

SYLWIA ŁABUŹEK<sup>1)</sup>, BOŻENA NOWAK<sup>1)</sup>, JOLANTA PAJĄK<sup>1)</sup>, GRAŻYNA RYMARZ<sup>2)</sup>

## Aktywność zewnątrzkomórkowej depolimerazy wydzielanej przez szczep *Gliocladium solani* w toku degradacji poliestru „Bionolle<sup>®</sup>”<sup>\*</sup>)

**Streszczenie** — Określono spektrum aktywności zewnątrzkomórkowej depolimerazy produkowanej przez wyizolowany z gleby szczep *Gliocladium solani* oraz zbadano przebieg mechanizmów degradacji alifatycznego poliestru „Bionolle<sup>®</sup>” typ # 3001 z udziałem tego enzymu. Optymalna wartość pH odpowiadająca jego maksymalnej aktywności wynosi 5. Stwierdzono, że enzym charakteryzuje się szerokim spektrum aktywności hydrolitycznej zarówno wobec wiązań estrowych naturalnych oraz syntetycznych polimerów, jak i estrowych pochodnych krótko- i długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Wydajniej atakuje fazę amorficzną niż krystaliczną tworzywa oraz preferencyjnie hydroлізуje przede wszystkim mery adypinianowe poliestru pozostawiając w nim mery bursztynianowe.

**Słowa kluczowe:** poliestr alifatyczny, degradacja, depolimeraza, grzyby mikroskopowe *Gliocladium solani*, specyficzność substratowa.

### ACTIVITY OF EXTRACELLULAR DEPOLYMERASE SECRETED BY *GLIOCLADIUM SOLANI* STRAIN DURING „BIONOLLE<sup>®</sup>” POLYESTER DEGRADATION

**Summary** — The range of activity of extracellular depolymerase secreted by *Gliocladium solani* strain (Fig. 2), isolated from the soil, was determined. The course of degradation of aliphatic „Bionolle<sup>®</sup>” polyester, type # 3001, under the influence of this enzyme (Table 1) was studied. Optimum pH value related to its maximal activity equals 5 (Fig. 1). It was found that the enzyme discussed shows wide range of hydrolytic activity, being active towards ester bonds of natural and synthetic polymers as well as towards ester derivatives of short- or long-chain fatty acids (Table 1). Depolymerase attacks better the amorphous phase of polymer than the crystalline one (Fig. 3). It preferentially caused hydrolysis of mainly adipate mers of polyester leaving succinate ones.

**Key words:** aliphatic polyester, degradation, depolymerase, *Gliocladium solani*, substrate specificity.

Degradację naturalnych bądź syntetycznych poliestrów w warunkach naturalnych [por. np. 1, 2] umożliwia m.in. działanie zewnątrzkomórkowych enzymów wydzielanych przez mikroorganizmy w wyniku ich bezpośredniego kontaktu z polimerem. Obecność tworzywa inicjuje lub przyspiesza syntezę w drobnoustrojach enzymów wydzielanych następnie do środowiska i adsorbowanych na powierzchni materiału polimerowego. Do enzymów rozrywających wiązania estrowe zalicza się przede wszystkim esterazy, lipazy, kutynazy i proteazy należące do klasy hydrolaz [3–5].

Powszechnie uważa się, że zdolność mikroorganizmów do degradacji syntetycznych poliestrów wynika z ich podobieństwa chemicznego do naturalnego poli-hydroksymaślanu (PHB). Naturalne poliestry  $\beta$ -hydroksykwasów [takie jak poli( $\beta$ -hydroksymaślan)] są rozkładane z udziałem esteraz zwanych depolimerazami

PHB, natomiast w degradacji syntetycznych poliestrów hydroksykwasów [takich jak poli( $\beta$ -propioniolakton)] są zaangażowane zarówno depolimerazy PHB, jak i lipazy [6–8]. Do 1996 r. sądzono, że degradację poliestrów  $\omega$ -hydroksykwasów [np. polikaprolaktonu (PCL)], powodują jedynie lipazy, prace Murphy i wsp. [9] wykazały jednak, że w rozkładzie PCL uczestniczą również kutynazy wydzielane przez patogenne dla roślin grzyby.

Enzymatyczna hydroliza poliestrów to proces dwuetapowy. Na pierwszym etapie enzym łączy się z materiałem, na kolejnym — rozrywa wiązania chemiczne łańcucha polimeru. W wyniku działania endo- bądź egzozymów powstają różne produkty degradacji co wiąże się z odmiennymi miejscami ataku białek enzymatycznych na wielkocząsteczkowy substrat. Do ataku endo- może dochodzić w dowolnych punktach łańcuchów polimerowych, natomiast atak egzozymów przebiega tylko na tych ich końcach, na których obecne są określone grupy funkcyjne, np. hydroksylowa lub karboksylowa. Rozrywanie wiązań łańcucha w efekcie działania endo- powoduje szybkie zmniejszanie ciężaru cząsteczkowego polimeru, podczas gdy działanie egzozymów prowadzi do powstawania dużej liczby oligomerów bądź monomerów, które z kolei łatwiej ulegają biologicznej asymilacji i mineralizacji [10].

<sup>\*</sup>) Artykuł zawiera treść wystąpienia w ramach Konferencji Naukowej „Materiały Polimerowe POMERANIA-PLAST”, Kołobrzeg, 23–25 maja 2007 r.

<sup>1)</sup> Uniwersytet Śląski, Katedra Biochemii, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, e-mail: bnowak@us.edu.pl

<sup>2)</sup> Instytut Inżynierii Materiałów Polimerowych i Barwników w Toruniu, Oddział Farb i Tworzyw, ul. Chorzowska 50, 44-100 Gliwice

W naszych poprzednich badaniach nad biodegradacją folii polietylenowych modyfikowanych poliestrem „Bionolle<sup>®</sup>” zaobserwowaliśmy, że stanowił on doskonałe źródło węgla dla grzybów mikroskopowych [11–14], co jednoznacznie dowodziło, iż mikroorganizmy te wydzielają specyficzne enzymy zdolne do rozzerwania wiązań estrowych polimeru [15].

Celem referowanej tu pracy było określenie spektrum aktywności zewnątrzkomórkowej depolimerazy wydzielanej przez wyizolowany z gleby szczep *Gliocladium solani* oraz poznanie mechanizmów degradacji poliestru „Bionolle<sup>®</sup>” typ # 3001 przebiegających z udziałem tego enzymu.

## CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

### Badany materiał

Badaniom poddano syntetyczny alifatyczny poliestr „Bionolle<sup>®</sup>” typ # 3001 o wskaźniku szybkości płynięcia (MFR) równym 4,7 g/10 min, firmy Showa Denko (Europe) GmbH.

### Mikroorganizmy

W badaniach wykorzystano szczep grzyba mikroskopowego *Gliocladium solani* (Karting) Petch, wyizolowany z gleby i oznaczony w Instytucie Ekologii Terenów Uprzemysłowanych w Katowicach. Szczep ten hodowano w zmodyfikowanym podłożu Martina [16] o składzie:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,5 g, pepton — 5 g, glukoza — 10 g, agar — 20 g, woda destylowana — 1000  $\text{cm}^3$ , pH 5,8. Modyfikacja polegała na eliminacji z podłoża różu bengalskiego i aureomycyny a wzbogaceniu go wyciągiem glebowym (25  $\text{cm}^3$  wyciągu/ $\text{dm}^3$  podłoża) o składzie: gleba — 1000 g, woda destylowana — 1000  $\text{cm}^3$ .

### Synteza enzymów

Syntezę zewnątrzkomórkowych enzymów (depolimerazy) prowadzono w kolbach, w mineralnej płynnej pożywce wg Oda [17] sterylizowanej w temp. 121 °C, pod ciśnieniem 1,2 atm (0,12 MPa), w ciągu 20 minut. Jej skład obejmował:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  — 1 g,  $\text{NaNO}_3$  — 1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 1 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,5 g,  $\text{KCl}$  — 0,1 g,  $\text{ZnSO}_4$  — 0,07 g,  $\text{FeSO}_4$  — 0,01 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  — 0,01 g, woda destylowana — 1000 ml, pH 5,2.

W toku badań nad wpływem obecności dodatkowego źródła węgla na aktywność depolimeraz, pożywkę mineralną wzbogacano ekstraktem drożdżowym lub roztworem glukozy bądź sacharozy o stężeniu 2 g/ $\text{dm}^3$  pożywki. W podłożach umieszczano, uprzednio sterylizowane na drodze zanurzenia na 5 min w 70-proc. izopropanolu, krążki folii „Bionolle<sup>®</sup>” o masie 0,25 g oraz zarodniki *Gliocladium solani* o stężeniu  $10^5$ . W celach

porównawczych stosowano również podłoża zawierające wyłącznie jedno z dodatkowych źródeł węgla (bez poliestru). Inkubowano bez wytrząsania w temperaturze pokojowej przez 7 dób. Hodowle przesączano w warunkach sterylnych. Sączki z grzybnią suszono do stałej masy w temp. 105 °C i obliczano suchą masę grzybni. Sterylny filtrat zawierający zewnątrzkomórkowe enzymy zachowywano w celu określenia ich specyficzności substratowej a następnie filtrat wykorzystywano w opisywanych tu badaniach biodegradacji.

### Badanie aktywności zewnątrzkomórkowych enzymów

Stopień aktywności enzymów jako depolimeraz poliesterów oznaczano stosując wodne zawiesiny polihydroksymaślanu (PHB), poli ( $\epsilon$ -kaprolaktonu) (PCL) i „Bionolle<sup>®</sup>”. Do badań sporządzano mieszaninę objętości 2  $\text{cm}^3$  i składzie: 1-mol. bufor fosforanowy o pH 6,0 — 0,2  $\text{cm}^3$ , zawiesina poliestru — 0,25  $\text{cm}^3$ , surowa frakcja enzymatyczna — 1,55  $\text{cm}^3$ .

— Aktywność enzymu wobec PHB oceniano na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych (spektrofotometr dwuwiązkowy „Cecil 8000”) po 1 h, a wobec PCL i „Bionolle<sup>®</sup>” — po 3 h inkubacji mieszanin reakcyjnych w łaźni wodnej w temp. 40 °C. Jednostkę aktywności depolimerazy 1U zdefiniowano jako ilość enzymu powodującą zmniejszenie absorbancji (A) mieszanin reakcyjnych mierzonych przy  $\lambda = 650$  nm lub  $\lambda = 580$  nm o 10 % na godzinę [17, 18].

— Aktywność lipolityczną enzymów określano przy użyciu palmitynianu *p*-nitrofenolu (pNPP), natomiast aktywność esterazową — z wykorzystaniem maślanu *p*-nitrofenolu (pNBP). W tym celu sporządzano mieszaninę reakcyjną objętości 3  $\text{cm}^3$  i składzie: 0,05-mol. bufor fosforanowy o pH 6,0 — 1,9  $\text{cm}^3$ , pNPP lub pNBP — 0,1  $\text{cm}^3$ , surowa frakcja enzymatyczna — 1  $\text{cm}^3$ . Spektrofotometrycznego pomiaru przyrostu absorbancji  $A_{410}$  ( $\lambda = 410$  nm) dokonywano po 60 min inkubacji w łaźni wodnej o temp. 40 °C. Aktywność 1U lipazy odpowiadała ilości *p*-nitrofenolu uwolnionego w ciągu 1 min [19].

— Aktywność lipolityczną wobec oliwy z oliwek oceniano stosując roztwór triglicerydów zawierający oliwę z oliwek — 15  $\text{cm}^3$ , czynnik emulgujący ( $\text{NaCl}$  — 1,79 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,041 g, guma arabska — 0,6 g, woda dejonizowana — 400  $\text{cm}^3$ ) — 50  $\text{cm}^3$  i wodę dejonizowaną — 235  $\text{cm}^3$ . Mieszaninę reakcyjną o składzie: 2  $\text{cm}^3$  przygotowanego roztworu triglicerydów oraz 5  $\text{cm}^3$  100-mmol. buforu octanowego o pH 5,5 inkubowano w temp. 40 °C w ciągu 1 h. Następnie dodawano 20  $\text{cm}^3$  alkoholu etylowego. Uwolnione kwasy tłuszczowe miareczkowano 0,05 N KOH. Za jednostkę aktywności 1U lipazy przyjęto w tym przypadku ilość zużytego KOH/1 h/mg białka [20, 21].

— Mieszanina reakcyjna do oznaczania aktywności proteolitycznej zawierała: 0,1-proc. roztwór kazeinianu

sodu w buforze Tris-HCl o pH 5,5 — 2,5 cm<sup>3</sup> i surową frakcję enzymatyczną — 1 cm<sup>3</sup>. Mieszaninę inkubowano w ciągu 1 h w łaźni wodnej o temp. 40 °C, po czym wprowadzano 1 cm<sup>3</sup> 17,5-proc. kwasu trichlorooctowego. Po odwirowaniu białka pobierano 2 cm<sup>3</sup> supernatantu i dodawano 3 cm<sup>3</sup> 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i 1 cm<sup>3</sup> trzykrotnie rozcieńczonego odczynnika Folina-Ciocalteu. Po upływie 10 min spektrofotometrycznie mierzono absorbancję. Jednostka aktywności proteazy 1U została zdefiniowana jako ilość proteazy powodująca wzrost absorbancji (A<sub>720</sub>) o 10 % [22].

— Do kontroli aktywności omawianych enzymów posłużyły sporządzone wg wyżej opisanych procedur odpowiednie mieszaniny reakcyjne zawierające frakcję danego enzymu uprzednio dezaktywowaną na drodze umieszczenia jej we wrzącej łaźni wodnej na okres 5 minut. Aktywność właściwą enzymu podawano w odnośnej się do danego substratu wartości U na mg białka w roztworze.

— Stężenie białka enzymatycznego w pochodowlanych filtratach oznaczano spektrofotometrycznie ( $\lambda = 280$  nm) i określano na podstawie krzywych wzorcowych sporządzonych w odniesieniu do roztworów lizozymu o znanych stężeniach.

— Produktywność, czyli zdolność grzybów mikroskopowych do wydzielania enzymu w określonych warunkach wyrażano w jednostkach aktywności roztworu enzymu (U) jako depolimerazy powodującej degradację poliestru „Bionolle<sup>®</sup>” (depolimerazy Bionolle<sup>®</sup>) w przeliczeniu na 1 gram wytworzonej suchej masy grzybnii.

### Optimum pH enzymu

Optymalne wartości pH odpowiadające maksymalnej aktywności depolimerazy oznaczano wobec „Bionolle<sup>®</sup>” jako substratu w buforach o pH mieszczącym się w przedziale 2—9.

### Enzymatyczna degradacja „Bionolle<sup>®</sup>”

W kolbach zawierających 250 cm<sup>3</sup> uzyskanego w powyżej opisany sposób filtratu pochodowlanego umieszczano uprzednio wysterylizowane w 70-proc. alkoholu izopropylowym krążki folii poliestrowej o masie 0,25 g. Dla porównania, kondycjonowanie folii prowadzono także w roztworze enzymów zdenaturowanych w ciągu 15 min w autoklawie w temp. 121 °C pod ciśnieniem 1,2 atm (0,12 MPa). W celu zachowania ciągłości procesu biodegradacji filtraty z roztworem enzymów wymieniało co 7 dni. Degradacja folii trwała łącznie 84 doby, przy czym oceniano jej przebieg po 21, 42, 63 i 84 dobach. Po każdym z tych okresów kondycjonowania krążki folii usuwano z roztworu, myto wodą destylowaną, zanurzano w 1-proc. roztworze chlorku rtęci(II) i ponownie przemywano wodą, po czym suszono do stałej masy. Takie postępowanie powtarzano pięciokrotnie.

### Ocena stopnia biodegradacji poliestru

— Ubytek masy próbek z dokładnością do 0,1 mg oznaczano grawimetrycznie.

— Fakturę folii obserwowano w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM) „Tesla BS 340”. Próbki pokrywano złotem technicznym metodą odparowania metalu w napyłarce typu „Pelco S. C. 6”, w ciągu 40 s (natężenie prądu 25 mA, ciśnienie 80 Pa).

— Oznaczanie masowego wskaźnika szybkości płynięcia (MFR) poliestru [wg PN-EN ISO 1133:2005 (U)] wykonywano przy użyciu plastometru obciążnikowego typu „As-108”. Tworzywo podgrzewano do temp. 190 °C i wytłaczano przez dyszę średnicy 2,095 mm pod obciążeniem tłoka 2,16 kg.

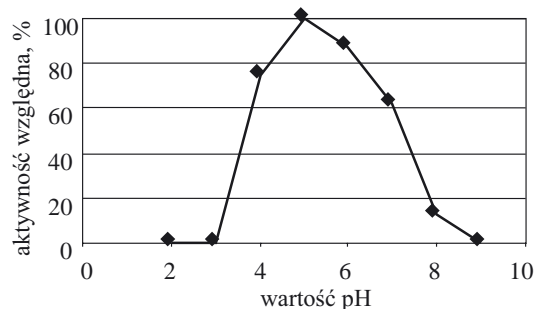
— Właściwości termiczne folii [wg PN-EN ISO 11357-1:2002] badano z zastosowaniem kalorymetru skaningowego typu „STA 625” (firmy Polymer Labs) z szybkością podgrzewania 20 °C/min. Do obliczania stopnia krystaliczności (X, %) folii po degradacji przyjęto podaną przez producenta wartość entalpii topnienia całkowicie krystalicznego „Bionolle<sup>®</sup>” wynoszącą 200 J/g.

## WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

### Optimum pH depolimerazy

W przypadku każdego rodzaju enzymu można określić optymalne pH roztworu, w warunkach którego wykazuje on maksymalną aktywność. Zmiana stężenia jonów wodorowych w środowisku w stosunku do wartości optymalnej wpływa na konformację enzymu lub na zmianę ładunku reszt aminokwasowych, zmniejszając tym samym jego zdolność do przyłączania substratu i katalizy reakcji enzymatycznej.

Na rysunku 1 przedstawiono wpływ pH roztworu na aktywność względną depolimerazy *Gliocladium solani* wobec zastosowanego poliestru „Bionolle<sup>®</sup>”. Tak więc, zewnątrzkomórkowa depolimeraza w badanym układzie wykazywała największą aktywność enzymatyczną



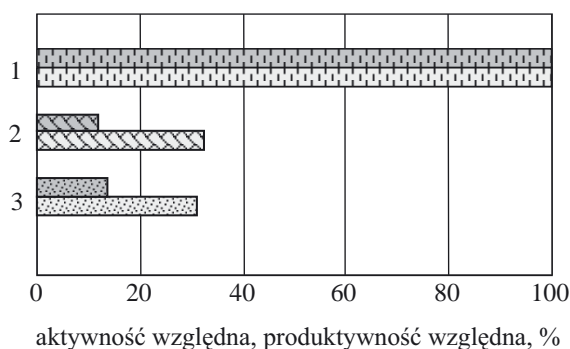
Rys. 1. Zależność aktywności względnej depolimerazy *Gliocladium solani* wobec „Bionolle<sup>®</sup>” od pH roztworu  
Fig. 1. Dependence of relative activity of depolymerase from *Gliocladium solani* towards „Bionolle<sup>®</sup>” on pH of the solution



w warunkach pH 5. Na kolejnych etapach pracy przygotowywano zatem podłoża o pH zbliżonym do optymalnego.

### Wpływ dodatkowego źródła węgla na aktywność enzymu

Uważa się, że synteza i wydzielanie depolimeraz podlega podwójnej regulacji, mianowicie zahamowanie wydzielania następuje w warunkach bądź braku odpowiedniego substratu, bądź też w obecności źródła łatwiej przyswajalnego przez mikroorganizmy węgla (tzw. represja kataboliczna) [23, 24]. Rysunek 2 ilustruje zależność aktywności względnej depolimerazy wobec „Bionolle<sup>®</sup>” oraz względnej produktywności enzymatycznej szczepu *Gliocladium solani* od obecności dodatkowego — poza poliesterowym — źródła węgla w podłożu.



Rys. 2. Aktywność względna (■) depolimerazy „Bionolle<sup>®</sup>” oraz względna produktywność enzymatyczna (■) szczepu *Gliocladium solani* po 7 dniach wzrostu w podłożu zawierającym: „Bionolle<sup>®</sup>” (1), „Bionolle<sup>®</sup>” + ekstrakt drożdżowy (2) lub „Bionolle<sup>®</sup>” + glukoza (3)

Fig. 2. Relative activity of „Bionolle<sup>®</sup>” depolymerase (■) and relative enzymatic productivity of *Gliocladium solani* strain (■) after seven-day growth in a medium containing: „Bionolle<sup>®</sup>” (1), „Bionolle<sup>®</sup>” and yeast extract (2), „Bionolle<sup>®</sup>” and glucose (3)

Przyrost suchej masy grzybni *Gliocladium solani* w pożywce, w której jedynym źródłem węgla była folia poliesterowa świadczył o tym, że wydzielala ona enzymy zdolne do rozkładu poliesteru a także o tym, że mikroorganizmy te asymilowały i mineralizowały powstałe małowcząsteczkowe oligomery wbudowując atomy węgla zawarte w łańcuchu syntetycznego polimeru w biomase. Obecność w podłożu źródła łatwiej przyswajalnego przez mikroorganizmy węgla (2 i 3 na rys. 2) hamowała aktywność oraz produktywność depolimerazy o ok. 66 %, a w podłożu z sacharozą (nieuwidocznionym na rysunku) — nawet o 100 %. Produktywność względna szczepu w obecności ekstraktu drożdżowego, glukozy bądź sacharozy stanowiła odpowiednio 11,8 %, 13,8 % i 0 % produktywności uzyskanej w podłożu bez do-

datkowego źródła węgla. Ponieważ w podłożach kontrolnych, w których grzyby wzrastały z wykorzystaniem jedynie takich właśnie łatwiej przyswajalnych substratów, wydzielane wówczas enzymy nie wykazywały żadnej aktywności wobec poliesteru można wnioskować, że w jego obecności następowało wytwarzanie specyficznej depolimerazy — wspomnianej już depolimerazy „Bionolle<sup>®</sup>”. Dalsze badania dotyczące specyficzności substratowej enzymu oraz mechanizmu degradacji poliesteru przebiegającej z jego udziałem prowadzono w pożywce mineralnej, gdzie jedynym źródłem węgla i induktorem enzymów był poliester „Bionolle<sup>®</sup>”.

### Aktywność depolimerazy

Tabela 1 przedstawia aktywność roztworu depolimerazy *Gliocladium solani* w obecności różnych substratów. Tak więc, badana depolimeraza charakteryzowała się szerokim spektrum aktywności enzymatycznej. Największą aktywność właściwą wynoszącą 9,4 U/mg białka przejawiała wobec wiązań estrowych krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych maślanu *p*-nitrofenolu oraz — 7,48 U/mg białka — wobec „Bionolle<sup>®</sup>”. Enzym wykazywał śladową, najprawdopodobniej nieistotną w procesie degradacji „Bionolle<sup>®</sup>”, aktywność proteazową (tj. wobec kazeinianu sodu). O aktywności lipazowej enzymu świadczyła zdolność do degradacji wiązań estrowych palmitynianu *p*-nitrofenolu oraz triglicerydów zawartych w oliwie z oliwek. Z danych literaturowych wynika, że — w przeciwieństwie do depolimeraz PHB — lipazy i kutynazy degradują szerszą gamę związków chemicznych, w tym poliestry  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -hydroksykwasów. Aktywności badanego enzymu jako lipazy dowodzi zatem nie tylko zdolność do rozkładu P(3HB) oraz PCL ale także wyznaczone wcześniej optimum pH, które dla kutynaz wynosi ok. 10 [25]. W innych naszych badaniach wykazano ponadto, że omawiana depolimeraza „Bionolle<sup>®</sup>” *Gliocladium solani* nie była wydzielana w obecności innych substratów, takich jak P(3HB), PCL oraz oliwa z oliwek, spełniających rolę induktorów syntezy białek o aktywności lipolitycznej [15].

T a b e l a 1. Specyficzność substratowa depolimerazy *Gliocladium solani*

T a b l e 1. Substrate specificity of *Gliocladium solani* depolymerase

Substrat	Aktywność enzymu, U	Aktywność właściwa enzymu U/mg białka
„Bionolle <sup>®</sup> ”	62,83	7,48
PCL	15,71	1,87
P(3HB) <sup>*)</sup>	18,86	2,24
pNPB	79	9,40
pNPP	30	3,57
Oliwa z oliwek	5,88	0,70
Kazeinian sodu	0,5	0,06

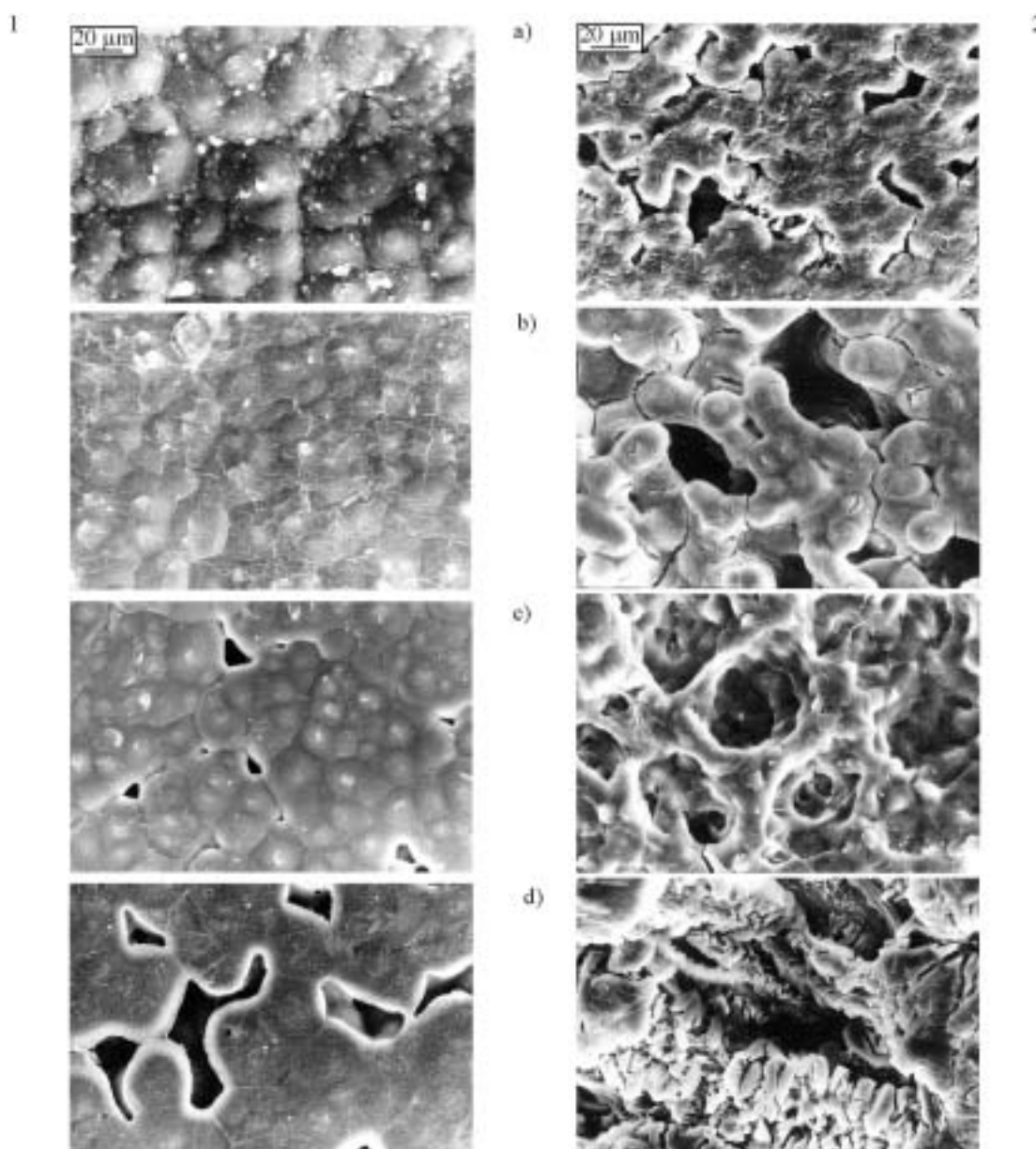
<sup>\*)</sup> P(3HB) — poli(3-hydroksymaślan), pozostałe symbole por. tekst.

### Mechanizmy degradacji poliestru

Rysunek 3 przedstawia, obrazy SEM folii „Bionolle<sup>®</sup>” inkubowanej w roztworach aktywnej (natywnej) i zdenaturowanej depolimerazy tego poliestru. Zaobserwowano znaczną różnicę w mechanizmie rozkładu folii w zależności od aktywności enzymatycznej środowiska degradacji. Próbkę poddane działaniu nieaktywnego enzymatycznie (denaturowanego) filtratu pochodzącego (rys. 3 — 1) ulegały wskutek hydrolizy degradacji powierzchniowej. Charakterystyczna faktura próbek wyraźnie wygładzała się i folie stawały się cieńsze. Pierwsze, niewielkie dziury w tworzywie stwierdzono dopiero po 63 dobach rozkładu (rys. 3 — 1c). W

przeciwieństwie do takiej degradacji abiotycznej, atak enzymatyczny przebiegał preferencyjnie w określonych obszarach folii — i to zarówno w powierzchniowych, jak i w głębszych warstwach materiału. Folia poddana działaniu aktywnej depolimerazy już po 21 dobach stawała się krucha a po 84 — przypominała sito (rys. 3 — 2d).

W tabeli 2 przedstawiono charakterystykę folii „Bionolle<sup>®</sup>” po degradacji w roztworze zewnątrzkomórkowych enzymów *Gliocladium solani*. Wraz z upływem czasu obserwowano zwiększający się ubytek masy folii w roztworach zarówno z natywną, jak i zdenaturowaną depolimerazą Bionolle<sup>®</sup>, przy czym po 84 dobach degradacji enzymatycznej wyniósł on 71,92 % a w przypadku



Rys. 3. Obraz (SEM) folii „Bionolle<sup>®</sup>” inkubowanej w roztworach depolimerazy: 1 — denaturowanej, 2 — aktywnej, w ciągu: a) 21 dób, b) 42 dób, c) 63 dób, d) 84 dób

Fig. 3. SEM images of „Bionolle<sup>®</sup>” film samples incubated in the solutions of denatured (1) or active (2) depolymerase for: a) 21 days, b) 42 days, c) 63 days and d) 84 days

degradacji abiotycznej w nieaktywnym enzymatycznie płynie pochodzonym — zaledwie 0,3 %.

**T a b e l a 2.** Charakterystyka poliestru „Bionolle<sup>®</sup>” po degradacji aktywną lub zdenaturowaną depolimerazą

**T a b e l e 2.** Characteristics of „Bionolle<sup>®</sup>” polyester after degradation with active or denatured depolymerase forms

Środowisko degradacji	Czas degradacji, doby	Badany parametr			
		Ubytek masy, %	MFR g/10 min	DSC	
				$T_m$ , °C	$X_c$ , %
	0	—	4,7	90,34	26,98
Enzym aktywny	21	3,77	2,5	89,66	30,91
	42	40,48	0,4	89,61	31,67
	63	54,55	0,2	88,88	35,53
	84	71,92	0,1	97,12	16,22
Enzym zdenaturowany	21	0,04	3,7	88,15	27,23
	42	0,12	1,6	92,64	27,17
	63	0,27	0,2	92,44	30,07
	84	0,30	0,2	88,14	31,15

Niezależnie od zastosowanego układu doświadczalnego, ciężar cząsteczkowy „Bionolle<sup>®</sup>” wzrasta (MFR maleje). Jest to spowodowane faktem, że degradacji ulegają przede wszystkim małowieliczkowe frakcje poliestru.

Krystaliczność folii inkubowanej w roztworze nieaktywnych enzymów zwiększała się z upływem czasu degradacji aż do końca badania (84 doby). Degradacji abiotycznej podlegał więc zwłaszcza amorficzny obszar przede wszystkim warstwy powierzchniowej tworzywa (rys. 3 — 1). Krystaliczność próbek poddawanych działaniu enzymów wzrastała z 26,98 % do 35,53 % do 63 doby degradacji po czym malała do 16,22 %. Można stąd wnioskować, że choć enzymy uczestniczące w depolimeracji „Bionolle<sup>®</sup>” preferencyjnie atakowały amorficzną fazę polimeru, to również były zdolne do wydajnego rozkładu jego fazy krystalicznej. Z literatury wiadomo, że temperatura topnienia poli(bursztynianu butylenu) oraz poli(adypinianu butylenu) wynosi odpowiednio 114 °C i 60 °C [26]. Spadek temperatury topnienia poliestru ( $T_m$ ) do wartości 88,88 °C po 63 dobach inkubacji wskazywał, że biodegradacja fazy amorficznej przebiegała w wyniku usuwania z materiału przede wszystkim merów bursztynianowych. Rozkładowi fazy krystalicznej folii obserwowanemu w ostatnich 21 dobach eksperymentu towarzyszył już też rozpad wiązań adypinianowych „Bionolle<sup>®</sup>”, o czym świadczył wzrost temperatury topnienia do 97,12 °C.

#### WNIOSKI

— Grzyby mikroskopowe *Gliocladium solani* rosnąc w obecności poliestru „Bionolle<sup>®</sup>” wydzielają zewnątrzkomórkową depolimerazę „Bionolle<sup>®</sup>”.

— Obecność w podłożu z poliestrem dodatkowego źródła łatwiej przyswajalnego przez mikroorganizmy węglę hamowała aktywność tego enzymu.

— Depolimeraza Bionolle<sup>®</sup> przejawiała aktywność wobec wiązań estrowych naturalnych i syntetycznych polimerów oraz pochodnych estrowych krótko- i długołańcuchowych kwasów tłuszczowych.

— Enzym wydajniej atakował fazę amorficzną niż krystaliczną polimeru; preferencyjnie hydrolizował on przede wszystkim mery bursztynianowe poliestru pozostawiając w nim mery adypinianowe.

Dziękujemy dr Jagnie Karcz z Pracowni Mikroskopii Skaningowej UŚ za wykonanie zdjęć.

#### LITERATURA

1. Krasowska K., Heimowska A., Rutkowska M.: *Polimery* 2006, **51**, 21.
2. Adamus G., Dacko P., Musiol M., Sikorska W., Sobota M., Biczak R., Herman B., Rychter P., Krasowska K., Rutkowska M., Kowalczyk M.: *Polimery* 2006, **51**, 539.
3. Jaeger K. -E., Steinbüchel A., Jendrossek D.: *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, **61**, 3113.
4. Fojan P., Jonson P. H., Petersen M. T. N., Petersen S. B.: *Biochimie* 2000, **82**, 1033.
5. Macedo G. A., Pio T. F.: *Braz. J. Microbiol.* 2005, **36**, 388.
6. Nishida H., Konno M., Ikeda A., Tokiwa Y.: *Polym. Degrad. Stab.* 2000, **68**, 205.
7. Jendrossek D.: *Polym. Degrad. Stab.* 1998, **59**, 317.
8. Çolak A., Şişik D., Saglam N., Güner S., Çanakçı S., Beldzy A. O.: *Bioresour. Technol.* 2005, **96**, 625.
9. Murphy C. A., Cameron J. A., Huang S. J., Vinopal R. T.: *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, **62**, 456.
10. Eldsäter C., Erlandsson B., Renstad R., Albertsson A. -C., Karlsson S.: *Polymer* 2000, **41**, 1297.
11. Łabuźek S., Pająk J., Nowak B., Majdiuk E., Karcz J.: *Polimery* 2002, **47**, 256.
12. Łabuźek S., Pająk J., Nowak B.: *Polimery* 2005, **50**, 675.
13. Łabuźek S., Nowak B., Pająk J.: *Polimery* 2006, **51**, 27.
14. Łabuźek S., Nowak B., Pająk J.: *Pol. J. Environ. Stud.* 2004, **13**, 59.
15. Nowak B.: Praca doktorska, Katowice 2006.
16. Azaz A. D.: *Turk. J. Bot.* 2003, **27**, 83.
17. Oda Y., Asari H., Urakami T., Tonomura K.: *J. Ferment. Bioeng.* 1995, **80**, 265.
18. Scherer T. M., Fueller R. C., Lenz R. W., Goodwin S.: *J. Environ. Polym. Degrad.* 1999, **7**, 117.
19. Helisto P., Korpela T.: *Enz. Microb. Technol.* 1998, **23**, 113.
20. Walter T., Augusta J., Müller R.-J., Widdecke H., Klein J.: *Enz. Microb. Technol.* 1995, **17**, 218.
21. Oda Y., Oida N., Urakami T., Tonomura K.: *FEMS Microbiol. Lett.* 1997, **152**, 339.
22. Janas P., Podgórska E., Mleko S., Pielecki J.: *Annales UMCS, Sec. E* 2004, **59**, 461.
23. Macris J. B., Kourentzi E., Hatzinikolaou D. G.: *Proc. Biochem.* 1996, **31**, 807.
24. Carvalho C. M. L., Aires-Barros M. R., Cabral J. M. S.: *Electr. J. Biotechnol.* 1998, **1**, 160.
25. Purdy R. E., Kolattukudy P. E.: *Biochemistry* 1975, **14**, 2832.
26. Zhao J.-H., Wang X.-Q., Zeng J., Yang G., Shi F.-H., Yan Q.: *Polym. Degrad. Stab.* 2005, **90**, 173.