalysed transesterification in ionic liquids and organic solvents: a comparative study, *Tetrahedron Lett.* 43 (16) (2002) 2979–2982, [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)00420-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)00420-3).
- [7] D. Procopio, C. Siciliano, A. Perri, G. Guillena, D.J. Ramón, M.L. Di Gioia, Sustainable synthesis of the active pharmaceutical ingredient atenolol in deep eutectic solvents, *Int. J. Mol. Sci.* 25 (12) (2024) 6677, <https://doi.org/10.3390/ijms25126677>.
- [8] A. Sikora, J. Chalupka, M.P. Marszał, The use of ion liquids as a trojan horse strategy in enzyme-catalyzed biotransformation of (R, S)-atenolol, *Catalysts* 10 (7) (2020) 787, <https://doi.org/10.3390/catal10070787>.
- [9] K. Jankowska, J. Zdarta, A. Grzywaczyk, E. Kijeńska-Gawrońska, A. Biadasz, T. Jesionowski, Electrospun poly(methyl methacrylate)/polyaniline fibres as a support for laccase immobilisation and use in dye decolourisation, *Environ. Res.* 184 (2020) 109332, <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109332>.
- [10] N. Shi, D. Zhang, Inorganic-organic composite solid electrolyte based on cement and polyacrylamide prepared by a synchronous reaction method, *Electrochim. Acta* 391 (2021) 138998, <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.138998>.
- [11] M. Abdelfetah Ghriga, A. Khoukh, S.E. Islam Lebouachera, B. Grassl, NMR investigation on the thermogelation of partially hydrolysed polyacrylamide/polyethylenimine mixtures, *Soft Matter* 18 (2022) 7075–7081, <https://doi.org/10.1039/D2SM00996J>.
- [12] O. Degórska, D. Szada, Q. Fu, L.D. Nghiem, A. Biadasz, T. Jesionowski, J. Zdarta, Ionic liquid supported hydrogel–lipase biocatalytic systems in asymmetric synthesis of enantiomerically pure S-ibuprofen, *Int. J. Biol. Macromol.* 281 (2024) 136221, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136221>.
- [13] S. Piedade Cestari, P.V. Rodrigues, A.C. Ribeiro, M.C.R. Castro, V. Cruz, A. R. Torres, N. Ramos, A.V. Machado, Compatibilizer efficiency in enhancing marine plastic waste valorization through simulated recycled plastic blends, *Polymers* 16 (2024) 3441, <https://doi.org/10.3390/polym16233441>.
- [14] J. Aakanchha, Basic techniques in biochemistry, microbiology and molecular biology, Humana Press, N. Y., 2020, <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9861-6>.
- [15] M.B. Ansoorge-Schumacher, Enzyme immobilization, in: *Introd. Enzyme Technol*, Springer International Publishing, Cham, 2024, pp. 219–241, [https://doi.org/10.1007/978-3-031-42999-6\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-031-42999-6_11).
- [16] Y.R. Maghraby, R.M. El-Shabasy, A.H. Ibrahim, H.M.E.-S. Azzazy, Enzyme immobilization technologies and industrial applications, *ACS Omega* 8 (2023) 5184–5196, <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>.
- [17] B. Su, Z. Bei, H. Pei, X. Xie, Z. Sun, Q. Chen, H. Cao, X. Liu, Generation of a nanobody-alkaline phosphatase heptamer fusion for ratiometric fluorescence immunodetection of trace alpha fetoprotein in serum, *Int. J. Biol. Macromol.* 201 (2022) 507–515, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.056>.
- [18] Z. Song, Q. Zhang, W. Wu, Z. Pu, H. Yu, Rational design of enzyme activity and enantioselectivity, *Front. Biotechnol.* 11 (2023), <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1129149>.
- [19] A. Chaudhary, K. Kumar, V.K. Singh, S. Rai, V. Kumar, K. Tungala, A. Das, T. Jana, Poly(acrylamide)-co-poly(hydroxyethyl) methacrylate-co-poly(cyclohexyl methacrylate) hydrogel platform for stability, storage and biocatalytic applications of urease, *Int. J. Biol. Macromol.* 265 (2024) 131039, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131039>.
- [20] M. Stanisz, K. Bachosz, K. Siwińska-Ciesielczyk, Ł. Kłapiszewski, J. Zdarta, T. Jesionowski, Tailoring lignin-based spherical particles as a support for lipase immobilization, *Catalysts* 12 (2022) 1031, <https://doi.org/10.3390/catal12091031>.
- [21] Y. Deng, X. Wang, H. Xu, C. Liu, R. Li, Y. Zhang, C. Qu, J. Miao, Optimization of  $\kappa$ -selenocarrageenase production by *Pseudoalteromonas* sp. Xi13 and its immobilization, *Molecules* 27 (2022) 7716, <https://doi.org/10.3390/molecules27227716>.
- [22] M. Reslan, V. Kayser, Ionic liquids as biocompatible stabilizers of proteins, *Biophys. Rev.* 10 (2018) 781–793, <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0407-6>.
- [23] L. Bui-Le, C.J. Clarke, A. Bröhl, A.P.S. Brogan, J.A.J. Arpino, K.M. Polizzi, J. P. Hallett, Revealing the complexity of ionic liquid–protein interactions through a multi-technique investigation, *Commun. Chem.* 3 (2020) 1–9, <https://doi.org/10.1038/s42004-020-0302-5>.
- [24] R. Karaman, A. Qtaib, K.K. Dajani, S. Abu Lafi, Design, synthesis, and in vitro kinetics study of atenolol prodrugs for the use in aqueous formulations, *Sci. World J.* (2014) 248651, <https://doi.org/10.1155/2014/248651>.
- [25] H. Zhao, What do we learn from enzyme behaviors in organic solvents? – structural functionalization of ionic liquids for enzyme activation and stabilization, *Biotechnol. Adv.* 45 (2020) 107638, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107638>.
- [26] M.M. Heravi, M. Ghavidel, L. Mohammadkhani, Beyond a solvent: triple roles of dimethylformamide in organic chemistry, *RSC Adv.* 8 (2018) 27832–27862, <https://doi.org/10.1039/c8ra04985h>.
- [27] Z. Tan, M. Bilal, A. Raza, J. Cui, S.S. Ashraf, H.M.N. Iqbal, Expanding the biocatalytic scope of enzyme-loaded polymeric hydrogels, *Gels* 7 (2021) 194, <https://doi.org/10.3390/gels7040194>.
- [28] B.N. Hudson, C.S. Dawes, H.-Y. Liu, N. Dimmitt, F. Chen, H. König, C.-C. Lin, Stabilization of enzyme-immobilized hydrogels for extended hypoxic cell culture, *Emerg. Mater.* 2 (2019) 263–272, <https://doi.org/10.1007/s42247-019-00038-4>.
- [29] G.G. Dodson, D.M. Lawson, F.K. Winkler, Structural and evolutionary relationships in lipase mechanism and activation, *Faraday Discuss.* 93 (1992) 95–105, <https://doi.org/10.1039/FD9929300095>.
- [30] E. Wehtje, P. Adlercreutz, Water activity and substrate concentration effects on lipase activity, *Biotechnol. Bioeng.* 55 (1997) 798–806, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970905\)55:5<798::AID-BIT10>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970905)55:5<798::AID-BIT10>3.0.CO;2-8).
- [31] O. Verho, J.-E. Bäckvall, Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution: a powerful tool for the preparation of enantiomerically pure alcohols and amines, *J. Am. Chem. Soc.* 137 (2015) 3996–4009, <https://doi.org/10.1021/jacs.5b01031>.
- [32] E. Buncl, E.A. Symons, The inherent instability of dimethylformamide–water systems containing hydroxide ion, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1970) 164–165, <https://doi.org/10.1039/C2970000164>.
- [33] A. Soyer Malyemez, A. Giwa, E. Bayraktar, Ü. Mehmetoğlu, Mathematical modeling of a continuous-flow packed-bed reactor with immobilized lipase for kinetic resolution of (R,S)-2-pentanol, *Turk. J. Chem.* 44 (2020) 1423–1429, <https://doi.org/10.3906/kim-1910-22>.
- [34] M.M. Musa, F. Hollmann, F.G. Mutti, Synthesis of enantiomerically pure alcohols and amines via biocatalytic deracemisation methods, *Catal. Sci. Technol.* 9 (2019) 5487–5503, <https://doi.org/10.1039/C9CY01539F>.

## **Publikacja 5**

**[P5] Degórska O\***, Zasada N, Badzińska W, Fu Q, Jesionowski T, Zdarta J\*, Targeted biocatalyst design for asymmetric citalopram conversion in a membrane reactor (2025), *Pharmaceutics*, 17, 1497.

Article

# Targeted Biocatalyst Design for Asymmetric Citalopram Conversion in a Membrane Reactor

Oliwia Degórska <sup>1,\*</sup>, Natalia Zasada <sup>1</sup>, Weronika Badzińska <sup>1</sup> , Qiang Fu <sup>2</sup> , Teofil Jesionowski <sup>1</sup>   
and Jakub Zdarta <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Institute of Chemical Technology and Engineering, Faculty of Chemical Technology, Poznań University of Technology, Berdychowo 4, 60965 Poznań, Poland; nataliazasada16@gmail.com (N.Z.); weronika.badzinska@doctorate.put.poznan.pl (W.B.); teofil.jesionowski@put.poznan.pl (T.J.)

<sup>2</sup> School of Civil and Environmental Engineering, University of Technology Sydney, Ultimo, NSW 2007, Australia; qiang.fu@uts.edu.au

\* Correspondence: oliwia.degorska@doctorate.put.poznan.pl (O.D.); jakub.zdarta@put.poznan.pl (J.Z.)

## Abstract

**Objective:** This study aimed to develop a stable and active biocatalytic system for enzyme immobilization, utilizing an electrospun support doped with a metal–organic framework (MOF) and supplemented with an ionic liquid as a lipase stabilizer and activity enhancer. **Methodology:** The system was applied for an efficient and enantioselective resolution of racemic citalopram. Key parameters, including MOF concentration, electrospinning and immobilization conditions, ionic liquid selection, and reaction time, were optimized to enhance biocatalyst performance. **Results:** The optimal immobilization time was determined to be 24 h, achieving 52% immobilization efficiency and 100% activity recovery. The resulting biocatalytic system HIGH PVC-MOF-lip-CA exhibited superior storage stability, retaining 80% of its initial activity, a 75% improvement over the free enzyme. In the resolution of citalopram, the system achieved 96% conversion of S-citalopram within 24 h, with the enantiomeric excess of 93% in favor of the S-ester over the R-ester. These findings demonstrate the system's potential for efficient and stereoselective biocatalytic applications.

**Keywords:** biocatalysis; enzyme immobilization; biocatalytic API resolution



Academic Editor: Thierry Vandamme

Received: 26 October 2025

Revised: 14 November 2025

Accepted: 14 November 2025

Published: 19 November 2025

**Citation:** Degórska, O.; Zasada, N.; Badzińska, W.; Fu, Q.; Jesionowski, T.; Zdarta, J. Targeted Biocatalyst Design for Asymmetric Citalopram Conversion in a Membrane Reactor.

*Pharmaceutics* **2025**, *17*, 1497.<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17111497>

**Copyright:** © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The increasing demand for sustainable and efficient chemical processes has driven the development of innovative solutions to enhance productivity while minimizing environmental impact. Among these advancements, hybrid materials, which synergistically integrate organic and inorganic components, have emerged as a promising approach due to their unique and tunable properties [1]. By combining the advantages of different material classes, these systems offer tailored functionalities that can address key challenges in catalysis, separation, and biocatalysis. Metal–organic frameworks (MOFs) are characterized as porous structures made of metal ions or clusters connected by organic ligands. Due to their unprecedented design flexibility at the molecular level, it is possible to precisely adjust their properties by modifying both the metallic and organic components. As a result, the materials obtained have controlled porosity, pore size and shape, hydrophilicity, required functional groups, and other specific chemical properties [2,3]. In addition, their optical, catalytic, as well as magnetic properties are also attracting a great deal of attention from researchers [4,5]. For this reason, these

unique properties offer benefits in the fields of catalysis, gas separation, environmental purification, and analytical detection [6]. Nonetheless, the opportunity to utilize MOFs in biocatalysis is particularly appealing. By immobilizing enzymes in their structures, it is not only possible to improve the stability of catalytic proteins, but also to control their activity through a suitably designed and controlled microenvironment [7].

Additional possibilities for optimizing catalytic properties and increasing the efficiency and productivity of biocatalytic processes are offered by combining MOFs with other components, such as ionic liquids (ILs). Referred to as ‘designer solvents’, ionic liquids owe their name to their configurable chemical nature, which directly affects the enhanced stability and performance of immobilized enzymes [8–10]. They are distinguished by their negligible vapor pressure, high stability in both chemical and thermal conditions, as well as high ionic conductivity. Because of these characteristics, ionic liquids used in enzyme catalysis exhibit the ability to stabilize the quaternary structure of enzymes, thereby contributing to their durability and resistance to extreme pH and temperature conditions. Consequently, this makes it possible to limit denaturation processes and allows reactions to proceed under conditions that would be destructive to free enzymes [11]. The application of the components aligns perfectly with the enzymatic synthesis of active pharmaceutical ingredients. The use of enzymes for such reactions fits within the principles of green chemistry and sustainable development goals, offering mild reaction conditions and low environmental toxicity. An additional advantage is the high selectivity of these reactions, which is crucial for obtaining specific enantiomers of active compounds, as exemplified by citalopram. To date, most biocatalytic processes rely predominantly on the use of free enzymes, which, despite their effectiveness, suffer from several limitations, including low stability, lack of reusability, and poor resistance to changing environmental conditions.

To overcome limitations of free enzymes, immobilization is the most frequently used solution. There have been studies and examples in the scientific literature on the efficient use of such immobilized systems in the separation of racemic mixtures as well as the synthesis of APIs. In one of the presented research projects, a *Candida antarctica* lipase immobilized in a MOF matrix was utilized, enabling efficient separation of carprofen enantiomers, achieving high yields and good selectivity. In addition, the produced system achieved better pH and temperature tolerance than the free enzyme [12]. In the context of naproxen, it was shown that the addition of ionic liquid as a reaction medium significantly improved the activity and enantioselectivity of lipase in the separation of (R,S)-naproxen, enabling efficient and stable enzymatic separation of the enantiomers [13,14]. In the enantioselective esterification of ibuprofen, *Candida antarctica* B lipase demonstrated remarkable efficiency when paired with the ionic liquid [BMIM][BF<sub>4</sub>], achieving high reaction yields and enhanced selectivity compared to conventional organic solvent systems [15]. Such studies underscore the potential of enzyme-mediated biocatalysis in the pharmaceutical industry, offering a greener and more sustainable alternative to traditional chemical processes.

In this study, we developed a novel MOF-doped electrospun nanofiber as a support for the immobilization of lipase *Candida* sp., with ionic liquids incorporated as activity enhancer factors. The resulting biocatalytic system was designed for the enantioselective resolution of racemic citalopram, a key pharmaceutical intermediate. By synergistically combining MOFs and ionic liquids, this approach aligns with green chemistry principles, offering a sustainable alternative for enzymatic catalysis in pharmaceutical synthesis, an area of growing research interest.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Reagents and Chemicals

Poly(vinyl chloride) (PVC) with low (MW = 40 kDa) and high (MW = 125 kDa) molecular weights, zirconium(IV) chloride ( $ZrCl_4$ ), 2-aminoterephthalic acid ( $NH_2$ -BDC), acetic acid, N,N-dimethylformamide (DMF), dichloromethane (DCM), lipase from *Candida* sp., choline acetate, choline chloride, paranitrophenyl palmitate (pNPP), vinyl acetate, acetonitrile, and used buffer solutions were purchased from Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany) and used as received. Racemic mixture of citalopram was purchased from Angene (Nanjing, China).

The MOF was prepared via a solvothermal reaction by dissolving zirconium (IV) chloride ( $ZrCl_4$ ) and 2-aminoterephthalic acid ( $NH_2$ -BDC) (500 mg) in anhydrous N,N-dimethylformamide (DMF) (30 mL) at a 1:1 molar ratio, with acetic acid (2 mL) added as a crystallization modulator. The mixture was sonicated for homogeneity, transferred to a Teflon-lined autoclave, and heated at 120 °C for 24 h. After cooling, the resulting yellow crystalline product was isolated by centrifugation, washed sequentially with DMF and ethanol to remove unreacted precursors and residual solvents, and finally vacuum-dried at 80 °C to yield activated UiO-66- $NH_2$  (with a zirconium-based metal–organic framework with amino functional groups, enabling further interactions).

### 2.2. Analytical Methods for the Morphology Evaluation

For the confocal laser scanning microscopy, two modes were used in this study: material mode, which recorded light reflection from the surface, and fluorescence mode, which recorded light emission. A Zeiss LSM710 confocal microscope (ZEISS, Oberkochen, Germany) was used for the analysis, built in an upright configuration on an Axio Imager Z2m stand (ZEISS, Oberkochen, Germany). The objective lens used was an EC Epiplan-Neofluar 20×/0.50 HD DIC (ZEISS, Oberkochen, Germany) with a working area of 0.424 × 0.424 mm. In material mode, laser light with a wavelength of 458 nm was used as illumination, and 488 nm in the fluorescence mode. Luminance observation was set within the wavelength range of 510–797 nm.

Thermogravimetry was used to visualize the change in sample mass caused by temperature changes. The results of this analysis are presented in the form of a thermogram. Measurements were conducted in nitrogen, air, argon, oxygen, or vacuum atmospheres, and the sample mass typically decreased with increasing temperature. The thermal stability of the materials was assessed using a Jupiter STA 449 device from Netzsch GmbH (Selb, Germany).

The electrokinetic properties of the fabricated membranes were examined over a pH range of 3–11 using zeta potential measurements (Anton Parr SurPASS 3 zeta potential analyzer, Warsaw, Poland). The measurements were evaluated at a 100 μm gap height using a 10<sup>−3</sup> M KCl solution, and an average of 4 readings was taken and reported at each pH value. Then, 0.05 M of HCl and NaOH solutions was used to adjust the pH of the KCl solution.

To determine the activity of the obtained biocatalysts and to perform Bradford analysis, the solutions were analyzed using UV-Vis spectroscopy. The study utilized the electromagnetic spectrum between 200 and 780 nm. Measurements for the Bradford analysis were performed at a wavelength of 595 nm, while measurements for the biocatalyst activity were carried out at a wavelength of 410 nm on a Jasco V-750 spectrophotometer (Jasco, Tokyo, Japan).

To determine the progress of rac-citalopram resolution, HPLC analysis was conducted using a high-performance liquid chromatograph 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a diode array detector (DAD). Separation of the

enantiomers of the substrate and enzymatic reaction products was performed using an InfinityLab Poroshell 120 Chiral-V column, 2.7  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  150 mm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), maintained at a temperature of 15  $^{\circ}\text{C}$ . The mobile phase consisted of a 2 mM ammonium acetate solution with 0.01% acetic acid in methanol. The flow rate of the mobile phase was set at 0.4 mL/min. Detection of analytes was carried out at a wavelength of 230 nm.

### 2.3. Fabrication of the Electrospun Nanofibers

Two solutions of low-molecular-weight poly(vinyl chloride) (LOW PVC) and high-molecular-weight poly(vinyl chloride) (HIGH PVC) were prepared at a concentration of 15% ( $w/w$ ) in a mixture of DCM:DMF (15 mL) (1:1  $v/v$ ). The solutions were placed in glass vials for 24 h on a magnetic stirrer (IKA RH basic). Then, to one solution of each type of PVC, MOF (UiO-66-NH<sub>2</sub>) grounded in a mortar was added, so that its percentage in the solution was 3% ( $w/w$ ) (relative to the dry mass of the polymer). The solutions with the addition of MOF were again placed on a magnetic stirrer until the MOF was completely dispersed in the polymer mixture. Then, each of the solutions was transferred to 5 mL syringes, which were placed in a syringe pump, which was part of the Spinbox electrospinning kit (Bioinica, Valencia, Spain), and the electrospinning process was started. Four types of electrospun mats were produced, which were used as an organic carrier in the immobilization process fabricated from (i) low-molecular-weight poly(vinyl chloride) solution (LOW PVC), (ii) low-molecular-weight poly(vinyl chloride) solution with the addition of UiO-66-NH<sub>2</sub> (LOW PVC MOF), (iii) high-molecular-weight poly(vinyl chloride) solution (HIGH PVC), and (iv) high-molecular-weight poly(vinyl chloride) solution with the addition of MOF UiO-66-NH<sub>2</sub> (HIGH PVC MOF).

The flow rates of the solutions during the electrospinning processes were controlled by the syringe pump settings and were 0.25 mL/h for solutions with the addition of MOF UiO-66-NH<sub>2</sub> and 0.5 mL/h for pure PVC solutions, while the current voltage during electrospinning was 12 kV for solutions with the addition of MOF UiO-66-NH<sub>2</sub> and 13 kV for pure PVC solutions. The electrospinning duration of individual mats varied from 15 to 30 min, depending also on the atmospheric conditions affecting the quality of nanofiber formation, since humidity influences the conductivity of the used solution. The variable values influencing the electrospinning process of mats were polymer flow rate controlled using a syringe pump, electrical potential changed using the Spinbox device, and electrospinning time.

### 2.4. Evaluation of MOF Incorporation in the Nanofiber Structure

To test the stability of MOF incorporation in the nanofiber structure, fabricated mats were soaked in a buffer solution, followed by submission for thermogravimetric analysis to estimate the changes in the material composition. A fragment of each mat weighing 10 mg was placed in a 1.5 mL Eppendorf tube, then each sample was flooded with 1 mL of an aqueous solution of phosphate buffer at pH 7. The samples were left on an IKA KS 260 basic shaker for 24 h and then dried in the open air. For comparison, a fragment of each mat weighing 10 mg was also cut out and analyzed without previously immersing it in the buffer. The samples were tested on a Jupiter STA 449 device from Netzsch GmbH (Selb, Germany).

### 2.5. Immobilization Procedure

Lipase from *Candida* sp. at a concentration of 5 mg/mL was placed in glass vials, mixed with an aqueous solution of phosphate buffer at pH 7 in a ratio of 50:50 (2.5 mL:2.5 mL), and then immobilized on carriers—4 types of electrospun mats both with the addition of MOF (UiO-66-NH<sub>2</sub>) and without. The mats used had dimensions of 0.5  $\times$  0.5 cm (the mass

of this piece was  $2.3 \text{ mg} \pm 0.3 \text{ mg}$ ). To investigate the effect of ionic liquids on the activity of the obtained biocatalytic systems, 5% aqueous solutions of choline chloride and choline acetate were prepared. They were then added separately to systems containing mat and enzyme in the amount of 25  $\mu\text{L}$ . The following systems were finally obtained: PVC-lip, PVC-lip-CC (addition of choline chloride), and PVC-lip-CA (addition of choline acetate).

To examine the effect of immobilization conditions, the immobilization was performed for 1 h and 24 h. Comparison of these two time points allows us to determine whether extending the immobilization time increases the degree of immobilization and enzyme stability, or whether the process reaches a plateau after a shorter incubation time. Throughout the entire process, the samples were placed on a shaking platform (IKA RH 260 basic), which ensured their continuous mixing at 150 rpm. After a set time, the mats were separated from the reaction mixture and tested for activity, reusability, stability, and immobilization efficiency.

### 2.6. Immobilization Efficiency

In order to determine the immobilization efficiency, Bradford analysis was performed. For this purpose, polymer mats were isolated from the solutions after the immobilization, and the solutions were analyzed. Then, 0.5 mL of each of the 12 solutions was taken and placed in plastic spectrophotometric cuvettes with a capacity of 1.5 mL, and then 0.5 mL of Bradford reagent was added to them. The blank sample was 0.5 mL of phosphate buffer solution at pH 7 and 0.5 mL of Bradford reagent. Analysis was also performed for the enzyme solution, which constituted sample 0 and allowed for the calculation of the percentage efficiency. All solutions were left for 15 min, and then their absorbance was measured on a Jasco V-750 spectrophotometer at a wavelength of 595 nm. The obtained absorbance results, defining the initial amount of enzyme in the solution with a known volume and mass of the carrier, allowed the calculation of the amount of enzyme immobilized in 1 g of carrier, while obtaining the percentage efficiency.

### 2.7. Evaluation of Fabricated Biocatalysts' Activity

To estimate the activity and stability of fabricated biocatalysts and their optimal conditions for the highest activity, each system was applied for several evaluations. Mats after immobilization were transferred to glass vials with the addition of 1 mL of a 15 mM paranitrophenyl palmitate (pNPP) solution in isopropanol and 2 mL of an aqueous solution of phosphate buffer at a certain pH for the evaluation of the amount of formed product (para-nitrophenol). The reactions took place on a rotational shaker (200 rpm) for 5 min at an estimated temperature, then the reaction was stopped by adding 1 mL of 0.5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution. After the reaction, all of the obtained solutions were centrifuged in an Eppendorf Centrifuge 5810 R and filtered to separate the precipitate of the formed palmitic acid. After such preparation, its absorbance was measured on a Jasco V-750 spectrophotometer at a wavelength of 410 nm and the concentration of the product was determined based on the calibration curves of para-nitrophenol.

Lipase activity recovery was calculated according to Equation (1):

$$\text{Activity recovery (\%)} = \frac{A_t}{A_i} \cdot 100\% \quad (1)$$

$A_i$ : the initial activity of lipase added to the immobilization medium,

$A_t$ : the activity of the immobilized lipase.

All the measurements were repeated three times, and the results are presented as a mean value  $\pm$  standard deviation.

### 2.8. Influence of Process Parameters on Activity of Produced Systems

To determine the pH influence, obtained biocatalysts were tested in different buffer solutions according to the method discussed in Section 2.7. These buffers were phosphate buffer with pH 7 and 8, acetate buffer with pH 5 and 6, and TRIS buffer with pH 9, which were prepared before starting the tests. At each of the above pH values, a reaction was carried out for each type of immobilized material with and without choline acetate (a total of 8 samples) under 40 °C.

To test the influence of temperature on the activity of produced systems, biocatalysts were tested as previously mentioned. The prepared samples were placed in an Eppendorf ThermoMixer C incubator (Warsaw, Poland), which provided the appropriate temperature for the process (20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, and 60 °C) at pH 7.

### 2.9. Storage Stability

To carry out the stability test, an electrospun mat was cut into 1 × 1 cm pieces and lipase was immobilized with the addition of choline acetate. The immobilization was carried out for 24 h. Then, each mat was transferred to a separate vial with 5 mL of phosphate buffer at pH 7 and stored at 4 °C for 30 days. Every 3 days (including day 0, the day of receiving the immobilized systems), mat activity tests were carried out by carrying out the pNPP hydrolysis reaction (as described in Section 2.7). The activity of the native enzyme at time 0 was taken as 100% of relative activity, becoming a base for other calculations.

### 2.10. Reusability

To estimate the reusability of the biocatalytic systems, obtained catalysts were applied for the reaction described in Section 2.7, under 40 °C and PBS pH 7. After the first cycle, the mats were washed with the buffer solution at pH 7 and transferred to new vials, to which the same amounts of fresh reagents were added, and the reaction was carried out under the same conditions as before. A total of 5 consecutive cycles were carried out for each mat. The activity of each tested biocatalyst after the first cycle was assumed as 100% of relative activity, becoming a base for other cycles.

### 2.11. Enzymatic Resolution of Racemic Citalopram

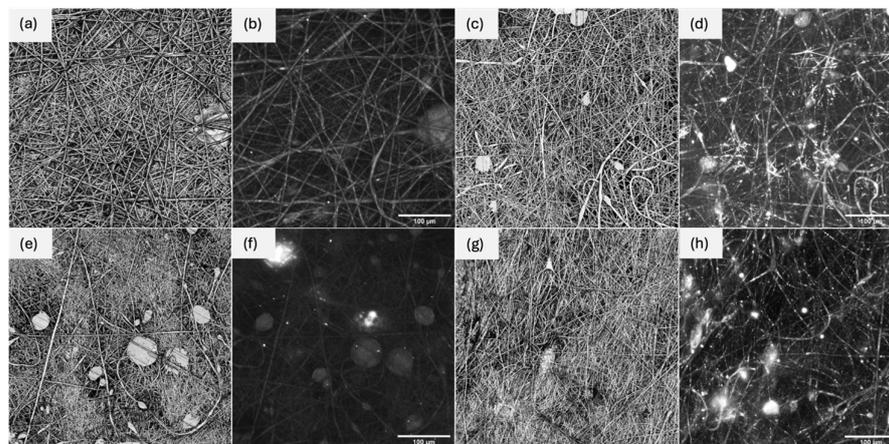
Since citalopram's highest psychotropic effect on the human body appears in the S-form, we conducted an enzymatic, greener resolution of the racemic citalopram. The reaction was carried out in a membrane reactor (Amicon 8010, Amicon, Warsaw, Poland), with the use of the produced HIGH PVC MOF-lip-CA system as a catalyst ( $r = 2.5$  cm). In the recirculated batch reactor with stirring, 5 mL of 40 mM racemic citalopram dissolved in acetonitrile and 1.66 mL of vinyl acetate as the acetyl donor were placed. The flow rate was established and sustained at 1 mL/min by a peristaltic pump. Progress of the reaction was monitored after 1, 8, 12, and 24 h by collecting the samples for HPLC analysis.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Physicochemical Characterization

The aim of using a confocal microscope was to determine the morphological structure of the electrospun mat fibers. It also allowed for the assessment of the potential incorporation of MOF particles into the fiber structure during the electrospinning process of LOW and HIGH PVC mats. In addition, the photos show the quality of the produced fibers, the presence of possible imperfections (polymer drops in the structure), and confirm the formation of a porous structure of the obtained mats that was crucial for use of the electrospun mats as carriers in immobilization. Based on the presented CLSM photos

(Figure 1), it can be concluded that high-quality fibers were created during electrospinning. They are dense, creating a network, and especially in the photos of pristine HIGH PVC material, the lack of imperfections in the form of drops is visible.

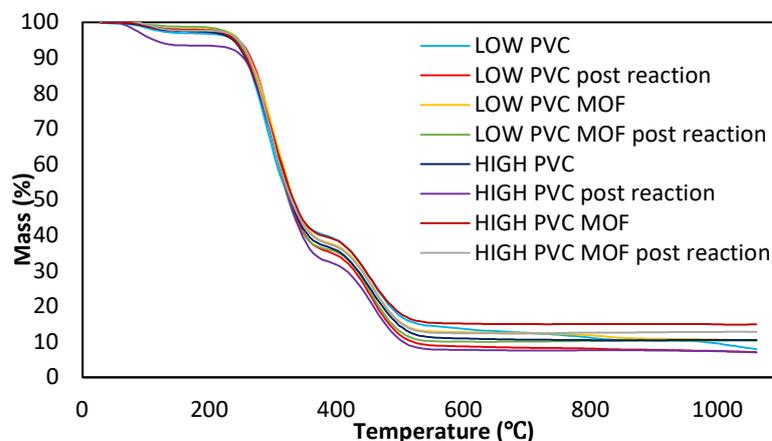


**Figure 1.** CLSM photos of the electrospun mats fabricated with low-molecular-weight PVC (LOW PVC): (a,b) pristine and (c,d) with the addition of MOF, and with high-molecular-weight PVC (HIGH PVC): (e,f) pristine and (g,h) with the addition of MOF. Photos were taken in material mode (a,c,e,g) and fluorescent mode (b,d,f,h).

Due to the fact that polymer molecular weight significantly affects electrospun fiber morphology, low-molecular-weight polymer can lead to formation of imperfections of electrospun fibers (Figure 1a), while higher molecular weight usually results in uniform, smooth fibers due to the increased chain entanglement and solution viscosity [16]. The photos of LOW PVC (Figure 1e) contain spherical areas (imperfections) that might result from non-ideal electrospinning conditions, which caused formation of clusters. The above photos also indicate the incorporation of MOF in the structure of the electrospun mats. This conclusion can also be drawn by comparing photos taken in fluorescence mode for mats spun from LOW PVC without and with MOF (Figure 1f,h) and from HIGH PVC without and with MOF (Figure 1b,d). In the case of mats containing the UiO-66-NH<sub>2</sub> MOF additive, bright shapes can be seen in fluorescence mode, which are not present in the case of mats spun without additives. In addition, photos in fluorescence mode of mats from HIGH PVC contain more bright inclusions (MOF particles) than mats from LOW PVC. This indicates more effective incorporation of MOF into the structure of a higher-molecular-weight polymer. This is probably the result of the increase in polymer adhesiveness with increasing molecular weight. What is worth mentioning is that even though the MOF is successfully incorporated in the fiber's structure, it does not change its morphology. The fibers stay uniform and well spun. This is a surprising observation, as previously it was reported by Hasheem et al. that pristine PVC fibers are smooth and continuous, while MOF-loaded fibers display embedded MOF aggregates [17]. However, they noticed that the presence of MOF aggregates is directly related to the specific MOF concentration, because at higher MOF loadings (20%), bead-like structures appear, indicating instability in the electrospinning jet and imperfections in the fiber network, due to the change of conductivity and viscosity of the polymer solution. They concluded that MOFs are evenly distributed at lower loadings but aggregate at higher concentrations.

Based on the CLSM images presented in this study, it might be assumed that the performed electrospinning process allowed formation of the desired porous structure composed of nanofibers, which provided a large surface area for enzyme immobilization. Besides the structure, also the thermal stability of the material plays a key role during enzyme immobilization and further application, as it can significantly determine the enzyme's

survivability under unfavorable conditions, ensuring protection of the protein structure. Thermogravimetric analysis (Figure 2) allowed us to determine which electrospun mat is the most durable and to check whether the incorporation of MOF into electrospun fibers is permanent and whether contact with an aqueous buffer solution will contribute to its leaching.



**Figure 2.** Effect of additive loading (MOF) on the thermal stability of electrospun PVC mats.

It can be stated that thermally, the most stable material turned out to be the electrospun mat made of HIGH PVC with the addition of UiO-66-NH<sub>2</sub> (Figure 2, maroon line). Further, the influence of MOF on the thermal stability of the material was more visible in the case of this PVC than for LOW PVC. This suggests again that the incorporation of MOF into the organic carrier was more effective for HIGH PVC, so with the increase of the molecular weight of this polymer, its adhesion capacity increased [18]. Moreover, the mat made of HIGH PVC without the addition of MOF showed a slightly smaller weight loss than in the case of the polymer with a lower molecular weight. Hence, it can be assumed that the thermal stability of the carrier is also influenced by the molecular weight of the polymer, because with its increase, the thermal resistance of the fibers increases [19]. Consequently, MOF addition increases not only the thermal stability but also the stability of the material in aqueous solutions, in agreement with previously published studies [17].

### 3.2. Immobilization Characterization

To determine how the addition and combination of the UiO-66-NH<sub>2</sub> MOF, choline chloride (CC), and choline acetate (CA) ILs, as well as the time of the process, affect the efficiency of the lipase immobilization process, its efficiency was examined (Table 1). The obtained results showed that the highest immobilization efficiency, reaching 52%, was obtained in the case of *Candida* sp. lipase immobilization on a HIGH PVC electrospun material with the addition of MOF in the structure and choline acetate as a substance supporting enzyme immobilization.

The incorporation of MOF in the structure of electrospun mats increased the enzyme adsorption due to the UiO-66-NH<sub>2</sub> features, such as large surface area and the presence of functional groups that increase the possibility of efficient enzyme attachment. Similar observations were made by Molco et al. after the fabrication of electrospun polymer fibers with in situ grown MOFs (HKUST-1 and ZIF-8) that possessed different functional groups. The MOF crystals grown toward the fiber surface created exposed active sites that significantly enhanced enzyme immobilization and catalytic performance, compared to fibers without MOFs [20]. In our study, it was observed that the addition of ionic liquids affected the immobilization efficiency, which resulted from the tendency of ionic liquids to stabilize the enzymatic structure [21]. The ionic liquid also increased the enzyme affinity to the mat,

creating a favorable microenvironment, which ultimately increased the immobilization efficiency. It can also be seen that choline acetate increased the immobilization efficiency more than the addition of choline chloride, which shows that lipase immobilization is dependent on the pH of the solution (choline chloride is more acidic than choline acetate). The pH also affected enzyme conformation and charge distribution, which in turn modulated the enzyme's affinity for the support surface [22].

**Table 1.** Immobilization efficiency influenced by time and addition of different ILs.

Immobilization Efficiency (%)			
	Without IL	Choline Chloride	Choline Acetate
<b>1 h</b>			
<b>LOW</b>	23 ± 0.9	29 ± 0.5	34 ± 1.1
<b>LOW MOF</b>	24 ± 1	26 ± 0.9	37 ± 0.8
<b>HIGH</b>	21 ± 0.8	19 ± 0.1	40 ± 0.8
<b>HIGH MOF</b>	25 ± 0.05	27 ± 0.1	38 ± 0.2
<b>24 h</b>			
<b>LOW</b>	22 ± 0.8	21 ± 1	42 ± 1.2
<b>LOW MOF</b>	28 ± 0.2	33 ± 0.9	35 ± 0.6
<b>HIGH</b>	27 ± 0.3	45 ± 0.7	48 ± 0.2
<b>HIGH MOF</b>	47 ± 0.05	45 ± 0.2	52 ± 0.1

Further, the results from Table 2 show that a longer immobilization time also had a positive effect on the activity of biocatalytic systems, because the activity of each tested system was higher in the case of 24 h immobilization than in the case of 1 h immobilization. This is due to the fact that the immobilization efficiency also increased with time and, therefore, with the increase in the number of enzyme particles immobilized on the support, its biocatalytic activity increased [23].

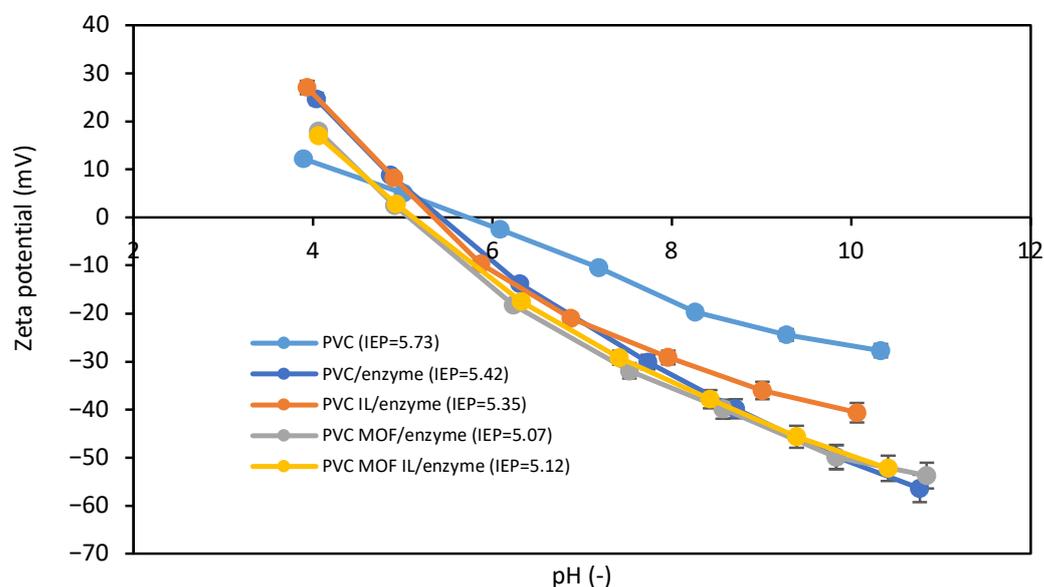
**Table 2.** Comparison of the effect of immobilization time, type of support, and type of ILs added on the catalytic activity of the produced systems.

Activity Recovery (%)			
	Without IL	Choline Chloride	Choline Acetate
<b>1 h</b>			
<b>LOW</b>	30 ± 1.1	37 ± 1	40 ± 0.9
<b>LOW MOF</b>	34 ± 0.6	38 ± 1.1	44 ± 0.8
<b>HIGH</b>	32 ± 1.1	44 ± 0.5	52 ± 1
<b>HIGH MOF</b>	59 ± 0.2	60 ± 0.9	74 ± 0.1
<b>24 h</b>			
<b>LOW</b>	37 ± 0.4	39 ± 0.8	49 ± 1
<b>LOW MOF</b>	45 ± 0.2	44 ± 0.4	57 ± 1
<b>HIGH</b>	51 ± 0.2	49 ± 0.5	58 ± 0.3
<b>HIGH MOF</b>	76 ± 0.2	77 ± 0.4	100 ± 0.1

What is worth mentioning is that the immobilization efficiency ranging from 40 to 60% is sufficient, determining a suitable environment for the immobilized enzyme, without the threat of the enzyme overloading, which could cause a significant decrease in the catalytic

performance. Data also show that the addition of choline acetate increased the activity of the systems more than the addition of choline chloride, which is not only associated with a higher immobilization efficiency in the systems to which choline acetate was added but also with a suitable pH provided by choline acetate in which lipase reached the highest relative activity. Lipase showed higher activity at alkaline pH, while choline chloride was more acidic than choline acetate, leading to lower lipase activity [24]. The highest activity was obtained using a HIGH PVC mat with the addition of MOF and after adding choline acetate in the immobilization process. Consequently, the use of the UiO-66-NH<sub>2</sub> additive during the formation of electrospun mats as well as the addition of this IL in the immobilization process had a positive effect on the enzymatic activity of the immobilized lipase.

Zeta potential was evaluated in terms of enzyme immobilization and the influence of ILs on the process (Figure 3). At a pH between 5 and 10, the electrokinetic potential of all fabricated membranes showed the same course with the zeta potential of the membranes with an immobilized enzyme with negative values.



**Figure 3.** Zeta potential over varying pH levels of the fabricated biocatalysts (based on HIGH PVC) with and without the choline acetate. The data are presented as a mean value from three experiments, and error bars represent the standard deviation.

Moreover, all systems were characterized by an isoelectric point (IEP) at a similar pH between 5 and 6. However, the zeta potential of the HIGH PVC membrane ranged from 0 to  $\pm 30$  mV, which indicates the electrokinetic instability of this system [25]. On the other hand, the systems with an immobilized enzyme were characterized by good electrokinetic stability (zeta potential below  $-30$  mV) at alkaline pH. A slight deterioration in the stability of the HIGH PVC-lip-CA system, compared to the HIGH PVC-lip system, could also be observed. This behavior can be explained, for example, by the higher accessibility of the unmodified fiber for the aqueous measurement solution. It should also be noted that the HIGH PVC-MOF-lip and HIGH PVC-MOF-lip-CA systems were characterized by very similar zeta potential values in the entire pH range studied, suggesting that both systems had similar accessibility of the aqueous measurement solution. It is also worth noting that the MOF-modified systems were characterized by electrokinetic stability in the widest pH range from 7.5 to about 10. A similar result was observed by Wang et al., who showed that the addition of MOF (UiO-66) improved the stability of ultrafiltration membranes [26]. Moreover, similarly to the presented studies, they observed a decrease in the zeta potential value and an improvement in the stability of the modified membranes with increasing

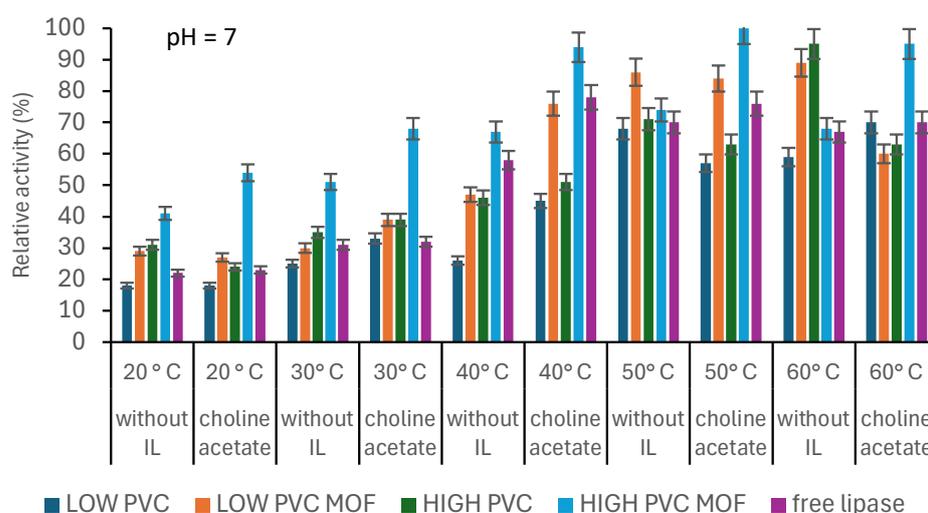
pH. The assumption that incorporation of an appropriately selected modifier to polymer membrane improves its stability was also confirmed by studies conducted by EL Hady et al., in which the membrane modified with  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$  core-shell nanoparticles was characterized by better stability (zeta potential below  $-30$  mV) than the pure PVC membrane (zeta potential between  $0$  and  $-30$  mV) [27]. Thus, based on the presented experimental and literature data, it can be stated that modification with an appropriately selected compound, for example, a metal–organic framework (MOF), affects the value of the zeta potential and improves the electrokinetic stability of the systems.

The results obtained in the above study and data on immobilization efficiency led to the rejection of further studies on the effect of choline chloride addition on the process. Both the efficiency of the immobilization and the activity of the systems increased more with the use of choline acetate. Moreover, it turned out that a longer process time (24 h) increased its efficiency, and further studies were carried out on biocatalysts obtained as a result of 24-h immobilization. The systems analyzed in subsequent studies were based on a biocatalyst with immobilized lipase with and without the addition of choline acetate (25  $\mu\text{L}$ ), for comparison.

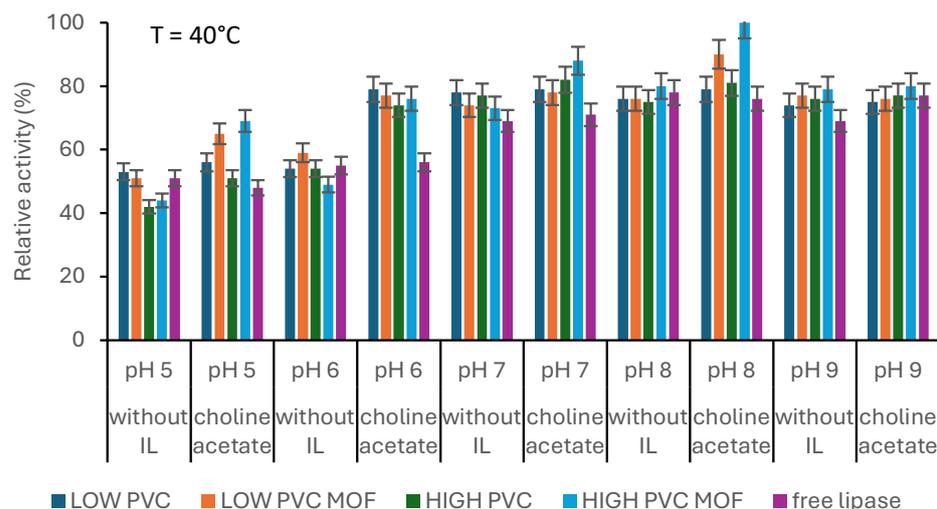
### 3.3. Biocatalysts' Evaluation

Free enzymes are often sensitive to high temperatures, at which they denature. The aim of the immobilization process was to increase their thermal stability so that they can be used in industrial processes often carried out at elevated temperatures. In the study on comparison of free and immobilized lipase, the concentration of the free enzyme was maintained equal to that of the immobilized enzyme to ensure a reliable comparison of their catalytic performance under identical conditions.

The most active biocatalyst turned out to be the system consisting of an enzyme immobilized on an electrospun PVC mat of high molecular weight with MOF added at  $50^\circ\text{C}$  (Figure 4), but generally it was observed that lipase showed higher activity at higher temperatures ( $50^\circ\text{C}$  and  $60^\circ\text{C}$ ) than at lower temperatures ( $20^\circ\text{C}$ ,  $30^\circ\text{C}$ , and  $40^\circ\text{C}$ ). Figure 5 also shows that immobilized lipase showed increased thermal tolerance, resulting in the possibility of using it in processes occurring at higher temperatures. Higher temperatures increased the movement of molecules moving in solution, which increased the affinity of the enzyme for the substrate and, therefore, the reaction was more efficient [28].



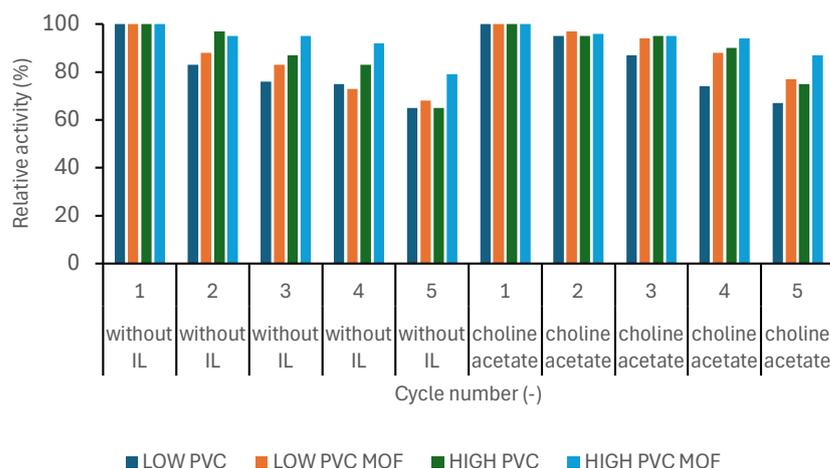
**Figure 4.** The effect of the temperature on the relative activity of produced biocatalysts and free lipase. The data are presented as a mean value from three experiments, and error bars represent the standard deviation.



**Figure 5.** The effect of the pH on the relative activity of produced biocatalysts (with and without ionic liquid (IL)) and free lipase. The data are presented as a mean value from three experiments, and error bars represent the standard deviation.

Moreover, materials containing MOF formed during immobilization with choline acetate showed higher activity than free lipase at almost all temperatures. This indicates that the hydrophobicity of IL creates a suitable microenvironment around the active site of lipase, thereby increasing its catalytic activity [29]. As stated by Waggett et al., consciously picked ionic liquids can help to maintain low water activity, which is crucial for lipase activity in, e.g., non-aqueous systems. Lipases typically require a thin layer of water for activity, but excess water can lead to hydrolysis of the desired product or enzyme denaturation [30]. The interfacial activation mechanism, where the “lid” domain of lipases undergoes conformational changes for activity, can be boosted with hydrophobic ILs, which can stabilize the open conformation of the lipase lid, exposing the active site and promoting substrate binding and increased relative activity [31,32]. As stated before, the pH of the solution had a significant impact on the activity of the biocatalytic systems (Figure 5). The most active biocatalyst was noticed at pH 8 and turned out to be the HIGH MOF system.

As described previously, immobilization enables simple separation of the biocatalyst from the post-reaction mixture and, therefore, facilitates multiple uses. The conducted study allowed us to determine not only the possibility of reuse but also whether the enzyme’s action in subsequent cycles of use was effective. These features are especially important at the time of potential use of biocatalytic systems on an industrial scale. The decrease in biocatalyst activity with each cycle of use was greater for systems without ionic liquid than for systems with choline acetate (Figure 6). This shows that adding ionic liquid during the immobilization process increased the stability of the obtained systems by strengthening the enzyme binding to the support [33]. This may also result in lower enzyme leaching during each reaction in solution. Also, the activity of LOW PVC mats was lower compared to the HIGH PVC mats in systems without ionic liquid and MOF addition, which shows that the possibility of multiple uses is also influenced by the choice of the polymer itself, due to the morphological and stability features of the produced support material [34]. The effect of the UiO-66-NH<sub>2</sub> addition on the reusability was also visible—the activity of systems with MOF addition had a smaller decrease in activity with each cycle of use. This dependency might result from higher amounts of immobilized enzyme due to the higher surface area and groups allowing a proper attachment of protein to the fiber [35]. The smallest decrease in activity and, consequently, the highest reusability was demonstrated by the biocatalyst consisting of an enzyme immobilized on HIGH PVC with the addition of MOF and choline acetate.

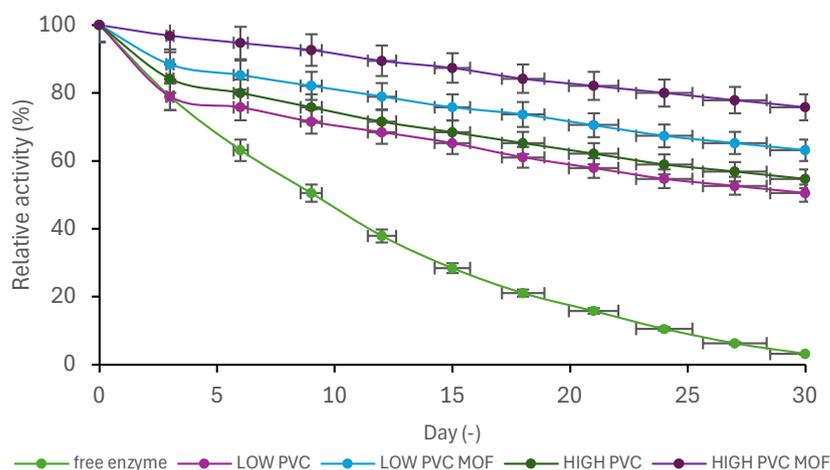


**Figure 6.** The dependence of the relative activity of the produced biocatalysts (with and without ionic liquid (IL)) during the reusability performance. The data are presented as a mean value from three experiments, and error bars represent the standard deviation.

At slightly acidic pH, the addition of choline acetate increased the activity of the immobilized enzyme more than the free enzyme. Consequently, the addition of this IL did not increase the resistance of the free enzyme to low pH, where the protective effect of the support material provided such resistance [36]. This may indicate that IL increases the stability and activity of biocatalytic systems. The addition of choline acetate increased the activity of biocatalytic systems in the entire pH range studied, which shows that the immobilization of *Candida* sp. lipase with this IL is able to expand the range of its possible applications. The type of immobilization applied in this study can be classified as IL-assisted physical adsorption (physisorption/electrostatic adsorption). The mechanism is based on non-covalent interactions between the enzyme, the ionic liquid, and the MOF/PVC hybrid surface. The ionic liquid (IL) acts as a stabilizing and activating agent, enhancing enzyme orientation and catalytic performance due to the interfacial activation phenomenon that occurs in hydrophobic conditions, while also protecting the enzyme from denaturation. Such IL-assisted physical immobilization on hybrid supports contributes to maintaining the structural integrity of the enzyme and improving its thermal and operational stability. This may further explain the high activity and durability of the biocatalytic systems observed under various pH conditions [37]. Finally, the immobilized systems were also less active at acidic pH (5) than at alkaline pH (8 and 9), which is characteristic for free lipase and confirms that no significant changes in the enzyme structures occurred during immobilization.

Storage stability tests are essential to ensure the long-term integrity of the produced biocatalytic systems. The fabricated systems were stored in a buffer solution at pH 7, which meant that the storage environment was constantly interacting with them. This interaction could cause the enzyme to wash out from the carrier material, which could have a direct impact on the activity of the obtained systems. Based on the obtained results (Figure 7), the system that lost its activity the slowest, and therefore was the most stable in the test, was the one in which the carrier was high-molecular-weight PVC with the addition of MOF. UiO-66-NH<sub>2</sub> as a metal-organic framework has a large surface area, which allowed for immobilization of a larger amount of enzyme on mats containing it. In addition to increasing the immobilization efficiency, it can also be stated that MOF hindered the enzyme from being washed out of mats stored in aqueous solutions. However, not only the addition of UiO-66-NH<sub>2</sub> had an impact on the stability of mats with immobilized enzyme, but also the molecular weight of the polymer from which they were electrospun. Biocatalysts made of HIGH PVC showed greater stability than those made of low-molecular-weight PVC,

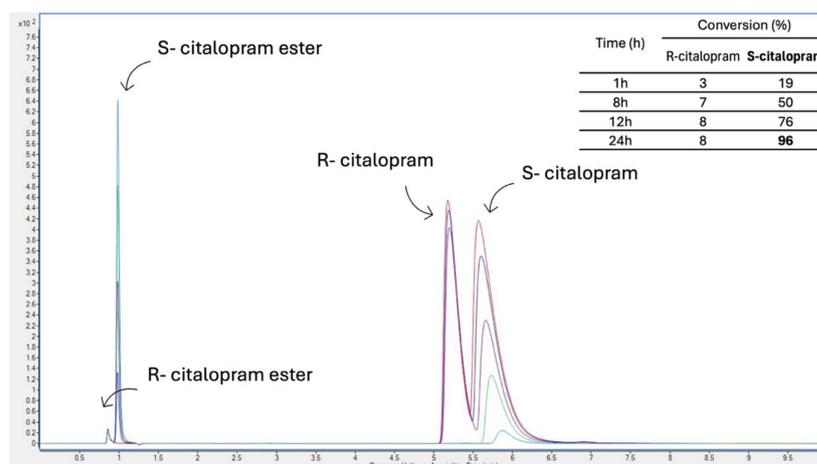
which shows that electrospun fibers made of HIGH PVC have greater strength and a greater affinity to the enzyme. It is also directly related to the morphology of the electrospun fibers, since the HIGH PVC ones were characterized with a smoother and more uniform structure, compared to LOW PVC. For this reason, the enzyme may leak out more slowly from these mats and, therefore, their catalytic activity will also decrease more slowly. The free CALB rapidly lost its catalytic activity (remaining activity ~3%) mainly due to conformational destabilization in aqueous solution. Storage in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) without any stabilizing additives, such as polyols or proteins, likely promoted gradual unfolding and aggregation. Moreover, phosphate ions can interact with charged amino acid residues on the enzyme surface, subtly altering its electrostatic balance and hydration shell, which may further contribute to conformational drift and loss of the active form. The obtained results also show the advantages of the immobilization process itself. The enzyme immobilized on the support had greater stability in each type of electrospun mat than free lipase. The immobilization process helped in saving a higher catalytic activity of the enzyme, due to the protective environment, which is not seen with the native form of the enzyme, where the molecule is directly exposed to the process environment. In another study in which lipase was encapsulated in a ZIF-8 structure, it was shown that after 25 days of incubation in phosphate buffer, it retained as much as 90% of its initial activity [38]. For comparison, in that study, free lipase and sonicated lipase retained only 68% and 66% of activity, respectively. Such high stability was attributed to the protective effect of MOF, which isolated the enzyme from the unfavorable effects of the chemical environment and minimized deformations within the active site of the enzyme. Presented results suggest that the immobilization method can significantly increase the stability of enzymes but can also affect their activity and active center availability for the possible substrate. It is worth emphasizing that after 30 days of storage stability, the system immobilized on HIGH MOF with the addition of choline acetate IL maintained 80% of activity compared to 3% of the free enzyme, demonstrating significantly increased enzyme protection.



**Figure 7.** Storage stability of the free lipase and produced biocatalytic systems. The data are presented as a mean value from three experiments, and error bars represent the standard deviation.

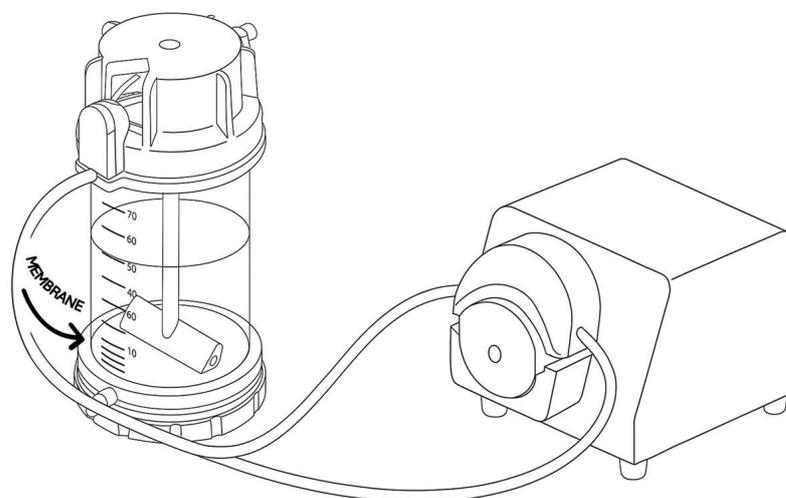
### 3.4. Enzymatic Resolution of Racemic Citalopram

After the characterization, one biocatalytic system was chosen for further application. HIGH PVC MOF-lip-CA was applied for tests in the recirculated batch membrane reactor to estimate its catalytic activity in the resolution of racemic citalopram to obtain the enantiomerically pure product S-citalopram ester (see Figure 8).



**Figure 8.** Chromatogram generated after HPLC analysis of rac-citalopram resolution and the product S-citalopram ester. Colors on the chromatogram correspond to specific samples collected after certain times (from the top): red—0 h, navy blue—1 h, purple—8 h, green—12 h, and light blue—24 h.

Enzymatic resolution of racemic citalopram in a membrane reactor yielded the desired product, citalopram S-ester (see scheme of the reactor on Figure 9). As can be seen in the chromatogram (Figure 8, right-hand peak), the concentration of S-citalopram decreased, while the concentration of S-ester increased, indicating successful conversion of the substrate to the product. An even more important observation was the slight loss of R-citalopram and minimal amount of R-ester in the final sample, demonstrating the high enantioselectivity and stereoselectivity of the biocatalytic system applied in the membrane reactor. Here, 1 h after starting the reaction, conversion of S-citalopram reached 19%, followed by 50% after 8 h and 76% after 12 h. In addition, enzyme stability in the recirculated batch membrane reactor was evaluated. The immobilized lipase maintained high catalytic performance throughout the process, exhibiting only about 8% loss of its initial activity after the reaction was completed. This result confirms that the enzyme remained stable under reaction conditions, which often impose mechanical and diffusional stresses that can lead to deactivation. The observed stability indicates strong enzyme–support interactions and an effective immobilization strategy that preserves enzyme conformation and activity over prolonged operation. Such robustness is a crucial factor for potential industrial applications, as it ensures reproducibility, cost efficiency, and long-term operational stability of the biocatalytic system.



**Figure 9.** Scheme of the membrane bioreactor for the asymmetric resolution of racemic citalopram.

As a result, an enantiomeric excess of S-ester over R-ester of >93% was obtained, with 95% conversion of S-citalopram after 24 h of reaction. Over the tested conversion time, the conversion of R-citalopram did not exceed 8%, proving the validity of the biocatalytic system used and the appropriate selection of the enzyme strain for the reaction. The obtained results show a promising application possibility and a great upscaling potential. Similar observations were made by Wang et al., where racemic ( $\pm$ )-1-phenylethanol, a citalopram intermediate, was resolved using *Candida antarctica* lipase B immobilized on silanized silica in an organic solvent with vinyl acetate. The process achieved around 50% conversion, >99% enantiomeric excess of (R)-1-phenylethanol, with high enantioselectivity ( $E > 200$ ) [39].

#### 4. Conclusions

This study successfully developed a highly efficient and stable biocatalytic system by integrating electrospun high-molecular-weight PVC mats with UiO-66-NH<sub>2</sub> and choline acetate IL. The MOF incorporation significantly enhanced the surface area and functional group density of the support, enabling high enzyme loading and minimized leaching, while the IL created a stabilizing microenvironment that broadened the lipase's operational range across pH and temperature. Optimal immobilization (24 h) yielded an exceptional 52% efficiency and 100% activity recovery, with the biocatalyst demonstrating peak performance under alkaline conditions (pH = 8–9) and elevated temperatures (50–60 °C). Notably, the system exhibited superior storage stability and reusability, critical for industrial applications. A key achievement was the system's application in a membrane reactor for the enantioselective resolution of racemic citalopram, achieving 93% enantiomeric excess at 95% conversion of S-citalopram, a milestone for sustainable pharmaceutical synthesis. The polymer's molecular weight was identified as a critical factor, with higher weights improving the fiber durability and immobilization efficiency. By combining the MOF-enhanced carrier design, IL-mediated enzyme stabilization, and membrane reactor technology, this work advances green biocatalysis, offering a scalable, eco-friendly alternative to traditional chemical processes in drug manufacturing.

**Author Contributions:** Conceptualization, O.D. and J.Z.; methodology, O.D., W.B. and Q.F.; validation, O.D.; formal analysis, O.D. and Q.F.; investigation, O.D., N.Z. and W.B.; resources, O.D.; data curation, O.D., N.Z. and W.B.; writing—original draft preparation, O.D. and N.Z.; writing—review and editing, Q.F., J.Z. and T.J.; supervision, J.Z., Q.F. and T.J.; funding acquisition, O.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the National Science Center, Poland, under research grant No. 2024/54/E/ST8/00089 as well as under research grant No. 2023/49/N/ST8/03038.

**Data Availability Statement:** The data that supports the findings of this study is available from the corresponding authors upon request.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

#### Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

API	Active pharmaceutical ingredient
CA	Choline acetate
CC	Choline chloride
DCM	Dichloromethane
DMF	N,N-dimethylformamide
IL	Ionic liquid
MOF	Metal–organic framework

pNPP Paranitrophenyl palmitate  
PVC Poly(vinyl chloride)

## References

1. Nadar, S.S.; Vaidya, L.; Rathod, V.K. Enzyme Embedded Metal Organic Framework (Enzyme–MOF): De Novo Approaches for Immobilization. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *149*, 861–876. [[CrossRef](#)]
2. Hu, Y.; Dai, L.; Liu, D.; Du, W.; Wang, Y. Progress & Prospect of Metal-Organic Frameworks (MOFs) for Enzyme Immobilization (Enzyme/MOFs). *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2018**, *91*, 793–801. [[CrossRef](#)]
3. Rogacka, J.; Labus, K. Metal–Organic Frameworks as Highly Effective Platforms for Enzyme Immobilization—Current Developments and Future Perspectives. *Braz. J. Chem. Eng.* **2024**, *42*, 1273–1301. [[CrossRef](#)]
4. Mehta, J.; Bhardwaj, N.; Bhardwaj, S.K.; Kim, K.-H.; Deep, A. Recent Advances in Enzyme Immobilization Techniques: Metal-Organic Frameworks as Novel Substrates. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *322*, 30–40. [[CrossRef](#)]
5. Patil, P.D.; Kelkar, R.K.; Patil, N.P.; Pise, P.V.; Patil, S.P.; Patil, A.S.; Kulkarni, N.S.; Tiwari, M.S.; Phirke, A.N.; Nadar, S.S. Magnetic Nanoflowers: A Hybrid Platform for Enzyme Immobilization. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2024**, *44*, 795–816. [[CrossRef](#)]
6. Li, S.; Han, W.; An, Q.-F.; Yong, K.-T.; Yin, M.-J. Defect Engineering of MOF-Based Membrane for Gas Separation. *Adv. Funct. Mater.* **2023**, *33*, 2303447. [[CrossRef](#)]
7. Wang, X.; Lan, P.C.; Ma, S. Metal–Organic Frameworks for Enzyme Immobilization: Beyond Host Matrix Materials. *ACS Cent. Sci.* **2020**, *6*, 1497–1506. [[CrossRef](#)]
8. Moniruzzaman, M.; Nakashima, K.; Kamiya, N.; Goto, M. Recent Advances of Enzymatic Reactions in Ionic Liquids. *Biochem. Eng. J.* **2010**, *48*, 295–314. [[CrossRef](#)]
9. Wolny, A.; Siewniak, A.; Zdarta, J.; Ciesielczyk, F.; Latos, P.; Jurczyk, S.; Nghiem, L.D.; Jesionowski, T.; Chrobok, A. Supported Ionic Liquid Phase Facilitated Catalysis with Lipase from *Aspergillus oryzae* for Enhance Enantiomeric Resolution of Racemic Ibuprofen. *Environ. Technol. Innov.* **2022**, *28*, 102936. [[CrossRef](#)]
10. Ji, L.; Chen, M.; Zhang, W.; Nian, B.; Hu, Y. Comprehensive Applications of Ionic Liquids in Enzyme Immobilization: Current Status and Prospects. *Mol. Catal.* **2024**, *552*, 113675. [[CrossRef](#)]
11. Naushad, M.; ALOthman, Z.A.; Khan, A.B.; Ali, M. Effect of Ionic Liquid on Activity, Stability, and Structure of Enzymes: A Review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *51*, 555–560. [[CrossRef](#)]
12. Zhang, P.; Chen, J.; Sun, B.; Sun, C.; Xu, W.; Tang, K. Enhancement of the Catalytic Efficiency of *Candida Antarctica* Lipase A in Enantioselective Hydrolysis through Immobilization onto a Hydrophobic MOF Support. *Biochem. Eng. J.* **2021**, *173*, 108066. [[CrossRef](#)]
13. Xin, J.; Zhao, Y.; Zhao, G.; Zheng, Y.; Ma, X.; Xia, C.; Li, S. Enzymatic Resolution of (*R*, *S*)-Naproxen in Water-Saturated Ionic Liquid. *Biocatal. Biotransform.* **2005**, *23*, 353–361. [[CrossRef](#)]
14. Swain, S.P.; Khanra, M. Lipase Enzymes for Sustainable Synthesis of Chiral Active Pharmaceutical Ingredients (API) and Key Starting Materials. *ChemRxiv* **2024**. [[CrossRef](#)]
15. Sikora, A.; Siódmiak, T.; Marszał, M.P. Kinetic Resolution of Profens by Enantioselective Esterification Catalyzed by *Candida Antarctica* and *Candida Rugosa* Lipases. *Chirality* **2014**, *26*, 663–669. [[CrossRef](#)]
16. Xiao, Y.; Wu, Y.; Sun, C.; Sun, F.; Zhou, E.; Lei, C.; Zhang, D. UiO-66-NH<sub>2</sub> Incorporated Nanofibrous Membranes by Direct Electrospinning/in-Situ Growth for Toluene Adsorption. *J. Environ. Chem. Eng.* **2025**, *13*, 115198. [[CrossRef](#)]
17. Hashem, M.H.; Wehbe, M.; Damacet, P.; El Habbal, R.K.; Ghaddar, N.; Ghali, K.; Ahmad, M.N.; Karam, P.; Hmadeh, M. Electrospun Metal–Organic Framework-Fabric Nanocomposites as Efficient Bactericides. *Langmuir* **2023**, *39*, 9503–9513. [[CrossRef](#)]
18. Zhou, M.; Zou, W.; Zhu, X.; Ma, H.; Wang, P.; Shang, J.; Luo, P. In Situ Growth of UiO-66-NH<sub>2</sub> on Thermally Stabilized Electrospun Polyacrylonitrile Nanofibers for Visible-Light Driven Cr (VI) Photocatalytic Reduction. *J. Solid State Chem.* **2022**, *307*, 122836. [[CrossRef](#)]
19. Peterson, G.W.; Lu, A.X.; Epps, T.H. Tuning the Morphology and Activity of Electrospun Polystyrene/UiO-66-NH<sub>2</sub> Metal-Organic Framework Composites to Enhance Chemical Warfare Agent Removal. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 32248–32254. [[CrossRef](#)]
20. Molco, M.; Laye, F.; Samperio, E.; Ziv Sharabani, S.; Fourman, V.; Sherman, D.; Tsotsalas, M.; Wöll, C.; Lahann, J.; Sitt, A. Performance Fabrics Obtained by In Situ Growth of Metal–Organic Frameworks in Electrospun Fibers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 12491–12500. [[CrossRef](#)]
21. Badgujar, K.C.; Badgujar, V.C.; Bhanage, B.M. Recent Update on Use of Ionic Liquids for Enzyme Immobilization, Activation, and Catalysis: A Partnership for Sustainability. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2022**, *36*, 100621. [[CrossRef](#)]
22. Elgharrawy, A.A.; Riyadi, F.A.; Alam, M.Z.; Moniruzzaman, M. Ionic Liquids as a Potential Solvent for Lipase-Catalysed Reactions: A Review. *J. Mol. Liq.* **2018**, *251*, 150–166. [[CrossRef](#)]

23. Degórska, O.; Szada, D.; Fu, Q.; Nghiem, L.D.; Biadasz, A.; Jesionowski, T.; Zdarta, J. Ionic Liquid Supported Hydrogel–Lipase Biocatalytic Systems in Asymmetric Synthesis of Enantiomerically Pure S-Ibuprofen. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *281*, 136221. [[CrossRef](#)]
24. de Castro Bizerra, V.; Leandro Fernandes Melo, R.; Simão Neto, F.; Carlos de Castro, E.; Bessa Sales, M.; Gonçalves de Sousa Junior, P.; Nascimento Dari, D.; Izaias da Silva Aires, F.; Moreira dos Santos, K.; de França Serpa, J.; et al. Exploring the Synergy of Ionic Liquids and Lipase in Sustainable Enzymatic Engineering. *J. Mol. Liq.* **2024**, *399*, 124373. [[CrossRef](#)]
25. Huang, B.; Wang, C.; Zhang, W.; Fu, C.; Liu, H.; Wang, H. Study on the Stability of Produced Water from Alkali/Surfactant/Polymer Flooding under the Synergetic Effect of Quartz Sand Particles and Oil Displacement Agents. *Processes* **2020**, *8*, 315. [[CrossRef](#)]
26. Wang, Y.; Li, D.; Li, J.; Li, J.; Fan, M.; Han, M.; Liu, Z.; Li, Z.; Kong, F. Metal Organic Framework UiO-66 Incorporated Ultrafiltration Membranes for Simultaneous Natural Organic Matter and Heavy Metal Ions Removal. *Environ. Res.* **2022**, *208*, 112651. [[CrossRef](#)]
27. EL Hady, R.H.M.; Gheith; Khalil, M.M.H.; Mubarak, M.F. Development and Characterization of PVC-Based Membranes Embedded with Magnetic Silica Core-Shell Composites for Enhanced Oil-Water Separation. *Desalin. Water Treat.* **2025**, *322*, 101127. [[CrossRef](#)]
28. Rodrigues Sousa, R.; Sant’Ana Silva, A.; Fernandez-Lafuente, R.; Santana Ferreira-Leitão, V. Solvent-Free Esterifications Mediated by Immobilized Lipases: A Review from Thermodynamic and Kinetic Perspectives. *Catal. Sci. Technol.* **2021**, *11*, 5696–5711. [[CrossRef](#)]
29. Liu, C.; Shi, J. Understanding Lipase-Deep Eutectic Solvent Interactions Towards Biocatalytic Esterification. *Catalysts* **2025**, *15*, 358. [[CrossRef](#)]
30. Palomo, J.M.; Ortiz, C.; Fernández-Lorente, G.; Fuentes, M.; Guisán, J.M.; Fernández-Lafuente, R. Lipase–Lipase Interactions as a New Tool to Immobilize and Modulate the Lipase Properties. *Enzym. Microb. Technol.* **2005**, *36*, 447–454. [[CrossRef](#)]
31. Waggett, A.; Pfaendtner, J. Hydrophobic Residues Promote Interfacial Activation of Candida Rugosa Lipase: A Study of Rotational Dynamics. *Langmuir* **2024**, *40*, 18262–18271. [[CrossRef](#)]
32. Abellanas-Perez, P.; Carballares, D.; Rocha-Martin, J.; Fernandez-Lafuente, R. The Effects of the Chemical Modification on Immobilized Lipase Features Are Affected by the Enzyme Crowding in the Support. *Biotechnol. Prog.* **2024**, *40*, e3394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kumar, A.; Dhar, K.; Kanwar, S.S.; Arora, P.K. Lipase Catalysis in Organic Solvents: Advantages and Applications. *Biol. Proced. Online* **2016**, *18*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wang, Q.; Ge, M.; Guo, X.; Li, Z.; Huang, A.; Yang, F.; Guo, R. Hydrophobic Poly(Ionic Liquid)s as “Two-Handed Weapons”: Maximizing Lipase Catalytic Efficiency in Transesterification of Soybean Oil toward Biodiesel. *Appl. Catal. A Gen.* **2021**, *626*, 118350. [[CrossRef](#)]
35. Kaar, J.L.; Jesionowski, A.M.; Berberich, J.A.; Moulton, R.; Russell, A.J. Impact of Ionic Liquid Physical Properties on Lipase Activity and Stability. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4125–4131. [[CrossRef](#)]
36. Zhou, Y.; Liu, Y.; Zhang, M.; Feng, Z.; Yu, D.-G.; Wang, K. Electrospun Nanofiber Membranes for Air Filtration: A Review. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 1077. [[CrossRef](#)]
37. Badoei-dalfard, A.; Shahba, A.; Zaare, F.; Sargazi, G.; Seyedalipour, B.; Karami, Z. Lipase Immobilization on a Novel Class of Zr-MOF/Electrospun Nanofibrous Polymers: Biochemical Characterization and Efficient Biodiesel Production. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *192*, 1292–1303. [[CrossRef](#)]
38. Nadar, S.S.; Rathod, V.K. Encapsulation of Lipase within Metal-Organic Framework (MOF) with Enhanced Activity Intensified under Ultrasound. *Enzym. Microb. Technol.* **2018**, *108*, 11–20. [[CrossRef](#)]
39. Wang, S.-Z.; Wu, J.-P.; Xu, G.; Yang, L.-R. Lipase-Catalyzed Remote Kinetic Resolution of Citalopram Intermediate by Asymmetric Alcoholysis and Thermodynamic Analysis. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2012**, *35*, 1043–1048. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## 11. Zgody współautorów

W Tabeli 14 przedstawiono wkład merytoryczny współautorów. Deklaracje o indywidualnym wkładzie merytorycznym współautorów publikacji składających się na rozprawę doktorską zostały umieszczone poniżej.

Tabela 14. Procentowy wkład autorski współautorów publikacji.

Autor	P1	P2	P3	P4	P5
Oliwia Degórska	x	x	x	x	x
Jakub Zdarta	x	x	x	x	x
Teofil Jesionowski	x	x	x	x	x
Weronika Badzińska					x
Natalia Zasada				x	x
Qiang Fu			x		x
Long Duc Nghiem			x		
Andrzej Biadasz			x		
Daria Szada	x	x	x		
Wojciech Smulek	x				
Agata Zdarta	x				

[P1] Degórska O\*, Szada D, Zdarta A, Smulek W, Jesionowski T, Zdarta J\*. Immobilized lipase in resolution of ketoprofen enantiomers: examination of biocatalysts properties and process characterization (2023), *Pharmaceutics*, 14 (7), 1443.

[P2] Degórska O\*, Szada D, Jesionowski T, Zdarta J\*. A biocatalytic approach for resolution of 3-hydroxy-3-phenylpropanonitrile with the use of immobilized enzymes stabilized with ionic liquids (2023), *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 1593-1597.

[P3] Degórska O\*, Szada D, Fu Q, Nghiem LD, Biadasz A, Jesionowski T, Zdarta J\*. Ionic liquid supported hydrogel–lipase biocatalytic systems in asymmetric synthesis of enantiomerically pure S-ibuprofen (2024), *International Journal of Biological Macromolecules*, 281, 136221.

[P4] Degórska O\*, Zasada N, Jesionowski T, Zdarta J\*. Immobilized lipase in the resolution of racemic atenolol – a possible key to sustainable pharmaceuticals synthesis (2025), *International Journal of Biological Macromolecules*, 318, 3.

[P5] Degórska O\*, Zasada N, Badzińska W, Fu Q, Jesionowski T, Zdarta J\*, Targeted biocatalyst design for asymmetric citalopram conversion in a membrane reactor (2025), *Pharmaceutics*, 17, 1497.



## Deklaracja

o indywidualnym wkładzie merytorycznym współautora

***mgr inż. Oliwia Degórska***

Jako pierwsza i wiodąca współautorka wymienionych publikacji:

**[P1] Degórska O\***, Szada D, Zdarta A, Smulek W, Jesionowski T, Zdarta J\*. Immobilized lipase in resolution of ketoprofen enantiomers: examination of biocatalysts properties and process characterization (2023), *Pharmaceutics*, 14 (7), 1443.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- konceptualizację badań oraz metodologii
- przeprowadzanie eksperymentów związanych z wytworzeniem układów biokatalitycznych oraz analiza ich morfologii, aktywności i stabilności
- przeprowadzenie reakcji otrzymania pożądanego produktu przy użyciu wytworzonych układów biokatalitycznych oraz optymalizacja procesu reakcji
- opracowanie wyników badań oraz ich interpretację
- edycję i przygotowanie wstępnej oraz ostatecznej wersji manuskryptu

**[P2] Degórska O\***, Szada D, Jesionowski T, Zdarta J\*. A biocatalytic approach for resolution of 3-hydroxy-3-phenylpropanonitrile with the use of immobilized enzymes stabilized with ionic liquids (2023), *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 1593-1597.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- konceptualizację badań oraz metodologii
- przeprowadzanie eksperymentów związanych z wytworzeniem układów biokatalitycznych oraz analiza ich morfologii, aktywności i stabilności
- przeprowadzenie reakcji otrzymania pożądanego produktu przy użyciu wytworzonych układów biokatalitycznych oraz optymalizacja procesu reakcji
- opracowanie wyników badań oraz ich interpretację
- edycję i przygotowanie wstępnej oraz ostatecznej wersji manuskryptu

**[P3] Degórska O\***, Szada D, Fu Q, Nghiem LD, Biadasz A, Jesionowski T, Zdarta J\*. Ionic liquid supported hydrogel–lipase biocatalytic systems in asymmetric synthesis of

enantiomerically pure S-ibuprofen (2024), International Journal of Biological Macromolecules, 281, 136221.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- konceptualizację badań oraz metodologii
- przeprowadzanie eksperymentów związanych z wytworzeniem układów biokatalitycznych oraz analiza ich morfologii, aktywności i stabilności
- przeprowadzenie reakcji otrzymania pożądanego produktu przy użyciu wytworzonych układów biokatalitycznych oraz optymalizacja procesu reakcji
- opracowanie wyników badań oraz ich interpretację
- edycję i przygotowanie wstępnej oraz ostatecznej wersji manuskryptu
- zapewnienie środków finansowych

**[P4] Degórska O\***, Zasada N, Jesionowski T, Zdarta J\*. Immobilized lipase in the resolution of racemic atenolol – a possible key to sustainable pharmaceuticals synthesis (2025), International Journal of Biological Macromolecules, 318, 3.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- konceptualizację badań oraz metodologii
- przeprowadzanie eksperymentów związanych z wytworzeniem układów biokatalitycznych oraz analiza ich morfologii, aktywności i stabilności
- przeprowadzenie reakcji otrzymania pożądanego produktu przy użyciu wytworzonych układów biokatalitycznych oraz optymalizacja procesu reakcji
- opracowanie wyników badań oraz ich interpretację
- edycję i przygotowanie wstępnej oraz ostatecznej wersji manuskryptu
- zapewnienie środków finansowych

**[P5] Degórska O\***, Zasada N, Badzińska W, Fu Q, Jesionowski T, Zdarta J\*, Targeted biocatalyst design for asymmetric citalopram conversion in a membrane reactor (2025), Pharmaceutics, 17, 1497.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- konceptualizację badań oraz metodologii

- przeprowadzanie eksperymentów związanych z wytworzeniem układów biokatalitycznych oraz analiza ich morfologii, aktywności i stabilności
- przeprowadzenie reakcji otrzymania pożądanego produktu przy użyciu wytworzonych układów biokatalitycznych oraz optymalizacja procesu reakcji
- opracowanie wyników badań oraz ich interpretację
- edycję i przygotowanie wstępnej oraz ostatecznej wersji manuskryptu
- zapewnienie środków finansowych

## Deklaracja

o indywidualnym wkładzie merytorycznym współautora

***dr hab. inż. Jakub Zdarta, prof. PP***

Jako współautor wymienionych publikacji:

**[P1] Degórska O\***, Szada D, Zdarta A, Smulek W, Jesionowski T, Zdarta J\*. Immobilized lipase in resolution of ketoprofen enantiomers: examination of biocatalysts properties and process characterization (2023), *Pharmaceutics*, 14 (7), 1443.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- konceptualizację badań
- edycję i przygotowanie ostatecznej wersji publikacji
- nadzór nad przebiegiem badań
- zapewnienie środków finansowych

**[P2] Degórska O\***, Szada D, Jesionowski T, Zdarta J\*. A biocatalytic approach for resolution of 3-hydroxy-3-phenylpropanonitrile with the use of immobilized enzymes stabilized with ionic liquids (2023), *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 1593-1597.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- konceptualizację badań
- nadzór nad przebiegiem badań
- edycję i przygotowanie ostatecznej wersji publikacji

**[P3] Degórska O\***, Szada D, Fu Q, Nghiem LD, Biadasz A, Jesionowski T, Zdarta J\*. Ionic liquid supported hydrogel–lipase biocatalytic systems in asymmetric synthesis of enantiomerically pure S-ibuprofen (2024), *International Journal of Biological Macromolecules*, 281, 136221.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- konceptualizację badań
- nadzór nad przebiegiem badań

- edycję i przygotowanie ostatecznej wersji publikacji
- wprowadzanie zmian sugerowanych przez recenzentów pracy

**[P4] Degórska O\***, Zasada N, Jesionowski T, Zdarta J\*. Immobilized lipase in the resolution of racemic atenolol – a possible key to sustainable pharmaceuticals synthesis (2025), International Journal of Biological Macromolecules, 318, 3.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- konceptualizację badań
- pomoc w interpretacji wyników
- edycję i przygotowanie ostatecznej wersji publikacji

**[P5] Degórska O\***, Zasada N, Badzińska W, Fu Q, Jesionowski T, Zdarta J\*, Targeted biocatalyst design for asymmetric citalopram conversion in a membrane reactor (2025), Pharmaceutics, 17, 1497.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- konceptualizację badań
- pomoc w interpretacji wyników
- edycję i przygotowanie ostatecznej wersji publikacji

Signed by /  
Podpisano przez:



Jakub Łukasz Zdarta

Date / Data: 2025-  
12-08 09:26

## Deklaracja

o indywidualnym wkładzie merytorycznym współautora

***prof. dr hab. inż. Teofil Jesionowski***

Jako współautor wymienionych publikacji:

**[P1] Degórska O\***, Szada D, Zdarta A, Smulek W, Jesionowski T, Zdarta J\*. Immobilized lipase in resolution of ketoprofen enantiomers: examination of biocatalysts properties and process characterization (2023), *Pharmaceutics*, 14 (7), 1443.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- nadzór nad przebiegiem badań
- edycję i przygotowanie ostatecznej wersji publikacji
- zapewnienie środków finansowych

**[P2] Degórska O\***, Szada D, Jesionowski T, Zdarta J\*. A biocatalytic approach for resolution of 3-hydroxy-3-phenylpropanonitrile with the use of immobilized enzymes stabilized with ionic liquids (2023), *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 1593-1597.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- nadzór nad przebiegiem badań
- edycję i przygotowanie ostatecznej wersji publikacji
- zapewnienie środków finansowych

**[P3] Degórska O\***, Szada D, Fu Q, Nghiem LD, Biadasz A, Jesionowski T, Zdarta J\*. Ionic liquid supported hydrogel–lipase biocatalytic systems in asymmetric synthesis of enantiomerically pure S-ibuprofen (2024), *International Journal of Biological Macromolecules*, 281, 136221.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- nadzór nad przebiegiem badań
- edycję i przygotowanie ostatecznej wersji publikacji

**[P4] Degórska O\***, Zasada N, Jesionowski T, Zdarta J\*. Immobilized lipase in the resolution of racemic atenolol – a possible key to sustainable pharmaceuticals synthesis (2025), International Journal of Biological Macromolecules, 318, 3.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- nadzór nad przebiegiem badań
- edycję i przygotowanie ostatecznej wersji publikacji

**[P5] Degórska O\***, Zasada N, Badzińska W, Fu Q, Jesionowski T, Zdarta J\*, Targeted biocatalyst design for asymmetric citalopram conversion in a membrane reactor (2025), Pharmaceutics, 17, 1497.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- nadzór nad przebiegiem badań
- edycję i przygotowanie ostatecznej wersji publikacji



Signed by / Podpisano przez:

Teofil Jesionowski  
Politechnika  
Poznańska

Date / Data: 2025-12-04 22:31

UTS Public

05 December 2025

## Declaration

of the co-author's individual contribution

### **Assoc. Prof., Qiang Fu**

As co-author of the mentioned publications below:

[P3] Degórska O\*, Szada D, Fu Q, Nghiem LD, Biadasz A, Jesionowski T, Zdarta J\*. Ionic liquid supported hydrogel–lipase biocatalytic systems in asymmetric synthesis of enantiomerically pure S-ibuprofen (2024), *International Journal of Biological Macromolecules*, 281, 136221.

I declare that my contribution to the work included:

- conceptualization of the methodology
- writing and reviewing of the original draft
- funding acquisition

[P5] Degórska O\*, Zasada N, Badzińska W, Fu Q, Jesionowski T, Zdarta J\*, Targeted biocatalyst design for asymmetric citalopram conversion in a membrane reactor (2025), *Pharmaceutics*, 17, 1497.

I declare that my contribution to the work included:

- conceptualization of the methodology
- writing the original draft



### **Qiang Fu | PhD**

Associate Professor, ARC Future Fellow, MRACI CChem  
School of Civil and Environmental Engineering, University of Technology Sydney  
Building 11, 15 Broadway, Ultimo NSW 2007, Australia  
E: Qiang.Fu@uts.edu.au; T: +61 2 95142635  
Web: <https://profiles.uts.edu.au/Qiang.Fu>

## Deklaracja

o indywidualnym wkładzie merytorycznym współautora

*dr hab. inż. Wojciech Smulek*

Jako współautor wymienionej publikacji:

**[P1] Degórska O\***, Szada D, Zdarta A, Smulek W, Jesionowski T, Zdarta J\*. Immobilized lipase in resolution of ketoprofen enantiomers: examination of biocatalysts properties and process characterization (2023), *Pharmaceutics*, 14 (7), 1443.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- edycję i przygotowanie ostatecznej wersji publikacji
- pomoc w interpretacji wyników badań

Deklaracja  
o indywidualnym wkładzie merytorycznym współautora  
***dr inż. Agata Zdarta***

Jako współautorka wymienionej publikacji:

**[P1] Degórska O\***, Szada D, Zdarta A, Smulek W, Jesionowski T, Zdarta J\*. Immobilized lipase in resolution of ketoprofen enantiomers: examination of biocatalysts properties and process characterization (2023), *Pharmaceutics*, 14 (7), 1443.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- edycję i przygotowanie ostatecznej wersji publikacji
- pomoc w interpretacji wyników badań



Signed by /  
Podpisano przez:

Agata Joanna  
Zdarta

Date / Data: 2025-  
12-05 10:38

Deklaracja  
o indywidualnym wkładzie merytorycznym współautora  
*dr inż. Andrzej Biadasz*

Jako współautor wymienionej publikacji:

[P3] **Degórska O\***, Szada D, Fu Q, Nghiem LD, Biadasz A, Jesionowski T, Zdarta J\*. Ionic liquid supported hydrogel–lipase biocatalytic systems in asymmetric synthesis of enantiomerically pure S-ibuprofen (2024), International Journal of Biological Macromolecules, 281, 136221.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- przeprowadzanie analizy
- opracowanie wyników

*A. Biadasz*



## Deklaracja

o indywidualnym wkładzie merytorycznym współautora

***mgr inż. Daria Szada***

Jako współautorka wymienionych publikacji:

**[P1] Degórska O\***, Szada D, Zdarta A, Smulek W, Jesionowski T, Zdarta J\*. Immobilized lipase in resolution of ketoprofen enantiomers: examination of biocatalysts properties and process characterization (2023), *Pharmaceutics*, 14 (7), 1443.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- walidacja i interpretacja wyników
- edycję i przygotowanie ostatecznej wersji publikacji

**[P2] Degórska O\***, Szada D, Jesionowski T, Zdarta J\*. A biocatalytic approach for resolution of 3-hydroxy-3-phenylpropanonitrile with the use of immobilized enzymes stabilized with ionic liquids (2023), *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 1593-1597.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- konceptualizację badań
- opracowanie wyników
- edycję i przygotowanie ostatecznej wersji publikacji

**[P3] Degórska O\***, Szada D, Fu Q, Nghiem LD, Biadasz A, Jesionowski T, Zdarta J\*. Ionic liquid supported hydrogel–lipase biocatalytic systems in asymmetric synthesis of enantiomerically pure S-ibuprofen (2024), *International Journal of Biological Macromolecules*, 281, 136221.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- edycję i przygotowanie ostatecznej wersji publikacji
- walidacja i interpretacja wyników

Declaration  
of the co-author's individual contribution  
***Prof. Long D. Nghiem***

As co-author of the above-mentioned publication:

[P3] **Degórska O\***, Szada D, Fu Q, Nghiem LD, Biadasz A, Jesionowski T, Zdarta J\*. Ionic liquid supported hydrogel–lipase biocatalytic systems in asymmetric synthesis of enantiomerically pure S-ibuprofen (2024), International Journal of Biological Macromolecules, 281, 136221.

I declare that my contribution to the work included:

- writing and reviewing of the original draft



5 Dec 2025  
Prof Long D. Nghiem  
Director of the Centre for Technology in Water and Wastewater  
University of Technology Sydney

Deklaracja  
o indywidualnym wkładzie merytorycznym współautora  
*mgr inż. Natalia Zasada*

Jako współautorka wymienionych publikacji:

**[P4] Degórska O\***, Zasada N, Jesionowski T, Zdarta J\*. Immobilized lipase in the resolution of racemic atenolol – a possible key to sustainable pharmaceuticals synthesis (2025), International Journal of Biological Macromolecules, 318, 3.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- edycję i przygotowanie ostatecznej wersji publikacji
- przeprowadzanie analizy
- opracowanie i interpretacja wyników

**[P5] Degórska O\***, Zasada N, Badzińska W, Fu Q, Jesionowski T, Zdarta J\*, Targeted biocatalyst design for asymmetric citalopram conversion in a membrane reactor (2025), Pharmaceutics, 17, 1497.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- edycję i przygotowanie ostatecznej wersji publikacji
- przeprowadzanie analizy
- opracowanie i interpretacja wyników

*Natalia Zasada*

Deklaracja  
o indywidualnym wkładzie merytorycznym współautora  
***mgr inż. Weronika Badzińska***

Jako współautorka wymienionej publikacji:

**[P5] Degórska O\***, Zasada N, Badzińska W, Fu Q, Jesionowski T, Zdarta J\*, Targeted biocatalyst design for asymmetric citalopram conversion in a membrane reactor (2025), *Pharmaceutics*, 17, 1497.

Oświadczam, że mój wkład w pracę obejmował:

- edycję i przygotowanie ostatecznej wersji publikacji
- przeprowadzanie analizy
- opracowanie i interpretacja wyników

*Weronika Badzińska*