

Design of modern biocatalysts for ϵ -caprolactone synthesis

Projektowanie nowoczesnych biokatalizatorów dla syntezy ϵ -kaprolaktonu



DOI: 10.15199/62.2025.12.18

*A biocatalyst based on *Candida antarctica* lipase B phys. immobilized on industrial-grade multi-walled C nanotubes was developed, characterized by high activity and stability. Its application in the chemoenzymatic synthesis of ϵ -caprolactone allowed for 83% conversion of cyclohexanone (45°C, 5 h) while maintaining activity over 4 consecutive reaction cycles.*

Keywords: biocatalysis, immobilization, nanomaterials, ϵ -caprolactone, Baeyer-Villiger oxidation

Przedstawiono badania nad opracowaniem biokatalizatora opartego na lipazie B z *Candida antarctica* fizycznie immobilizowanej na wielościennych nanorurkach węglowych o jakości przemysłowej, który wykazał wysoką aktywność i stabilność. Zastosowanie go w chemoenzymatycznej syntezie ϵ -kaprolaktonu pozwoliło uzyskać konwersję cykloheksanonu na poziomie 83% (45°C, 5 h) oraz zachować aktywność przez cztery cykle reakcyjne.

Słowa kluczowe: biokataliza, immobilizacja, nanomateriały, ϵ -kaprolakton, utlenianie Baeyera i Villigera

Dynamiczny rozwój nowych technologii w przemyśle chemicznym stanowi kluczowy element globalnej transformacji w kierunku zrównoważonego rozwoju. Wdrażanie innowacyjnych procesów i materiałów pozwala nie tylko na poprawę wydajności produkcji, ale także na zmniejszanie skutków ubocznych działalności przemysłowej, w tym na ochronę środowiska. Ogromne znaczenie mają innowacje technologiczne, które pozwalają na ograniczenie zapotrzebowania na energię, minimalizację odpadów produkcyjnych oraz możliwość zastąpienia surowców kopalnych surowcami odnawialnymi, co jest zgodne z Agendą 2030 ONZ i celami zrównoważonego rozwoju¹⁾.

Rozwiązania biotechnologiczne stanowią jeden z kluczowych kierunków rozwoju nowoczesnego przemysłu chemicznego, w pełni wpisujący się w ideę tzw. zielonej chemii oraz zrównoważonego rozwoju. Zastosowanie

biokatalizatorów, takich jak enzymy i mikroorganizmy, umożliwia prowadzenie procesów produkcyjnych w łagodnych warunkach temperatury i ciśnienia, ograniczenie zużycia energii oraz eliminację toksycznych reagentów, rozpuszczalników i powstawania produktów ubocznych. Reakcje enzymatyczne charakteryzuje wysoka selektywność, dzięki czemu możliwe jest uzyskiwanie produktów o dużej czystości i wysokiej wydajności, co przekłada się na mniejszą ilość odpadów i niższe koszty ich utylizacji. Pomimo licznych zalet, szerokie zastosowanie enzymów w procesach przemysłowych jest ograniczone. Enzymy są wyjątkowo wrażliwe na zmiany pH, temperatury oraz obecność zanieczyszczeń, co znacząco utrudnia utrzymanie ich aktywności w warunkach rzeczywistych. Dodatkowo wydzielenie enzymów z mieszaniny poreakcyjnej jest kłopotliwe i kosztowne, a produkty reakcji często ulegają



Inż. Anita PROCEK (ORCID: 0009-0005-3068-4620) w roku 2025 ukończyła studia I stopnia na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach. Obecnie kontynuuje kształcenie na studiach magisterskich na specjalizacji chemia farmaceutyczna i kosmetyczna na tym samym wydziale.



Dr inż. Anna WOLNY (ORCID: 0000-0003-1843-8791) w roku 2025 uzyskała stopień doktora nauk inżynieryjno-technicznych w dyscyplinie inżynieria chemiczna z wyróżnieniem na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach. Od 2024 r. jest pracownikiem Katedry Technologii Chemicznej Organicznej i Petrochemii na tej samej uczelni. Jest laureatką konkursów, takich jak PRELUDIUM22 (NCN) oraz „Drive Innovations – Rozwiązania dla Zrównoważonego Rozwoju” (BASF Polska), a także współautorką licznych publikacji naukowych, patentów i uczestniczką wielu konferencji naukowych o wymiarze krajowym i międzynarodowym. Specjalność – biokataliza, immobilizacja białek, modyfikacja materiałów, kataliza heterogeniczna i zielona chemia.

zanieczyszczeniu ich pozostałościami. Enzymy łatwo ulegają również denaturacji, co uniemożliwia ich ponowne wykorzystanie i ogranicza ekonomiczną opłacalność procesów biokatalitycznych.

Jednym z najbardziej efektywnych rozwiązań wspominanych ograniczeń jest immobilizacja enzymów. Unieruchomienie białka umożliwia jego łatwe oddzielenie od mieszaniny poreakcyjnej, poprawia jego stabilność oraz odporność na zmienne warunki procesu, a ponadto pozwala na jego wielokrotne wykorzystanie bez utraty aktywności^{2,3}. Na podstawie danych literaturowych można wyróżnić wiele metod immobilizacji enzymów, natomiast najbardziej popularną z nich jest adsorpcja natywnego biokatalizatora na stałym nośniku^{4,5}. Dobór odpowiedniego nośnika stanowi kluczowy aspekt podczas fizycznej immobilizacji enzymu i zależy głównie od jego rodzaju. Zarówno aktywność katalityczna, jak i efektywność immobilizacji enzymu w dużym stopniu zależą od polarności środowiska, co wpływa na jego stabilność i dostępność miejsca aktywnego. W przypadku lipaz, które są najczęściej wykorzystywaną grupą enzymów w zastosowaniach przemysłowych, ich aktywacja zachodzi w środowisku hydrofobowym, a proces ten nazywany jest aktywacją międzyfazową i stanowi klasyczny przykład zależności aktywności enzymu od charakteru środowiska. W środowisku hydrofobowym dochodzi do częściowego otwarcia się wieczonego lipazy przykrywającego miejsce aktywne, co przekłada się na wzrost efektywności immobilizacji białka i otrzymania aktywnego biokatalizatora^{6,7}.

Do efektywnej immobilizacji lipaz najczęściej wybiera się nośniki, takie jak wielościenne nanorurki węglowe, materiały krzemionkowe, węgle aktywne i materiały polimerowe⁸⁻¹⁰. Istotnym aspektem jest hydrofobowość nośnika, więc w przypadku materiałów krzemionkowych konieczna jest modyfikacja powierzchni hydrofobowymi modyfikatorami¹¹. Materiały węglowe stanowią atrakcyjną grupę nośników dla enzymów ze względu na hydrofobowy charakter, dużą powierzchnię właściwą, wysoką stabilność chemiczną i termiczną oraz możliwość modyfikacji powierzchni, co pozwala na optymalizację warunków immobilizacji. W tym kontekście nanorurki węglowe wyróżniają się jako nośniki o unikalnej strukturze jednowymiarowej, dużej powierzchni kontaktu i możliwości

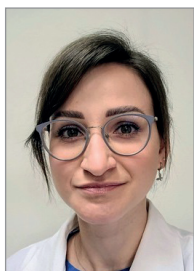
tworzenia oddziaływań typu π - π oraz van der Waalsa, co sprawia, że są obiecującym rozwiązaniem w projektowaniu nowoczesnych i stabilnych układów biokatalitycznych do zastosowań przemysłowych^{12, 13}. W doniesieniach literaturowych można znaleźć liczne przykłady zastosowań lipaz immobilizowanych na nanorurkach węglowych. Nanobiokatalizator składający się z lipazy B z *Candida antarctica* (CALB) unieruchomionej na wielościennej nanorurkach węglowych (MWCNTs) został zastosowany w syntezie estrów kwasów dikarboksylogowych. Opracowany biokatalizator wykazał wysoką aktywność katalityczną w reakcji kwasu bursztynowego z *n*-butanolem, uzyskując 95% wydajności procesu w cykloheksanie w 45°C po 3 h z możliwością jego 6-krotnego zawrotu¹⁴. W innym przykładzie CALB unieruchomiony fizycznie na MWCNTs został wykorzystany w chemo-enzymatycznym utlenianiu Baeyera i Villigera 2-metylocykloheksanonu w systemie ciągłym. Otrzymano 6-metylo- ϵ -kaprolakton z wydajnością 87,5% i selektywnością > 99% po 5 min prowadzenia procesu w octanie etylu w 40°C. Podaną wydajność produkcji obserwowano przez co najmniej 8 h prowadzenia procesu, co wskazuje na wysoką stabilność układu biokatalitycznego¹⁵. Lipaza z *Candida rugosa* fizycznie immobilizowana na MWCNTs, które sfunkcjonalizowano grupami karboksylowymi, została wykorzystana w enzymatycznej syntezie oleinianu metylu. Biokatalizator umożliwił otrzymanie estru z wydajnością 84,2%, a reakcję prowadzono w izooktanie w 50°C¹⁶.

Celem badań opisanych w artykule było opracowanie aktywnego i stabilnego heterogenicznego biokatalizatora opartego na lipazie B z *Candida antarctica* oraz wielościennej nanorurkach węglowych, przeznaczonego do chemo-enzymatycznej produkcji ϵ -kaprolaktonu w systemie okresowym.

Część doświadczalna

Materiały

Stosowano: lipazę B z *Candida antarctica* (5000 LU/g, Sigma-Aldrich), wielościenne nanorurki węglowe (Nanocyl NC7000TM, Nanocyl), wielościenne nanorurki węglowe syntezowane na Politechnice Śląskiej, wielościenne nano-



Dr inż. Magdalena SITKO (ORCID: 0000-0002-4823-2009) w roku 2013 ukończyła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach. W 2018 r. uzyskała stopień doktora nauk technicznych na tym samym wydziale. Obecnie jest zatrudniona na stanowisku starszego specjalisty ds. badań i rozwoju w Synthos SA. Specjalność – technologia chemiczna organiczna, technologia polimerów.



Dr inż. Anna SZELWICKA (ORCID: 0000-0001-8324-856X) w roku 2016 ukończyła studia magisterskie na kierunku technologia chemiczna organiczna na Politechnice Śląskiej w Gliwicach, a następnie na tej samej uczelni rozpoczęła studia doktoranckie, kierując zainteresowania naukowe na opracowanie nowych heterogenicznych układów katalitycznych opartych na nośnikach na bazie materiałów węglowych, cieczach jonowych i enzymach, wprowadzając opracowane układy katalityczne do wybranych procesów organicznych, takich jak utlenianie Baeyera i Villigera, estryfikacja kwasu akrylowego, kwasu lewulinowego oraz kwasów dikarboksylogowych z wybranymi alkoholami. W latach 2022–2024 była zatrudniona jako pracownik naukowy na Technical University of Darmstadt, prowadząc we współpracy z firmą Merck projekt dotyczący degradacji niehydrolizowalnych polimerów, takich jak PE czy PP, z wykorzystaniem modyfikowanych genetycznie enzymów. Obecnie jest zatrudniona jako specjalista R&D w Centrum Badawczo-Rozwojowym Orlen SA.

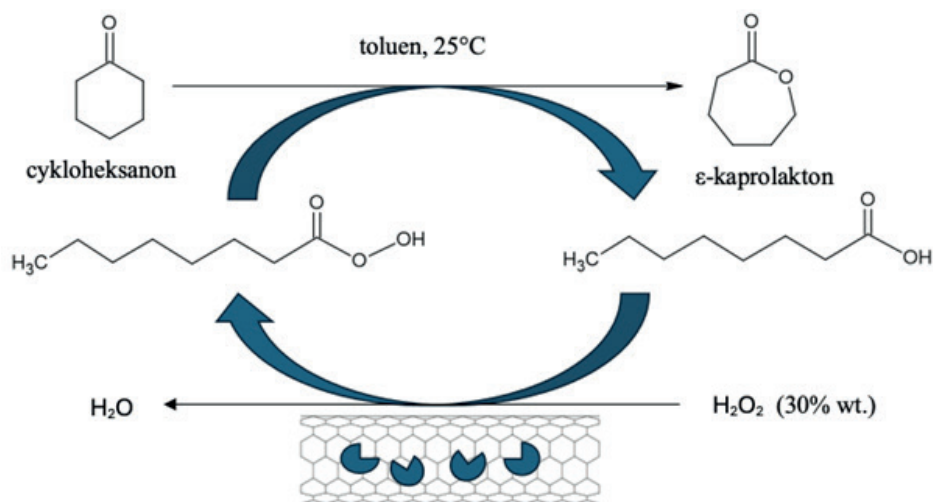


Fig. 1. Chemo-enzymatic Baeyer-Villiger oxidation of cyclohexanone to ε-caprolactone

Rys. 1. Chemo-enzymatyczne utlenianie Baeyera i Villigera cykloheksanonu do ε-kaprolaktonu

rukki węglowe (czystość przemysłowa, CheapTubes), grafit (POCH SA), węgiel aktywny (POCH SA), cykloheksanon (Grupa Azoty Zakłady Azotowe „Puławy” SA), kwas oktanowy ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich), 30-proc. wodny roztwór nadtlenu wodoru (POCH SA), toluen (cz.d.a., Chempur), dekan ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich), bufor fosforanowy pH 7,0 w 20°C (Sigma-Aldrich).

Metodyka badań

Wstępnie proces immobilizacji prowadzono przy zastosowaniu nadmiaru enzymu (6 mL roztworu lipazy na 0,1 g nośnika), w celu zapewnienia maksymalnego pokrycia powierzchni analizowanych materiałów węglowych. Niezwiązany enzym usuwano poprzez filtrację oraz wielokrotne przemywanie osadu. Po optymalizacji procesu immobilizacji enzymu do kolby okrągłodennej wprowadzono odważoną masę nośnika, dodano 0,2 mL wodnego roztworu lipazy i 0,4 mL wody w przeliczeniu na każde wprowadzone 0,1 g nośnika. Zawiesinę mieszano za pomocą termostатовanej wytrząsarki przez 3 h w temp. 20°C z prędkością 180 rpm. Po tym czasie zawiesinę przesączono próżniowo, a materiał przemyto wodą w ilości 3 mL na 0,1 g użytego nośnika. Następnie biokatalizator suszono przez 2 doby w temp. 5°C (lodówka), w ekscytorze (pod próżnią), nad bezwodnym pentatlenkiem difosforu.



Inż. Mateusz PILSZEK (ORCID: 0009-0000-2350-7443) jest studentem II semestru studiów magisterskich na kierunku technologia chemiczna o specjalności technologia chemiczna organiczna na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach. Aktywnie angażuje się w życie akademickie jako prezes Studenckiego Koła Naukowego Chemików, członek Rady Samorządu Wydziału Chemicznego oraz delegat do Rady Kół Naukowych Politechniki Śląskiej. Specjalność – projektowanie hybryd metaloorganicznych o potencjalnym zastosowaniu katalitycznym.



Mgr inż. Magdalena MORAWIEC-WITCZAK w roku 2001 ukończyła studia na Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Łódzkiej. Posiada ponad 20-letnie doświadczenie w przemyśle chemicznym przy realizacji projektów badawczo-rozwojowych. Obecnie zajmuje stanowisko starszego specjalisty technologa ds. rozwoju biznesu w Grupie Azoty Zakłady Azotowe „Puławy” SA.

W kolbie okrągłodennej o pojemności 25 mL umieszczono kolejno biokatalizator (0,02 g), kwas oktanowy (0,5 mL), toluen (0,5 mL) i cykloheksanon (0,25 mmol). Kolbę zaopatrzono w septę, umieszczono w wytrząsarce elektrycznej w temp. 25°C lub 45°C i wkroplono 30-proc. wodny roztwór nadtlenu wodoru (0,5 mmol), po czym rozpoczęto mieszanie z prędkością 250 rpm. Postęp reakcji śledzono metodą chromatografii gazowej.

Wszystkie reakcje prowadzono wg ogólnej procedury chemo-enzymatycznego utleniania cykloheksanonu opisaną powyżej, wychodząc z 20 mmol cykloheksanonu. Następnie biokatalizator poddawano sączeniu,

przemywano toluenem i suszono. W każdym kolejnym cyklu reakcyjnym modyfikowano w razie konieczności ilości użytych substratów (ze względu na częściowe straty biokatalizatora podczas sączenia), tak aby zachować odpowiednie stosunki reagentów.

Metody analityczne

Przebieg reakcji śledzono, pobierając z układu reakcyjnego próbki (10 μL) w ustalonych odstępach czasu, rozcieńczając je chlorkiem metylenu (1,5 mL) i analizując metodą chromatografii gazowej ze wzorcem wewnętrznym (dekan). Do analiz stosowano chromatograf gazowy Clarus 500 firmy Perkin Elmer zaopatrzonej w kolumnę SPBTM-5 (30 m × 0,2 mm × 0,2 μm) oraz detektor FID. Parametry analizy: temperatura dozownika 250°C, temperatura detektora 250°C, dzielnik przepływu 100:1, objętość nastrojki 1 μL, gaz nośny – hel, stały przepływ 30 cm/s, powietrze 450 mL/min, wodór 45 mL/min.

Pomiary TG-DTA wykonano, stosując termowagę Mettler Toledo TGA/SDTA-851ew systemie termoanalitycznym STARe. Pomiary wykonywano dla masy próbki ok. 20 mg w platynowym naczynku pomiarowym o pojemności 70 μL, w zakresie temp. 25–800°C, przy szybkości ogrzewania 20°C/min, w dynamicznej (100 mL/min) atmosferze azotu.

Wyniki badań i ich omówienie

Reakcja modelowa

Testy aktywności katalitycznej opracowanych biomateriałów węglowych badano w procesie o dużym znaczeniu przemysłowym, syntezie ϵ -kaprolaktonu poprzez chemo-enzymatyczne utlenianie Baeyera i Villigera cykloheksanonu. W literaturze zostały opisane 2 główne podejścia chemo-enzymatycznego utleniania Baeyera i Villigera, które różnią się sposobem generowania nadkwasu w układzie reakcyjnym. W pierwszym z nich lipaza katalizuje reakcję perhydrolizy kwasu karboksylowego (np. kwasu oktanowego) z nadtlenkiem wodoru, co prowadzi do powstania odpowiedniego nadkwasu. Powstały w ten sposób utleniacz umożliwia transformację ketonu do laktonu. Drugie podejście opiera się na perhydrolizie estru, najczęściej octanu etylu, w obecności nadtlenku wodoru, co prowadzi do powstania nadkwasu octowego. W tym wariantie lipaza pełni funkcję katalizatora umożliwiającego łagodną i selektywną generację utleniacza *in situ*. Zaletą tego rozwiązania jest fakt, że octan etylu może odgrywać podwójną rolę, zarówno rozpuszczalnika reakcji, jak i prekursora nadkwasu, co upraszcza układ reakcyjny oraz ogranicza liczbę stosowanych reagentów¹⁵). Na rys. 1 przedstawiono reakcję modelową chemo-enzymatycznego utleniania Baeyera i Villigera cykloheksanonu do ϵ -kaprolaktonu z zastosowaniem kwasu karboksylowego jako prekursora nadkwasu.

Immobilizacja adsorpcyjna CALB na materiałach węglowych

Opracowano układy biokatalityczne oparte na lipazie B z *Candida antarctica* (CALB) unieruchomionej na wybranych materiałach węglowych: syntezowanych wielościennych nanorurkach węglowych (MWCNTs), komercyjnie dostępnych wielościennych nanorurkach węglowych (MWCNTs-Nanocyl), komercyjnie dostępnych wielościennych nanorurkach węglowych jakości przemysłowej (MWCNTs-IG), graficie oraz węgla aktywnym z wykorzystaniem prostej metody adsorpcji fizycznej. Metoda ta opiera się na oddziaływaniach niekowalencyjnych, takich jak wiązania wodorowe oraz siły van der Waalsa pomiędzy enzymem a powierzchnią nośnika. Zastosowanie immobilizacji fizycznej uzasadniono faktem, że immobilizacja chemiczna, polegająca na tworzeniu wiązań kowalencyj-

Table 1. Immobilized CALB content on selected carbon materials along with their surface characteristics

Tabela 1. Zawartość immobilizowanego CALB na wybranych materiałach węglowych wraz z charakterystyką ich powierzchni

Nośnik	Powierzchnia właściwa BET, m ² /g	Objętość porów, cm ³ /g	Zawartość CALB na nośniku, % mas.
MWCTs	34	0,11	6,0
MWCNTs-Nanocyl	177	1,38	19,8
MWCNTs-IG	233	brak danych	8,0
Węgiel aktywny	1158	0,42	16,9
Grafit	3	0,01	2,0

nych między enzymem a nośnikiem, często prowadzi do obniżenia aktywności katalitycznej enzymu¹⁷). Dodatkowo przeprowadzenie procesów modyfikacji nośnika niezbędnych do chemicznego związania białka z materiałem wiąże się z wyższymi kosztami otrzymywania biokatalizatorów.

Wstępnie proces immobilizacji prowadzono przy zastosowaniu nadmiaru enzymu (6 mL roztworu lipazy na 0,1 g nośnika), w celu zapewnienia maksymalnego pokrycia

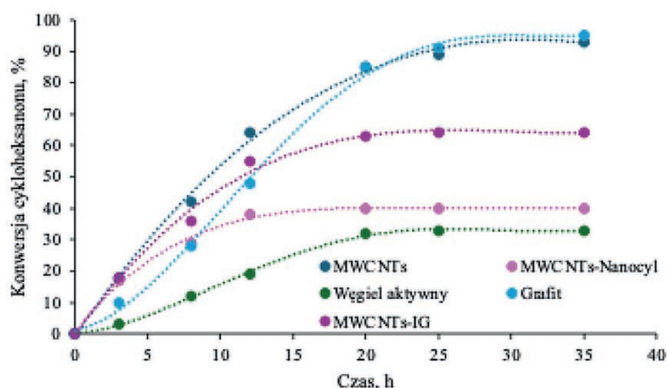


Fig. 2. Effect of the type of carrier on CALB activity in the model reaction; reaction conditions: cyclohexanone (0,25 mmol), 30% aq. H₂O₂ (2 eq., 0,5 mmol), octanoic acid 0,5 mL, toluene 0,5 mL, biocatalyst 20 mg, temp. 25°C, shaker 250 rpm, conversion determined by GC

Rys. 2. Wpływ rodzaju nośnika na aktywność CALB w reakcji modelowej; warunki reakcji: cykloheksanon (0,25 mmol), 30% aq. H₂O₂ (2 eq., 0,5 mmol), kwas oktanowy 0,5 mL, toluen 0,5 mL, biokatalizator 20 mg, temp. 25°C, wyrząsarka 250 rpm, konwersję oznaczono za pomocą GC



Dr inż. Krzysztof DZIUBA (ORCID: 0000-0002-7817-3601) w roku 2004 ukończył studia z zakresu inżynierii chemicznej na Politechnice Łódzkiej, a w 2008 r. uzyskał stopień doktora na tej samej uczelni. Od 2003 r. jest związany z Grupą Azoty Zakładami Azotowymi „Puławy” SA. Obecnie pełni funkcję głównego technologa w Pionie Produkcji. Odpowiada za nadzór technologiczny instalacji chemicznych, techniczne aspekty zarządzania emisjami, uczestniczy w pracach badawczo-rozwojowych oraz w procesach przygotowania inwestycji. Jest współautorem kilkunastu publikacji i kilku patentów.



Prof. dr hab. inż. Anna CHROBOK (ORCID: 0000-0001-7176-7100) w roku 1996 ukończyła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach. W 2001 r. uzyskała stopień doktora nauk technicznych, a w 2011 r. stopień doktora habilitowanego na tym samym wydziale. W 2018 r. otrzymała tytuł profesora nauk technicznych. Obecnie pracuje w Katedrze Technologii Chemicznej Organicznej i Petrochemii na Wydziale Chemicznym, a także pełni funkcję dyrektora Kolegium Studiów Politechniki Śląskiej. Specjalność – inżynieria chemiczna.

* Adres do korespondencji:

Katedra Technologii Chemicznej Organicznej i Petrochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Śląska, ul. Krzywoustego 4, 44-100 Gliwice, tel.: (32) 237-29-17, e-mail: anna.chrobok@polsl.pl

Table 2. Optimization of CALB physical immobilization on MWCNTs-IG and catalytic activity results of the obtained biocatalysts

Tabela 2. Optymalizacja immobilizacji fizycznej CALB na MWCNTs-IG oraz wyniki aktywności katalitycznej otrzymanych biokatalizatorów

Sposób immobilizacji CALB na 0,1 g MWCNTs-IG	Konwersja cykloheksanonu po 5 h, %
6 mL CALB + 3 mL bufor fosforanowy	86
2 mL CALB + 3 mL bufor fosforanowy	86
0,5 mL CALB + 3 mL bufor fosforanowy	84
0,4 mL CALB + 3 mL bufor fosforanowy	80
0,2 mL CALB + 3 mL bufor fosforanowy	42
0,2 mL CALB + 1,5 mL bufor fosforanowy	58
0,2 mL CALB + 0,4 mL bufor fosforanowy	76
0,2 mL CALB + 0,4 mL woda	78

Warunki reakcji: cykloheksanon (0,25 mmol), 30% aq. H_2O_2 (2 eq., 0,5 mmol), kwas oktanowy 0,5 mL, toluen 0,5 mL, CALB-MWCNTs-IG 20 mg, temp. 45°C, wytrząsarka 250 rpm, konwersję oznaczono za pomocą GC

powierzchni analizowanych materiałów węglowych. Niezwiązany enzym usuwano poprzez filtrację oraz wielokrotne przemywanie osadu. Ilości osadzonego białka na wybranych materiałach węglowych oznaczono na podstawie analiz termogravimetrycznych i przedstawiono w tabeli 1 wraz z charakterystyką ich powierzchni. Na rys. 2 przedstawiono wyniki aktywności katalitycznej opracowanych materiałów w procesie chemo-enzymatycznego utleniania Baeyera i Villigera cykloheksanonu do ϵ -kapolaktanu.

Na podstawie wyników przedstawionych w tabeli 1 można wywnioskować, że dobrze rozwinięta powierzchnia właściwa nośnika miała znaczący wpływ na ilość adsorbowanego CALB. Dla nośników o małej powierzchni właściwej, takich jak MWCNTs oraz grafit, oznaczono odpowiednio 6% mas.

oraz 2% mas. enzymu, natomiast dla węgla aktywnego oraz MWCNTs-Nanocyl te wartości wynosiły 16,9% mas. i 19,8% mas. Warto zauważyć, że pomimo mniejszej powierzchni właściwej materiał MWCNTs-Nanocyl (177 m^2/g) był w stanie unieruchomić większą ilość białka niż węgiel aktywny (1158 m^2/g), co miało związek z jego większą objętością porów (0,42 cm^3/g). Dla MWCNTs-IG oznaczono 8% mas. enzymu na powierzchni, co jest wynikiem zbliżonym do MWCNTs syntezowanych w laboratorium. Testy aktywności katalitycznej (rys. 2) wykazały, że wszystkie opracowane biokatalizatory umożliwiły przekształcenie cykloheksanonu do ϵ -kapolaktanu. Najwyższą aktywnością w badanej reakcji modelowej charakteryzował się biokatalizator oparty na MWCNTs oraz graficie, gdzie po 35 h trwania procesu w temp. 25°C zaobserwowano prawie całkowitą konwersję cykloheksanonu ze 100-proc. selektywnością. Obiecującą aktywność wykazał również biokatalizator oparty na MWCNTs-IG, dla którego po 35 h trwania reakcji oznaczono 65% przereagowania substratu. Dla biokatalizatorów składających się z węgla aktywnego oraz MWCNTs-Nanocyl, dla których oznaczono największą ilość białka na powierzchni, nie zaobserwowano większej aktywności katalitycznej. Świadczy to o tym, że wzrost upakowania enzymu na powierzchni nośnika może powodować zbytnie stłoczenie enzymu na powierzchni, co prowadzi do ograniczenia dostępności kwasu karboksylowego do centrów aktywnych białka. Biorąc pod uwagę koszty produkcji nośnika, jego komercyjną dostępność, możliwość zawrotu oraz aktywność katalityczną w reakcji modelowej, do dalszej optymalizacji wybrano MWCNTs-IG.

W celu obniżenia kosztów syntezy biokatalizatora, która jest głównie determinowana ceną natywnego CALB przeprowadzono optymalizację immobilizacji enzymu na powierzchni MWCNTs-IG. W tym celu zmieszano roztwór CALB (0,2–6 mL) oraz bufor fosforanowy (0,4–3 mL) lub wodę (0,4 mL). Przeprowadzone eksperymenty optymalizacji immobilizacji fizycznej CALB na MWCNTs-IG wraz z otrzymanymi wynikami aktywności katalitycznej w reakcji modelowej zestawiono w tabeli 2. Aktywność katalityczną otrzymanych biokatalizatorów badano w wyższej temp. 45°C w celu skrócenia czasu trwania procesu.

Na podstawie otrzymanych wyników można wywnioskować, że skutecznie udało się zmniejszyć ilość wykorzystywanego natywnego roztworu CALB w procesie immobilizacji bez negatywnego wpływu na aktywność katalityczną układu. Można zaobserwować, że zmniejszenie ilości roztworu CALB z 6 mL do 0,4 mL przy 3 mL buforu fosforanowego nie miało znaczącego wpływu na konwersję cykloheksanonu (86–80%), natomiast zmniejszenie ilości do 0,2 mL drastycznie obniżyło przereagowanie substratu do 42%. Zmniejszenie ilości dodawanego buforu fosforanowego z 3 mL do 1,5 mL przy ilości 0,2 mL roztworu CALB powodowało wzrost konwersji ketonu do 58%, a zmniejszenie ilości buforu fosforanowego do minimalnej ilości 0,4 mL, która umożliwiała mieszanie się składników,

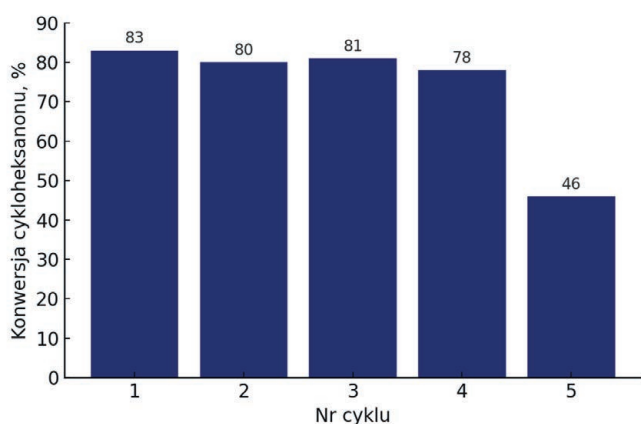


Fig. 3. Catalytic activity of the developed biocatalyst during its recycling; reaction conditions: cyclohexanone (10 mmol), 30% aq. H_2O_2 (2 eq., 20 mmol), octanoic acid 20 mL, toluene 20 mL, biocatalyst 0.8 g, temp. 45°C, shaker 250 rpm, 5 h, conversion determined by GC

Rys. 3. Aktywność katalityczna opracowanego biokatalizatora podczas jego zawrotu; warunki reakcji: cykloheksanon (10 mmol), 30% aq. H_2O_2 (2 eq., 20 mmol), kwas oktanowy 20 mL, toluen 20 mL, biokatalizator 0,8 g, temp. 45°C, wytrząsarka 250 rpm, 5 h, konwersję oznaczono za pomocą GC

spowodowało uzyskanie 76% przereagowania cykloheksanonu. W celu jeszcze większego zmniejszenia kosztów syntezy biokatalizatora, zamiast buforu fosforanowego wykorzystano wodę destylowaną jako medium reakcyjne, co nie wpłynęło negatywnie na aktywność katalityczną enzymu (78% konwersji cykloheksanonu).

W kolejnym kroku zbadano możliwość zawrotu opracowanego biokatalizatora opartego na CALB oraz MWCNTs-IG. W tym celu zwiększono skalę prowadzenia procesu chemo-enzymatycznego utleniania cykloheksanonu z 0,25 mmol do 20 mmol. Na podstawie otrzymanych wyników przedstawionych na rys. 3 można stwierdzić, że jest możliwy zawrót opracowanego biokatalizatora do kolejnego cyklu. Obniżenie aktywności katalitycznej z 83% do 46% zaobserwowano w 5. cyklu reakcyjnym.

Podsumowanie

Przeprowadzone badania miały na celu opracowanie aktywnego i stabilnego układu biokatalitycznego opartego na CALB, immobilizowanego fizycznie na wielościennych nanorurkach węglowych o jakości przemysłowej, przeznaczonego dla chemo-enzymatycznej syntezy ϵ -kaprolaktonu. Uzyskane wyniki potwierdziły, że opracowany biokatalizator stanowi efektywne i innowacyjne rozwiązanie, które umożliwia osiągnięcie konwersji cykloheksanonu na poziomie 83% po 5 h trwania procesu utleniania Baeyera i Villigera. Optymalizacja procedury immobilizacji pozwoliła na znaczące obniżenie kosztów wytwarzania biokatalizatora oraz uzyskanie materiału o wysokiej stabilności w badanym procesie. Biokatalizator pozostał aktywny przez 4 cykle reakcyjne, zachowując konwersję cykloheksanonu na poziomie ok. 80% (5 h). Zastosowane podejście biokatalitycznego utleniania cykloheksanonu wpisuje się w założenia zielonej chemii i odpowiedzialnego rozwoju gospodarki w obiegu zamkniętym. Opracowany biokatalizator stanowi przykład synergicznego połączenia biotechnologii i nanomateriałów, otwierając nowe perspektywy dla zrównoważonej syntezy organicznej w przemyśle chemicznym.

Projekt nr POIR.01.02.00-00-0042/16 uzyskał dofinansowanie Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu sektorowego „INNOCHEM”, Działanie 1.2 „Sektorowe programy B+R” Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014–2020. Prace realizowane były przez Grupę Azoty Zakłady Azotowe „Puławy” SA oraz kluczowych podwykonawców, tj. Politechnika Śląska w Gliwicach i Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Ciężkiej Syntezy Organicznej „Blachownia” w Kędzierzynie Koźlu.

Otrzymano: 13-11-2025

Zrecenzowano: 13-11-2025

Zaakceptowano: 22-11-2025

Opublikowano: 17-12-2025

LITERATURA

- [1] R.A. Sheldon, J.M. Woodley, *Chem. Rev.* 2018, **118**, 801.
- [2] H.J. Federsel, T.S. Moody, S.J.C. Taylor, *Molecules* 2021, **26**, 2822.
- [3] J.M. Bolivar, J.M. Woodley, R. Fernandez-Lafuente, *Chem. Soc. Rev.* 2022, **51**, 6251.
- [4] T. Jesionowski, J. Zdarta, B. Krajewska, *Adsorption* 2014, **20**, 801.
- [5] C. Silva Almeida, F. Simão Neto, P. da Silva Sousa, F.I. da Silva Aires, J.R. de Matos Filho, A.L. Gama Cavalcante, P.G. Sousa Junior, R.L.F. Melo, J.C.S Dos Santos, *ACS Omega* 2024, **9**, 46698.
- [6] R. Fernandez-Lafuente, P. Armisen, P. Sabuquillo, G. Fernández-Lorente, J.M. Guisán, *Chem. Phys. Lipids* 1998, **93**, 185.
- [7] G. Fernandez-Lorente, J. Rocha-Martín, J.M. Guisan, *Methods Mol. Biol.* 2020, **2100**, 143.
- [8] C. Mateo, J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.* 2017, **40**, 1451.
- [9] C. Garcia-Galan, Á. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente, R.C. Rodrigues, *Adv. Synth. Catal.* 2011, **353**, 2885.
- [10] E.P. Cipolatti, A. Valério, R.O. Henriques, D.E. Moritz, J.L. Ninow, D.M.G. Freire, E.A. Manoel, R. Fernandez-Lafuente, D. De Oliveira, *RSC Adv.* 2016, **6**, 104675.
- [11] A. Wolny, D. Więclawik, J. Zdarta, S. Jurczyk, T. Jesionowski, A. Chrobok, *Green Chem.* 2024, **26**, 10829.
- [12] F. Danafar, A. Fakhru'l-Razi, M.A.M. Salleh, D. Radiah. A. Biak, *Chem. Eng. J.* 2009, **155**, 37.
- [13] L. Vaisman, H.D. Wagner, G. Marom, *Adv. Colloid Interface Sci.* 2006, **128**, 37.
- [14] A. Szelwicka, S. Boncel, S. Jurczyk, A. Chrobok, *Appl. Catal. A Gen.* 2019, **574**, 41.
- [15] A. Szelwicka, P. Zawadzki, M. Sitko, S. Boncel, W. Czardybon, A. Chrobok, *Org. Process Res. Dev.* 2019, **23**, nr 7, 1386.
- [16] N.H.C. Marzuki, N.A. Mahat, F. Huyop, N.A. Buang, R.A. Wahab, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2015, **177**, 967.
- [17] B.C. Koops, E. Papadimou, H.M. Verheij, A.J. Slotboom, M.R. Egmond, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999, **52**, 791.

