



POLITECHNIKA POZNAŃSKA

dr inż. Jakub Zdarta
Wydział Technologii Chemicznej
Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej
ul. Berdychowo 4, 60-965 Poznań,
tel. +48 61 665 3626, fax +48 61 665 3649
e-mail: Jakub.Zdarta@put.poznan.pl

dr inż. Jakub Zdarta

Projektowanie systemów biokatalitycznych i ich rola
w procesach konwersji biomasy oraz unieszkodliwiania
wybranych zanieczyszczeń środowiskowych

Autoreferat

Poznań 2020

Spis treści

1. Informacje o kandydacie	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.	4
4.1. Monotematyczny cykl publikacji.....	4
4.2. Wprowadzenie do tematyki biokatalizy i biokatalizatorów	7
4.3. Wykorzystanie immobilizowanych enzymów w procesach konwersji biomasy	11
4.4. Wykorzystanie immobilizowanych enzymów w usuwaniu wybranych zanieczyszczeń środowiskowych.....	22
4.5. Podsumowanie	42
4.6. Literatura	44
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.	47
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	48
7. Pozostałe informacje dotyczące kariery zawodowej.....	50

1. Informacje o kandydacie

Imię i nazwisko: **Jakub Zdarta**

Adres: **ul. 27 Grudnia 29, 62-080 Tarnowo Podgórne**

Tel.: **+48 606-752-765**; e-mail: **Jakub.Zdarta@put.poznan.pl**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

Wykształcenie:

- | | |
|----------------------|--|
| 11.04.2017 r. | stopień naukowy doktora nauk chemicznych w zakresie technologii chemicznej , Wydział Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej.
Tytuł rozprawy doktorskiej: „ Immobilizacja enzymów na wybranych nośnikach organicznych i nieorganicznych ”
promotor pracy: prof. dr hab. inż. Teofil Jesionowski |
| 01.02.2013 r. | tytuł zawodowy inżyniera w zakresie technologii chemicznej , Wydział Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej.
Tytuł pracy inżynierskiej: „ Immobilizacja <i>Amano Lipase A</i> na powierzchni krzemionki ”
promotor pracy: dr inż. Agnieszka Kołodziejczak-Radzimska |
| 28.06.2010 r. | tytuł zawodowy magistra w zakresie chemii (specjalność: chemia podstawowa) , Wydział Chemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu
Tytuł pracy magisterskiej: „ Studia nad syntezą oligonukleotydu zawierającego addukt 2'-deoksyguanozyny z aldehydem malonowym i octowym ”
promotor pracy: prof. dr hab. Henryk Koroniak |

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Zatrudnienie:

- | | |
|--------------------------------------|---|
| 01.10.2020 r. – obecnie | Adiunkt – Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej |
| 01.09.2018 r. – 30.09.2020 r. | Asystent naukowy – Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej |

01.11.2017 r. – 30.05.2018 r. **Postdoc, Researcher** – Department of Chemical and Biochemical Engineering, Technical University of Denmark, Dania

Stáže naukowe:

25.11.2019 r. – 10.12.2019 r. Centre for Technology in Water and Wastewater, School of Civil and Environmental Engineering, University of Technology Sydney, Australia, Profesor Long. D. Nghiem, Profesor Luong N. Nguyen

01.05.2017 r. – 30.05.2018 r. Center for Bioprocess Engineering, DTU Chemical Engineering, Technical University of Denmark, Dania, Profesor Anne S. Meyer, Profesor Manuel Pinelo

15.06.2015 r. – 22.06.2015 r. Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński, Polska, dr hab. Barbara Krajewska, profesor UJ

01.03.2015 r. – 31.05.2015 r. DTU Chemical Engineering, Technical University of Denmark, Dania, Profesor Anne S. Meyer, Profesor Manuel Pinelo

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy

4.1. Monotematyczny cykl publikacji

Osiągnięcia naukowe w zakresie wytwarzania, charakterystyki oraz zastosowania nowych układów immobilizowanych enzymów zaprezentowano w monotematycznym cyklu publikacji nt. **„Projektowanie systemów biokatalitycznych i ich rola w procesach konwersji biomasy oraz unieszkodliwiania wybranych zanieczyszczeń środowiskowych”**. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) prac stanowiących znaczny wkład w rozwój dyscypliny wynosi **67,939** (z roku opublikowania pracy) oraz **69,734** (IF 5-letni), a łączna wartość punktów MNiSW to **1720**. Prace opublikowano w latach 2017–2020, a ich zestawienie przedstawiono w tabeli poniżej. Oświadczenia współautorów, opisujące indywidualny wkład każdego z nich w powstanie wymienionych prac stanowią **załącznik nr 5 (zał. 5)**, natomiast kopie prac **H1–H13** stanowią **załącznik nr 6 (zał. 6)**.

Monotematyczny cykl publikacji

Nr	Dane bibliograficzne	IF ^{a)}	IF ^{b)}	Punkty MNiSW ^{c)}
H1	Zdarta J.*, Meyer A.S., Jesionowski T., Pinelo M., A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility, <i>Catalysts</i> (2018) 8, 92.	3,465	3,708	100
H2	Zdarta J.*, Jędrzak A., Klapiszewski Ł., Jesionowski T.*, Immobilization of cellulase on a functional inorganic–organic hybrid support: Stability and kinetic study, <i>Catalysts</i> (2017) 7, 374.	3,465	3,708	100
H3	Zdarta J.*, Pinelo M., Jesionowski T., Meyer A.S., Upgrading of biomass monosaccharides by immobilized glucose dehydrogenase and xylose dehydrogenase, <i>ChemCatChem</i> (2018) 10, 5164–5173.	4,674	4,769	100
H4	Zdarta J.*, Bachosz K., Degórska O., Zdarta A., Kaczorek E., Pinelo M., Meyer A.S., Jesionowski T.*, Co-immobilization of glucose dehydrogenase and xylose dehydrogenase as a new approach for simultaneous production of gluconic and xylonic acid, <i>Materials</i> (2019) 12, 3167.	2,972	3,424	140
H5	Zdarta J.*, Antecką K., Jędrzak A., Synoradzki K., Łuczak M., Jesionowski T.*, Biopolymers conjugated with magnetite as support materials for trypsin immobilization and protein digestion, <i>Colloids and Surfaces B: Biointerfaces</i> (2018) 169, 118–125.	3,997	4,263	100
H6	Zdarta J.*, Meyer A.S., Jesionowski T., Pinelo M., Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: A comprehensive review, <i>Advances in Colloid and Interface Science</i> (2018) 258, 1–20.	7,346	9,922	200
H7	Zdarta J.*, Meyer A.S., Jesionowski T., Pinelo M., Multi-faceted strategy based on enzyme immobilization with reactant adsorption and membrane technology for biocatalytic removal of pollutants: A critical review, <i>Biotechnology Advances</i> (2019) 37, 107401.	12,831	13,597	200
H8	Zdarta J.*, Feliczak-Guzik A., Siwińska-Ciesielczyk K., Nowak I., Jesionowski T.*, Mesostructured cellular foam silica materials for laccase immobilization and tetracycline removal: A comprehensive study, <i>Microporous and Mesoporous Materials</i> (2020) 291, 109688.	4,551	4,157	100

H9	Zdarta J.* , Machałowski T., Degórska O., Bachosz K., Fursov A., Ehrlich H., Ivanenko V.N., Jesionowski T.*, 3D Chitin scaffolds from the marine demosponge <i>Aplysina archeri</i> as a support for laccase immobilization and its use in the removal of pharmaceuticals, <i>Biomolecules</i> (2020) 10, 646.	4,082	-	100
H10	Zdarta J.* , Jankowska K., Bachosz K., Kijeńska-Gawrońska E., Zgoła-Grześkowiak A., Kaczorek E., Jesionowski T.*, A promising laccase immobilization using electrospun materials for biocatalytic degradation of tetracycline: Effect of process conditions and catalytic pathways, <i>Catalysis Today</i> (2020) 348, 127–136.	5,825	5,266	140
H11	Zdarta J.* , Jankowska K., Wyszowska M., Kijeńska-Gawrońska E., Zgoła-Grześkowiak A., Pinelo M., Meyer A.S., Moszyński D., Jesionowski T.*, Robust biodegradation of naproxen and diclofenac by laccase immobilized using electrospun nanofibers with enhanced stability and reusability, <i>Materials Science and Engineering C</i> (2019) 103, 109789.	4,959	5,364	140
H12	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 A removal, <i>International Journal of Biological Macromolecules</i> (2020) 165, 2049–2059.	5,162	5,137	100
H13	Zdarta J.* , Antecką K., Frankowski R., Zgoła-Grześkowiak A., Ehrlich H., Jesionowski T., The effect of operational parameters on the biodegradation of bisphenols by <i>Trametes versicolor</i> laccase immobilized on <i>Hippospongia communis</i> spongin scaffolds, <i>Science of the Total Environment</i> (2018) 615, 784–795.	4,610	6,419	200
Sumarycznie		67,939	69,734	1720

^{a)} Impact Factor z roku opublikowania pracy ^{b)} 5-letni Impact Factor (2019) ^{c)} Punkty MNiSW (2019/2020)

* autor korespondencyjny

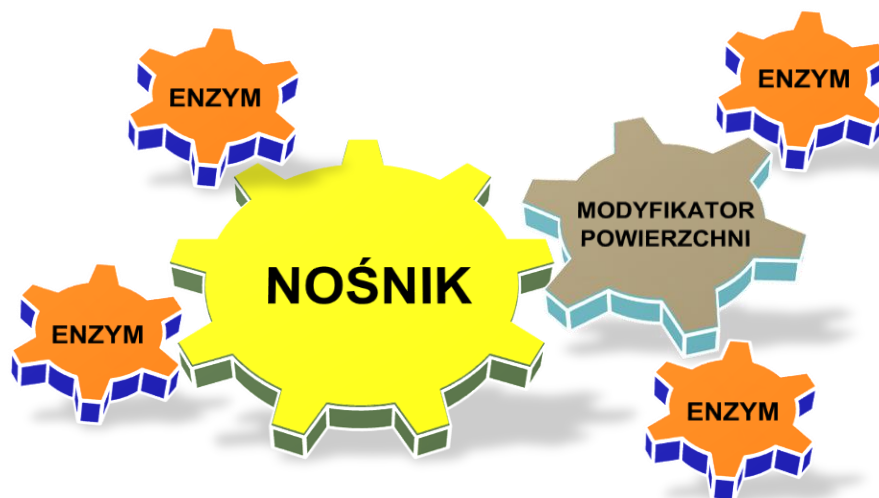
4.2. Wprowadzenie do tematyki biokatalizy i biokatalizatorów

Tematyka badawcza podjęta i opisana w pracach naukowych stanowiących podstawę wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego jest oryginalna i ma multidyscyplinarny charakter. Zrealizowane prace wpisują się przede wszystkim w zakres nauk chemicznych i skoncentrowane są na wykorzystaniu szerokiej gamy materiałów różnego pochodzenia, charakteryzujących się zdefiniowanymi właściwościami, jako nośników w procesie immobilizacji wybranych enzymów z grupy hydrolaz (EC 1) oraz oksydoreduktaz (EC 3), a także charakterystyce i ocenie ich aktywności oraz stabilności, a więc parametrów determinujących ich praktyczne zastosowanie. Kluczowy aspekt przeprowadzonych dotąd badań dotyczył oceny możliwego zastosowania wytworzonych systemów biokatalitycznych w procesach konwersji biomasy oraz usuwania wybranych zanieczyszczeń środowiskowych. W pracach podjęto także zagadnienia związane z opisaniem mechanizmu realizowanych procesów unieruchamiania, jak i skupiono się na zdefiniowaniu szlaków katalitycznych i metabolicznych prowadzonych reakcji biokatalitycznych. Są to niezwykle istotne kwestie, które stanowią podstawowy problem badawczy artykułów naukowych prezentowanych w monotematycznym cyklu prac. Należy podkreślić, że podjęte i opisane zagadnienia wpisują się w aktualne trendy badawcze, wskazujące na konieczność poszukiwania wydajnych katalizatorów procesów technologicznych, jak i efektywnych oraz przyjaznych dla środowiska technik usuwania niebezpiecznych związków z wody i ścieków.

Prowadzenie przemian chemicznych w sposób ekonomiczny, zgodnie z zasadami zielonej chemii, a jednocześnie w możliwie łagodnych warunkach procesowych wymaga zastosowania efektywnych i wysoce wyspecjalizowanych katalizatorów. Pod tym kątem coraz szersze uznanie zyskują enzymy, jako katalizatory pochodzenia naturalnego o wysokiej aktywności oraz selektywności. Zastosowanie biokatalizatorów pozwala na prowadzenie przemian w warunkach otoczenia, bez konieczności stosowania wyspecjalizowanej aparatury, z uzyskaniem wysokich wydajności, a zarazem przy niewielkiej ilości powstających produktów ubocznych [1]. Enzymy stanowią zatem atrakcyjną alternatywę dla dotychczas stosowanych katalizatorów chemicznych, jednak ich praktyczne wykorzystanie nie jest w pełni rozwinięte m.in. ze względu na trudności w oddzieleniu biokatalizatora od produktów reakcji, niską stabilność białek katalitycznych oraz ograniczoną możliwość ich wielokrotnego wykorzystania [2].

Trudności te spowodowały dynamiczny wzrost liczby badań nad rozwiązaniami poprawiającymi stabilność i właściwości użytkowe enzymów. W ostatnich latach najintensywniejsze prace związane są z immobilizacją enzymów, jako uniwersalną techniką pozwalającą na poprawę parametrów biokatalizatorów oraz rozszerzającą potencjalne spektrum aplikacyjne enzymów. Proces immobilizacji najogólniej można zdefiniować jako przyłączenie cząsteczek enzymów do nierozpuszczalnej w środowisku reakcji matrycy, czego efektem jest zmiana formy katalizatora z homogenicznej na heterogeniczną (Rys. 1) [3,4]. Zmiana formy katalizatora to jedna z największych zalet immobilizowanych enzymów, która nie tylko pozwala na szybkie i efektywne wydzielenie biokatalizatora z mieszaniny poreakcyjnej, ale przede wszystkim umożliwia jego wielokrotne zastosowanie w kolejnych cyklach reakcyjnych. Dodatkowo możliwe stało się magazynowanie i transportowanie

unieruchomionych biokatalizatorów, bez znacznej utraty początkowych właściwości, co jest istotne w procesie formowania finalnego produktu komercyjnego [5].

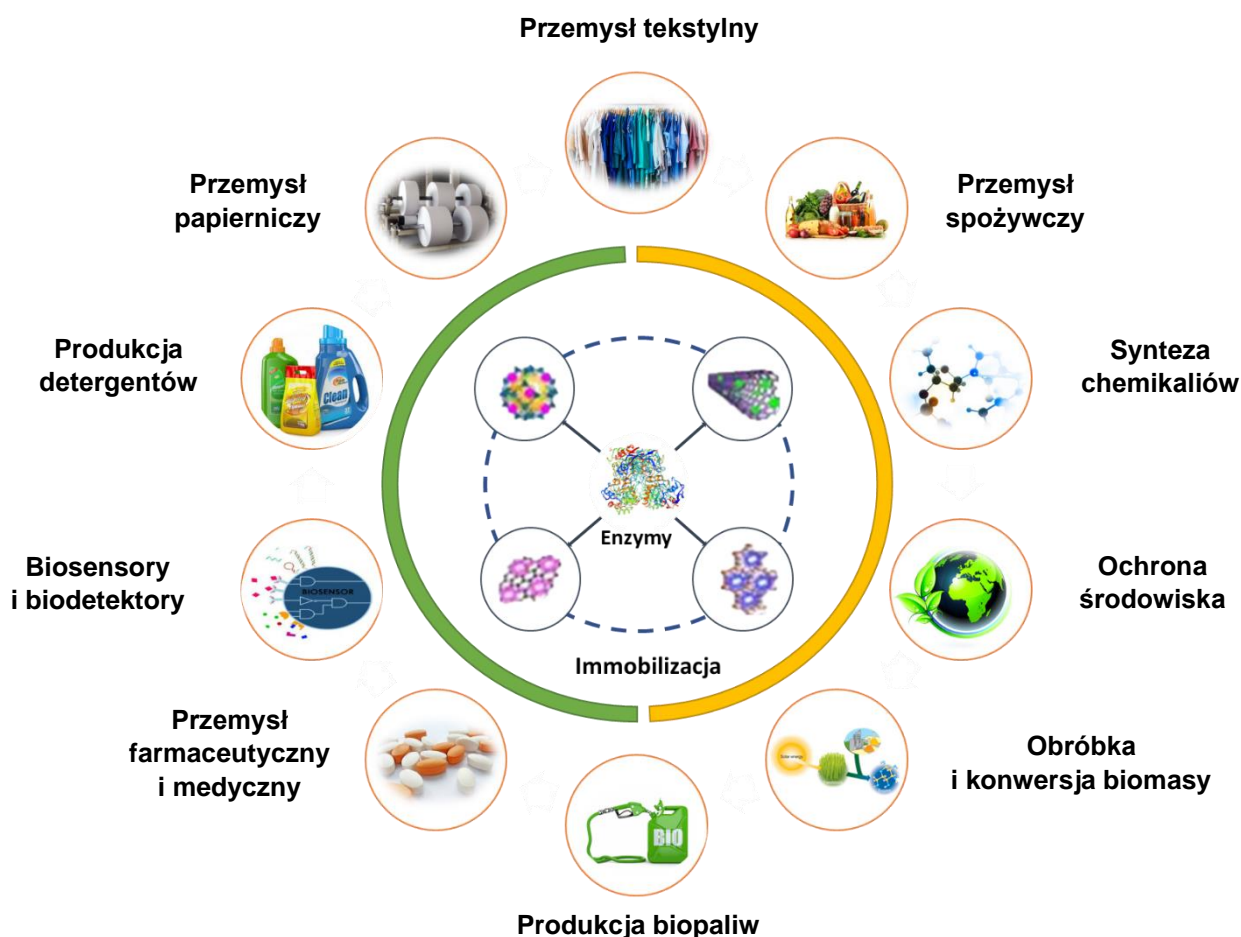


Rys. 1. Schematyczne zaprezentowanie procesu immobilizacji enzymów, na podstawie [4]

Opracowano dotąd kilka technik immobilizacji, takich jak immobilizacja adsorpcyjna, kowalencyjna, czy immobilizacja poprzez pułapkowanie, kapsułkowanie i/lub sieciowanie enzymów. Metody te różnią się od siebie rodzajem związania białka, siłą powstałych oddziaływań, umiejscowieniem cząsteczek enzymu w obrębie nośnika, a także spektrum materiałów, które mogą zostać wykorzystane jako matryce. Mnogość technik unieruchamiania, a zarazem możliwość projektowania typu i siły interakcji enzym - nośnik pozwala na otrzymywanie systemów biokatalitycznych o zdefiniowanych właściwościach i aktywności, co jest kluczowe z punktu widzenia rosnącego zainteresowania omawianymi systemami. Co więcej, oddziaływania pomiędzy nośnikiem i biomolekułami enzymu stabilizują i wzmacniają białkową strukturę biokatalizatorów, co stanowi kolejną zaletę ich immobilizacji, bowiem przyczynia się do znacznej poprawy odporności biokatalizatora w zmiennych warunkach procesowych oraz w środowisku rozpuszczalników organicznych [6,7]. Wytworzenie stabilnych układów immobilizowanych enzymów daje także możliwość realizacji przemian biokatalitycznych w reaktorach okresowych i/lub ciągłych, gdzie silne związanie enzymu oraz odporność układu są kluczowymi parametrami [8]. Zatem dobór odpowiedniej techniki immobilizacji wydaje się być kluczowy pod kątem wytworzenia aktywnych i wysoce stabilnych układów unieruchomionych enzymów, a selekcja optymalnych parametrów immobilizacji nie tylko usprawnia prowadzony proces lecz kształtuje również finalne właściwości wytwarzanych systemów.

Poza techniką immobilizacji, czynnikiem determinującym parametry układów immobilizowanych enzymów, w tym ich stabilność operacyjną, jest także rodzaj zastosowanego nośnika. Materiały klasyfikowane jako nośniki w immobilizacji muszą odznaczać się szeregiem cech, spośród których najważniejsze to dobrze rozwinięta powierzchnia właściwa i struktura porowata, obecność grup funkcyjnych umożliwiających bezpośrednie związanie białka lub efektywną modyfikację powierzchni matrycy, wysokie powinowactwo do białek, stabilność mechaniczna i operacyjna, a także dostępność i relatywnie niski koszt pozyskania [9]. W praktyce wykorzystywane jest bardzo szerokie spektrum materiałów pochodzenia zarówno organicznego, jak i nieorganicznego, w tym przede wszystkim

materiały krzemionkowe, tlenki nieorganiczne, syntetyczne polimery czy biopolimery [10]. Jednak w ostatnich latach coraz większe zainteresowanie, jako nośniki do unieruchamiania enzymów, wzbudzają materiały hybrydowe i kompozytowe. W zależności od potrzeb, materiały tego typu można syntezować różnymi technikami, a rodzaj prekursorów oraz metoda produkcji nośnika kształtują jego finalne właściwości oraz dają możliwość wytworzenia materiału o charakterystyce dopasowanej zarówno do specyfiki unieruchamianego enzymu jak i procesu technologicznego, w którym układ ma być wykorzystany [11]. Jako matryce z powodzeniem mogą być stosowane np. międzytlenkowe układy hybrydowe, materiały biopolimerowe domieszkowane jonami metali i/lub domieszkami nieorganicznymi w celu poprawy właściwości, polimery i kopolimery powstające na drodze syntezy różnych monomerów, a nawet materiały elektroprowadzące powstałe w oparciu o prekursory organiczne i nieorganiczne [12,13]. Szeroka gama dostępnych połączeń umożliwia wytworzenie systemów biokatalitycznych o znacznej stabilności oraz zdefiniowanej aktywności, co jest niezwykle istotne z punktu widzenia zastosowania powstałych układów (Rys. 2).



Rys. 2. Wybrane kierunki zastosowania immobilizowanych enzymów

Dobór nośnika do immobilizacji wybranego enzymu jest kluczowym zagadnieniem, definiującym właściwości unieruchomionego enzymu, wymagającym szczegółowej analizy, a ocena wpływu matrycy na białko katalityczne ciągle nie jest wystarczająco dobrze opisana w literaturze przedmiotu. Niemniej jednak, w oparciu o dostępne dane oraz zebrane doświadczenie, należy jednoznacznie stwierdzić, że

zarówno dobór techniki immobilizacji, jak i rodzaj nośnika, jest kwestią niezwykle indywidualną i uzależnioną zarówno od właściwości unieruchamianego biokatalizatora, jak i warunków procesu, w których powstały układ ma pracować [14]. Stąd też kluczowe wydaje się opisanie właściwości wykorzystywanego nośnika oraz stosowanej techniki immobilizacji pod kątem efektywności działania powstałych systemów biokatalitycznych w zmiennych warunkach procesowych, co w końcowym rozrachunku prowadzi do opracowania uniwersalnych założeń immobilizacji wybranych enzymów. Jednak poza zaawansowaną charakterystyką, najlepszą drogą weryfikacji efektywności systemów unieruchomionych enzymów jest ich wykorzystanie w zróżnicowanej gamie procesów technologicznych i reakcji chemicznych, w tym w procesach szeroko rozumianej obróbki wstępnej biomasy i konwersji jej składników, a także w procesach związanych z ochroną środowiska.

Enzymatyczna obróbka i konwersja biomasy to niezwykle dynamicznie rozwijający się trend badawczo-przemysłowy, którego istotę stanowi wykorzystanie biokatalizatorów, w tym immobilizowanych enzymów, na etapie rozdziału wstępnych składników biomasy, jak i na etapie ich dalszych transformacji do związków o wysokiej wartości przemysłowej i/lub czystości. Problem realizacji obróbki wstępnej biomasy w sposób ekonomicznie opłacalny oraz efektywny stanowi poważne wyzwanie. Efektem zastosowania biokatalizatorów na tym etapie jest możliwość otrzymanie surowca o wysokiej czystości i fragmentacji, co zapewnia wysoką dostępność substratu dla enzymów w dalszych etapach konwersji [15]. Z kolei wykorzystanie immobilizowanych enzymów w reakcjach transformacji składników biomasy, ze względu na wysoką specyficzność i selektywność biokatalizatorów, skutkuje otrzymaniem finalnych produktów o wysokiej czystości, spełniających najwyższe normy m.in. przemysłu kosmetycznego i farmaceutycznego [16]. Ponieważ procesy z udziałem biomasy prowadzone są w skali milionów ton rocznie [17] kluczowym zagadnieniem jest ich aspekt ekonomiczny, uwzględniający głównie koszt biokatalizatora oraz możliwość jego wielokrotnego wykorzystania. Z tego punktu widzenia konieczne jest zastosowanie stabilnych i tanich nośników enzymów, jak i zdefiniowanie ich wpływu na właściwości unieruchomionego biokatalizatora. Dodatkowo istotne wydaje się być zdefiniowanie optymalnych warunków immobilizacji celem wytworzenia układów o wysokiej aktywności do przetestowania w procesach konwersji biomasy z roztworów modelowych, co w konsekwencji może prowadzić do opracowania założeń ich realizacji także w układach rzeczywistych.

Poważne wyzwanie społeczne oraz istotne zagrożenie środowiskowe stanowią również różnego rodzaju odpady i zanieczyszczenia przemysłowe, spośród których warto wspomnieć przede wszystkim o fenolu i jego pochodnych, farmaceutykach, barwnikach, surfaktantach, a nawet białkach [18]. Związki te są trudno usuwalne przez obecnie stosowane techniki, takie jak koagulacja, fotokataliza, adsorpcja, czy metoda osadu czynnego, a ich obecność jest wykrywalna również w odciekach z oczyszczalni ścieków. Ponadto wspomniane metody są czaso- i kosztochłonne oraz generują duże ilości szkodliwych produktów ubocznych i odpadów [19]. Warto także podkreślić, że długotrwały i niekontrolowany kontakt z substancjami stanowiącymi zanieczyszczenia środowiskowe może prowadzić do nieodwracalnych zmian i mutacji obejmujących najważniejsze układy w organizmie człowieka, a także wywoływać trwałe zaburzenia funkcjonowania całych ekosystemów. Istnieje zatem konieczność opracowania efektywnych technik ich remediacji, a coraz częściej do usuwania wspomnianych substancji wykorzystuje się enzymy, głównie z grupy oksydoreduktaz [20].

Zastosowanie białek katalitycznych wydaje się być interesującą alternatywą, która pozwala na usunięcie większości z wyżej zaprezentowanych substancji z wysokimi wydajnościami, a powstające produkty enzymatycznej konwersji charakteryzują się znacznie niższą toksycznością niż związki wyjściowe i można je w stosunkowo łatwy sposób wydzielić z mieszaniny poreakcyjnej [21]. Kluczowe jest zatem wytworzenie systemów biokatalitycznych o wysokiej aktywności i stabilności, poprzez dobór optymalnych parametrów i nośników, a także przetestowanie ich w procesach usuwania zanieczyszczeń realizowanych w szerokim zakresie zmiennych parametrów procesowych takich jak pH, temperatura, stężenie substancji czy ilość katalizatora. Pod tym kątem istotne jest także zdefiniowanie produktów reakcji katalitycznych oraz wskazanie możliwych szlaków prowadzonych przemian w celu zidentyfikowania ograniczeń proponowanych rozwiązań oraz wskazania możliwości ich przewyższenia.

Zebrane i zaprezentowane w monotematycznym cyklu publikacji zagadnienia dotyczące wykorzystania szerokiej gamy nośników do immobilizacji wybranych enzymów, jak i wszechstronna charakterystyka wytworzonych nowatorskich systemów biokatalitycznych w połączeniu ze zdefiniowaniem i opisaniem mechanizmów realizowanych przemian mogą mieć bezpośrednie przełożenie na wzrost ich praktycznego wykorzystania. Co więcej, przetestowanie wytworzonych systemów pod kątem ich zastosowania jako katalizatorów procesów syntezy wartościowych substancji z biomasy oraz jako efektywnych narzędzi katalitycznych do degradacji niebezpiecznych związków wydaje się być niezwykle istotne i może przełożyć się na prowadzenie wspomnianych procesów w sposób bardziej ekonomiczny i przyjazny dla środowiska. Wartym odnotowania jest również fakt, że zebrane zależności pozwoliły na znaczące uzupełnienie istniejącego stanu wiedzy, co wpłynęło także na rozwój dyscypliny naukowej.

4.3. Wykorzystanie immobilizowanych enzymów w procesach konwersji biomasy

Mnogość możliwych do wykorzystania materiałów, a także ich różnorodna charakterystyka powodują, że jednoznaczna ocena przydatności danego nośnika pod kątem immobilizacji wybranego enzymu jest niezwykle utrudniona, a właściwie niemożliwa bez przeprowadzenia szeregu testów i wnikliwej interpretacji uzyskanych danych. Jako matryce wykorzystywana jest dobrze poznana i scharakteryzowana grupa materiałów nieorganicznych oraz polimerowych, które po naniesieniu nowej grupy enzymów mogą w odmienny sposób oddziaływać na właściwości biokatalizatora, niż te opisane dotąd w literaturze. Co więcej, coraz powszechniejsze jest zastosowanie materiałów hybrydowych i/lub kompozytowych jako wysoce wyspecjalizowanych nośników w immobilizacji enzymów [22]. Dodatkowo przy doborze właściwego nośnika należy również pamiętać o zapewnieniu jego obojętności chemicznej oraz braku zakłócania przebiegu reakcji [23]. Stąd konieczność wnikliwej oceny każdego z potencjalnych nośników, pod kątem zastosowania w procesie immobilizacji wydaje się być niezwykle istotna dla właściwej selekcji materiału nośnego.

Biorąc pod uwagę powyższe informacje oraz złożoność procedury wyboru nośnika do unieruchomienia enzymu, jednym z pierwszych, a zarazem najważniejszych aspektów prac nad efektywną immobilizacją biokatalizatorów jest przegląd aktualnego stanu wiedzy uwzględniający przegląd cech, właściwości oraz typów materiałów stosowanych jako nośniki do unieruchamiania

enzymów, co w sposób szczegółowy opisano w pracy **H1**. Stałe udoskonalanie popularnych nośników, jak i dynamiczny rozwój nowych matryc powodują, że koniecznym stało się usystematyzowanie oraz wnikliwe scharakteryzowanie materiałów znajdujących zastosowanie jako matryce w immobilizacji enzymów. Podstawowym założeniem przy selekcji materiałów nośnych jest obecność dużej ilości reaktywnych grup funkcyjnych, głównie hydroksylowych, karboksylowych czy aminowych, umożliwiających efektywne związanie białka oraz zapewniających wysokie powinowactwo do enzymów. Co więcej, nośnik powinien odznaczać się chemiczną i termiczną stabilnością oraz odpornością mechaniczną, być nierozpuszczalny w środowisku reakcji, a także charakteryzować się dużą dostępnością i/lub niskimi kosztami pozyskania ceną syntezy, jak i wykazywać zdolność do regeneracji oraz ponownego wykorzystania (Rys. 3).



Rys. 3. Wybrane cechy materiałów stosowanych jako nośniki w procesie immobilizacji, na podstawie [24]

Celem dokonania przejrzystej klasyfikacji stosowanych obecnie materiałów, w pracy **H1** wprowadzono podział na tzw. Materiały Klasyczne (z ang. *Classic Materials*), obejmujące najpowszechniej stosowane nośniki oraz tzw. Nowe Materiały (z ang. *New Materials*), obejmujące substancje o właściwościach dedykowanych dla immobilizowanych enzymów. Do pierwszej grupy zaliczono matryce nieorganiczne, głównie tlenki metali, minerały oraz materiały węglowe, a także materiały pochodzenia organicznego, w tym przede wszystkim szeroką gamę polimerów, jak i biopolimerów. Materiały te charakteryzują się głównie dużą ilością powierzchniowych grup funkcyjnych oraz stabilnością i odpornością, co jest cechą pożądaną zwłaszcza w procesach długotrwałych. Ich zaletą jest także możliwość przyjmowania różnych kształtów i rozmiarów, co pozytywnie wpływa na potencjał aplikacyjny tworzonych systemów enzymatycznych. O dużej uniwersalności opisanych matryc świadczy przede wszystkim fakt, że z ich udziałem unieruchamiane może być bardzo wiele różnych enzymów, jednak przewagę stanowią enzymy z grupy hydrolaz. W drugiej grupie materiałów sklasyfikowano przede wszystkim materiały hybrydowe powstałe na skutek połączenia prekursorów różnego pochodzenia, a także materiały nieorganiczne o zdefiniowanych

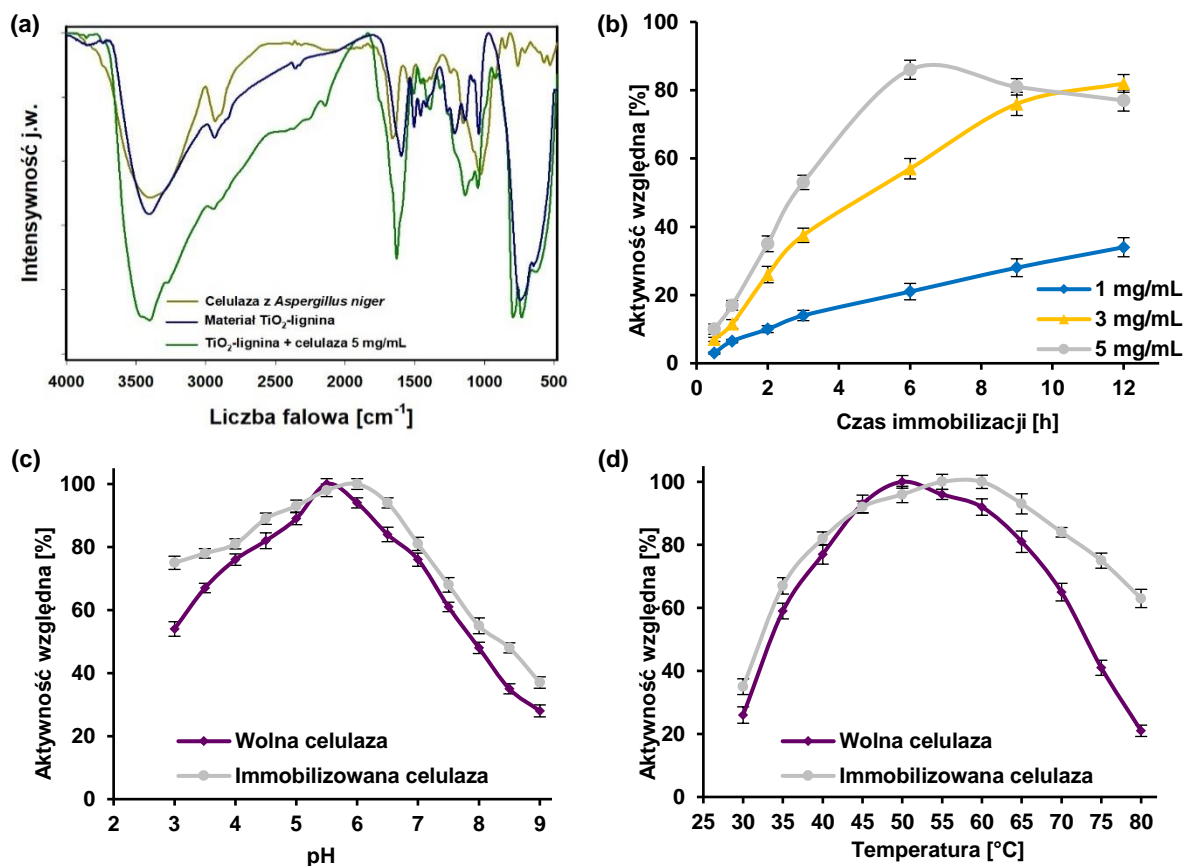
właściwościach, jak np. magnetyczne nanocząstki, materiały mezoporowate czy nanocząstki. Co więcej, do tej grupy należy zaliczyć także materiały polimerowe, formowane w zdefiniowany sposób, jak np. materiały elektroprzędzone czy polimerowe membrany o określonej wielkości porów. Największą zaletą tej grupy nośników jest możliwość wytworzenia i zastosowania materiałów o zdefiniowanej morfologii i porowatości, a także wielkości cząstek, z obecnością w ich strukturze grup funkcyjnych wykazujących istotne powinowactwo do osadzanego enzymu. Stąd przy zastosowaniu substancji z grupy „Nowych Materiałów”, kontrola procesu technologicznego ulega znacznej poprawie, immobilizowane enzymy wykazują zwiększoną skuteczność katalityczną, a czystość i jakość produktów reakcji wzrasta w zdecydowanej większości przypadków w porównaniu z procesami katalizowanymi przez enzymy immobilizowane na związkach z grupy „Materiałów Klasycznych”. Kluczowym etapem każdego skutecznego procesu immobilizacji jest wytworzenie stabilnych oddziaływań enzym - nośnik i powstanie aktywnego systemu biokatalitycznego. Jest to możliwe dzięki odpowiedniemu doborowi matrycy, a wnikliwa charakterystyka materiałów jest do tego niezbędnym krokiem. Co więcej, jasne sklasyfikowanie i szczegółowe opisanie szerokiego spektrum związków, wraz ze wskazaniem przykładów konkretnych enzymów oraz procesów technologicznych w znacznym stopniu może ułatwić dobór odpowiedniego nośnika. Świadomy wybór matrycy ma bowiem bezpośrednie przełożenie na finalne właściwości układów immobilizowanych biokatalizatorów i możliwość praktycznego wykorzystania powstałych systemów. Zebrane dane pozwoliły ponadto na zaproponowanie nowych układów katalitycznych do wykorzystania w procesach wstępnej obróbki biomasy.

Rozwój technologii, w tym ulepszanie stosowanych już rozwiązań wymaga nie tylko zaawansowanej aparatury, lecz także wykorzystania wydajnych i specjalistycznych narzędzi o zdefiniowanych właściwościach i charakterystyce. Obserwowane jest to między innymi w procesach obróbki wstępnej oraz konwersji biomasy, a więc procesach o dużym znaczeniu, których efektywna realizacja dostarcza produktów i substancji znajdujących szerokie praktyczne wykorzystanie w różnych dziedzinach nauki, przemysłu i życia codziennego. Obecnie wstępną obróbkę biomasy prowadzi się z wykorzystaniem kilku technik, które najogólniej podzielić można na metody fizyczne (np. mielenie, zagęszczanie, toryfikacja) metody chemiczne (np. działanie kwasami, zasadami czy parą wodną (z ang. *steam explosion*), a także biologiczne [25]. Zwłaszcza te ostatnie wzbudzają szczególne zainteresowanie ze względu na zapewnienie wysokiego stopnia depolimeryzacji wyjściowego surowca i otrzymanie prostych aczkolwiek wartościowych związków, stanowiących substraty do dalszych przemian [26]. Metody te opierają się głównie na wykorzystaniu mikroorganizmów, a także wolnych oraz immobilizowanych enzymów. Na tym etapie szczególne zainteresowanie wzbudzają enzymy z grupy hydrolaz, jak np. celulazy, amylazy czy glukozydazy, a także wybrane oksydoreduktazy, m.in. lakaza, peroksydaza ligninowa czy peroksydaza manganowa [27]. Enzymy te umożliwiają efektywną obróbkę biomasy i jej fragmentację, jednak poważny problem stanowi ich oddzielenie od mieszaniny poreakcyjnej oraz ograniczona możliwość wielokrotnego użycia. Należy również pamiętać, że docelowo przemiany te mają być realizowane w skali przemysłowej, co powoduje, że niezwykle istotny jest aspekt ekonomiczny procesu uwzględniający głównie koszty katalizatora, okres jego żywotności czy czystość produktów. Atrakcyjne pod tym względem mogą być immobilizowane enzymy, a zwłaszcza wysoce

stabilne układy wytworzone w relatywnie prosty sposób z wykorzystaniem funkcjonalnych nośników. Zagadnienie to poddano wnikliwej analizie, czego następstwem jest opublikowany artykuł naukowy **H2**.

W pracy tej wykorzystano celulazę pozyskaną z grzyba *Aspergillus niger*, jako enzym zdolny do depolimeryzacji celulozy na drodze jej hydrolitycznego rozkładu. Ze względu na fakt szerokiego wykorzystania celulaz, które poza procesami obróbki wstępnej biomasy są stosowane również w branży papierniczej, tekstylnej, spożywczej czy w procesach fermentacji, niezbędnym jest opracowanie efektywnych układów immobilizowanej celulazy. Celem wytworzenia wielopunktowych oddziaływań enzym - nośnik, przy jednoczesnym jak największym uproszczeniu samej procedury immobilizacji, jako nośnik wykorzystano materiał hybrydowy tlenek tytanu(IV) - lignina. Materiał ten charakteryzuje się relatywnie wysoką stabilnością i odpornością, co zapewnia TiO_2 , a czego potwierdzeniem są rezultaty analizy termogravimetrycznej wskazujące na nieznaczny ubytek masy nośnika nawet w wysokich temperaturach. Materiał TiO_2 - lignina odznacza się także obecnością w swojej strukturze reaktywnych grup funkcyjnych, wchodzących w skład ligniny, co wpływa na efektywne związanie białka na drodze prostej adsorpcji. W oparciu o analizę widm FTIR w układzie po immobilizacji potwierdzono obecność wiązań amidowych I oraz amidowych II, charakterystycznych dla struktury enzymu, co jednoznacznie wskazuje na skuteczność zaproponowanej techniki immobilizacji celulazy (Rys 4a). Co więcej, odnotowano ponad 20-proc. obniżenie wartości parametrów struktury porowatej analizowanych materiałów po immobilizacji celulazy, wskazujący na unieruchomienie znacznych ilości biokatalizatora. Jednym z najważniejszych analizowanych aspektów było określenie wpływu czasu immobilizacji oraz początkowego stężenia enzymu na ilość unieruchomionego białka oraz zachowaną aktywność katalityczną, które są niezwykle istotnymi cechami projektowanych układów biokatalitycznych (Rys. 4b). Wykazano, że wraz ze wzrostem początkowej ilości enzymu oraz wydłużając czas immobilizacji, możliwe jest osadzenie coraz większych ilości biokatalizatora, a maksimum wynoszące 76 mg enzymu na 1 g nośnika uzyskano po 12 h immobilizacji prowadząc proces z roztworu celulazy o stężeniu 5 mg/mL. Zaobserwowano jednak, że preparat enzymatyczny otrzymany w tych warunkach zachował tylko ok. 75% maksymalnej aktywności katalitycznej. Jest to najprawdopodobniej związane z nagromadzeniem zbyt dużej ilości cząsteczek biokatalizatora na powierzchni nośnika co prowadzi do lokalnych przeładowań, blokowania miejsc aktywnych i w konsekwencji spadku jego aktywności katalitycznej. Jako optymalne warunki procesu immobilizacji celulazy na powierzchni matrycy tlenek tytanu(IV) - lignina wskazano roztwór białka o stężeniu 5 mg/mL oraz 6 h trwania procesu, bowiem układy biokatalityczne otrzymane w tych warunkach charakteryzowały się zachowaniem 100% początkowej aktywności. Weryfikację stabilności wiązań enzym - nośnik przeprowadzono w oparciu o testy desorpcji enzymu z użyciem Tritonu X-100 oraz roztworów NaCl o różnym stężeniu. Uzyskane zależności wskazują, że niezależnie od czynnika wymywającego, obserwowany jest częściowy spadek aktywności immobilizowanych enzymów. Ma to związek z częściowym wymyciem biokatalizatora z powierzchni matrycy, co jest następstwem wytworzenia głównie oddziaływań jonowych i elektrostatycznych podczas procesu immobilizacji. Rezultaty analizy potencjału elektrokinetycznego hybrydy TiO_2 - lignina wskazują, że w całym analizowanym zakresie pH przyjmuje on negatywne wartości, co sprzyja powstaniu głównie jonowych oddziaływań enzym - nośnik. Ze względu na fakt, że celulaza posiada swój punkt izoelektryczny w pH ok. 5, prowadzenie immobilizacji w buforze octanowym

o pH 5 skutkuje protonizacją aminowych grup funkcyjnych obecnych w jej strukturze. Niemniej jednak, z punktu widzenia wykorzystania układów po immobilizacji, kluczowe jest zdefiniowanie ich stabilności w zróżnicowanych warunkach procesowych.



Rys. 4. Widma FTIR materiału TiO₂ – lignina przed i po immobilizacji celulozy (a), wpływ: czasu immobilizacji oraz stężenia roztworu enzymu (b), pH (c) oraz temperatury (d) na aktywność wytworzonych układów immobilizowanych enzymów

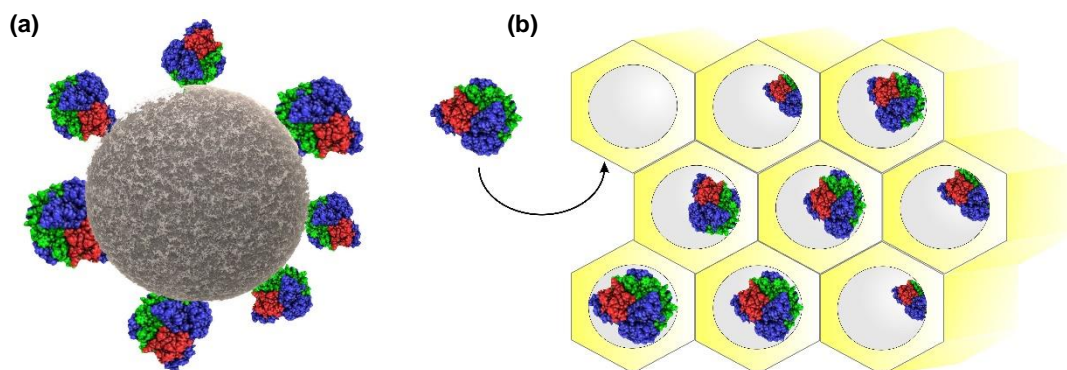
Ochronny efekt zaproponowanego nośnika został potwierdzony rezultatami obrazującymi wpływ pH oraz temperatury (Rys. 4c i 4d), jak i czasu inkubacji na aktywność immobilizowanej celulozy. Odnotowano bowiem zachowanie wyższej aktywności katalitycznej przez unieruchomiony enzym w szerszym zakresie pH (ponad 80% aktywności w zakresie pH 4–7) i temperatury (ponad 80% aktywności w zakresie temperatury 40–70 °C) niż wolny enzym. Dodatkowo immobilizowana celuloza zachowała ponad 70-proc. aktywność po 3 h inkubacji w warunkach procesowych (pH 5, temperatura 50 °C), podczas gdy wolny enzym w tych samych warunkach zachował mniej niż 30% początkowych właściwości. Znacząca poprawa stabilności oraz rozszerzenie zakresu operacyjnego unieruchomionego enzymu są związane przede wszystkim ze stabilizującym wpływem matrycy na cząsteczki biokatalizatora, co zapobiega dysocjacji podjednostek enzymu i w efekcie zmniejsza denaturację białka wywołaną przez warunki reakcyjne. Na stabilizujący wpływ nośnika wskazują także rezultaty testów stabilności, które dowiodły, że unieruchomiona celuloza zachowuje ponad 90-proc. aktywność po przechowywaniu w temperaturze 4 °C przez 30 dni. Dodatkowo wykazano, że po 10 następujących po sobie cyklach degradacji celulozy wykorzystany system biokatalityczny zachował ok. 90% początkowej aktywności. Jest to następstwo związania enzymu z powierzchnią nośnika

i wprowadzenia dodatkowego zewnętrznego szkieletu, który zapobiega zmianom konformacyjnym w obrębie cząsteczek biokatalizatora. Uzyskane zależności wskazują, że wybór materiału hybrydowego TiO₂ - lignina do immobilizacji celulazy okazał się słuszny, a dobór warunków procesu immobilizacji pozwolił na uzyskanie preparatów o wysokiej aktywności katalitycznej. Wykazano również znaczną poprawę stabilności i możliwość wielokrotnego wykorzystania wytworzonych preparatów immobilizowanej celulazy, co może w przyszłości przełożyć się na praktyczne wykorzystanie otrzymanych układów. Warty odnotowania jest fakt, że zdefiniowanie i opisanie otrzymanych zależności może znaleźć bezpośrednie przełożenie na wykorzystanie zaproponowanego nośnika także w immobilizacji innych enzymów.

Ideę badań nad doбором nośnika w immobilizacji enzymów do wykorzystania w procesach konwersji biomasy kontynuowano z wykorzystaniem enzymów mogących znaleźć zastosowanie w reakcjach transformacji cukrów pozyskanych z biomasy do bardziej wartościowych związków, co zaprezentowano w pracach **H3** i **H4**. W procesach obróbki największą rolę odgrywają enzymy z grupy hydrolaz, natomiast w procesach dalszej konwersji powstałych związków najważniejsze są dehydrogenazy, hydroksylazy czy peroksydazy, a więc biokatalizatory z grupy oksydoreduktaz. Enzymatyczna konwersja składników biomasy przez rozpuszczalne i/lub immobilizowane enzymy rysuje się jako obiecujące podejście w zrównoważonej produkcji wartościowych związków chemicznych w łagodnych warunkach procesowych [28]. Dodatkowo oprócz transformacji substratów powstałych po obróbce wstępnej, konwersja enzymatyczna ułatwia późniejsze oddzielenie produktów reakcji, na przykład przy użyciu separacji membranowej [29]. Ze względu na przemysłowe znaczenie finalnych produktów przemian, dużym zainteresowaniem naukowym cieszą się procesy konwersji monosacharydów, głównie przy użyciu szerokiego spektrum dehydrogenaz. Powstałe związki znajdują wykorzystanie w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym czy rolnym, a nawet w medycynie [30]. Jednak biorąc pod uwagę wielkotonażową produkcję wspomnianych związków, stosowane układy katalityczne muszą charakteryzować się dużą stabilnością oraz długą aktywnością, a koszt ich wytworzenia musi być relatywnie niski. Dlatego też interesującym nośnikiem dla enzymów z grupy dehydrogenaz wydają się być materiały krzemionkowe, ze względu na ich niską cenę, wysokie powinowactwo do enzymów oraz dużą odporność. Należy również podkreślić mocno ograniczoną ilość prac naukowych dotyczących wykorzystania krzemionek w immobilizacji dehydrogenaz stosowanych w konwersji monosacharydów.

W zaprezentowany powyżej nurt badawczy wpisują się prace badawcze dotyczące immobilizacji dehydrogenazy glukozowej (GDH) lub dehydrogenazy ksylozowej (XDH) z wykorzystaniem nanocząstek krzemionki oraz mezoporowatej krzemionki SBA 15 i opisanie wpływu nośnika oraz miejsca unieruchomienia enzymu na właściwości powstałego preparatu po immobilizacji (praca **H3**). W badaniach wykorzystano matryce krzemionkowe o odmiennej morfologii i charakterystyce, i potwierdzono ich dobre właściwości sorpcyjne w oparciu o rezultaty wydajności procesu immobilizacji obu enzymów, która w przypadku nanometrycznej krzemionki wyniosła ponad 90%, a w przypadku materiału mezoporowatego przekroczyła 75%. W oparciu o zdjęcia z transmisyjnego mikroskopu elektronowego potwierdzono, że w przypadku nanocząstek enzym unieruchomiony jest na powierzchni nośnika, podczas gdy heksagonalny układ porów mezoporowatej krzemionki SBA 15 o wielkości blisko

20 nm umożliwia osadzenie enzymu również w ich wnętrzu, co było niezwykle istotną obserwacją i determinowało rezultaty związane z aktywnością i stabilnością unieruchomionych enzymów (Rys. 5).



Rys. 5. Schematyczne zaprezentowanie procesu immobilizacji dehydrogenazy glukozowej i/lub dehydrogenazy ksylozowej: na powierzchni nanocząstek krzemionki (a), we wnętrzu porów mezoporowatej krzemionki SBA 15 (b)

Warto podkreślić, że wyższą aktywnością katalityczną charakteryzowały się preparaty powstałe po immobilizacji GDH lub XDH na powierzchni nanometrycznej krzemionki. Niższa aktywność systemów biokatalitycznych powstałych w oparciu o krzemionkę SBA 15 jest związana z kilkoma czynnikami, wśród których najważniejsze to niższa ilość unieruchomionego enzymu, a także gorsza dostępność miejsc aktywnych biokatalizatorów dla substratów reakcji, ze względu na osadzenie biomolekuł głównie w porach matrycy. Należy także dodać, że niezależnie od zastosowanego nośnika, lepsze właściwości katalityczne zachowała dehydrogenaza glukozowa. Powstanie ograniczeń w transporcie substratów i produktów znajduje swoje odzwierciedlenie także w wartościach parametrów kinetycznych immobilizowanych enzymów, które obliczono zgodnie z modelem kinetycznym zaproponowanym przez L. Michaelis i M. Menten (Tabela 1). Zaobserwowano bowiem wyższe o ponad 30% wartości stałej Michaelis-Menten (K_M) dla obu dehydrogenaz immobilizowanych z wykorzystaniem mezoporowatej krzemionki, w porównaniu do enzymów unieruchomionych na nanometrycznym nośniku, co jednoznacznie wskazuje na niższe powinowactwo enzymu do substratu będące następstwem powstania oporów dyfuzyjnych. Konsekwencją jest znaczny, ponad 20-proc. spadek maksymalnej szybkości reakcji (V_{max}) katalizowanych przez systemy powstałe w oparciu o materiał SBA 15. Ciekawą obserwacją stanowi jednak fakt, że w przypadku immobilizowanych enzymów, w porównaniu z ich wolnymi odpowiednikami, niemalże niezmienna pozostała wartość tzw. ilości obrotów katalizatora (z ang. *turnover number*, k_{cat}), co wskazuje, że struktura enzymu nie została w znacznym stopniu naruszona na skutek immobilizacji i potwierdza głównie adsorpcyjny charakter powstałych oddziaływań.

Tabela 1. Wartości parametrów kinetycznych wolnych oraz immobilizowanych na materiałach krzemionkowych dehydrogenazy glukozowej i dehydrogenazy ksylozowej

Analizowany parametr	wolna GDH	nanoSiO ₂ GDH	SBA15 GDH	wolna XDH	nanoSiO ₂ XDH	SBA15 XDH
K_M [mM]	16,1	21,8	28,7	0,31	0,34	0,45
V_{max}	7,7 U/mg	5,1 U/mg	4,1 U/mg	0,81 U/mL	0,70 U/mg	0,64 U/mg
k_{cat} [1/s]	79	77	75	27	21	19
k_{cat}/K_M [1/s*mM]	4,9	3,5	2,6	87,1	61,7	42,2

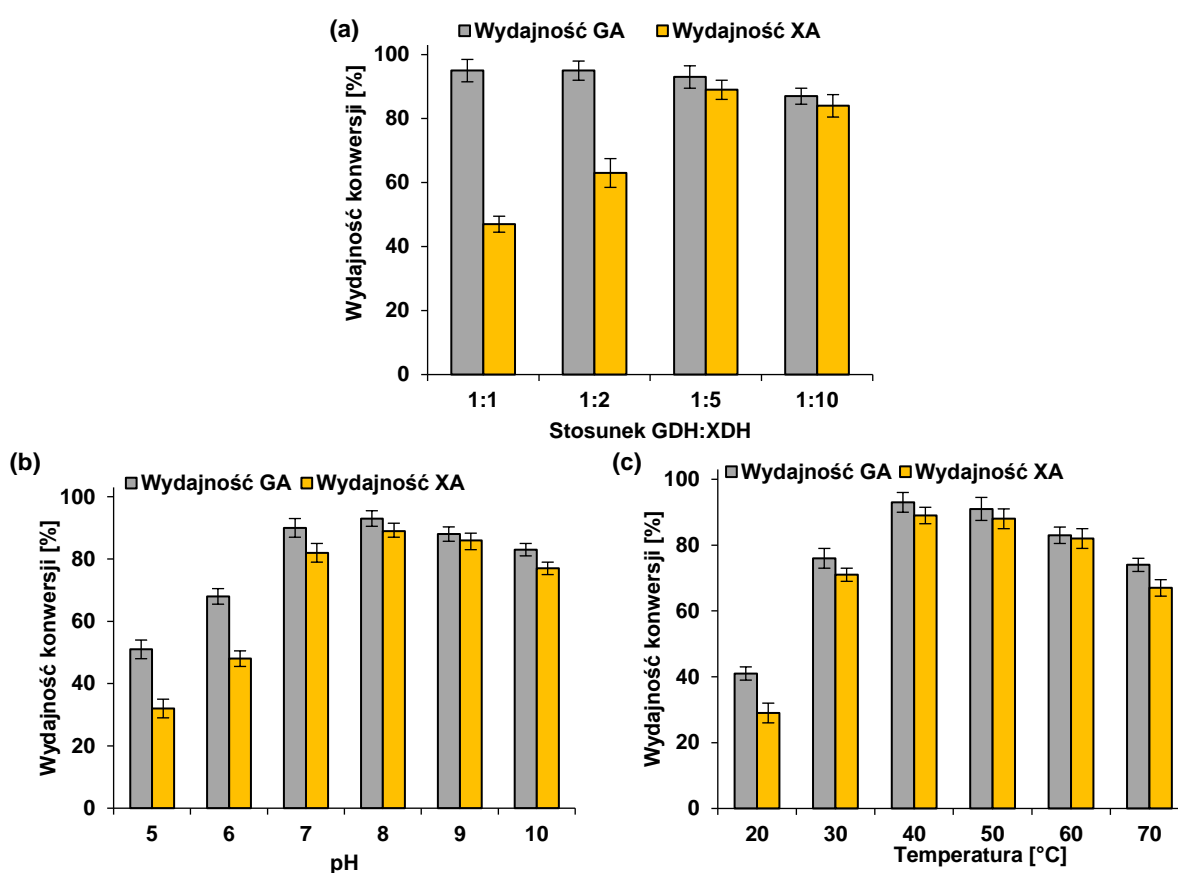
Do weryfikacji efektywności i stabilności wytworzonych układów wykorzystano modelowe reakcje konwersji D-glukozy oraz D-ksylozy w zmiennych warunkach reakcyjnych. Wykorzystanie nanometrycznej, jak i mezoporowatej krzemionki jako matrycy pozwala na poprawę odporności obu enzymów na działanie temperatury oraz pH. Chociaż zarówno wolne jak i immobilizowane GDH i XDH wykazują podobne profile w zależności aktywności od wspomnianych parametrów, to odnotować można o około 20–30% wyższą aktywność unieruchomionych enzymów w porównaniu do wolnego biokatalizatora. Widać to wyraźnie zwłaszcza w pH zasadowym oraz w temperaturze powyżej 45 °C, a więc w warunkach, w których dochodzi do gwałtownej denaturacji wolnych białek. Jest to bezpośrednio związane ze stabilizacją struktury enzymu, która ma miejsce w wyniku związania biokatalizatora z nośnikiem, a wyższą aktywność obserwowaną w przypadku układów powstałych na bazie krzemionki SBA 15 można wytłumaczyć dodatkową ochroną biomolekuł przed negatywnym działaniem warunków procesowych, ze względu na ich lokowanie wewnątrz porów matrycy. W wyniku unieruchomienia znacznej poprawie uległa też odporność białka na denaturację wywołaną długotrwałą inkubacją w warunkach procesowych. Po czterech godzinach inkubacji, GDH oraz XDH immobilizowane na materiale SBA 15 zachowały ok. 30% początkowej aktywności. Koresponduje to z wartościami okresu półtrwania enzymu (z ang. *half-life time*) oraz stałej inaktywacji białka (z ang. *inactivation constant*), które w przypadku wspomnianych układów po immobilizacji, odpowiednio, wzrosły ok. 7 razy i spadły ok. 4 razy. Fakt ten potwierdza znaczący wpływ materiałów krzemionkowych na stabilność enzymów oraz istotność doboru odpowiedniego nośnika, nawet spośród materiałów tego samego rodzaju. Zależności uzyskane w oparciu o modelowe reakcje mogą być z powodzeniem wykorzystane do opisu i przeprowadzenia procesów realizowanych w oparciu o roztwory rzeczywiste. W kolejnym etapie badań układy wolnej oraz immobilizowanej dehydrogenazy glukozowej oraz dehydrogenazy ksylozowej przetestowano w reakcjach konwersji D-glukozy do kwasu glukonowego i D-ksylozy do kwasu ksylonowego, prowadzonych z rzeczywistego roztworu biomasy zawierającego poza ksylozą i glukozą także inne monosacharydy oraz inhibitory enzymatyczne takie jak pochodne furanu czy kwasy organiczne. Podczas gdy wolne białka pozwalają na konwersję ok. 60% glukozy i ponad 50% ksylozy do odpowiednich kwasów, w przypadku immobilizowanych enzymów uzyskano niższe wydajności konwersji: dla GDH immobilizowanej na nanometrycznej krzemionce było to ok. 50%, a w przypadku immobilizacji na krzemionce SBA 15 wydajność konwersji glukozy wyniosła 45%. Odnotowane rezultaty konwersji ksylozy przez immobilizowaną XDH były jeszcze niższe i mieściły się w granicach 30–40%. Takie rezultaty wskazują na bezpośredni związek aktywności katalitycznej

układów po immobilizacji oraz wydajności prowadzonej przemiany. Należy jednak podkreślić, że ok. 50-proc. wydajności prowadzonych procesów należy uznać za zadowalające, bowiem zastosowany roztwór biomasy pochodził bezpośrednio z obróbki wstępnej i nie był w żaden sposób oczyszczany. Co więcej, niepełna konwersja monosacharydów jest kompensowana przez wydłużoną aktywność oraz możliwość wielokrotnego wykorzystania immobilizowanych biokatalizatorów. Wykazano również, że wolne enzymy po 3 cyklach reakcyjnych zachowały mniej niż 20% początkowej aktywności, podczas gdy unieruchomione białka, wykazały ok. 40-proc. aktywność. Istotną obserwacją stanowi również fakt, że XDH oraz GDH unieruchomione na krzemionce SBA 15 utrzymały lepsze właściwości katalityczne, co koresponduje z wcześniej poczynionymi obserwacjami i dowodzi, że enzymy unieruchomione wewnątrz nośnika wykazują wyższą aktywność i stabilność w dłuższym okresie. Konsekwencją tego jest znacznie wyższa produktywność biokatalityczna unieruchomionych enzymów, która była o ponad 50% wyższa niż w przypadku ich wolnych odpowiedników. Uzyskane zależności potwierdziły, że morfologia nośnika oraz miejsce osadzenia enzymu mają znaczący wpływ na końcowe właściwości systemu biokatalitycznego. Dowiedziono także, że materiały krzemionkowe mogą zostać z powodzeniem stosowane jako nośniki w procesie immobilizacji dehydrogenaz. Relatywnie wysoka efektywność oraz możliwość wielokrotnego wykorzystania unieruchomionych enzymów pozwala wnioskować o potencjalnym, praktycznym wykorzystaniu opracowanych systemów, a także wdrożeniu zaproponowanych procedur.

Kontynuacją nurtu zainicjowanego w opisanych wcześniej pracach, były badania związane z koimmobilizacją dehydrogenazy glukozowej oraz dehydrogenazy ksylozowej, dla których inspirację stanowiła chęć poprawy stopnia konwersji monosacharydów do odpowiednich cukrów. Rezultaty przeprowadzonych badań oraz otrzymane zależności przedstawiono w pracy **H4**. Idea koimmobilizacji enzymów opiera się na jednoczesnym unieruchomieniu dwóch lub więcej różnych enzymów w celu sprawniejszej realizacji procesów technologicznych [31]. Funkcje białek oraz produkty katalizowanych reakcji mogą być względem siebie komplementarne lub tworzyć tzw. kaskadę enzymatyczną, gdzie produkt jednej przemiany jest substratem dla kolejnego biokatalizatora [32]. Z tego względu jednym z największych wyzwań przy projektowaniu procesu koimmobilizacji jest dobranie odpowiedniego stosunku enzymów, aby umożliwić efektywne działanie całego układu. Poza tym swoistą trudność stanowi wyznaczenie optymalnych warunków procesowych dla koimmobilizowanych białek, co uwydatnia się zwłaszcza w przypadku białek z różnych grup katalitycznych wykazujących maksimum aktywności w różnych wartościach pH i temperatury [33]. Warto również dodać, że choć proces koimmobilizacji jest coraz powszechniej stosowany, właściwie brak jest doniesień literaturowych o koimmobilizacji dehydrogenaz do wykorzystania w procesie konwersji monosacharydów.

Hipoteza badawcza pracy **H4** opiera się na założeniu, że koimmobilizowane GDH i XDH są w stanie efektywnie katalizować jednoczesną konwersję glukozy i ksylozy do odpowiadających im kwasów. Jako nośnik wykorzystano scharakteryzowaną i opisaną na wcześniejszym etapie prac mezoporowatą krzemionkę typu SBA 15, ze względu na zapewnienie ochrony dla koimmobilizowanych enzymów. W oparciu o rezultaty transmisyjnej mikroskopii elektronowej oraz widma spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera potwierdzono efektywną koimmobilizację białek, a dodatkowym faktem wskazującym na osadzenie enzymów na powierzchni nośnika, jak i we wnętrzu

jego porów jest obniżenie wartości wszystkich analizowanych parametrów struktury porowatej. Jednak z punktu widzenia efektywności działania enzymów, kluczowe jest określenie optymalnego stosunku koimmobilizowanych enzymów (Rys. 6a). Przetestowano szeroki zakres stosunków ilości GDH do XDH (1:1, 1:2, 1:5, 1:10), a przewaga ilości XDH w analizowanym układzie wynika z wyższej zawartości ksylozy w biomacie, w porównaniu do ilości glukozy. Zwiększenie udziału dehydrogenazy ksylozowej skutkowało wzrostem wydajności produkcji kwasu ksyłonowego, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej efektywności otrzymywania kwasu glukonowego, na poziomie ok. 90%. Przy stosunku ilościowym GDH do XDH 1:5, efektywność produkcji kwasu glukonowego oraz ksyłonowego wyniosła odpowiednio 93% oraz 89%. Dalsze zwiększanie udziału dehydrogenazy ksylozy (stosunek 1:10) skutkowało obniżeniem efektywności procesu w stosunku do obu substratów, ze względu na zbyt duże nagromadzenie cząsteczek enzymu.



Rys. 6. Wpływ stosunku GDH do XDH (a), pH (b) oraz temperatury (c) na wydajność jednoczesnej konwersji glukozy do kwasu glukonowego (GA) i ksylozy do kwasu ksyłonowego (XA)

W następnym etapie analizy wytworzonego układu zdefiniowano wpływ czasu na zmiany stężenia glukozy oraz ksylozy. Wykazano, że unieruchomione enzymy charakteryzują się wysoką aktywnością i dużą szybkością działania, bowiem już po 30 min prowadzenia procesu wydajność konwersji obu substratów przekraczała 80%, by osiągnąć maksymalne wartości po 60 min trwania reakcji. Poza selekcją odpowiedniego stosunku koimmobilizowanych enzymów, parametrami determinującymi wydajność procesów katalizowanych enzymatycznie są również pH i temperatura. pH biomasy po obróbce wstępnej zmienia się i może przyjmować odczyn zarówno zasadowy, jak i silnie kwaśny. Co

więcej, koimmobilizowane enzymy zazwyczaj wykazują różne optymalne wartości pH i temperatury. Uzyskane zależności wskazują, że unieruchomione GDH i XDH wykazują optimum działania w pH 8 (Rys. 6b) i temperaturze 40 °C (Rys. 6c). Oba biokatalizatory odznaczają się zachowaniem wysokiej aktywności i umożliwiają ponad 80-proc. konwersję zarówno ksylozy jak i glukozy w szerokim zakresie pH od 7 do 10 i temperatury od 40 do 60 °C. Dane te potwierdzają poczynione wcześniej obserwacje związane z ochronnym działaniem matrycy krzemionkowej SBA 15 na strukturę enzymu oraz wskazują, że wykorzystana matryca może być również z powodzeniem stosowana nie tylko w immobilizacji pojedynczych enzymów, lecz także w koimmobilizacji biokatalizatorów. Znacząca stabilność koimmobilizowanych dehydrogenaz znajduje swoje odzwierciedlenie także w rezultatach testów stabilności podczas inkubacji w warunkach reakcyjnych oraz podczas magazynowania. Wykazano, że oba unieruchomione biokatalizatory zachowują ponad 80% początkowych właściwości po 120 min inkubacji w pH 8 i temperaturze 40 °C oraz po 20 dniach przechowywania w temperaturze 4 °C, co stanowi o ponad 30% wyższe wartości niż w przypadku wolnych białek. Jak już wspomniano wysoka stabilność jest związana przede wszystkim z faktem osadzenia enzymów w porach nośnika, co chroni enzym przed denaturacją. Jednak fakt braku ingerencji w strukturę enzymu podczas immobilizacji oraz jej dodatkowego zabezpieczenia nie może zostać pominięty. O wysokim potencjale wytworzonych układów świadczy też relatywnie duża możliwość ich wielokrotnego wykorzystania, bowiem nawet po sześciu następujących po sobie cyklach konwersji, ponad 80% glukozy i ksylozy zostało przekształconych. Jest to niezwykle istotne, bowiem może ułatwić obniżenie kosztów prowadzonych przemian związanych z zakupem nowych porcji biokatalizatorów, co jest jednym z najistotniejszych czynników wpływających na ekonomię procesu. Zebrane dane jednoznacznie wskazują, że proces koimmobilizacji enzymów może stanowić interesujące rozwiązanie w procesach konwersji wybranych składników masy poprzez wykorzystanie możliwości jednoczesnej przemiany wielu składników. Co więcej, dowiedziono, że mezoporowata krzemionka SBA 15 może z powodzeniem być wykorzystana do koimmobilizacji enzymów sprzyjając zachowaniu wysokiej aktywności przez unieruchomione białka, co może znaleźć swoje odzwierciedlenie w praktycznym zastosowaniu opracowanych układów, o czym świadczy także fakt, że zaproponowana metoda koimmobilizacji enzymów jest prosta i tania.

Analiza informacji zebranych i zaprezentowanych w pracach **H1–H4** dowodzi znacznej różnorodności materiałów, które mogą być stosowane jako nośniki w procesie immobilizacji enzymów, a także wskazuje na duży wpływ właściwości nośnika na charakterystykę systemów po immobilizacji. Efektem zaproponowanych technik wytwarzania immobilizowanych enzymów są wysoce aktywne oraz stabilne układy biokatalityczne mogące znaleźć zastosowanie w procesach obróbki wstępnej oraz konwersji składników biomasy. Dowiedziono także, że jedną z metod usprawniających działanie systemów enzymatycznych jest ich koimmobilizacja, czego efektem jest powstanie multifunkcyjnych układów immobilizowanych biokatalizatorów. Zaproponowane procedury immobilizacji enzymów prowadzą do powstania systemów biokatalitycznych o zdefiniowanych parametrach, których efektywność potwierdzono w testach z wykorzystaniem układów modelowych oraz rzeczywistych. Co więcej, uzyskane zależności wskazują także, że zaproponowana metodyka wytwarzania

unieruchomionych enzymów może mieć uniwersalne zastosowanie, także do osadzania enzymów z innych grup katalitycznych.

4.4. Wykorzystanie immobilizowanych enzymów w usuwaniu wybranych zanieczyszczeń środowiskowych

W ostatnich dziesięcioleciach odnotowano znaczny wzrost globalnej konsumpcji, który jest wynikiem stale rosnącej światowej populacji. Trend ten znajduje swoje odzwierciedlenie także we wzroście ilości dóbr i usług, które są produkowane i używane. Należy jednak pamiętać, że do wytwarzania wielu spośród tych produktów używa się znacznych ilości chemikaliów, w tym barwników, substancji farmaceutycznie aktywnych, fenoli, bisfenoli, a także innych substancji jak np. surfaktanty czy substancje pochodzenia białkowego [34]. Związki te zazwyczaj nie są w pełni wykorzystywane na etapie produkcji ani przekształcane przez organizmy żywe, dlatego wraz ze ściekami przemysłowymi, odciekami z gospodarstw domowych oraz rolnych, czy szpitali mogą przedostawać się do wód pitnych i gruntowych. Należy podkreślić, że związki te klasyfikowane są jako „występujące zanieczyszczenia” (z ang. *emerging contaminants, EC*), a długotrwały i niekontrolowany kontakt z tego typu substancjami może prowadzić do poważnych zaburzeń, mutacji oraz chorób organizmów żywych, a także negatywnie wpływać na ekosystemy wodne [35]. Stosowane na szeroką skalę klasyczne metody remediacji tego typu zanieczyszczeń nie pozwalają na ich efektywne usunięcie i/lub generują produkty, których toksyczność może być większa niż wyjściowych związków [36]. Istnieje zatem konieczność opracowania efektywnych i przyjaznych dla środowiska technik usuwania zanieczyszczeń środowiskowych, które dodatkowo nie wymagają stosowania szkodliwych chemikaliów i nie generują problematycznych odpadów. Pod tym kątem, w ostatnich latach, jako interesującą alternatywę zaczęto na coraz szerszą skalę wykorzystywać enzymy [37]. Skuteczne okazało się wykorzystywanie hydrolaz w procesach remediacji zanieczyszczeń lipidowych oraz białkowych, a także dowiedziono wysokiej efektywności oksydoreduktaz w procesach konwersji zanieczyszczeń fenolowych. Celem poprawy stabilności i odporności enzymów w procesach szeroko rozumianej ochrony środowiska zaczęto także stosować preparaty immobilizowanych enzymów, co doprowadziło do znacznego usprawnienia prowadzonych przemian. Należy podkreślić, że wydajny biokatalizator poza zdefiniowaną odpornością powinien charakteryzować się także łatwością wydzielenia z mieszaniny reakcyjnej oraz możliwością wielokrotnego stosowania. Atrakcyjne zatem wydaje się wykorzystanie materiałów hybrydowych wytworzonych różnymi technikami z połączenia nieorganicznych i organicznych prekursorów, których właściwości zapewniają osiągnięcie wysokich efektywności procesów degradacji szkodliwych substancji. Ten aspekt badawczy poddano wnikliwej analizie, czego efektem są opublikowane prace naukowe **H5–H13**.

Substancje białkowe są powszechnie i bardzo szeroko wykorzystywane głównie w przemyśle spożywczym, ale spotyka się ich zastosowanie także w branży farmaceutycznej oraz kosmetycznej [38]. Konsekwencją tego jest ich obecność w ściekach i zbiornikach wodnych, a kontakt z substancjami białkowymi może w dłuższej perspektywie czasu prowadzić do wystąpienia różnych chorób cywilizacyjnych [39]. Interesującym rozwiązaniem wydaje się być zastosowanie immobilizowanej tripsyny jako enzymu, który katalizuje procesy hydrolizy wiązań białkowych, a powstałe w ten sposób

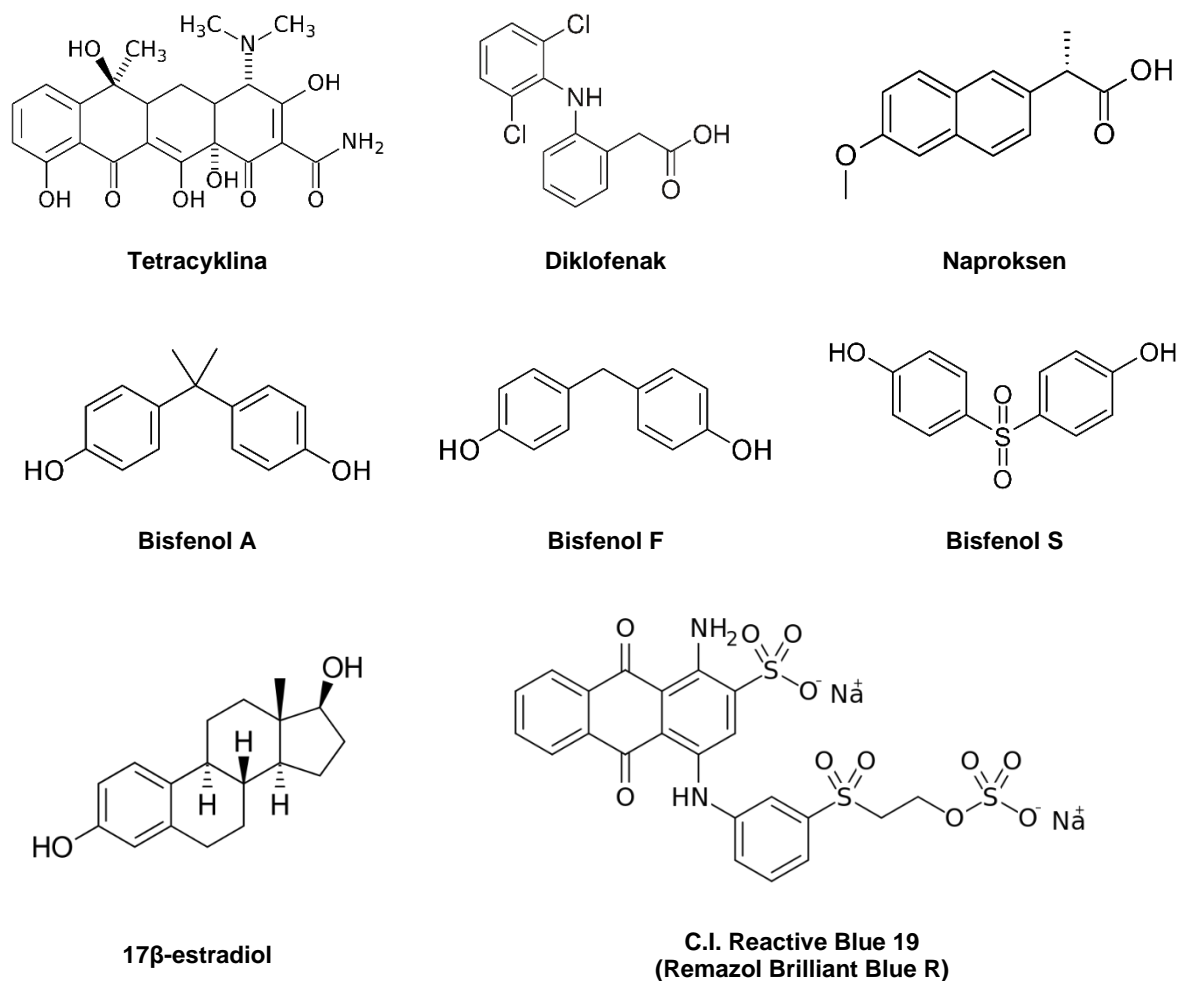
krótkołańcuchowe fragmenty białkowe są zdecydowanie mniej szkodliwe [40]. W procesie szybkiego wydzielenia unieruchomionego enzymu z mieszaniny reakcyjnej, swoją rolę doskonale spełniają materiały hybrydowe zawierające w swoim składzie nanocząstki magnetytu, ze względu na ich właściwości umożliwiające wydzielenie systemu biokatalitycznego z wykorzystaniem zewnętrznego pola magnetycznego. Niemniej jednak, dopiero poznanie wszystkich właściwości nośnika, jak i scharakteryzowanie aktywności unieruchomionego enzymu pozwala w pełni ocenić przydatność danego materiału.

W tym kontekście, w pracy **H5**, podjęto próbę wytworzenia materiałów hybrydowych opartych o magnetyt oraz biopolimerowy komponent, który stanowiła chityna lub lignina, a otrzymane układy posłużyły do immobilizacji trypsyny. Decyzja o wykorzystaniu wymienionych biopolimerów była podyktowana dużą ilością grup funkcyjnych w ich strukturze, a także wysokim powinowactwem do białek, co ułatwia skuteczną immobilizację. Prace eksperymentalne skoncentrowano na wytworzeniu cząstek o rozmiarach nanometrycznych i ich połączeniu w medium wodnym zgodnie z zaproponowaną procedurą. Efektywność wykorzystanej metody potwierdzono m.in. analizując rezultaty dyfraktometrii rentgenowskiej (XRD), które potwierdziły obecność sygnałów charakterystycznych dla obu prekursorów, a także dowiodły zachowania struktury krystalicznej przez wytworzone materiały magnetyt - chityna oraz magnetyt - lignina. Dokonano także oceny parametrów struktury porowatej powstałych hybryd, a otrzymane dane jasno wskazały, że dodatek magnetycznych nanocząstek w znacznym stopniu zwiększa wartość powierzchni właściwej obu biopolimerów. Otrzymane nośniki, przed i po unieruchomieniu enzymu, poddano także ocenie ich właściwości magnetycznych. Otrzymany magnetyt charakteryzował się wartością namagnesowania na poziomie 71 emu/g, podczas gdy zmierzone wartości tego parametru dla układu magnetyt - chityna oraz |magnetyt - lignina były niższe i wyniosły odpowiednio 64 emu/g oraz 46 emu/g. Dalsze obniżenie wartości namagnesowania zaobserwowano po immobilizacji trypsyny, co jest wynikiem zmiany grubości warstwy otaczającej cząstki magnetytu. Niemniej, uzyskane właściwości magnetyczne obu hybrydowych nośników umożliwiają szybkie oczyszczenie mieszaniny poreakcyjnej z układu biokatalitycznego. Dodatkowo wykazano, że unieruchomiono ponad 150 mg trypsyny na powierzchni materiału magnetyt - lignina oraz ponad 200 mg enzymu na powierzchni układy magnetyt - chityna, co jasno dowodzi ich dużych pojemności sorpcyjnych względem białek i wskazuje na możliwość zastosowania także w immobilizacji innych enzymów. Aby zbadać zmiany powinowactwa trypsyny do substratu na skutek immobilizacji, obliczono parametry kinetyczne wolnej i unieruchomionej formy białka. Odnotowano wzrost wartości stałej Michaelis-Menten (1,863 mM) i jednoczesny spadek maksymalnej szybkości reakcji (0,893 U/mg) dla trypsyny unieruchomionej na materiale magnetyt - lignina, w porównaniu z wartościami K_M i V_{max} uzyskanymi dla wolnego enzymu (1,036 mM, 1,486 U/mg) oraz danymi obrazującymi biokatalizator związany z układem magnetyt - chityna (1,351 mM, 1,157 U/mg). W oparciu o analizę uzyskanych danych wykazano wzrost oporów dyfuzyjnych oraz zmniejszenie powinowactwa enzymu do substratu po immobilizacji, a większe zmiany powyższych parametrów obserwowane dla układu zawierającego ligninę są spowodowane amorficzną i rozbudowaną strukturą tego biopolimeru, co utrudnia swobodny przepływ substratów i produktów. Poza dobrymi właściwościami separacyjnymi, testowane hybrydy charakteryzują się także ochronnym

efektem dla unieruchomionych biomolekuł. Rezultaty badań dowiodły, że po 20 dniach przechowywania trypsyna osadzona na materiale magnetyt - chityna i magnetyt - lignina zachowała odpowiednio 84% i 69% początkowych właściwości. Wykazano również, że po dziesięciu cyklach reakcyjnych immobilizowana trypsyna wykazała 80% (materiał magnetyt - chityna) oraz 60% (materiał magnetyt - lignina) początkowej aktywności. Wzrost stabilności enzymu jest wynikiem usztywnienia struktury enzymu i jej stabilizacji na skutek wytworzenia oddziaływań enzym - nośnik, co chroni białko przed procesem autodysocjacji i pomaga utrzymać aktywność w dłuższym okresie czasu. Co więcej, zachowanie wysokiej aktywności w trakcie następujących po sobie testów katalitycznych jest związane także z ograniczeniem wymywania enzymu z matrycy, co jest konsekwencją wielopunktowego związania enzymu z nośnikiem dzięki wykorzystaniu biopolimerów zawierających reaktywne grupy funkcyjne na powierzchni. Skuteczność testowanych układów zweryfikowano w oparciu o proces hydrolizy albuminy surowiczej (z ang. *human serum albumin*, HSA) jako modelowego białka. Immobilizowana trypsyna zachowuje swoje wysokie właściwości katalityczne i nie traci swojej specyficzności, na co wskazuje ponad 60-proc. zbieżność sygnałów obecnych na widmach MALDI TOF-MS uzyskanych po analizie próbek po enzymatycznej degradacji HSA. Dodatkowo dowiedziono, że produktami konwersji są głównie krótkołańcuchowe struktury białkowe. Na podstawie wnikliwej analizy uzyskanych zależności wykazano, że materiały hybrydowe powstałe z połączenia nanocząstek magnetycznych z biopolimerem wykazują znaczny potencjał jako nośniki w procesie immobilizacji trypsyny zapewniając jednocześnie możliwość szybkiej separacji systemu biokatalitycznego po przeprowadzonej reakcji, co znacznie podnosi kontrolę operacyjną procesu. Stwarzają one także możliwości zachowania wysokiej stabilności przez unieruchomiony enzym oraz utrzymanie jego niezmiennych właściwości katalitycznych. Niemniej jednak, zebrane zależności wskazują, że komponentem biopolimerowym bardziej właściwym do tworzenia matryc w unieruchomieniu enzymów jest chityna, głównie ze względu na bardziej uporządkowaną i krystaliczną strukturę.

Spośród wszystkich rodzajów zanieczyszczeń obecnych w ściekach i wodach, w ciągu ostatnich lat najbardziej dynamicznie rośnie ilość fenolu oraz jego pochodnych. Substancje te należą do grupy chemikaliów wywołujących zaburzenia endokrynologiczne (z ang. *endocrine disrupting chemicals*, EDC) i są to głównie fenole i bisfenole, ale także barwniki, różne grupy farmaceutyków, a nawet estrogeny (Rys. 7). Związki te są szczególnie uciążliwe i niebezpieczne dla organizmów żywych, bowiem poza funkcją terapeutyczną, w niekontrolowanych ilościach mogą prowadzić do mutacji czy zaburzeń w prawidłowym funkcjonowaniu układów wewnętrznych człowieka, a co więcej, są to w większości substancje kancerogenne [41]. Jednak ich efektywne usunięcie lub przekształcenie do mniej szkodliwych pochodnych jest ciągle poważnym wyzwaniem technologicznym i społecznym. Pod tym kątem duże zainteresowanie wzbudzają enzymy z grupy oksydoreduktaz, które zdolne są do efektywnej konwersji wspomnianych zanieczyszczeń. Stosowane są takie biokatalizatory jak m.in. lakaza, tyrozynaza czy peroksydazy, włączając głównie peroksydazę ligninową, chrzanową oraz manganową [42]. Białka te charakteryzują się relatywnie małą specyficznością i umożliwiają utlenianie szerokiego zakresu związków fenolowych, w tym większości ze wspomnianych powyżej zanieczyszczeń, przy jednoczesnej redukcji tlenu cząsteczkowego bądź nadtlenu wodoru do wody [43]. Badania nad

opracowaniem nowej gamy biokatalizatorów dla procesów remediacji zanieczyszczeń środowiskowych ukierunkowane są przede wszystkim na wytworzenie stabilnych układów oraz selekcję enzymów i warunków umożliwiających ich efektywne otrzymanie. Niemniej, nie są to jedyne zmienne warunkujące skuteczne usuwanie zanieczyszczeń fenolowych, bowiem równie istotny jest wpływ warunków procesowych, ilości zastosowanego katalizatora, jak i czas kontaktu z mieszaniną reakcyjną [44]. Dodatkowo istotne wydaje się także określenie mechanizmów prowadzonych przemian katalitycznych, jak i zdefiniowanie finalnych produktów enzymatycznej konwersji. Ma to bezpośrednie przełożenie na określenie toksyczności mieszaniny poreakcyjnej, co jest kluczowym czynnikiem determinującym przydatność zaproponowanych technik remediacji szkodliwych substancji.



Rys. 7. Struktury wybranych zanieczyszczeń fenolowych obecnych w wodach i ściekach

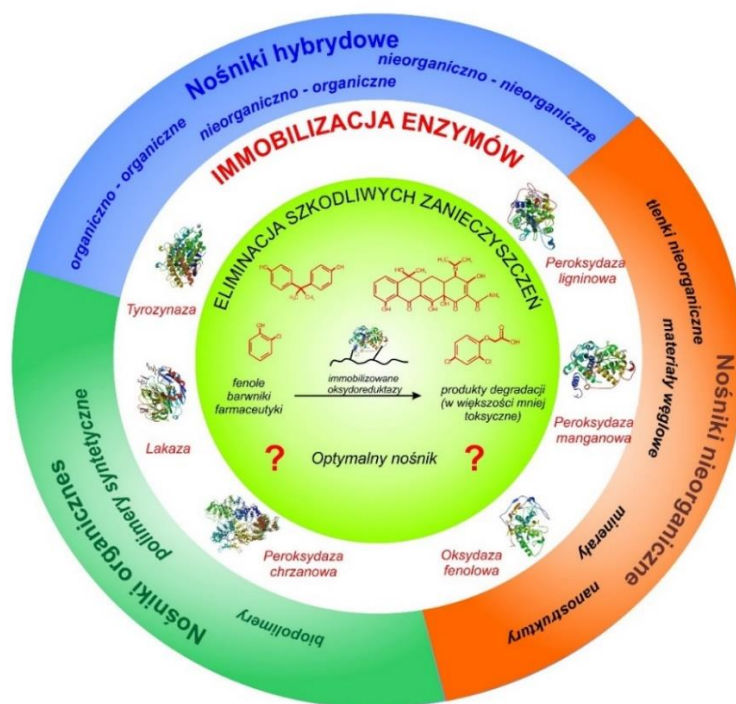
Należy jednak wyraźnie podkreślić, że zarówno proces wytworzenia aktywnych systemów immobilizowanych enzymów do zastosowań środowiskowych, jak i późniejsza właściwa realizacja degradacji zanieczyszczeń są niezwykle skomplikowane i zależne od wielu zmiennych. Stąd zebranie i usystematyzowanie informacji na temat materiałów stosowanych jako nośniki w procesie immobilizacji oksydoreduktaz, wykazanie mnogości wariantów realizacji tego procesu oraz wskazanie wad i zalet każdego podejścia wydaje się mieć istotne znaczenie pod kątem opracowania efektywnych technik mogących znaleźć swoje praktyczne zastosowanie. Cenne źródło informacji dla wspomnianych

aspektów stanowią artykuły **H6** oraz **H7**, które w zbiorczy, porównawczy sposób opisują najważniejsze zmienne jakie należy uwzględnić przy projektowaniu enzymatycznych procesów usuwania szkodliwych substancji z wykorzystaniem immobilizowanych enzymów. Poza wskazaniem potencjalnych nośników w procesie immobilizacji oksydoreduktaz, główną ideę tych prac stanowiło zdefiniowanie wpływu optymalnych warunków procesu degradacji zanieczyszczeń na jej efektywność, wykazanie możliwości realizacji tych procesów w reaktorach, jak i wskazanie technik łączonych opartych o immobilizowane enzymy jako atrakcyjnego rozwiązania zwiększającego efektywność prowadzonych przemian.

Immobilizacja jest niezwykle użytecznym narzędziem służącym do podnoszenia stabilności enzymów oraz ich ochrony przed negatywnym działaniem warunków reakcyjnych. Niemniej jednak, szczegółowa analiza parametrów nośnika oraz jego wpływ na wybrane oksydoreduktazy są często pomijane w dostępnej literaturze. Stąd w pracy **H6** przybliżono rodzaje najważniejszych enzymów z grupy oksydoreduktaz znajdujących swoje zastosowanie w ochronie środowiska. Wskazano źródła pochodzenia takich enzymów jak lakaza, tyrozynaza, peroksydaza manganowa, peroksydaza ligninowa oraz peroksydaza chrzanowa i dowiedziono, że największym zainteresowaniem cieszą się biokatalizatory pozyskane z grzybów różnego pochodzenia. Białka te wykazują co prawda odmienną budowę strukturalną a optymalne warunki ich działania różnią się od siebie, jednak wszystkie są w stanie efektywnie utleniać fenolowe substraty lub ich pochodne. Co więcej, w swoich strukturach zawierają one aminokwasy posiadające na końcach reaktywne grupy funkcyjne umożliwiające związanie enzymu różnymi technikami. Jednak finalne właściwości systemów biokatalitycznych są definiowane także przez rodzaj nośnika oraz jego właściwości. Szeroki wachlarz materiałów mogących znaleźć wykorzystanie jako nośniki w immobilizacji oksydoreduktaz powoduje dużą różnorodność w ich selekcji, jak i możliwość wyboru odpowiedniej formy i kształtu nośnika, co z kolei umożliwia wykorzystanie układów enzymatycznych w różnych konfiguracjach reaktora, zarówno w procesach okresowych, ciągłych, jak i półokresowych. Dostępne dane na temat analizowanego procesu skutkują zaproponowaniem nieco odmiennego podziału opartego na trzech głównych kategoriach, a więc materiałach nieorganicznych, organicznych i hybrydowych (Rys. 8).

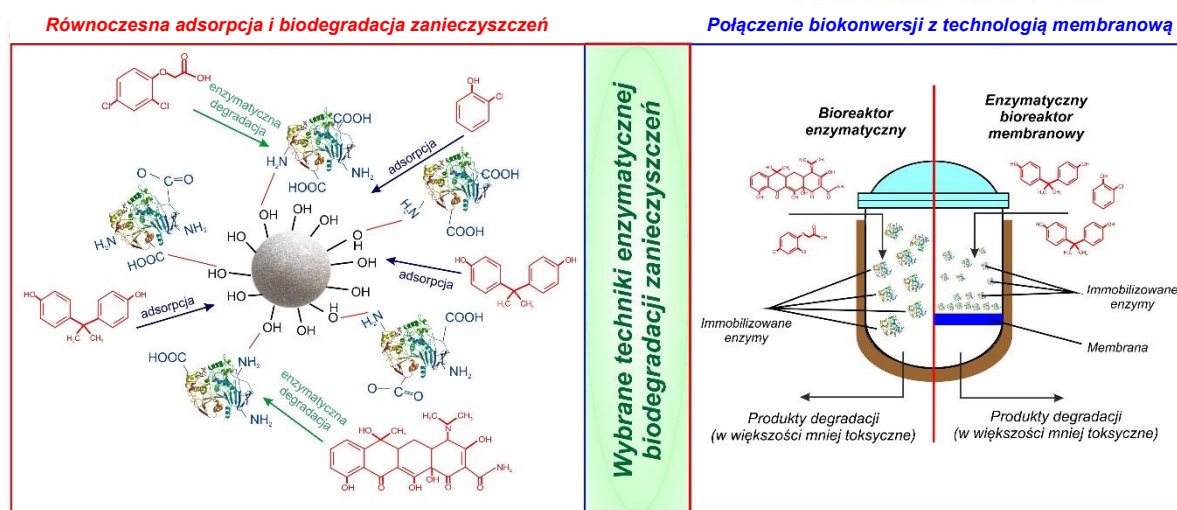
Pierwszą z tych grup stanowią materiały nieorganiczne, a wśród nich przede wszystkim tlenki metali, minerały czy materiały węglowe (m.in. węgle aktywne) o wielkościach nano- lub mikrometrycznych. Są to nośniki najpowszechniej stosowane w immobilizacji oksydoreduktaz, ze względu na ich dużą stabilność i odporność, znaczne pojemności sorpcyjne oraz niską cenę. Jednak wykorzystywane są także materiały pochodzenia organicznego, a więc szeroka grupa polimerów syntetycznych oraz biopolimerów znana głównie z zawartości licznych grup funkcyjnych i w konsekwencji wysokiego powinowactwa do enzymów. Warto dodać, że materiały organiczne mają bardzo ograniczony negatywny wpływ na unieruchomiony enzym, co dodatkowo pozwala zachować jego właściwości katalityczne. Alternatywę dla wspomnianych powyżej grup stanowią materiały hybrydowe, które umożliwiają przede wszystkim silne związanie białka z nośnikiem, gwarantują możliwość jego ponownego wykorzystania po dezaktywacji i wymyciu enzymu, a także dają możliwość wytworzenia materiału z prekursorów dobranych zarówno pod kątem wymagań procesu technologicznego, jak i unieruchomienia enzymu. Mogą one powstać na skutek połączenia

prekursorów nieorganiczno-nieorganicznych (zapewniają wysoką stabilność dla unieruchamianego enzymu), organiczno-organicznymi (zapewniają wysokie powinowactwo do biokatalizatorów i umożliwiają unieruchomienie dużych ilości białka) oraz nieorganiczno-organicznymi, których cechy są wypadkową obu prekursorów. Niemniej, niezależnie od unieruchamianego enzymu, zastosowanie w immobilizacji lakaz, tyrozynez czy peroksydaz znajdują głównie materiały o ściśle określonych właściwościach, których zadaniem jest nie tylko poprawa właściwości enzymu, lecz również usprawnienie i poprawa kontroli nad realizowanym procesem technologicznym. Dodatkowym faktem warunkującym selekcję odpowiedniego nośnika dla oksydoreduktaz jest zapewnienie odpowiednio wysokiego poziomu dostępności tlenu i/lub nadtlenu wodoru, a więc kosubstratów wspomnianych enzymów, których obecność warunkuje uzyskanie przez nie wysokiej aktywności. Również typ immobilizacji ma wpływ na selekcję odpowiedniej matrycy ponieważ np. materiały porowate, z dobrze rozwiniętą powierzchnią właściwą ułatwiają immobilizację adsorpcyjną, podczas gdy materiały bogate w różne grupy funkcyjne sprzyjają immobilizacji kowalencyjnej. Z kolei materiały hybrydowe wydają się stanowić nośniki właściwe do immobilizacji wszystkimi dostępnymi technikami, włączając w to pułapkowanie oraz enkapsulację, co daje nowe, ogromne możliwości produkcji systemów biokatalitycznych o pożądanej charakterystyce. Wykorzystanie lakaz w procesach usuwania fenolu i jego pochodnych jest udokumentowane w literaturze [45], natomiast ograniczone są informacje na temat wykorzystania w tych procesach tyrozynez czy innych peroksydaz. Jasno sprecyzowane kryteria selekcji materiału nośnego do immobilizacji tego typu enzymów oraz wskazanie zalet i wad każdego z tych materiałów umożliwiają zastosowanie także immobilizowanych peroksydaz w remediacji zanieczyszczeń środowiskowych, co wydaje się niezwykle istotne ze względu na możliwość usuwania szerszej gamy substancji fenolowych, niż w przypadku wykorzystania tylko lakaz.



Rys. 8. Przykłady oraz ogólny podział materiałów znajdujących zastosowanie jako nośniki w procesie immobilizacji oksydoreduktaz, na podstawie [46]

Należy jednak wyraźnie podkreślić, że właściwa selekcja nośnika oraz wytworzenie aktywnych systemów immobilizowanych enzymów nie gwarantują osiągnięcia wysokich wydajności remediacji zanieczyszczeń. Istnieje bowiem szereg zmiennych procesowych, jak np. pH, temperatura, czy stężenie zanieczyszczenia, które wpływają na uzyskaną skuteczność usuwania. Jednak jednym z najistotniejszych czynników jest typ i rodzaj realizowanego procesu oraz forma zastosowanego bioreaktora [47]. Co więcej, ze względu na duże objętości ścieków, które docelowo poddane mają zostać oczyszczaniu, koniecznym wydaje się być opracowanie efektywnych sposobów i technik usuwania szkodliwych związków, ponieważ klasyczne reaktory okresowe, jak i systemy typu *batch* nie spełniają swojej roli w dostatecznym stopniu. Koniecznym jest zatem poszukiwanie efektywnych rozwiązań, które nie tylko zapewniają wysokie wydajności, jak i dobrą kontrolę procesową, ale również umożliwiają otrzymanie czystej mieszaniny poreakcyjnej, wolnej zarówno od wyjściowych związków, jak i produktów ich konwersji. Pod tym kątem szczególnie interesujące wydaje się być zastosowanie jednoczesnej enzymatycznej konwersji połączonej z adsorpcją szkodliwych substancji, jak i wykorzystanie enzymatycznych reaktorów membranowych zaopatrzonych w membrany z immobilizowanymi oksydoreduktazami (Rys. 9).



Rys. 9. Idea usuwania zanieczyszczeń środowiskowych na drodze jednoczesnej adsorpcji i enzymatycznej konwersji oraz z wykorzystaniem bioreaktorów, na podstawie [47]

Zagadnienia te opisano w pracy **H7**, w której zebrano i wnikliwie przeanalizowano dane związane z charakterystyką nośników oraz warunkami procesowymi umożliwiającymi wydajne prowadzenie wspomnianych przemian, jak i w krytyczny sposób przedyskutowano wady i zalety omawianych rozwiązań, uwzględniając przede wszystkim efektywność tych przemian oraz możliwość ich praktycznej realizacji. Zanieczyszczenia fenolowe występują w wodach i w ściekach w niskich, ale znaczących stężeniach, co powoduje, że do ich usuwania konieczne jest wykorzystanie aktywnych oraz trwałych układów, których cena będzie relatywnie niska. Zabiegiem umożliwiającym podniesienie efektywności usuwania zanieczyszczeń jest wykorzystanie jednoczesnej enzymatycznej konwersji przez immobilizowane enzymy oraz adsorpcji przez zastosowany nośnik/adsorbent. Rozwiązanie to posiada wiele zalet, spośród których najważniejsze to możliwość skrócenia czasu procesu remediacji,

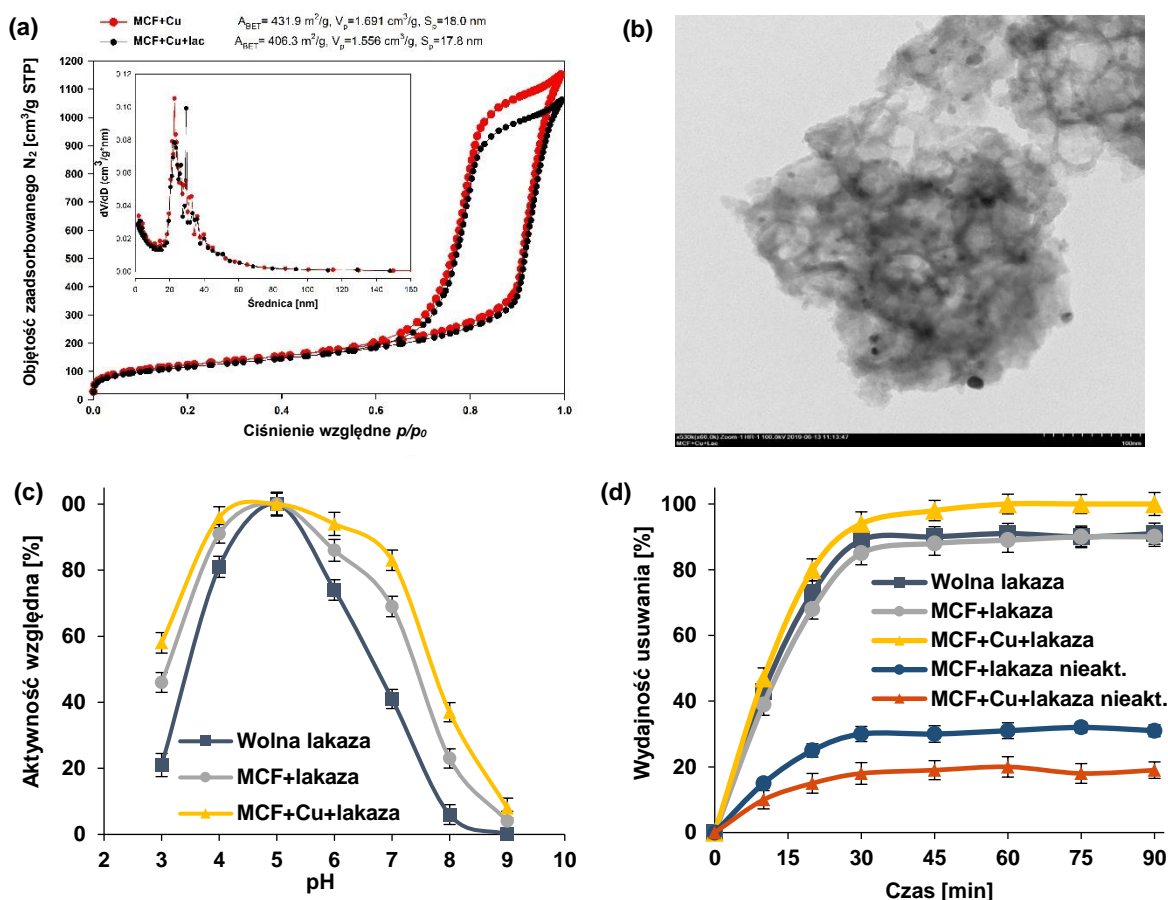
utrzymanie aktywności enzymatycznej na wysokim poziomie dzięki ograniczeniu zjawiska inhibicji, a także uzyskanie finalnej mieszaniny o wysokiej czystości i niskiej toksyczności, dzięki adsorpcji zarówno wyjściowych związków, jak i produktów ich enzymatycznej konwersji. Cechy te pozwalają podnieść wydajność procesów remediacji oraz obniżyć ich koszty. Jednak znaczny wpływ na efektywność procesu ma wybór materiału, który spełniał będzie funkcję nośnika dla enzymów oraz adsorbentu. Zebrane dane wskazują, że w tej roli najlepiej sprawdzają się materiały charakteryzujące się dobrze rozwiniętą powierzchnią właściwą i dużą porowatością oraz zawartością reaktywnych grup chemicznych, pochodzenia zarówno nieorganicznego, jak i organicznego. Poza wykorzystaniem jednoczesnych procesów enzymatycznej konwersji i adsorpcji, interesującym rozwiązaniem wydaje się być zastosowanie reaktorów enzymatycznych, w szczególności enzymatycznych reaktorów membranowych (EMR) z immobilizowanymi enzymami umożliwiającymi oczyszczanie dużych objętości zanieczyszczonych roztworów. Jedną z większych zalet tego rozwiązania jest możliwość dobrania konfiguracji bioreaktora, która umożliwia zajęcie procesów enzymatycznej konwersji i separacji produktów mieszaniny reakcyjnej osobno, jednocześnie, lub kolejno po sobie, celem osiągnięcia jak najwyższej sprawności. EMR oferują wysoki reżim przepływu, zmniejszając ograniczenia transferu masy, które są powszechnie obserwowane w przypadku katalizatorów heterogenicznych. Dodatkowo możliwość wykorzystania membran jako nośników do immobilizacji enzymów pozwala na znaczny wzrost stabilności biokatalizatora, który osadzony w porach membrany jest dodatkowo chroniony przed dezaktywacją tworząc reaktywny konwersyjno-separacyjny układ. Przekłada się to na skrócenie czasu procesu, zmniejszenie jego energochłonności oraz możliwość jego prowadzenia w sposób przyjazny dla środowiska i opłacalny ekonomicznie. Stabilność nośnika oraz jego wytrzymałość mechaniczna to główne cechy determinujące wybór materiału do immobilizacji w reaktorach enzymatycznych, stąd zastosowanie znajdują głównie materiały nieorganiczne oraz układy hybrydowe, w których jeden z komponentów stanowi składnik nieorganiczny. Z kolei w reaktorach membranowych wykorzystywane są głównie komercyjnie dostępne membrany ceramiczne oraz polimerowe o zdefiniowanej wielkości porów oraz szybkości przepływu, jednak prowadzone są także prace nad wytworzeniem nowej gamy membran biopolimerowych i nieorganicznych umożliwiającymi nie tylko immobilizację enzymu i separację produktów konwersji, lecz także adsorpcję zanieczyszczeń. Zaproponowane rozwiązanie umożliwia prowadzenie jednoetapowej remediacji zanieczyszczeń w łagodnych warunkach procesowych, w sposób przyjazny dla środowiska oraz opłacalny ekonomicznie. Niemniej właściwa selekcja nośnika/sorbentu, jak i membrany przy konfiguracji reaktora oraz immobilizacji enzymu mają znaczny wpływ na efektywność prowadzonych przemian. W tym świetle konieczne są dalsze prace nad usprawnieniem opisanych procesów i podjęcie próby ich transferu do skali przemysłowej aby spełnić obecne wyśrubowane normy oraz zapotrzebowanie rynkowe.

Przedstawione informacje stanowiły inspiracje do dalszych prac badawczych mających na celu wytworzenie efektywnych układów immobilizowanych enzymów do usuwania zanieczyszczeń fenolowych. Kluczowym zagadnieniem było dobranie nośnika do immobilizacji celem poprawy stabilności enzymu i osiągnięcie wysokiej efektywności usuwania wybranych zanieczyszczeń fenolowych, w tym przede wszystkim farmaceutyków i bisfenoli przez enzymy z grupy oksydoreduktaz.

Atrakcyjne zatem wydaje się być wykorzystanie materiałów o zdefiniowanych właściwościach, różnego pochodzenia i wytworzonych różnymi technikami (**H8–H13**).

W pracy **H8** jako nośnik do immobilizacji lakazy z *Trametes versicolor* zastosowano mezoporowate materiały krzemionkowe typu MCF (z ang. *Mesostructured Cellular Foam*) ze względu na ich właściwości teksturalne, morfologiczne oraz mechaniczne, a w badaniach zweryfikowano efektywność powstałego systemu biokatalitycznego w procesach usuwania tetracykliny, na drodze jednoczesnej adsorpcji i enzymatycznej konwersji. Materiały typu MCF wytworzono, scharakteryzowano oraz zmodyfikowano jonami miedzi celem poprawy aktywności unieruchomionej lakazy, bowiem enzym ten w obecności jonów Cu^{2+} wykazuje zwiększoną aktywność. Analizie poddano m.in. parametry struktury porowatej otrzymanych materiałów, pod kątem oceny ich pojemności sorpcyjnej w stosunku do immobilizowanych enzymów. Niemodyfikowany MCF charakteryzował się powierzchnią właściwą o wielkości ponad $580 \text{ m}^2/\text{g}$ i wielkością porów ok. 22 nm. Na skutek wprowadzenia jonów miedzi wartości tych parametrów zmalały i wyniosły odpowiednio $430 \text{ m}^2/\text{g}$ oraz 18 nm (Rys. 10a). Dalszy spadek analizowanych wartości zaobserwowano po immobilizacji lakazy, co wskazuje na skuteczne unieruchomienie enzymu. Dobre właściwości sorpcyjne wykorzystanych materiałów znajdują swoje odzwierciedlenie w wysokich wartościach wydajności immobilizacji lakazy, które dla niemodyfikowanego i modyfikowanego jonami miedzi MCF wyniosły 94% oraz 85%, co przekłada się na znaczną ilość unieruchomionego enzymu. Zimmobilizowano bowiem 188 g lakazy na 1 g niemodyfikowanego MCF i 170 mg/g enzymu na sfunkcjonalizowanym MCF. Dodatkowo rezultaty testów desorpcji enzymu pozwoliły na potwierdzenie silnego związania białka z nośnikiem, co wskazuje na wielopunktowe związanie biokatalizatora dzięki dużej ilości grup hydroksylowych oraz ulokowanie enzymu także w porach matrycy. W trakcie analizy parametrów kinetycznych wolnych i immobilizowanych biokatalizatorów nie wykazano jednak znacznych zmian w ich wartościach, co potwierdza przydatność zaproponowanego nośnika. Co więcej, weryfikacja rezultatów analizy termogravimetrycznej pozwoliła na stwierdzenie, że materiał krzemionkowy odznacza się znaczną stabilnością termiczną, a obserwacje poczynione na podstawie zdjęć z wysokorozdzielczego transmisyjnego mikroskopu elektronowego potwierdziły trójwymiarową, mezoporowatą strukturę materiału krzemionkowego i dowiodły, że enzym może być unieruchomiony również w porach matrycy (Rys. 10b). Właściwości katalityczne oraz stabilność wolnych i unieruchomionych enzymów zdefiniowano i porównano w oparciu o modelowe reakcje, w celu określenia wpływu matrycy, jak i immobilizacji na te parametry. Zarówno wolna, jak i immobilizowana lakaza wykazują optimum pH i temperatury przy wartości pH 5 (Rys. 10c) oraz w $30 \text{ }^\circ\text{C}$, co wskazuje, że mikrośrodowisko wokół centr aktywnych enzymu nie zostało w znaczący sposób zmienione na skutek unieruchomienia. Należy jednak podkreślić stabilizujący oraz ochronny wpływ matrycy, bowiem unieruchomione enzymy w całym analizowanym zakresie pH i temperatury wykazały ponad 20% wyższą aktywność niż ich wolny odpowiednik. Niemniej jednak, lakaza unieruchomiona na materiale MCF sfunkcjonalizowanym jonami miedzi odznaczała się wyższą aktywnością, co stanowi cenną wskazówkę przy projektowaniu układów katalitycznych zawierających ten enzym. Co ważne, dowiedziono możliwości wielokrotnego zastosowania układów po immobilizacji, co jest związane przede wszystkim z unieruchomieniem

biokatalizatora także w porach matrycy, co zapobiega szybkiemu wymywaniu enzymu oraz chroni go przed dezaktywacją.



Rys. 10. Izotermy adsorpcji/desorpcji azotu oraz wielkość porów materiału MCF+Cu przed i po immobilizacji lakazy (a) zdjęcie TEM materiału MCF+Cu po immobilizacji lakazy (b), wpływ pH na aktywność wolnej i immobilizowanej lakazy (c) oraz krzywe usuwania tetracykliny przez wolny biokatalizator oraz dezaktywowany i aktywny unieruchomiony enzym

Jednak finalną weryfikację właściwości wytworzonych układów immobilizowanej lakazy stanowiło ich wykorzystanie w procesie usuwania tetracykliny z modelowego roztworu wodnego ze szczególnym uwzględnieniem analizy zjawiska adsorpcji farmaceutyku, jak i jego enzymatycznej konwersji (Rys. 10d). Wykazano, że materiały MCF ze zdeaktywowanym enzymem zaadsorbowały nie więcej niż 30% antybiotyku, co stanowiło pewne zaskoczenie, bowiem materiały te znane są z dobrych właściwości sorpcyjnych. Może to być jednak wytłumaczone przez fakt, że molekuly enzymu zajmują większość z miejsc aktywnych nośnika, redukując jego zdolności do przyłączania tetracykliny. Z kolei wolna lakaza była w stanie usunąć zanieczyszczenie z ok. 90-proc. wydajnością. Dopiero zastosowanie układu biokatalitycznego opartego na zmodyfikowanym jonami miedzi MCF pozwoliło na usunięcie antybiotyku ze 100-proc. wydajnością. Jest to efekt zarówno poprawy aktywności enzymu przez jony miedzi jak i fakt, że część tetracykliny została zaadsorbowana przez nośnik. Zaproponowano zatem prostą i wydajną metodę immobilizacji enzymów na materiale krzemionkowym, która może służyć do otrzymywania narzędzi katalitycznych o potencjale aplikacyjnym w ochronie środowiska. Co więcej, całkowite usunięcie tetracykliny, jako modelowego zanieczyszczenia, było możliwe przy zachodzących

jednocześnie procesach adsorpcji i enzymatycznej konwersji, co potwierdza komplementarność powyższych technik w usuwaniu wybranych substancji szkodliwych.

Tematykę immobilizacji lakazy w celu jej wykorzystania w procesach usuwania zanieczyszczeń na drodze adsorpcji i enzymatycznej konwersji kontynuowano z wykorzystaniem nowatorskiego materiału biopolimerowego jako nośnika, jakim były chitynowe szkielety gąbek morskich z gatunku *Aplysina archeri*, co zaprezentowano w pracy **H9**. Uwagę skoncentrowano na tym materiale ze względu na fakt, że trójwymiarowe skafoldy (materiały przypominające strukturę rusztowanie) o złożonej wewnętrznej strukturze i kanałach, mogą zapewnić dodatkową ochronę dla cząsteczek enzymu, a dodatkowo umożliwiają swobodny przepływ substratów i produktów. Co więcej, są to materiały naturalnego pochodzenia, które mogą być hodowane na całym świecie, co czyni je relatywnie tanimi, odnawialnymi i mogącymi znaleźć zastosowanie także w immobilizacji innych enzymów. Efektywne unieruchomienie enzymu zostało potwierdzone na podstawie analizy zdjęć SEM, gdzie na powierzchni chitynowego szkieletu widoczne są agregaty enzymatyczne. Obserwacje te zostały zweryfikowane w oparciu o analizę rezultatów energodispersyjnej mikroanalizy rentgenowskiej, które wykazały obecność w składzie tych agregatów m.in. azotu oraz miedzi, a więc pierwiastków charakterystycznych dla lakazy. Duży stosunek objętości do masy wykorzystanego materiału skutkuje immobilizacją znacznych ilości enzymu, bowiem unieruchomiono 1820 mg lakazy na 1 g chitynowego nośnika, przy wydajności immobilizacji wynoszącej ponad 90%. Oddziaływania enzym - nośnik, głównie typu wodorowego, które ograniczają ingerencję w strukturę nośnika, zapewniają zachowanie prawie 90-proc. aktywności przez unieruchomiony enzym, a otwarta struktura nośnika, gwarantująca minimalizowanie oporów dyfuzyjnych, powoduje, że zaobserwowano jedynie niewielkie zmiany w parametrach kinetycznych immobilizowanej lakazy, co wskazuje na wysokie powinowactwo unieruchomionego enzymu do substratów. Dobre właściwości sorpcyjne chitynowego szkieletu, jak i zachowanie wysokiej aktywności przez unieruchomiony enzym przetestowano pod kątem usuwania tetracykliny, jako jednego z najczęściej wykorzystywanych antybiotyków. Należy dodać, że pierwsze testy, obrazujące zdolności sorpcyjne czystej matrycy chitynowej, jak i katalityczne możliwości enzymu do konwersji antybiotyku, wykazały, że w optymalnych warunkach procesowych, na drodze adsorpcji, możliwe jest usunięcie ok. 80% tetracykliny, a enzymatyczna konwersja pozwala na degradację ok. 60% farmaceutyku. Słuszne zatem wydaje się połączenie obu procesów, celem osiągnięcia wysokiej efektywności usuwania badanych zanieczyszczeń. Wykazano, że na drodze jednoczesnej adsorpcji oraz enzymatycznej konwersji możliwe było całkowite usunięcie tetracykliny z roztworów o stężeniu do 1 mg/L. Warto dodać, że wraz ze wzrostem stężenia roztworu antybiotyku malał udział adsorpcji w procesie, a rósł enzymatycznej konwersji. Jest to związane z faktem, że na powierzchni chitynowego nośnika znajduje się ograniczona ilość miejsc aktywnych zdolnych do związania antybiotyku, co ogranicza osiągnięcie wyższych wydajności adsorpcji. Ponieważ zarówno na proces adsorpcji, jak i enzymatycznej konwersji znaczny wpływ może mieć pH oraz temperatura realizowanego procesu, efekt tych parametrów na usuwanie tetracykliny poddano wnikliwej analizie. W pH od 3 do 7 odnotowano ponad 80-proc. wydajność usuwania antybiotyku, a w pH 8 i pH 9 wartości te oscylowały w okolicach 60%. Wykazano, że w całym analizowanym zakresie pH wydajność adsorpcji wyniosła od 40 do 65% i była wyższa niż enzymatycznej konwersji, która okazała się być bardziej podatna na zmiany pH.

Niemniej jednak, immobilizowana lakaza umożliwiła usunięcie ok. 40% zanieczyszczenia w pH od 3 do 6, a zmniejszenie jej katalitycznego działania w zasadowych warunkach jest związane z negatywnym wpływem jonów OH^- , które powodują występowanie zjawiska wzajemnego odpychania aminokwasów tworzących centra aktywne białka, co zaburza jego strukturę i powoduje utratę właściwości. Dowiedziono również, że wytworzone systemy są wysoce efektywne w zakresie temperatur od 15 do 65 °C, w którym umożliwiają usunięcie ponad 80% tetracykliny, a maksimum wydajności wykazują w temperaturze 25 i 35 °C. Odnotowano także, że profile wydajności adsorpcji i enzymatycznej konwersji mają zbliżony przebieg, przy czym proces adsorpcji przebiega w całym analizowanym zakresie temperatury z wydajnością większą o ok. 20%. Wysokie wydajności usuwania antybiotyku w szerokim zakresie warunków procesowych, jak i wytrzymałość mechaniczna szkieletu gąbki połączona z jej budową morfologiczną powodują, że wytworzone materiały wydają się być interesujące pod kątem katalizowania procesów realizowanych w reaktorach. Efektywność otrzymanego układu zweryfikowano prowadząc usuwanie tetracykliny w optymalnych warunkach procesowych (pH 5 temperatura 25 °C, stężenie tetracykliny 1 mg/L), w reaktorze ze złożem stałym, w którym masę aktywną stanowiła immobilizowana lakaza, z szybkością przepływu wynosząca 2 mL/min (Rys. 11). W trakcie pierwszych 6 h procesu odnotowano całkowite usunięcie tetracykliny, następnie zaobserwowano powolny spadek wydajności usuwania antybiotyku, jednak nawet po 24 h osiągnięto wysoką, ponad 80-proc. wydajność usuwania tetracykliny. Jest to związane głównie z poprawą stabilności unieruchomionego enzymu i jego większą odpornością na warunki procesowe, co zmniejsza ryzyko utraty aktywności na skutek chemicznej lub termicznej dezaktywacji. Zaprezentowano zatem nowatorskie podejście do immobilizacji lakazy polegające na wykorzystaniu jako nośnika chitynowych szkieletów gąbek morskich o zdefiniowanej morfologii i strukturze. Wytworzono układy biokatalityczne, które umożliwiły uzyskanie satysfakcjonujących wydajności usuwania tetracykliny z roztworów wodnych w szerokim zakresie pH oraz temperatury. Co więcej, uzyskane rezultaty jasno wskazały, że zastosowanie jednoczesnej adsorpcji oraz katalitycznej konwersji może być wydajnym rozwiązaniem w procesach usuwania zanieczyszczeń środowiskowych, realizowanych także w bioreaktorach.



Rys. 11. Schemat bioreaktora zastosowanego w procesie konwersji tetracykliny przez lakazę unieruchomioną na chitynowym szkielecie gąbki *Aplysina archeri*

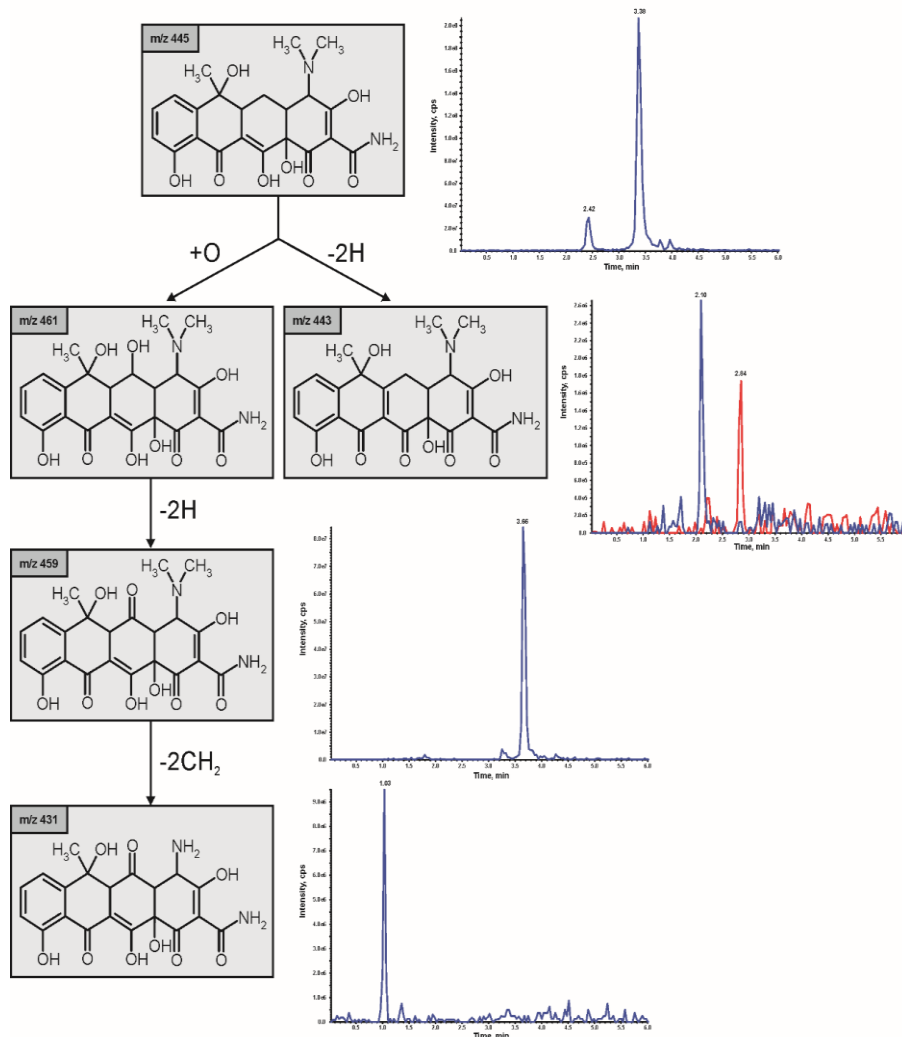
Wysoce porowate matryce, zmniejszające opory dyfuzyjne, a jednocześnie zapewniające stabilizację dla struktury enzymu wydają się być bardzo obiecujące jako nośniki dla enzymów.

Przykładem takich materiałów mogą też być monoskładnikowe lub hybrydowe materiały wytworzone techniką elektroprzędzenia. Jest to proces polegający na wykorzystaniu ładunków elektrycznych do wyciągania naładowanych nici polimerowych i tworzenia z nich pojedynczych włókien, bądź materiałów włóknistych o średnicy pojedynczego włókna od kilkuset nanometrów do kilku mikrometrów [48]. Materiały elektroprzędzone stanowią obiecującą alternatywę dla obecnie stosowanych nośników. Zainteresowanie to wynika z możliwości otrzymywania multifunkcyjnych układów z szerokiej gamy polimerów, kopolimerów i biopolimerów z różnymi dodatkami, np. nieorganicznymi [49]. Co więcej, materiały te odznaczają się szeregiem właściwości niezwykle pożądanymi w procesie immobilizacji enzymów, takich jak znaczna porowatość, duża powierzchnia oraz obecność wielu ugrupowań funkcyjnych, czy wysoka stabilność oraz swoboda formowania umożliwiających osadzenie enzymu różnymi technikami nie tylko na powierzchni włókna, ale także w jego wnętrzu [50]. Niemniej jednak, jedną z najważniejszych zalet materiałów elektroprzędzonych jest możliwość projektowania i otrzymywania włókien o określonych i ściśle zdefiniowanych właściwościach, co zostaje osiągnięte dzięki pełnej kontroli procesu i możliwości zmian jego parametrów, takich jak temperatura, wilgotność, natężenie przepływu prądu, odległość dyszy od kolektora oraz napięcie prądu. Co więcej, z łatwością można formować hybrydowe materiały elektroprzędzone, w których domieszki dodatkowo podnoszą atrakcyjność opisywanych materiałów.

W tym nurcie badawczym powstały prace **H10–H12**, w których przeanalizowano wpływ materiałów elektroprzędzonych na właściwości unieruchomionej lakazy oraz tyrozynazy, a nowatorskie układy oparte o zsyntezowane materiały wykorzystano w procesach usuwania wybranych farmaceutyków oraz bisfenoli. W pracy **H10**, do wytworzenia nośnika wykorzystano poli(metakrylan metylu), który na etapie elektroprzędzenia został domieszkowany cząstkami magnetytu celem poprawy zdolności jego izolacji z mieszaniny reakcyjnej. Otrzymany materiał w następnym kroku sfunkcjonalizowano z wykorzystaniem 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu oraz *N*-hydroksysukcynimidu (procedura EDS/NHS) celem stabilnego, kowalencyjnego związania cząsteczek lakazy. Co więcej, uniwersalny charakter stosowanego nośnika potwierdzono poprzez enkapsulację lakazy wewnątrz struktury nośnika, na etapie jego wytwarzania. Uzyskano zatem aktywny układ katalityczny dzięki przeprowadzeniu jednoczesnej syntezy nośnika i immobilizacji. Na podstawie analizy morfologicznej otrzymanych układów udowodniono, że średnice włókien wytworzonych materiałów przed i po immobilizacji nie przekraczają 500 nm. Zaobserwowano jednak nieznaczny wzrost średnicy włókien w przypadku materiału po kowalencyjnej immobilizacji enzymu, co jest związane nie tylko z przyłączeniem enzymu, ale także modyfikacją powierzchni nośnika. Dodatkowym potwierdzeniem unieruchomienia enzymu obydwoma zaproponowanymi technikami są zdjęcia z mikroskopu konfokalnego pracującego w trybie fluorescencji, na których wyraźna jest fluorescencja na skutek wzbudzenia, charakterystyczna dla materiałów białkowych. Należy także dodać, że kowalencyjnie związane ponad 63 mg enzymu na 1 cm² nośnika, a na drodze enkapsulacji 40 mg/cm², co wskazuje na wysokie pojemności zaproponowanego nośnika względem enzymów. Ocena stabilności układów po immobilizacji dowiodła, że immobilizacja obiema technikami w znacznym stopniu poprawiła odporność enzymu na działanie pH oraz temperatury, w porównaniu z wolnym biokatalizatorem. Jednak nieznacznie większą aktywność zachowała lakaza osadzona wewnątrz elektroprzędzonego nośnika,

która po 3 h inkubacji w warunkach procesowych zachowała ponad 85% początkowych właściwości, co jest bezpośrednio związane z lepszą ochroną enzymu przed denaturacją. Wykazano także możliwość wielokrotnego użycia otrzymanych systemów, które po 5 cyklach reakcyjnych zachowały ponad 80-proc. aktywność. Jest to wynikiem nie tylko stabilizacji enzymu na skutek immobilizacji, ale także silnym ograniczeniem wymywania cząsteczek enzymu z nośnika, co pozwala zachować wysoką aktywność w dłuższym okresie czasu. Analogicznie jak w poprzednich przykładach, kluczowym było wykorzystanie wytworzonych układów w procesach usuwania tetracykliny w zmiennych warunkach procesowych. Zaskakująco, chociaż materiały elektroprzędzone charakteryzują się wysoką porowatością, tylko ok. 5% substancji uległo adsorpcji na powierzchni zastosowanego materiału z nieaktywnym enzymem, co wskazuje że usuwanie zanieczyszczenia zachodzi głównie na drodze enzymatycznej konwersji, w przeciwieństwie do rezultatów wcześniejszych badań. Ocena wpływu czasu oraz stężenia roztworu antybiotyku na efektywność jego usuwania pozwala stwierdzić, że zarówno wolna lakaza, jak i oba układy po immobilizacji umożliwiają efektywnie usunięcie antybiotyku z roztworów o stężeniu do 1 mg/L (wydajność usuwania 100%) w czasie zaledwie 40 min, a dalszy wzrost stężenia roztworu skutkuje obniżeniem wydajności usuwania. Niemniej, stężenie tetracykliny w wodach oraz ściekach zazwyczaj nie przekracza wartości 1 mg/L, co pozwala na sformułowanie stwierdzenia, że wytworzone systemy mogą być efektywnie stosowane do usuwania tetracykliny. Co więcej, wykazano, że wolna lakaza umożliwia całkowite usunięcie tetracykliny tylko w pH 5 oraz temperaturze 25 °C, a nawet niewielkie różnice w tej wartości powodują szybką utratę aktywności katalitycznej i obniżenie wydajności usuwania tetracykliny. Z kolei unieruchomiona kowalencyjnie lakaza pozwala na niemal całkowite usunięcie tetracykliny w pH 5 i pH 4 oraz temperaturach od 25 °C do 45 °C, natomiast w zdecydowanie szerszym zakresie pH i temperatury, niż w przypadku wolnego białka, możliwe jest usunięcie ponad 75% zanieczyszczenia. Lakaza unieruchomiona poprzez enkapsulację umożliwia osiągnięcie niższych wydajności usuwania niż w przypadku lakazy związanej kowalencyjnie, bowiem maksymalna wydajność usuwania antybiotyku wyniosła 93% w warunkach optymalnych (pH 5, temperatura 25 °C, stężenie tetracykliny 1 mg/L), co jest konsekwencją zamknięcia enzymu w strukturze nośnika, w pewnym stopniu ograniczające swobodny transport substratów i produktów reakcji. Jednak pomimo uzyskania niższych wydajności stosując enkapsulowany enzym, należy podkreślić, że charakteryzuje się on wysoką stabilnością i pozwala na efektywne konwertowanie tetracykliny w skrajnych warunkach procesowych. Jest to korzystne zjawisko i wynika z faktu, że lakaza wewnątrz materiału elektroprzędzonego jest lepiej chroniona przed negatywnym wpływem warunków reakcji na jej aktywność i stabilność, co pozwala wnioskować o dużej użyteczności tego układu, nawet pomimo nieco mniejszej wydajności usuwania. Poza określeniem wpływu warunków procesu na efektywność usuwania tetracykliny niezwykle istotnym etapem prac było zdefiniowanie produktów powstałych po enzymatycznej konwersji oraz określenie możliwych szlaków degradacji tetracykliny. W oparciu o rezultaty analizy wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas wykazano, że w mieszaninie reakcyjnej obecne są śladowe pozostałości tetracykliny (pik dla protonowanej cząsteczki przy m/z 445 charakterystyczny dla formy ketonowej i enolowej tego związku), a także dwa związki, powstałe na skutek utleniania tetracykliny na atomie węgla C5 (pik protonowanej cząsteczki przy m/z 461) i/lub dehydrogenacji wyjściowego związku również na atomie węgla C5 (pik protonowanej cząsteczki przy

m/z 443). Odnotowano także dalsze transformacje związku powstałego po utlenianiu tetracykliny, które poprzez dehydrogenację prowadzą do powstania głównego produktu przemiany, którego protonowana cząsteczka przyjmuje wartość m/z 459. Związek ten może częściowo ulegać także procesowi demetylacji na grupie aminowej wchodzącej w strukturę antybiotyku, jednak powstałe produkty o m/z 431 nie są głównymi produktami przemiany (Rys. 12).

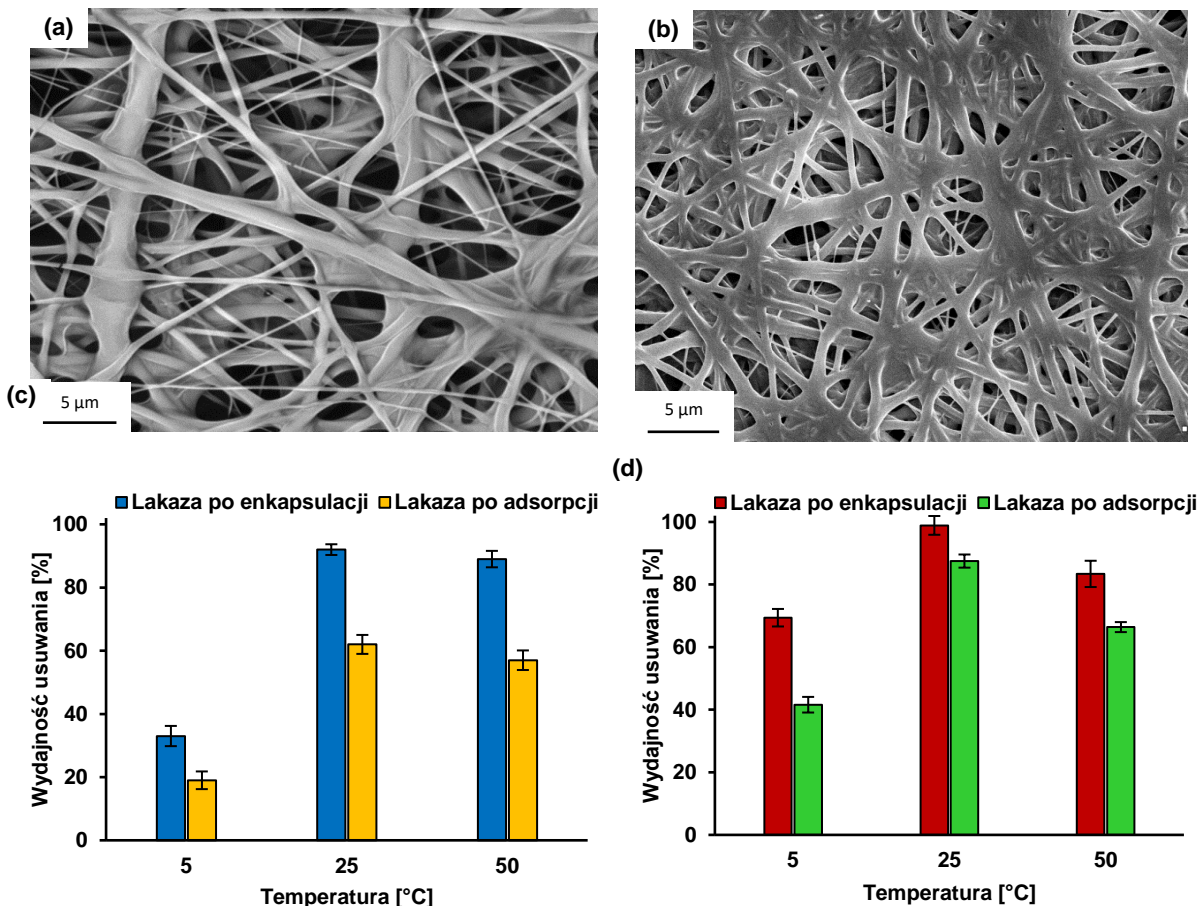


Rys. 12. Chromatogramy oraz odpowiadające im produkty enzymatycznej konwersji tetracykliny

Można zatem podsumować, że zaproponowany, wytworzony, scharakteryzowany oraz wykorzystany jako nowatorski nośnik w procesie immobilizacji układ hybrydowy poli(metakrylan metylu)-magnetyt jest niezwykle interesującym materiałem umożliwiającym przeprowadzenie immobilizacji lakazy różnymi technikami, co pozwala na znaczne podniesienie stabilności enzymu, jak i umożliwia zachowanie wysokich właściwości katalitycznych. Utylitarny charakter prowadzonych badań oraz powstałego systemu biokatalitycznego potwierdzono dzięki przeprowadzeniu testów usuwania tetracykliny z roztworów wodnych i wykazaniu, że możliwe jest usunięcie zanieczyszczenia z wysokimi wydajnościami przez immobilizowane lakazy, w szerokim zakresie pH oraz temperatury.

W oparciu o uzyskane zależności potwierdzono zasadność badań nad układami immobilizowanych enzymów opartych o materiały elektroprzędzone. Prace te kontynuowano i jako nośnik do unieruchomienia lakazy wybrano kopolimerowy materiał elektroprzędzony poli(kwas mlekowy)-ko-poli(ϵ -kaprolakton) (PLCL) odznaczający się dużą odpornością mechaniczną oraz zawartością grup karbonylowych i karboksylowych umożliwiającą zwiążanie enzymu (**H11**). W celach porównawczych enzym unieruchomiono na powierzchni włókien metodą adsorpcyjną oraz w ich wnętrzu poprzez enkapsulację. W oparciu o interpretację zdjęć SEM wykazano znaczne zmiany w morfologii materiałów przed i po immobilizacji. Czysty materiał PLCL charakteryzował się rozgałęzioną, trójwymiarową siecią relatywnie jednorodnych włókien o średnicach od 300 do 500 nm (Rys. 13a). Po enkapsulacji enzymu średnica włókien nie zmieniła się znacząco, jednak zaobserwowano występowanie charakterystycznych zgrubień, które wskazują na obecność agregatów enzymatycznych w tych częściach włókien (Rys. 13b). Z kolei po immobilizacji adsorpcyjnej powierzchnia włókien wydaje się być niejednorodna i częściowo pokryta agregatami enzymatycznymi, a średnice włókien wzrastają do około 800 nm. Wskazuje to na efektywną immobilizację enzymu zaproponowanymi technikami. Co więcej, analiza widm uzyskanych techniką spektroskopii fotoelektronów wzbudzonych promieniowaniem rentgenowskim wykazała zmiany w maksimum energii wiązań w regionie 289 eV, który jest charakterystyczny dla grup karbonylowych i karboksylowych, dla układu z zaadsorbowaną lakazą, w porównaniu do widma czystego nośnika PLCL. Może to wskazywać na wykorzystanie części grup funkcyjnych na powierzchni nośnika do zwiążania enzymu i wytworzenia oddziaływań adsorpcyjnych, co znajduje swoje potwierdzenie także w rezultatach analizy FTIR, na których zaobserwowano nieznaczne przesunięcia (o ok. 10 cm^{-1}) maksimów sygnałów pasm charakterystycznych dla wiązań obecnych w strukturze enzymu. Po potwierdzeniu efektywnej immobilizacji enzymu i zachowaniu przez lakazę aktywności katalitycznej, układy wykorzystano w procesach konwersji naproksenu oraz diklofenaku. Substancje te stanowią jeden z najczęściej wykorzystywanych, podstawowych składników niesteroidowych leków przeciwzapalnych, stosowanych powszechnie jako substancje przeciwzapalne, przeciwbólowe i przeciwgorączkowe. Ze względu na szkodliwy i mutageny charakter po przekroczeniu dopuszczalnej dawki, ich obecność w wodach i ściekach jest wysoce niepożądana, a metody wydajnego ich usuwania są poszukiwane. Stąd wspomniane przemiany realizowano w zmiennych warunkach procesowych, celem określenia zdolności biodegradacyjnych wytworzonych układów. W toku prowadzonych badań uzyskano wysokie wyniki usuwania obu farmaceutyków przez lakazę unieruchomioną na drodze enkapsulacji wewnątrz włókien elektroprzędzonego nośnika. Zarówno dla diklofenaku, jak i naproksenu, odnotowano ok. 90-proc. wydajność usuwania badanych zanieczyszczeń w pH od 3 do 5 i w temperaturze od 25 do 50 °C (Rys. 13c i 13d). Jest to związane z lepszą ochroną cząsteczek enzymu unieruchomionych wewnątrz matrycy, przed termiczną i chemiczną dezaktywacją. Warto odnotować, że ze względu na fakt, że naproksen jest relatywnie odporny na enzymatyczną degradację, do mieszaniny reakcyjnej dodano mediatora, którym był kwas (2,2'-azynobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy)) (ABTS). Dodatek ABTSu skutkował wzrostem efektywności degradacji naproksenu, a także znacznym wzrostem efektywności jego usuwania przez enzym unieruchomiony adsorpcyjnie. Aplikacyjny charakter wytworzonych systemów katalitycznych zweryfikowano w oparciu o testy ich wielokrotnego

wykorzystania w konwersji farmaceutyków. Chociaż w przypadku obu układów aktywność katalityczna spada wraz z wielokrotnym wykorzystaniem, to lakaza unieruchomiona poprzez enkapsulację umożliwiła usunięcie ponad 60% obu farmaceutyków po 5 cyklach reakcyjnych, co było możliwe głównie ze względu na ochronę cząsteczek enzymu oraz silne ograniczenie ich wymywania z nośnika.



Rys. 13. Zdjęcia SEM materiału PLCL po immobilizacji adsorpcyjnej (a) i enkapsulacji (b) lakazy oraz wpływ temperatury na efektywność usuwania diklofenaku (c) i naproksenu (d)

Rezultaty analizy wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas mieszanin otrzymanych po enzymatycznej konwersji farmaceutyków pozwoliły na zidentyfikowanie finalnych produktów procesu. Głównymi składnikami mieszaniny poreakcyjnej po konwersji diklofenaku były dwa związki, spośród których jeden powstał na skutek eliminacji cząsteczki wody ze struktury diklofenaku (jon przy m/z 278), a drugi na skutek wewnętrznego przegrupowania zachodzącego w strukturze pierwszego związku (jon przy m/z 284). Oba te produkty mogą ulegać dalszym konwersjom polegającym na eliminacji CO, H₂O₂ lub jonów chlorkowych ze struktury diklofenaku. W mieszaninie reakcyjnej nie wykryto hydroksy- i dihydroksydiklofenaku, a więc standardowych produktów enzymatycznej konwersji tego związku, kierując prowadzone przemiany na nie do końca zdefiniowane dotąd szlaki metaboliczne. Z kolei rezultaty analizy HPLC-MS mieszaniny po degradacji naproksenu wykazały większą różnorodność powstałych związków, spośród których wymienić należy związki posiadające jony przy m/z 201 oraz m/z 185, które powstają na skutek usunięcia cząsteczki kwasu mrówkowego z grupy karboksylowej naproksenu i wewnętrznych przegrupowań cząsteczki. Co więcej,

powstaje jeszcze jeden związek, którego jon charakteryzuje się m/z 231, a który po rozłożeniu i utracie cząsteczki ketenu tworzy 1-(6-metoksynaftalen-2-yl), jako główny produkt konwersji naproksenu przez immobilizowaną lakazę. Ocena toksyczności produktów po enzymatycznej konwersji pozwala na weryfikację szkodliwości powstałych produktów i odpowiedź na ile zaproponowana metoda usuwania farmaceutyków obniża toksyczność wyjściowych związków. Uzyskane dane wskazują, że wykorzystując enzym unieruchomiony poprzez enkapsulację możliwe było ponad czterokrotne zmniejszenie toksyczności wyjściowych substancji, podczas gdy enzym unieruchomiony adsorpcyjnie obniżał toksyczność mieszaniny o około 15–20%. Wykazano zatem, że nowatorskie, elektroprzędzone materiały hybrydowe okazały się być efektywnymi nośnikami w procesie immobilizacji oksydoreduktaz ukazując potencjał immobilizacji tego typu. Co więcej, wytworzone materiały w znaczący sposób poprawiły stabilność unieruchomionych enzymów, a powstałe układy biokatalityczne pozwoliły na zaproponowanie innowacyjnych sposobów konwersji substancji farmaceutycznie aktywnych. Dużą zaletą przedstawionych układów jest fakt, że prowadzą one do powstania mniej toksycznych substancji końcowych, w porównaniu do wyjściowych związków, co jednoznacznie potwierdza, jak perspektywiczną metodą jest enzymatyczna konwersja.

Poza farmaceutykami, w ściekach obecne są też inne związki fenolowe, jak np. bisfenole, które w znaczący sposób mogą wpływać na zdrowie ludzi i funkcjonowanie organizmów żywych. Bisfenole to klasa związków, które w swojej strukturze zawierają dwa pierścienie fenolowe połączone krótkim łącznikiem. Najpopularniejszym związkiem z tej grupy jest bisfenol A (BPA), który jest związkiem powszechnie wykorzystywanym w przemyśle polimerów oraz przetwórstwie tworzyw sztucznych oraz jest także znanym i stosowanym środkiem zmniejszającym palność [51]. Związek ten może łatwo przedostawać się np. do pożywienia z puszek, w których produkty te są przechowywane. Ze względu na silnie toksyczny charakter BPA obecnie poszukuje się jego mniej szkodliwych zamienników jak np. bisfenol S (BPS) czy bisfenol F (BSF). Jednak również i te związki są szkodliwe i mogą prowadzić do wystąpienia niepożądanych zmian i mutacji [52]. Stąd także w przypadku tego typu związków fenolowych konieczne jest opracowanie efektywnych i przyjaznych dla środowiska metod ich usuwania.

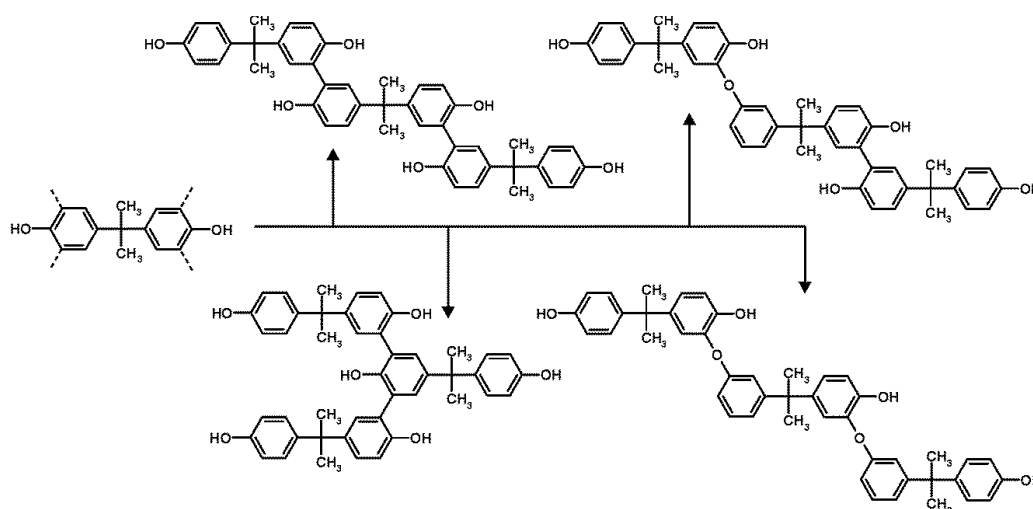
Korzystając ze zdobytego wcześniej doświadczenia, jak i w oparciu o zaprezentowane informacje podjęto badania mające na celu wykorzystanie immobilizowanej lakazy oraz tyrozynazy w procesach usuwania wspomnianych bisfenoli, co zweryfikowano i zaprezentowano w pracach **H12** oraz **H13**. Bazując na satysfakcjonujących rezultatach usuwania farmaceutyków z zastosowaniem oksydoreduktaz unieruchomionych na materiałach elektroprzędzonych, w kolejnym etapie prac jako nośnik wykorzystano hybrydowy układ elektroprzędzony powstały w skutek połączenia poli(kaprolaktonu) oraz chitozanu. Materiał ten charakteryzuje się nie tylko wysoką odpornością i stabilnością, ale także zawiera w swojej strukturze wiele reaktywnych grup funkcyjnych, przede wszystkim grupy karbonylowe, karboksylowe oraz aminowe, co ułatwia efektywne związanie białka. Immobilizacji poddano tyrozynazę, a więc enzym z grupy oksydoreduktaz również wykorzystujący tlen cząsteczkowy jako kosubstrat, a co więcej, charakteryzujący się specyficznością i selektywnością względem pochodnych fenolowych zawierających więcej niż jeden pierścień fenolowy w swojej strukturze. Dowiedziono, że materiał elektroprzędzony przed unieruchomieniem enzymu składa się z rozgałęzionych włókien o jednorodnej powierzchni i średnicach włókien ok. 340 nm. Po immobilizacji

tyrozynazy odnotowano znaczny wzrost średnic włókien, do wartości ok. 690 nm, co potwierdza unieruchomienie biokatalizatora, a analiza zdjęć SEM wskazuje na powstanie agregatów enzymatycznych na powierzchni włókien. Niemniej, jednym z najistotniejszych etapów badań był dobór optymalnych warunków procesu immobilizacji pod kątem uzyskania jak najwyższej aktywności układów po immobilizacji. Przeanalizowano wpływ pH, temperatury, początkowego stężenia roztworu tyrozynazy oraz czasu procesu unieruchamiania na aktywność układów biokatalitycznych, a do optymalizacji procesu wykorzystano modelowanie zrealizowane w oparciu o *response surface methodology*. Zastosowany model wykazuje tylko jedno globalne maksimum, a powierzchnia odpowiedzi jest dopasowana statystycznie. Przeprowadzone obliczenia wskazały pH 7, temperaturę 25 °C, roztwór enzymu o stężeniu 3 mg/mL oraz 16 h prowadzenia procesu jako optymalne warunki immobilizacji. Dane te pozostają w zgodzie z obserwacjami poczynionymi w oparciu o testy wstępne i pozwalają na wytworzenie systemów biokatalitycznych zachowujących 95% aktywności wolnego enzymu. Efektywność działania tych układów zweryfikowano następnie w procesie konwersji bisfenolu A z roztworów wodnych w zmiennych warunkach procesowych. Otrzymane dane wskazują na wysoką wydajność immobilizowanej tyrozynazy w usuwaniu BPA, bowiem odnotowano całkowite usunięcie tego związku z roztworów o stężeniu do 3 mg/L w czasie 90 min. Co więcej, możliwe było ponad 80-proc. usunięcie zanieczyszczenia z roztworów o pH od 6 do 9 oraz w temperaturze od 15 °C do 25 °C. W trakcie prac zweryfikowano także stabilizujący wpływ zastosowanego nośnika oraz typu immobilizacji na stabilność unieruchomionego enzymu. Zachowanie o około 40% wyższej aktywności przez immobilizowaną tyrozynazę, w porównaniu z wolnym odpowiednikiem, po 20 dniach przechowywania oraz po 120 min inkubacji w warunkach reakcyjnych jednoznacznie dowodzi poprawy odporności unieruchomionej tyrozynazy. Jest to związane nie tylko z ochronnym wpływem zastosowanego nośnika na cząsteczki enzymu, lecz także ze stabilizacją trójwymiarowej struktury biokatalizatora na skutek wytworzenia wiązań enzym - nośnik. Ma to bezpośrednie przełożenie na ograniczenie denaturacji struktury białkowej i zachowanie wyższej aktywności przez immobilizowany enzym. Co więcej, stabilne oddziaływanie enzym - nośnik zmniejszają wmywanie biokatalizatora z powierzchni nośnika. Fakt ten jest niezwykle istotny ponieważ umożliwia wielokrotne wykorzystanie systemu biokatalitycznego, co zostało zweryfikowane w przeprowadzonych testach. Uzyskane dane dowiodły, że nawet po 10 cyklach reakcyjnych, tyrozynaza związana z elektroprzędzonym nośnikiem umożliwia konwersję ponad 80% bisfenolu A. Zebrane dane dowiodły, że kompozytowy materiał elektroprzędzony poli(kaprolakton) - chitozan jest odpowiednią platformą do unieruchomienia enzymów, a określenie optymalnych warunków immobilizacji pozwala na wytworzenie układów o wysokiej aktywności. Znalazło to bezpośrednie przełożenie na wysokie wydajności procesu usuwania bisfenolu A, a dodatkowo możliwość wielokrotnego zastosowania wytworzonych systemów biokatalitycznych pozwala wnioskować o możliwości ich praktycznego wykorzystania.

W kolejnej pracy (**H13**) jako nośnik do adsorpcyjnego unieruchomienia enzymu użyto sponginoowego szkieletu pozyskanego z gąbek *Hippospongia communis*. Jest to odnawialny, biopolimerowy materiał, którego zaletą, poza otwartą strukturą jest duża ilość wolnych grup funkcyjnych wchodzących w skład aminokwasów budujących sponginę. Zapewnia to efektywne związanie enzymu bez konieczności modyfikacji powierzchni nośnika, czego potwierdzeniem jest analiza zdjęć SEM, na

których agregaty enzymatyczne o nieregularnym kształcie są widoczne na powierzchni sponginowego nośnika, dość jednolicie pokrywając powierzchnię materiału. Co więcej, na widmach FTIR układu po immobilizacji widoczne są pasma charakterystyczne zarówno dla struktury enzymu, jak i dla nośnika, co również pośrednio wskazuje na obecność biokatalizatora w analizowanym układzie. Skuteczność wytworzonych układów poddano weryfikacji w procesach usuwania trzech bisfenoli stanowiących zagrożenia środowiskowe, a więc bisfenolu A, bisfenolu F oraz bisfenolu S. W pierwszym etapie prac zdefiniowano najbardziej korzystne stężenie roztworu enzymu wykorzystanego do immobilizacji. Wykazano, że stężeniem które pozwala na unieruchomienie znacznych ilości enzymu, a jednocześnie umożliwia usuwanie bisfenoli z wysokimi wydajnościami jest stężenie lakazy wynoszące 1 mg/mL, wykorzystane w całym zakresie prac obrazujących usuwanie szkodliwych bisfenoli. Na proces biodegradacji wpływa wiele zmiennych, a jedną z nich jest ilość wykorzystanego biokatalizatora. Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują, że wytworzono wysoce aktywne systemy biokatalityczne, bowiem dodatek 0,05 g układu po immobilizacji umożliwia całkowite usunięcie BPA z roztworu modelowego. Po zdefiniowaniu wstępnych warunków procesu degradacji określono wpływ pH, temperatury oraz stężenia zanieczyszczenia na efektywność jego usuwania. Analogicznie jak w poprzednich badaniach zdefiniowano zdolności sorpcyjne sponginowego nośnika oraz efektywność enzymatycznej konwersji przez wolny enzym. Wykazano, że zaledwie ok. 10% BPA zostało usunięte przez czysty materiał. Wydajności usuwania bisfenoli przez wolną lakazę były zdecydowanie wyższe i przekraczały 90% po 24 h prowadzenia procesu, jednak trudności w oddzieleniu enzymu od mieszaniny poreakcyjnej powodują, że zastosowanie immobilizowanej formy enzymu wydaje się bardziej opłacalne. Po 24 h procesu realizowanego z roztworu o stężeniu 2 mg/L, w optymalnych warunkach immobilizowana lakaza pozwoliła na całkowite usunięcie BPA (pH 5, temperatura 30 °C) oraz BPF (pH 5, temperatura 40 °C) oraz ok. 40% BPS (pH 5, temperatura 30 °C). Zdecydowanie niższa wydajność usuwania bisfenolu S jest spowodowana obecnością w jego strukturze grupy SO_2 , co powoduje, że w roztworze wodnym cząsteczka tego związku jest dodatkowo stabilizowana dzięki transferowi elektronów pomiędzy wspomnianą grupą chemiczną, a pierścieniem fenolowym. Niemniej jednak, w temperaturach od 20 do 40 °C oraz w pH w zakresie od 4 do 7 ponad 90% BPA zostało usunięte z analizowanych roztworów przez unieruchomioną lakazę. Z kolei w przypadku BPF ponad 80-proc efektywność remediacji odnotowano w węższym zakresie pH (4, 5) i temperatury (20 i 40 °C). Były to wartości zdecydowanie wyższe niż uzyskane dla wolnego enzymu, co wskazuje na wzrost stabilności i odporności immobilizowanej lakazy na działanie czynników zewnętrznych, w porównaniu do jej wolnego odpowiednika. Najmniejszy wpływ zmiennych warunków procesowych na efektywność usuwania zanieczyszczenia odnotowano dla BPS. Warto również dodać, że wraz ze wzrostem stężenia roztworu badanego bisfenolu maleje wydajność jego usuwania, jednak stężenia 20 mg/L oraz 50 mg/L daleko wykraczają poza przyjęte normy środowiskowe, stąd osiągnięty stopień biodegradacji bisfenoli z tych roztworów należy uznać za satysfakcjonujący. Dowodem potwierdzającym wzrost stabilności enzymów są także rezultaty obrazujące zmiany aktywności enzymu w trakcie przechowywania. Nawet po 50 dniach magazynowania lakaza immobilizowana na sponginowym nośniku zachowuje ok. 85% początkowych właściwości, co wskazuje na stabilizujący efekt nośnika oraz wytworzenie wielopunktowych oddziaływań enzym - nośnik. Finalny etap badań stanowiło zdefiniowanie produktów

enzymatycznej konwersji lakazy i wskazanie do jakich związków konwertowany jest wyjściowy substrat. Niezależnie od transformowanego związku, głównymi produktami rozkładu BPA oraz BPF, poza pozostałościami nieusuniętego początkowego bisfenolu, są ich dimery oraz trimery (Rys. 14). Jest to zgodne z utleniającym mechanizmem działania lakazy, które w pierwszym etapie reakcji generuje powstanie wolnego rodnika w pierścieniu fenolowym, który następnie może łączyć się z innymi wolnymi rodnikami prowadząc do powstania dimerów, trimerów, a nawet oligomerów wyjściowych związków. Warto zatem odnotować, że biopolimerowy nośnik o dużej ilości grup funkcyjnych w strukturze po raz kolejny okazał się właściwym materiałem do osadzenia enzymu, a wytworzone systemy biokatalityczne nie tylko odznaczały się wysoką aktywnością i stabilnością, ale umożliwiły również wydajne usuwanie bisfenoli, czyniąc je predysponowanymi do wykorzystania m.in. w szeroko rozumianej ochronie środowiska.



Rys. 14. Przykładowe struktury trimerów bisfenolu A (BPA) powstające jako główne produkty enzymatycznej konwersji tego związku

4.5. Podsumowanie

Zaprezentowany monotematyczny cykl artykułów naukowych traktuje o różnorodności metod oraz mnogości materiałów nośnych, służących do wytwarzania nowych układów immobilizowanych enzymów o potencjalnym praktycznym zastosowaniu w procesach obróbki wstępnej i konwersji składników biomasy oraz w procesach usuwania wybranych zanieczyszczeń środowiskowych z roztworów wodnych. Wnikliwa analiza przedstawionego tematu pozwoliła na stwierdzenie, że zarówno technika immobilizacji, jak i dobór odpowiedniego nośnika kształtują stabilność i aktywność katalityczną unieruchomionych enzymów, jak i determinują ich możliwe praktyczne wykorzystanie. Dowiedziono, że w roli nośników dla enzymów wykorzystanych może zostać bardzo szeroki wachlarz materiałów, jednak kwestią zasadniczą jest obecność reaktywnych grup na ich powierzchni oraz duża stabilność mechaniczna. Niemniej, wykorzystanie nowych materiałów hybrydowych o zdefiniowanych właściwościach, jak i nośników wytworzonych specjalnie pod kątem danego enzymu daje dodatkowe możliwości i w zdecydowany sposób zwiększa zakres stosowalności unieruchomionych enzymów.

Wytworzone układy biokatalityczne okazały się być wydajnymi katalizatorami procesów związanych z konwersją składników biomasy oraz usuwania wybranych zanieczyszczeń, w tym związków fenolowych. Dowiedziono jednak, że wydajność realizowanych przemian zależy nie tylko do aktywności unieruchomionego enzymu, ale także od warunków prowadzenia procesu, stąd konieczny jest ich właściwy dobór. Odpowiednie zaprojektowanie procesu technologicznego pozwala na uzyskanie wysokich wydajności prowadzonych przemian, co skutkuje możliwością przeniesienia opracowanych rozwiązań na roztwory rzeczywiste oraz stwarza możliwość realizacji wspomnianych procesów w skali przemysłowej. Ten użyteczny aspekt prowadzonych prac odznacza się nie tylko wysokim poziomem nowości naukowej, ale może mieć także bezpośrednie przełożenie na wzrost wykorzystania układów immobilizowanych enzymów w procesach technologicznych.

Do najważniejszych osiągnięć badawczych prezentowanego monotematycznego cyklu artykułów naukowych zaliczyć należy przede wszystkim:

- Zdefiniowanie założeń wytwarzania nowych układów immobilizowanych enzymów z wykorzystaniem materiałów pochodzenia organicznego, nieorganicznego oraz hybrydowych;
- Wykorzystanie różnych technik immobilizacji do wytworzenia multifunkcyjnych układów biokatalitycznych o wysokiej aktywności i stabilności;
- Opracowanie metody wytwarzania nowej gamy materiałów elektroprzewodzących oraz metodyki immobilizacji enzymów na ich powierzchni oraz w ich wnętrzu;
- Zdefiniowanie rodzaju i charakteru oddziaływań enzym - nośnik, jak i ocena wpływu tych oddziaływań na właściwości unieruchomionego enzymu;
- Ocenę możliwości zastosowania unieruchomionej celulazy w procesie obróbki wstępnej biomasy;
- Efektywną konwersję monosacharydów zawartych w rzeczywistym roztworze biomasy do wartościowych związków katalizowaną przez wytworzone układy enzymatyczne;
- Zwiększenie efektywności i przyspieszenie procesów katalitycznych dzięki wykorzystaniu procesu koimmobilizacji enzymów;
- Ocenę możliwości wykorzystania układów immobilizowanych enzymów w procesach usuwania wybranych zanieczyszczeń środowiskowych z modelowych roztworów wodnych, poprzedzoną zaawansowaną charakterystyką wytworzonych układów;
- Określenie wpływu wybranych parametrów procesowych, w tym przede wszystkim pH, temperatury i stężenia farmaceutyków na efektywność ich biodegradacji;
- Wykorzystanie bioreaktora enzymatycznego zawierającego wytworzone systemy unieruchomionych enzymów jako złoża katalityczne do prowadzenia procesów konwersji tetracykliny w sposób ciągły;
- Realizację procesu usuwania wybranych zanieczyszczeń z wykorzystaniem jednoczesnych procesów adsorpcji i enzymatycznej konwersji;
- Zdefiniowanie produktów enzymatycznej transformacji tetracykliny, naproksenu i diklofenaku, jak i podjęcie próby scharakteryzowania ścieżek konwersji wspomnianych związków;
- Ocenę i porównanie toksyczności mieszanin farmaceutyków przed i po procesie biodegradacji;
- Skuteczną konwersję bisfenoli przez układy immobilizowanych oksydoreduktaz, ze szczególnym uwzględnieniem weryfikacji i optymalizacji procesu immobilizacji wspomnianych enzymów pod kątem osiągnięcia wysokich wydajności realizowanych przemian.

Reasumując, można stwierdzić, że właściwa selekcja nośnika, pod kątem unieruchamianego enzymu oraz procesu technologicznego, w którym układ ten ma znaleźć swoje zastosowanie jest kluczowa i w dużym stopniu determinuje właściwości wytworzonego układu biokatalitycznego. Dodatkowo zaproponowane metody immobilizacji pozwoliły na wytworzenie wysoce stabilnych i aktywnych układów immobilizowanych enzymów, które mogą znaleźć praktyczne zastosowanie w procesach przemysłowych. Stąd też niezwykle ważne wydaje się dalsze prowadzenie badań związanych z immobilizacją enzymów, z wykorzystaniem nowej generacji materiałów nośnych celem wytworzenia innowacyjnych układów immobilizowanych enzymów.

Uzyskane, scharakteryzowane i opisane dane eksperymentalne mają duże znaczenie dla dynamicznego rozwoju nowo opracowanych systemów immobilizowanych biokatalizatorów o specyficznych właściwościach użytkowych. Uzyskane zależności w istotny sposób uzupełniają istniejący stan wiedzy takich dziedzin nauki jak chemia, technologia chemiczna, inżynieria materiałowa, czy biotechnologia, a także mają znaczny wpływ na rozwój dyscypliny nauki chemicznej. W oparciu o uzyskane informacje możliwe będzie opracowanie założeń technologicznych wytwarzania nowej generacji układów biokatalitycznych przeznaczonych do wykorzystania w różnych dziedzinach technologii, włączając procesy konwersji biomasy, jak i usuwania zanieczyszczeń środowiskowych. Podjęcie wspomnianej tematyki badawczej jest niezwykle istotne i może przyczynić się do bardziej ekonomicznego prowadzenia procesów przeróbki składników biomasy, jak również ograniczenia rozprzestrzeniania się szkodliwych substancji w środowisku naturalnym, w sposób zrównoważony i przyjazny dla środowiska. Należy również dodać, że artykuły opublikowane w ramach monotematycznego cyklu prac, a związane z tematyką ochrony środowiska, zostaną uzupełnione o dane eksperymentalne i założenia technologiczne prowadzenia tych procesów w większej skali oraz z wykorzystaniem roztworów rzeczywistych.

4.6. Literatura

1. Sheldon, R.A., Woodley, J.M., Role of biocatalysis in sustainable chemistry, *Chemical Reviews*, 118 (2018) 801-838.
2. Wu, J., Wang, X., Wang, Q., Lou, Z., Li, S., Zhu, Y., Qin, L., Wei, H., Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): Next-generation artificial enzymes (II), *Chemical Society Reviews*, 48 (2019) 1004-1076.
3. Bilal, M., Asgher, M., Cheng, H., Yan, Y., Iqbal, H.M.N., Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design, *Critical Reviews in Biotechnology*, 39 (2018) 202-219.
4. Jesionowski, T., Zdarta, J., Krajewska, B., Enzyme immobilization by adsorption: A review, *Adsorption* (2014) 20, 801-821.
5. Boudrant, J., Woodley, J.M., Fernandez-Lafuente, R., Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation, *Process Biochemistry*, 90 (2020) 66-80.
6. Sheldon, R.A., Brady, D., The limits to biocatalysis: Pushing the envelope, *Chemical Communications*, 54 (2018) 6088-6104.
7. Silva, C., Martins, M., Jing, S., Fu, J., Cavaco-Paulo, A., Practical insights on enzyme stabilization, *Critical Reviews in Biotechnology*, 38 (2018) 335-350.
8. Chapman, J, Ismail, A.E., Dinu, C.Z., Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks, *Catalysts*, 8 (2018) 238.
9. Liu, D.-M., Chen, J., Shi, Y.-P., Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 102 (2018) 332-342.
10. Zhou, Y., Fang, Y., Ramasamy, R.P., Non-covalent functionalization of carbon nanotubes for electrochemical biosensor development, *Sensors*, 19 (2019) 392.

11. Husain, Q., Nanocarriers immobilized proteases and their industrial applications: An overview, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 18 (2018) 486-499.
12. Huang, W.-C., Wang, W., Xue, C., Mao, X., Effective enzyme immobilization onto a magnetic chitin nanofiber composite, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6 (2018) 8118-8124.
13. Galvão, W.S., Pinheiro, B.B., Golçalves, L.R.B., de Mattos, M.C., Fonseca, T.S., Regis, T., Zampieri, D., dos Santos, J.C.S., Costa, L.S., Correa, M.A., Bohn, F., Fachine, P.B.A., Novel nanohybrid biocatalyst: application in the kinetic resolution of secondary alcohols, *Journal of Materials Science*, 53 (2018) 14121-14137.
14. Deng, Z., Wang, F., Zhou, B., Li, J., Li, B., Liang, H., Immobilization of pectinases into calcium alginate microspheres for fruit juice application, *Food Hydrocolloids*, 89 (2019) 691-699.
15. Bugg, T.D.H., Williamson, J.J., Rashid, G.M.M., Bacterial enzymes for lignin depolymerisation: New biocatalysts for generation of renewable chemicals from biomass, *Current Opinion in Chemical Biology*, 55 (2020) 26-33.
16. Dou, B., Zhang, H., Song, Y., Zhao, L., Jiang, B., He, M., Ruan, C., Chen, H., Xu, Y., Hydrogen production from the thermochemical conversion of biomass: Issues and challenges, *Sustainable Energy and Fuels*, 3 (2019) 314-342.
17. Wang, H., Pu, Y., Ragauskas, A., Yang, B., From lignin to valuable products—strategies, challenges, and prospects, *Bioresource Technology*, 271 (2019) 449-461.
18. Bilal, M., Adeel, M., Rasheed, T., Zhao, Y., Iqbal, H.M.N., Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation – A review, *Environment International*, 124 (2019) 336-353.
19. Xiong, Z., Zhang, H., Zhang, W., Lai, B., Yao, G., Removal of nitrophenols and their derivatives by chemical redox: A review, *Chemical Engineering Journal*, 359 (2019) 13-31.
20. Bilal, M., Rasheed, T., Iqbal, H.M.N., Yan, Y., Peroxidases-assisted removal of environmentally-related hazardous pollutants with reference to the reaction mechanisms of industrial dyes, *Science of the Total Environment*, 644 (2018) 1-13.
21. Jun, L.Y., Yon, L.S., Mubarak, N.M., Bing, C.H., Pan, S., Danquah, M.K., Abdullah, E.C., Khalid, M., An overview of immobilized enzyme technologies for dye and phenolic removal from wastewater, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7 (2019) 102961.
22. Kumar, D., Das, T., Giri, B.S., Verma, B., Preparation and characterization of novel hybrid bio-support material immobilized from *Pseudomonas cepacia* lipase and its application to enhance biodiesel production, *Renewable Energy*, 147 (2020) 11-24.
23. Ismail, A.R., Baek, K.H., Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects, *International Journal of Biological Macromolecules*, 163 (2020) 1624-1639.
24. Zdarta, J., Meyer, A.S., Jesionowski, T., Pinelo, M., A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility, *Catalysts* (2018) 8, 92.
25. Sankaran, R., Parra Cruz, R.A., Pakalapati, H., Show, P.L., Ling, T.C., Chen, W.H., Tao, Y., Recent advances in the pretreatment of microalgal and lignocellulosic biomass: A comprehensive review, *Bioresource Technology*, 298 (2020) 122476.
26. Zabed, H.M., Akter, S., Yun, J., Zhang, G., Awad, F.N., Qi, X., Sahu, J.N., Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 105 (2019) 105-128.
27. Saldarriaga-Hernandez, S., Velasco-Ayala, C., Leal Isla Flores, P., de Jesus Rostro-Alanis, M., Parra-Saldivar, R., Iqbal, H.M.N., Carrillo-Nieves, D., Biotransformation of lignocellulosic biomass into industrially relevant products with the aid of fungi-derived lignocellulolytic enzymes, *International Journal of Biological Macromolecules*, 161 (2020) 1099-1116.
28. Kwak, S., Jo, J.H., Yun, E.J., Jin, Y.S., Seo, J.H., Production of biofuels and chemicals from xylose using native and engineered yeast strains, *Biotechnology Advances*, 37 (2019) 271-283.
29. Qi, B., Vu, A., Wickramasinghe, S.R., Qian, X., Glucose production from lignocellulosic biomass using a membrane-based polymeric solid acid catalyst, *Biomass and Bioenergy*, 117 (2018) 137-145.
30. Kumar, V., Binod, P., Sindhu, R., Gnansounou, E., Ahluwalia, V., Bioconversion of pentose sugars to value added chemicals and fuels: Recent trends, challenges and possibilities, *Bioresource Technology*, 269 (2018) 443-451.
31. Marpani, F., Pinelo, M., Meyer, A.S., Enzymatic conversion of CO₂ to CH₃OH via reverse dehydrogenase cascade biocatalysis: Quantitative comparison of efficiencies of immobilized enzyme systems, *Biochemical Engineering Journal*, 127 (2017) 217-228.

32. da Silva, R.M., Goncalves, L.R.B., Rodrigues, S., Different strategies to co-immobilize dextranucrase and dextranase onto agarose based supports: Operational stability study, *International Journal of Biological Macromolecules*, 156 (2020) 411-419.
33. Ansari, M., Alam, A., Bera, R., Hassan, A., Goswami, S., Das, N., Synthesis, characterization and adsorption studies of a novel triptycene based hydroxyl azo-nanoporous polymer for environmental remediation, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8 (2020) 103558.
34. Alshabib, M., Onaizi, S.A., A review on phenolic wastewater remediation using homogeneous and heterogeneous enzymatic processes: Current status and potential challenges, *Separation and Purification*, 219 (2019) 186-207.
35. Belaidi, S., Mammeri, L., Mechakra, H., Remache, W., Benhamouda, K., Larouk, S., Kribeche, M.A., Sehili, T., UV and solar light induced natural iron oxide activation: Characterization and photocatalytic degradation of organic compounds, *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 17 (2019) 20180027.
36. Morsi, R., Bilal, M., Iqbal, H.M.N., Ashraf, S.S., Laccases and peroxidases: The smart, greener and futuristic biocatalytic tools to mitigate recalcitrant emerging pollutants, *Science of the Total Environment*, 714 (2020) 136572.
37. Hwang, E., Ngo, H.T.T., Yang, J.-E., Park, S.-Y., Bae, J., Yi, T.-H., Evaluation of protective effect of cyclodextrin glucanotransferase-treated *Gastrodia elata* blume extract on ultraviolet b-induced premature skin aging, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 17 (2018) 1969-1975.
38. Cai, M.-H., Wu, Y.-P., Ji, W.-X., Han, Y.-Z., Li, Y., Wu, J.-C., Shuang, C.-D., Korshin, G.V., Li, A.-M., Li, W.-T., Characterizing property and treatability of dissolved effluent organic matter using size exclusion chromatography with an array of absorbance, fluorescence, organic nitrogen and organic carbon detectors, *Chemosphere*, 243 (2020) 125321.
39. Siddiqui, I., Husain, Q., Stabilization of polydopamine modified silver nanoparticles bound trypsin: Insights on protein hydrolysis, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 173 (2019) 733-741.
40. Gangopadhyay, U.K., Dongre, S.S., Salunkhe, P.R., Biological method to reduce phenol content for efficient and environment friendly effluent treatment, *Mad-Made Textiles in India*, 46 (2018) 367-371.
41. Alshabib, M., Onaizi, S.A., Enzymatic remediation of bisphenol A from wastewaters: Effects of biosurfactant, anionic, cationic, nonionic, and polymeric additives, *Water, Air, and Soil Pollution*, 231 (2020) 428.
42. Varga, B., Somogyi, V., Meiczinger, M., Kovats, N., Domokos, E., Enzymatic treatment and subsequent toxicity of organic micropollutants using oxidoreductases – A review, *Journal of Cleaner Production*, 221 (2019) 306-322.
43. Naghdi, M., Taheran, M., Brar, S.K., Kermanshahi-pour, A., Verma, M., Surampall, R.Y., Removal of pharmaceutical compounds in water and wastewater using fungal oxidoreductase enzymes, *Environmental Pollution*, 234 (2018) 190-213.
44. Wu, E., Li, Y., Huang, Q., Yang, Z., Wei, A., Hu, Q., Laccase immobilization on amino-functionalized magnetic metal organic framework for phenolic compound removal, *Chemosphere*, 239 (2019) 327-335.
45. Chen, Y., Shafiq, M., Liu, M., Morsi, Y., Mo, X., Advanced fabrication for electrospun three-dimensional nanofiber aerogels and scaffolds, *Bioactive Materials*, 5 (2020) 963-979.
46. Zdarta, J., Meyer, A.S., Jesionowski, T., Pinelo, M., Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: A comprehensive review, *Advances in Colloid and Interface Science* (2018) 258, 1-20.
47. Zdarta, J., Meyer, A.S., Jesionowski, T., Pinelo, M., Multi-faceted strategy based on enzyme immobilization with reactant adsorption and membrane technology for biocatalytic removal of pollutants: A critical review, *Biotechnology Advances* 37 (2019) 107401.
48. Padil, V.V.T., Cheong, J.Y., KP, A., Makvandi, P., Zare, E.N., Torres-Mendieta, R., Waclawek, S., Černík, M., Kim, I.-D., Varma, R.S., Electrospun fibers based on carbohydrate gum polymers and their multifaceted applications, *Carbohydrate Polymers*, 247 (2020) 116705.
49. Zaarour, B., Zhu, L., Huang, C., Jin, X., A mini review on the generation of crimped ultrathin fibers via electrospinning: Materials, strategies, and applications, *Polymers for Advanced Technologies*, 31 (2020) 1449-1462.
50. El-Aassar, M.R., Alsohaimi, I.H., Ali, A.S.M., Elzain, A.A., Removal of phenol and bisphenol A by immobilized laccase on poly(acrylonitrile-co-styrene/pyrrole) nanofibers, *Separation Science and Technology*, 55 (2020) 2670-2678.
51. Osman, M.A., Mahmoud, G.I., Elgammal, M.H., Hasan, R.S., Bisphenol A hormonal disruption and preventive effect of rose water and clove oil, *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11 (2021) 8780-8803.

52. Xiao, X., Zhang, X., Bai, J., Li, J., Zhang, C., Zhao, Y., Zhu, Y., Zhang, J., Zhou, X., Bisphenol S increases the obesogenic effects of a high-glucose diet through regulating lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans*, *Food Chemistry*, 339 (2021) 127813.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

1. W latach 2017–2018 uczestniczyłem, jako główny wykonawca po stronie jednostki naukowej, w projekcie *PTL clean up – Enhanced value and expanded applications from 2G/hemicellulosic sugars from PTL (Pretreated Liquids)* realizowanym w ramach konsorcjum badawczo-rozwojowego utworzonego przez Technical University of Denmark (DTU) oraz Nova Pangea Company, którego organem współfinansującym był The Research Council of Denmark.
2. Podczas stażu naukowego PostDoc na DTU Chemical Engineering, Technical University of Denmark byłem promotorem pomocniczym dwóch prac magisterskich realizowanych pod promotorstwem Prof. Manuela Pinelo.
3. 23.05.2019 r. jako External Reviewer brałem udział w obronie rozprawy doktorskiej PhD Student Zhibo Zhang, pod tytułem *Use of Ionic Liquids and Support Materials for High Performance Enzymatic Conversion of CO₂ into Formic Acid and Formaldehyde*. Obrona odbyła się w Department of Chemical and Biochemical Engineering, DTU Chemical Engineering, Technical University of Denmark, Kgs. Lyngby, Dania.

Współpraca z innymi ośrodkami akademickimi

1. W latach 2015–obecnie prowadzę aktywną współpracę z zespołem kierowanym przez Profesor Anne S. Meyer, DTU Bioengineering, Technical University of Denmark. Współpraca została zainicjowana moim stażem naukowo-badawczym realizowanym w DTU Chemical Engineering, Technical University of Denmark, a dotyczy ona poprawy właściwości białek katalitycznych poprzez immobilizację oraz możliwości praktycznego wykorzystania wytworzonych układów. Owocem współpracy są liczne artykuły naukowe opublikowane w renomowanych czasopismach indeksowanych przez JCR Thomson Reuters.
2. W latach 2017–obecnie prowadzę aktywną współpracę z Profesorem Manuelem Pinelo z DTU Chemical Engineering, Department of Chemical and Biochemical Engineering, Technical University of Denmark. Współpraca dotyczy głównie projektowania i wykorzystania membranowych reaktorów enzymatycznych z immobilizowanymi biokatalizatorami w procesach enzymatycznej konwersji biomasy i/lub usuwania wybranych zanieczyszczeń fenolowych w sposób ciągły, a jej owocem są liczne artykuły naukowe opublikowane w renomowanych czasopismach indeksowanych przez JCR Thomson Reuters.
3. W latach 2017–obecnie prowadzę aktywną współpracę naukową z dr inż. Ewą Kijeńską-Gawrońską z Wydziału Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej. Współpraca ta dotyczy otrzymywania nowej grupy hybrydowych materiałów elektroprzewodzących pod kątem ich zastosowania jako nośników w immobilizacji enzymów. Owocem tej współpracy są liczne artykuły naukowe opublikowane w czasopismach indeksowanych przez JCR Thomson Reuters.
4. W latach 2018–obecnie prowadzę aktywną współpracę z zespołem naukowym Profesor Izabeli Nowak z Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Współpraca dotyczy wykorzystania syntezowanych w zespole Profesor Nowak materiałów nieorganicznych o zdefiniowanych parametrach i właściwościach jako nośników w procesie immobilizacji biokatalizatorów.

5. W latach 2019–obecnie prowadzę aktywną współpracę z Profesorem Long N. Nghiem i Profesorem Luong N. Nguyen, która została nawiązana w trakcie stażu naukowo-badawczego w Environmental & Water Engineering, School of Civil and Environmental Engineering, University of Technology Sydney. Współpraca dotyczy produkcji i otrzymywania nowej gamy enzymów z grupy oksydoreduktaz, które po pozyskaniu przez australijskiego partnera są poddawane immobilizacji w badaniach realizowanych na Politechnice Poznańskiej.
6. W latach 2020–obecnie prowadzę intensywną współpracę z Profesorem Muhammadem Bilalem oraz Profesorem Hafizem M.N. Iqbalem, którzy reprezentują School of Life Sciences and Food Engineering, Huaiyin Institute of Technology (Chiny) oraz Tecnológico de Monterrey, School of Engineering and Sciences (Meksyk). Współpraca ta dotyczy opracowania nowatorskich systemów biokatalitycznych do usuwania zanieczyszczeń środowiskowych.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Działalność dydaktyczna – prowadzone zajęcia od 2019 r.

Rodzaj zajęć dydaktycznych	Przedmiot	Kierunek studiów	Studia
Wykład	Wybrane zagadnienia współczesnej wiedzy chemicznej	Technologia Chemiczna, specjalność: Chemia Organiczna	Stacjonarne II stopnia
	Materiały kompozytowe	Inżynieria Chemiczna i Procesowa, specjalność: Inżynieria Bioprocessów i Biomateriałów	Stacjonarne II stopnia
Ćwiczenia	Technologia nieorganiczna	Inżynieria Chemiczna i Procesowa	Stacjonarne I stopnia
Laboratorium	Technologia chemiczna nieorganiczna	Technologia Chemiczna	Stacjonarne I stopnia
	Hybrid Materials and Fillers	Technologia Chemiczna, specjalność: Composites and Nanomaterials	Stacjonarne II stopnia
	Technologia chemiczna	Technologia Chemiczna	Niestacjonarne I stopnia
	Wybrane działy technologii	Technologia Chemiczna Ogólna	Niestacjonarne II stopnia

Działalność dydaktyczna – promotorstwo prac dyplomowych od 2019 r.

Prace dyplomowe inżynierskie studia stacjonarne I stopnia, kierunek studiów: Technologia Chemiczna	Prace dyplomowe magisterskie studia stacjonarne II stopnia, kierunek studiów: Technologia Chemiczna, specjalność: Technologia Chemiczna Organiczna, Composites and Nanomaterials, Elektrochemia Techniczna
6	3

W ramach działalności dydaktycznej realizowanej w Zakładzie Technologii Chemicznej, w Instytucie Technologii i Inżynierii Chemicznej Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej od 2019 roku prowadziłem zajęcia ze studentami, na różnych kierunkach studiów, w ramach I i II stopnia kształcenia na studiach stacjonarnych i niestacjonarnych, co szczegółowo zaprezentowano w powyższej tabeli. Od 2019 r. byłem/jestem promotorem 6 prac dyplomowych inżynierskich oraz 3 prac dyplomowych magisterskich. Dodatkowo od 2020 r. jestem odpowiedzialny za przedmiot *Technologia chemiczna nieorganiczna* (wykłady oraz laboratoria), z czym związane było

opracowanie zagadnień teoretycznych oraz ćwiczeń laboratoryjnych dla nowo powstałego kierunku studiów *Inżynieria farmaceutyczna*. Warto dodać, że w ramach działalności dydaktycznej w 2020 r. brałem też udział w przygotowaniu zajęć dydaktycznych dla anglojęzycznego kierunku studiów *Chemical Technology* realizowanego na Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej, w ramach programu POWER.

Działalność dydaktyczna – opieka naukowa nad doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub promotora pomocniczego

Imię i nazwisko doktoranta	mgr inż. Katarzyna Jankowska
Okres sprawowania opieki	2017–obecnie
Tytuł rozprawy doktorskiej	The removal of selected environmental pollutants from aqueous solutions using immobilized laccase (Usuwanie wybranych zanieczyszczeń środowiskowych z roztworów wodnych z wykorzystaniem immobilizowanej lakazy)
Dane przewodu doktorskiego	Przyjęcie uchwały: 04.12.2018 r., Nr uchwały: RW-13/4/2018
Jednostka organizacyjna	Politechnika Poznańska, Wydział Technologii Chemicznej, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej
Charakter opieki	Promotor pomocniczy
Imię i nazwisko doktoranta	mgr inż. Karolina Bachosz
Okres sprawowania opieki	2018–obecnie
Tytuł rozprawy doktorskiej	Reaktywna konwersja składników biomasy z równoczesną regeneracją kofaktora enzymatycznego
Dane przewodu doktorskiego	Przyjęcie uchwały: 06.10.2020 r., Nr uchwały RD-10/6/2020
Jednostka organizacyjna	Politechnika Poznańska, Wydział Technologii Chemicznej, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej
Charakter opieki	Promotor pomocniczy

Działalność organizacyjna i promocyjna

Lata	Rodzaj aktywności
2014–2016, 2018, 2019	Organizacja warsztatów „Poznaj chemiczne technologie przyszłości” podczas Nocy Naukowców organizowanej na Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej
2015	Członkostwo w Komitecie Organizacyjnym konferencji BioOrg 2015 – I Wielkopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów, Poznań 2015 r.
2015, 2016	Udział i promocja Politechniki Poznańskiej na Targach Edukacyjnych
2015, 2016, 2019	Organizacja warsztatów podczas dni otwartych organizowanych na Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej w ramach ogólnouczelnianych akcji „Drzwi otwarte” oraz „Dziewczyny na Politechnikę”

7. Pozostałe informacje dotyczące kariery zawodowej

W czerwcu 2010 r. ukończyłem studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu uzyskując tytuł magistra chemii broniąc pracę magisterską pt. „*Studia nad syntezą oligonukleotydu zawierającego addukt 2'-deoksyguanozyny z aldehydem malonowym i octowym*”, której promotorem był prof. dr hab. Henryk Koroniak. Realizując studia magisterskie rozpocząłem jednocześnie studia na Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej, które ukończyłem w 2013 r. broniąc pracę inżynierską pt. „*Immobilizacja Amano Lipase A na powierzchni krzemionki*”, której promotorem była dr inż. Agnieszka Kołodziejczak-Radzimska. Kontynuację zainicjowanych badań stanowiły rozpoczęte w 2012 r. studia doktoranckie na Wydziale Technologii Chemicznej pod opieką prof. dr. hab. inż. Teofila Jesionowskiego, których tematyką była immobilizacja enzymów na wybranych nośnikach organicznych i nieorganicznych. Studia te zakończyły się uzyskaniem, stopnia naukowego doktora nauk chemicznych w zakresie technologii chemicznej w kwietniu 2017 r. Decyzją Rady Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej rozprawa doktorska została wyróżniona.

Po ukończeniu studiów doktoranckich wyjechałem na staż naukowy typu postdoc, który miał miejsce w latach 2017–2018 w Center for Bioprocess Engineering, DTU Chemical Engineering, Technical University of Denmark, Dania, pod nadzorem profesor Anne S. Meyer oraz profesora Manuela Pinelo. Poza zdobytym bezcennym doświadczeniem, efektem stażu było nawiązanie trwałej i efektywnej współpracy naukowej, która trwa do dziś, a której efektem są liczne artykuły naukowe opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych. Od września 2018 roku jestem zatrudniony na Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej, a moje prace skoncentrowane są na wytwarzeniu stabilnych i aktywnych systemów biokatalitycznych do różnorodnych zastosowań praktycznych. Warty odnotowania jest także fakt, że poza bliską współpracą z Duńskim Uniwersytemem Technicznym prowadzę aktywną współpracę z uznanymi naukowcami z renomowanych jednostek naukowych, wśród których wymienić należy przede wszystkim profesora Muhammada Bilala (School of Life Sciences and Food Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Chiny), profesora Hafiza M.N. Iqbal (Tecnologico de Monterrey, School of Engineering and Sciences, Meksyk), profesora Long N. Nghiema i profesora Luong N. Nguyena (Environmental & Water Engineering, School of Civil and Environmental Engineering, University of Technology Sydney, Australia). Realizuję także aktywne prace badawcze we współpracy z krajowymi jednostkami, takimi jak Wydział Chemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza (grupa naukowa profesor Izabeli Nowak) czy Wydział Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej (grupa naukowa profesora Wojciecha Świążkowskiego).

Obecnie realizuję badania związane z opracowaniem efektywnych metod usuwania substancji farmaceutycznie aktywnych z grupy związków psychotropowych oraz estrogenów z roztworów wodnych, z wykorzystaniem funkcjonalnych systemów biokatalitycznych opartych o immobilizowane oksydoreduktazy. Za swoją pracę naukową zostałem dwukrotnie uhonorowany nagrodami zespołowymi JM Rektora Politechniki Poznańskiej w latach 2018 oraz 2019. Natomiast w 2019 r. przyznano mi Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla Wybitnych Młodych Naukowców na okres 3 lat. W 2015 roku przyznano mi Stypendium celowe dla Doktorantów i młodych Doktorów w ramach Projektu „Inżynier Przyszłości. Wzmocnienie potencjału dydaktycznego Politechniki Poznańskiej”. Także w 2015 r. prezentowane przeze mnie wyniki zostały wyróżnione nagrodą za najlepszy poster na

konferencji VIII Ogólnopolskie Sympozjum Nauka i Przemysł - Metody Spektroskopowe w Praktyce, Nowe Wyzwania i Możliwości.

Poza pracami nad nowatorskimi systemami biokatalitycznymi do różnorodnych zastosowań, jednym z moich zainteresowań naukowych jest wykorzystanie spektroskopii w podczerwieni do identyfikacji związków organicznych i nieorganicznych, jak i zastosowanie tej techniki do weryfikacji efektywności realizowanych procesów adsorpcji, fotokatalizy, czy syntezy hybrydowych i kompozytowych materiałów pochodzenia nieorganicznego oraz organicznego. Efektem tych prac jest szereg artykułów naukowych nie wchodzących bezpośrednio w skład monotematycznego cyklu prac, jednak stanowiący niezwykle istotne uzupełnienie mojej dotychczasowej działalności naukowej.

Mój dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje 34 publikacji, w czasopismach znajdujących się aktualnie na liście filadelfijskiej, których łączny IF z roku publikacji wynosi 130,925, a suma punktów MNiSW dla tych publikacji wynosi 3620. Ponadto jestem współtwórcą jednego zgłoszenia patentowego zgłoszonego do Urzędu Patentowego Rzeczypospolitej Polskiej. Według bazy Web of Science liczba cytowań wszystkich artykułów z moim udziałem to 1341 (bez autocytowań 1183) (dane z dnia 23.11.2020 r.), a indeks Hirscha wynosi 18. Wyniki prac zrealizowanych po uzyskaniu stopniu doktora prezentowałem na licznych konferencjach krajowych i międzynarodowych, czego efektem są liczne publikacje w materiałach konferencyjnych oraz wystąpienia ustne, jak i prezentacje posterów.

