

# Hydroliza odpadów celulozowych katalizowana enzymami celulolitycznymi immobilizowanymi na nośniku polimerowym<sup>\*)</sup>

Katarzyna Sokołowska<sup>1)</sup>, Anna Konieczna-Molenda<sup>2)</sup>, Ewa Witek<sup>1), \*\*)</sup>

DOI: [dx.doi.org/10.14314/polimery.2016.633](https://doi.org/10.14314/polimery.2016.633)

**Streszczenie:** Trzy komercyjne enzymy celulolityczne: Viscozyme<sup>®</sup> L, Novozym 476<sup>®</sup> oraz celulazy z *Aspergillus* sp. immobilizowano na polimerowym nośniku otrzymanym w procesie rodnikowej kopolimeryzacji *N*-winyloformamidu (NVF) z dimetakrylanem glikolu etylenowego (EGDMA) w odwróconej suspensji. Efektywność immobilizacji oceniano na podstawie aktywności w procesach hydrolizy papieru celulozowego i ścieru drzewnego katalizowanych enzymami natywnymi lub immobilizowanymi. Stabilność biokompozytów badano w trzech cyklach hydrolizy. Wyznaczono stałe szybkości hydrolizy i stałe Michaelisa.

**Słowa kluczowe:** immobilizacja, enzymy celulolityczne, hydroliza celulozy, *N*-winyloformamid, dime-takrylan glikolu etylenowego.

## Hydrolysis of cellulose waste catalyzed by cellulolytic enzymes immobilized on polymer carrier

**Abstract:** Three commercial cellulolytic enzymes (Viscozyme<sup>®</sup> L, Novozym 476<sup>®</sup> and cellulase from *Aspergillus* sp.) were immobilized on the polymer carrier, which was synthesized via free radical copolymerization of *N*-vinylformamide (NVF) with ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) in inverse suspension. The efficiency of the enzyme immobilization was determined on the basis of enzymatic activity of the native and immobilized enzyme in the hydrolysis of wood pulp and cellulose paper. The stability of biocatalysts was tested in three reaction cycles of hydrolysis. The reaction rate constants for hydrolysis and Michaelis constants were determined.

**Keywords:** immobilization, cellulolytic enzymes, hydrolysis of cellulose, *N*-vinylformamide, ethylene glycol dimethacrylate.

Biomasa lignocelulozowa stanowi potencjalny surowiec do produkcji biopaliw drugiej generacji, podstawowych chemikaliów i materiałów polimerowych [1–4]. Zastępowanie surowców kopalnych surowcami odnawialnymi, a w szczególności pochodzącymi z recyklingu, jest atrakcyjne ekonomicznie i lokuje się w obszarze działań proekologicznych. Biokonwersja surowców lignocelulozowych do cukrów fermentujących stała się ważnym zagadnieniem w opracowywaniu technologii bioetanolu II generacji, co przyczyniło się do intensyfikacji badań nad enzymatyczną hydrolizą celulozy, sta-

nowiącej główny składnik ścian komórkowych roślin [5, 6]. Największy udział celulozy w tzw. czystej postaci wykazują len i bawełna. Natomiast drewno, w zależności od rodzaju i odmiany zawiera ok. 45 % celulozy, 25 % hemiceluloz, 25 % ligniny oraz 5 % innych substancji organicznych i nieorganicznych [7]. Procesy przetwarzania biomasy lignocelulozowej ze względu na jej złożoną budowę wymagają wykorzystania nowych technologii, których opracowanie wiąże się z dalszymi badaniami nad enzymatyczną hydrolizą surowców celulozowych [8]. Celuloza to nierozgałęziony biopolimer, którego jednostką strukturalną jest celobioza zbudowana z dwóch reszt glukozywych połączonych wiązaniami  $\beta$ -1,4-glikozydowymi [9]. Hydroliza enzymatyczna celulozy, prowadząca do pełnej depolimeryzacji, wymaga użycia kilku enzymów działających synergistycznie. W skład celulaz hydrolizujących celulozę wchodzi endoglukanazy (EG I, EG III) i celobiohydrolazy (CBH I, CBH II), degradujące na pierwszym etapie krystaliczną celulozę do rozpuszczalnej celodekstryny i amorficz-

<sup>1)</sup> Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii, ul. Ingardena 3, 30-060 Kraków.

<sup>2)</sup> Uniwersytet Rolniczy, Instytut Chemii i Fizyki, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków.

<sup>\*)</sup> Materiał zawarty w artykule prezentowano w ramach VIII Kongresu Technologii Chemicznej „Surowce – Energia – Materiały” w dniach 30.08–4.09.2015 r. w Rzeszowie.

<sup>\*\*)</sup> Autor do korespondencji; e-mail: [witek@chemia.uj.edu.pl](mailto:witek@chemia.uj.edu.pl)

nej celulozy, oraz  $\beta$ -glukozydaza (BG) hydrolizująca celobiozę do glukozy [10]. Olbrzymie możliwości wykorzystania enzymów celulolitycznych przyczyniły się do zastosowania ich w wielu gałęziach przemysłu, m.in. tekstylnego, farmaceutycznego, papierniczego, spożywczego i rolniczego [11–14]. Trudności związane z odzyskiwaniem enzymów w celu ponownego użycia generują jednak znaczne koszty i są główną przyczyną ograniczonej ich komercjalizacji [15, 16]. Wdrożenie enzymów do procesów przemysłowych w charakterze katalizatorów jest zadaniem interdyscyplinarnym. Wymaga wyselekcjonowania enzymów o odpowiednich właściwościach, ulepszenia ich za pomocą technik biomolekularnych i immobilizacji oraz dostosowania reaktorów przemysłowych [17, 18]. Ze względów zarówno technologicznych, jak i ekonomicznych ważna jest możliwość ponownego użycia oraz wydłużenie czasu aktywności enzymów wykorzystywanych jako katalizatory w procesach technologicznych. Rozwiązanie stanowi immobilizacja enzymów na stałym nośniku, zwiększająca ich stabilność i umożliwiająca łatwe wyizolowanie biokatalizatora z mieszaniny poreakcyjnej oraz ponowne jego użycie w kilku cyklach lub prowadzenie procesu w trybie ciągłym [19, 20]. Dodatkowymi korzyściami wynikającymi z procesu immobilizacji jest wzrost aktywności i selektywności używanych enzymów [21–23]. Sposób przyłączenia enzymu do nośnika stanowi jeden z trzech najważniejszych czynników, obok rodzaju białka oraz używanego nośnika, mających wpływ na efekt końcowy immobilizacji. W ciągu ostatnich kilkadziesiąt lat ukazało się bardzo wiele publikacji opisujących różne techniki unieruchamiania enzymów [24–28]. Przykładowo, celulazę unieruchomiono metodą adsorpcji i sieciowania na ziarnach polianiliny pokrytych kopolimerem poli(styren-co-diwinylbenzen) [29]. W pracach [21–23, 30] w charakterze nośników wykorzystano m.in. chitynę i chitozan, poli(alkohol winylowy), nylon i poliakrylonitryl. Wykazano, że heterogeniczne biokatalizatory otrzymane w wyniku immobilizacji celulaz na polimerowych nośnikach są stabilne w szerokim zakresie pH i temperatury, a ich użycie daje możliwość obniżenia kosztów procesu [15]. Końcowy efekt procesu immobilizacji biokatalizatora w decydującym stopniu zależy od rodzaju, ilości oraz sposobu rozmieszczenia na powierzchni nośnika grup funkcyjnych odpowiedzialnych za tworzenie wiązania z biokatalizatorem. Nie opracowano dotąd uniwersalnych reguł określających dobór nośnika do immobilizacji konkretnego enzymu, nie wskazano też najkorzystniejszego sposobu immobilizacji. Badania immobilizacji enzymów są ukierunkowane na poszukiwania nośników do immobilizacji konkretnych enzymów i optymalizację procesu immobilizacji na podstawie wyników doświadczalnych [31]. Nośniki polimerowe z pierwszorzędowymi grupami aminowymi są interesujące zarówno dla ośrodków badawczych, jak i przemysłowych. Za pośrednictwem aldehydu glutarowego tworzą one łatwo wiązanie ko-

walencyjne z grupami  $\epsilon$ -aminowymi reszt lizynowych białka [32]. Poliwiniloaminę otrzymaną na drodze hydrolizy poli(*N*-winyloformamidu), szczepionego na folii polietylenowej PE i włóknach poli(tereftalanu etylenu) PET, użyto do immobilizacji DNA [30, 33, 34]. Drevon i współpr. zastosowali kopolimer *N*-winyloformamidu (NVF) oraz akrylan metylu (MA) do wytworzenia homogenicznych powłok zawierających unieruchomioną anhydrazę węglanową (CA, E.C. 4.2.1.1), katalizującą odwracalną hydratację ditlenku węgla oraz hydrolizę różnych estrów *p*-nitrofenylowych [35]. W pracy Koniecznej-Molendy i współpr.  $\alpha$ -amylazę związano kowalencyjnie z nośnikiem zawierającym grupy aminowe za pomocą aldehydu glutarowego jako łącznika, a następnie wykorzystano w procesie hydrolizy skrobi [36]. W 2011 r. Karagoz i współpr. opublikowali wyniki badań nad kowalencyjną immobilizacją laktazy za pomocą grup aminowych w polimerowych mikrosferach otrzymanych w procesie kopolimeryzacji strąceniowej NVF i dimetakrylanu glikolu etylenowego (EGDMA) [37]. Pierwszorzędowe grupy aminowe w nośniku autorzy [37] generowali w reakcji hydrolizy alkalicznej, co w tym wypadku budzi uzasadnione obawy związane ze stabilnością monomeru sieciującego w silnie alkalicznym środowisku. Nośniki z pierwszorzędowymi grupami aminowymi generowanymi w procesie alkalicznej hydrolizy w kopolimerach NVF i diwinylbenzenu (DVB) zastosowano do kowalencyjnej immobilizacji celulaz [38].

W niniejszych badaniach syntetyzowano polimerowy nośnik z *N*-winyloformamidu (NVF) sieciowanego dimetakrylanem glikolu etylenowego (EGDMA), w procesie polimeryzacji rodnikowej w odwróconej suspensji, zgodnie z wcześniej opracowaną procedurą [39]. W wyniku immobilizowania trzech komercyjnych enzymów celulolitycznych otrzymano heterogeniczne biokatalizatory na bazie p(NVF-EGDMA), które następnie testowano w procesie hydrolizy papieru celulozowego i ścieru drzewnego.

## CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

### Materiały

*N*-winyloformamid 98 % (NVF, Sigma-Aldrich) stosowano bezpośrednio po oczyszczeniu metodą destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałe odczynniki: dimetakrylan glikolu etylenowego (EGDMA) oraz dichlorowodorek 2,2'-azobis(metylopropionoamidyny) (AIBA) (Sigma-Aldrich), olej silikonowy o lepkości 2000 cSt (POLSIL OM<sup>®</sup> 2000, Silikony Polskie Sp. z o. o.), toluen, wodorofosforan(V) potasu, diwodorofosforan(V) potasu, chlorek sodu, octan sodu bezwodny, lodowaty kwas octowy oraz winian sodowo-potasowy (Polskie Zakłady Odczynników Chemicznych POCh) używano bez dodatkowego oczyszczania.

W badaniach wykorzystano enzymy: Viscozyme<sup>®</sup> L (o aktywności nie mniejszej niż 100 FBGU/g), Novo-

zym 476<sup>®</sup>, celulozy z *Aspergillus* sp. (o aktywności nie mniejszej niż 1000 units/g) oraz wzorzec – D-(+)-glukoza monohydrat (Sigma-Aldrich), papier celulozowy P1 (zawierający 99,5 % celulozy i 0,5 % lignin, wyprodukowany z drzew iglastych i bielony siarczanem o pH = 6,3, TNO Delft, Holandia) [40, 41], a także ścier drzewny pochodzący ze ściętych drzew iglastych (tzw. drewno miękkie), dostarczony przez Tartak Usługowy w Ponicach.

### Synteza polimerowego nośnika p(NVF-EGDMA)

Rodnikową kopolimeryzację sieciującą NVF z EGDMA w odwróconej suspensji prowadzono zgodnie z procedurą opisaną w [39], w okrągłodennej kolbie trójzszyjnej (500 cm<sup>3</sup>), zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, mieszadło magnetyczne, termometr, wkraplacz i kapilarę do barbotażu argonem. Mieszaninę zawierającą 5,0 g NVF, 2,0 g EGDMA (stosunek molowy NVF:EGDMA = 7:1) i 0,1000 g AIBA (rozpuszczonego w 2,0 cm<sup>3</sup> wody destylowanej, stosunek molowy inicjatora do sumy monomerów 1:200) wkraplano do 250 cm<sup>3</sup> oleju silikonowego ogrzanego do temp. 80 °C. Polimeryzację prowadzono przez 8 h w temp. 80 °C w atmosferze argonu, w warunkach ciągłego mieszania (370 rpm), następnie ziarna kopolimeru odsączano, przemywano kilkakrotnie toluenem i suszono w suszarce próżniowej.

### Immobilizacja enzymów

Do 0,2 g nośnika umieszczonego w kolbie o poj. 50 cm<sup>3</sup>, zawierającej 25 cm<sup>3</sup> buforu fosforanowego o pH = 7,0, dodano 1 cm<sup>3</sup> roztworu enzymu, całość delikatnie mieszano w temperaturze pokojowej przez 2 h. Po zakończeniu immobilizacji mieszaninę przechowywano 24 h w temp. 4 °C. Następnie przesączano ją na lejku Büchnera przez sączek celulozowy o średnicy porów 5 μm (Whatman). Przesącz zachowano do oznaczenia ilości niezaimobilizowanego białka. Przesączony biokompozyt przemywano kolejno buforem fosforanowym o pH = 7,0, roztworem buforu fosforanowego z NaCl o pH = 7,0, buforem octanowym o pH = 5,5 oraz buforem TRIS-HCl o pH = 7,2. Następnie nośnik z zaimobilizowanym enzymem umieszczano w 10 cm<sup>3</sup> buforu fosforanowego o pH = 7,0. Tak przygotowaną mieszaninę wykorzystywano następnie w reakcji hydrolizy enzymatycznej.

### Hydroliza enzymatyczna surowców celulozowych

Biokatalizatory otrzymane w wyniku immobilizacji enzymów zastosowano w reakcji hydrolizy enzymatycznej ścieru drzewnego oraz papieru celulozowego. Substrat w ilości 0,1 ± 0,0001 g umieszczano w kolbie o poj. 100 cm<sup>3</sup> zawierającej 90 cm<sup>3</sup> wody destylowanej (89 cm<sup>3</sup> w wypadku enzymów nieimmobilizowanych) i pozostawiano na ok. 24 h. Następnie do układu doda-

wano nośnik z zaimobilizowanym enzymem celulozowym w 10 cm<sup>3</sup> buforu fosforanowego lub, odrębnie, 1 cm<sup>3</sup> nieimmobilizowanego enzymu i 10 cm<sup>3</sup> buforu. W chwili dodania enzymu rozpoczynano pomiar czasu reakcji. Mieszaninę termostatowano w łaźni wodnej o temp. 37 ± 1 °C i jednocześnie mieszano z prędkością 150 rpm. W określonych odstępach czasu pobierano po 5 cm<sup>3</sup> mieszaniny reakcyjnej, w której dezaktywowano enzym za pomocą 5 cm<sup>3</sup> roztworu kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (DNS) o stężeniu 0,5 %. W otrzymanych próbach metodą UV-Vis oznaczano zawartość powstałych cukrów redukujących.

Aktywność unieruchomionych enzymów określano w trzech, następujących po sobie cyklach reakcji. W tym celu mieszaninę poreakcyjną dekantowano, a pozostały osad (otrzymany biokompozyt wraz z pozostałością nieprzereagowanego substratu) przechowywano w temp. 4 °C. Następnie przenoszono go do kolby zawierającej 0,1 ± 0,0001 g substratu, wcześniej namoczonego w 90 cm<sup>3</sup> wody destylowanej. Reakcję hydrolizy enzymatycznej prowadzono zgodnie z wyżej podaną procedurą.

### Metody badań

#### Charakterystyka nośnika

Rozmiary i kształt ziaren p(NVF-EGDMA) oznaczano za pomocą wyposażonego w kamerę mikroskopu optycznego firmy Delta Optical Genetic Pro Bino. Obrazy rejestrowano w powiększeniu 1000x.

Stożek pęcznienia ( $S_w$ ) określano grawimetrycznie. 1,0 ± 0,0001 g ziaren nośnika kondycjonowanego na powietrzu ( $W_0$ ) umieszczano w 200 cm<sup>3</sup> wody dejonizowanej o temp. pokojowej. Po upływie 72 h ziarna nośnika odsączano i ważono na wadze analitycznej ( $W_t$ ).  $S_w$  obliczano zgodnie z równaniem (1).

$$S_w = \frac{W_t - W_0}{W_0} \cdot 100 \% \quad (1)$$

#### Wyznaczanie stałej Michaelisa

Do oznaczeń stałej Michaelisa przygotowywano po pięć prób każdego z dwóch substratów. Odważano po 0,001 g, 0,25 g, 0,5 g, 1,5 g oraz 2,0 g ścieru drzewnego lub papieru celulozowego. Hydrolizę enzymatyczną prowadzono zgodnie z podaną wyżej procedurą przy użyciu enzymów immobilizowanych oraz w postaci natywnej. Próbkę o obj. 5 cm<sup>3</sup> pobierano w stałych odstępach czasu, po upływie 20, 400 oraz 420 min od chwili rozpoczęcia reakcji.

#### Oznaczanie stężenia cukrów redukujących

Stężenie cukrów redukujących powstających w wyniku enzymatycznej hydrolizy celulozy mikrokrystalicznej określano spektrofotometrycznie z zastosowaniem

roztworu kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (DNS) [42]. Pomiar absorbancji wykonano w zakresie 490–520 nm za pomocą spektrofotometru Shimadzu 2101PC. Na podstawie wartości absorbancji i z wykorzystaniem sporządzonej krzywej wzorcowej D-(+)-glukozy oznaczano stężenie powstałych cukrów redukujących.

## WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

W kopolimeryzacji rodnikowej NVF z EGDMA w odwróconej suspensji otrzymano mikroziarna nośnika p(NVF-EGDMA) o sferycznym kształcie i szerokim rozkładzie rozmiarów cząstek ( $d = 135\text{--}20\ \mu\text{m}$ ) (rys. 1). Wartość oznaczonego stopnia pęcznienia  $S_w = 79,8\ \%$  odpowiada nominalnemu stopniowi usieciowania

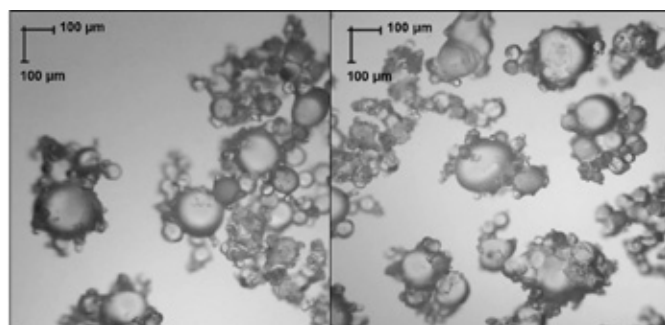
$$\left( \alpha = \frac{\text{EGDMA}}{\text{NVF} + \text{EGDMA}} \cdot 100\ \% \right) \text{ równemu } 12,5\ \% \text{ mol.}$$

### Immobilizacja enzymów

Zestawione w tabeli 1 wartości wydajności immobilizacji komercyjnych enzymów celulolitycznych wskazują na duże powinowactwo enzymów Novozym 476® i celulazy z *Aspergillus* sp. do polimerowego nośnika p(NVF-EGDMA) – w tym wypadku wydajność immobilizacji wynosiła 70 %. Mniejszą wydajność immobilizacji uzyskano w odniesieniu do enzymów Viscozyme® L (18 %). Viscozyme® L to multienzymatyczny kompleks karbohydraz zawierający m.in. celulazy,  $\beta$ -glukanazy, hemicelulazy i ksylanazy. Głównym składnikiem enzymów celulolitycznych *Aspergillus* sp. i Novozym 476® jest endo- $\beta$ -D-glukanaza. Na podstawie wyników badań stwierdzono, że kopolimer NVF z EGDMA, zawierający silnie spolaryzowaną grupę formamidową, jest znakomitym nośnikiem endo- $\beta$ -D-glukanazy. Na tym nośniku z powodzeniem zaimobilizowano także inne enzymy celulolityczne, czego potwierdzeniem był proces hydrolizy surowców celulozowych i ocena trwałości immobilizacji.

### Hydroliza enzymatyczna surowców celulozowych i trwałość immobilizacji

Na podstawie wyznaczonych stałych szybkości reakcji oraz wartości stałej Michaelisa  $K_M$ , określającej powinowactwo enzymu do substratu (szybkość powsta-



Rys. 1. Obrazy ziaren nośnika p(NVF-EGDMA) uzyskane z mikroskopu optycznego

Fig. 1. Optical microscopy images of carrier grains p(NVF-EGDMA)

wania kompleksu enzym-substrat, ES, a także stabilność tego kompleksu) oceniano kinetykę hydrolizy enzymatycznej [43].

Na rys. 2 i rys. 3 przedstawiono przebieg reakcji hydrolizy, odpowiednio, ścieru drzewnego i papieru celulozowego katalizowanych enzymem *Aspergillus* sp. w postaci natywnej oraz enzymem immobilizowanym na nośniku p(NVF-EGDMA), jako zależność stężenia powstających cukrów redukujących od czasu reakcji. W obu badanych procesach hydrolizy (rys. 2 i 3) enzym immobilizowany wykazywał aktywność porównywalną do aktywności enzymu w postaci natywnej. W obu wypadkach aktywność immobilizowanego enzymu malała w kolejnych cyklach reakcji.

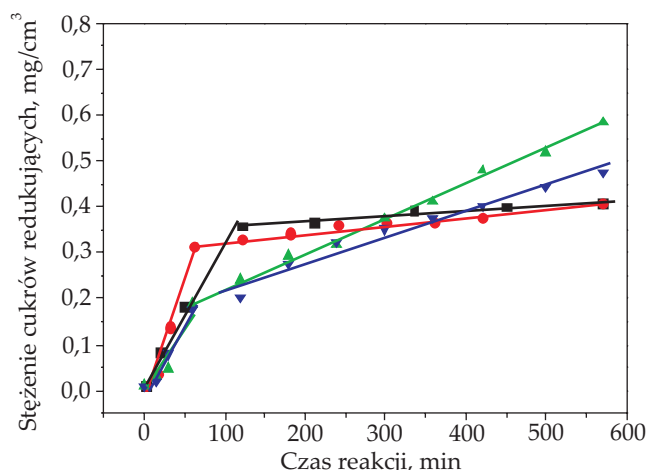
Rysunki 4 i 5 przedstawiają przebieg reakcji hydrolizy, odpowiednio, ścieru drzewnego i papieru celulozowego, katalizowanych enzymem Viscozyme® L w postaci natywnej oraz enzymem immobilizowanym na nośniku p(NVF-EGDMA), jako zależność stężenia powstających cukrów redukujących od czasu reakcji. W obu badanych procesach hydrolizy (rys. 4, 5), enzym immobilizowany wykazywał większą aktywność niż enzym w postaci natywnej. Należy zauważyć, że immobilizowany enzym Viscozyme® L, nawet w III cyklu reakcji, wykazywał większą aktywność niż enzym w postaci natywnej.

Zależność stężenia powstających cukrów redukujących od czasu reakcji hydrolizy, ścieru drzewnego i papieru celulozowego, katalizowanych enzymem Novozym 476® w postaci natywnej oraz unieruchomionym na nośniku p(NVF-EGDMA), przedstawiają rys. 6 i 7. W procesie hydrolizy ścieru drzewnego większą aktyw-

T a b e l a 1. Wydajność immobilizacji enzymów *Aspergillus* sp., Viscozyme® L i Novozym 476®

T a b l e 1. Immobilization yield of enzymes *Aspergillus* sp., Viscozyme® L and Novozym 476®

	Zawartość białka, $\mu\text{g}$			Wydajność immobilizacji %
	w postaci natywnej enzymu	w przesączu po immobilizacji	na 0,2 g nośnika	
Viscozyme® L	402,0	329,6	72,4	18
Novozym 476®	351,0	105,0	246,0	70
<i>Aspergillus</i> sp.	351,5	105,0	246,5	70

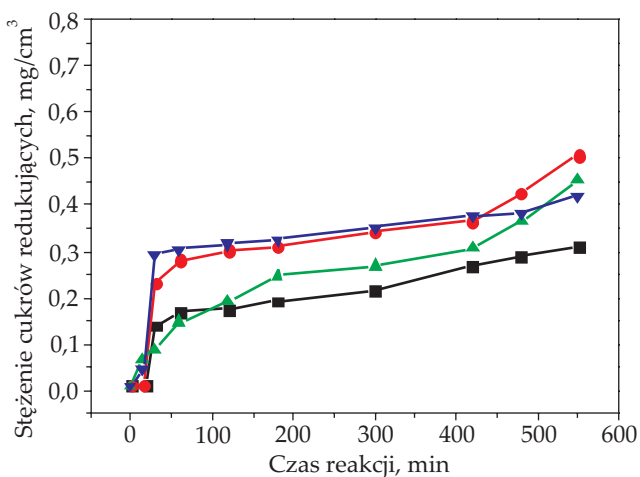


Rys. 2. Zależność stężenia cukrów redukujących od czasu reakcji hydrolizy ścieru drzewnego katalizowanej *Aspergillus* sp.: ■ – enzymem w postaci natywnej oraz enzymem immobilizowanym na nośniku p(NVF-EGDMA): ● – I cykl reakcji; ▲ – II cykl reakcji; ▼ – III cykl reakcji

Fig. 2. Dependence of reducing sugars concentration on the time of wood pulp hydrolysis catalyzed by *Aspergillus* sp.: ■ – native enzyme; ● – enzyme immobilized on p(NVF-EGDMA) carrier: reaction cycle I; ▲ – reaction cycle II; ▼ – reaction cycle III

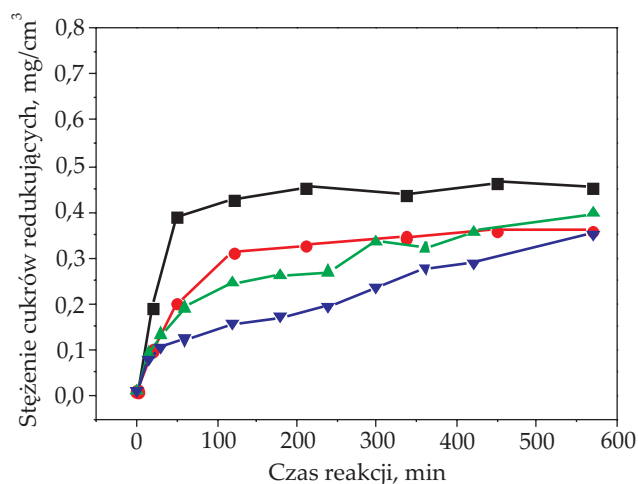
ność wykazywał enzym immobilizowany, natomiast hydroliza papieru celulozowego przebiegała efektywniej w obecności enzymu Novozym 476® w postaci natywnej.

W tabeli 2 zestawiono wyznaczone stałe szybkości badanych reakcji hydrolizy. W większości analizowanych wypadków reakcja hydrolizy przebiegała dwuetapowo. Na pierwszym etapie reakcji hydrolizy ulegały przede



Rys. 4. Zależność stężenia cukrów redukujących od czasu hydrolizy ścieru drzewnego katalizowanej Viscozyme® L: ■ – enzymem w postaci natywnej oraz enzymem immobilizowanym na nośniku p(NVF-EGDMA): ● – I cykl reakcji; ▲ – II cykl reakcji; ▼ – III cykl reakcji

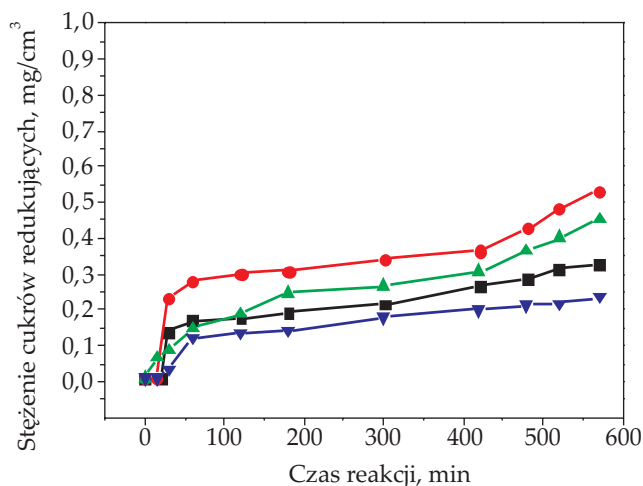
Fig. 4. Dependence of reducing sugars concentration on the time of wood pulp hydrolysis catalyzed by Viscozyme® L: ■ – native enzyme; ● – enzyme immobilized on p(NVF-EGDMA) carrier: reaction cycle I; ▲ – reaction cycle II; ▼ – reaction cycle III



Rys. 3. Zależność stężenia cukrów redukujących od czasu reakcji hydrolizy papieru celulozowego katalizowanej *Aspergillus* sp.: ■ – enzymem w postaci natywnej oraz enzymem immobilizowanym na nośniku p(NVF-EGDMA): ● – I cykl reakcji; ▲ – II cykl reakcji; ▼ – III cykl reakcji

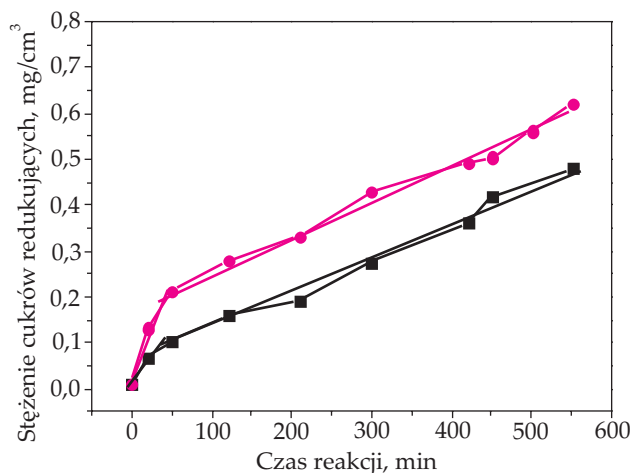
Fig. 3. Dependence of reducing sugars concentration on the time of cellulose paper hydrolysis catalyzed by *Aspergillus* sp.: ■ – native enzyme; ● – enzyme immobilized on p(NVF-EGDMA) carrier: reaction cycle I; ▲ – reaction cycle II; ▼ – reaction cycle III

wszystkim łatwo dostępne obszary amorficzne materiału. Miejsca wykazujące budowę krystaliczną oraz celobioza ulegały degradacji na kolejnych etapach hydrolizy. Warto zauważyć, że na pierwszym etapie procesu aktywność wykazywały przede wszystkim endo- $\beta$ -D-glukanazy, odpowiedzialne za degradację wiązań  $\beta$ -1,4-glikozydowych, oraz egzo- $\beta$ -D-glukanazy zdolne do degradowania monomerów i dimerów z końca łańcucha. Wraz z postępem



Rys. 5. Zależność stężenia cukrów redukujących od czasu reakcji hydrolizy papieru celulozowego katalizowanej Viscozyme® L: ■ – enzymem w postaci natywnej oraz enzymem immobilizowanym na nośniku p(NVF-EGDMA): ● – I cykl reakcji; ▲ – II cykl reakcji; ▼ – III cykl reakcji

Fig. 5. Dependence of reducing sugars concentration on the time of cellulose paper hydrolysis catalyzed by Viscozyme® L: ■ – native enzyme; ● – enzyme immobilized on p(NVF-EGDMA) carrier: reaction cycle I; ▲ – reaction cycle II; ▼ – reaction cycle III

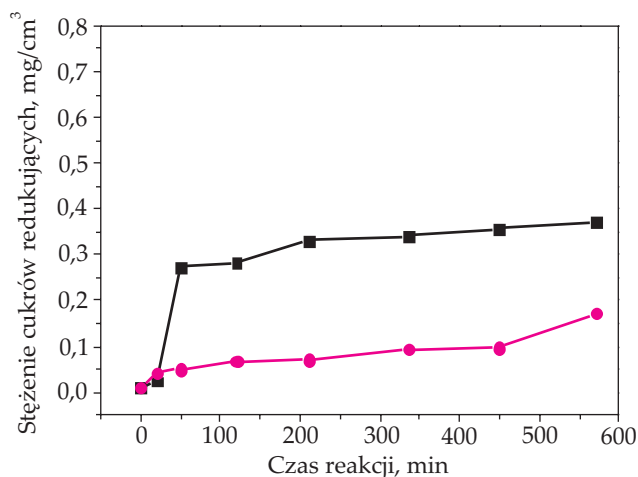


Rys. 6. Zależność stężenia cukrów redukujących od czasu reakcji hydrolizy ścieru drzewnego katalizowanej enzymem Novozym 476®: ■ – enzymem w postaci natywnej; ● – enzymem immobilizowanym na nośniku p(NVF-EGDMA): I cykl reakcji

Fig. 6. Dependence of reducing sugars concentration on the time of wood pulp hydrolysis catalyzed by Novozym 476®: ■ – native enzyme; ● – enzyme immobilized on p(NVF-EGDMA) carrier: reaction cycle I

reakcji znaczenia nabierają  $\beta$ -glukozydazy hydrolizujące powstałe dimery do glukozy.

Rysunek 8 przedstawia zależność stężenia powstałych cukrów redukujących po 2 i 9 godzinach reakcji hydrolizy ścieru drzewnego i papieru celulozowego, katalizowanej enzymami immobilizowanymi i w postaci natywnej. W reakcji hydrolizy ścieru drzewnego, zarówno po 2, jak i po 9 godzinach od jej rozpoczęcia obserwowano wzrost aktywności immobilizowanych enzymów Viscozyme® L oraz Novozym 476®. Natomiast wydajność



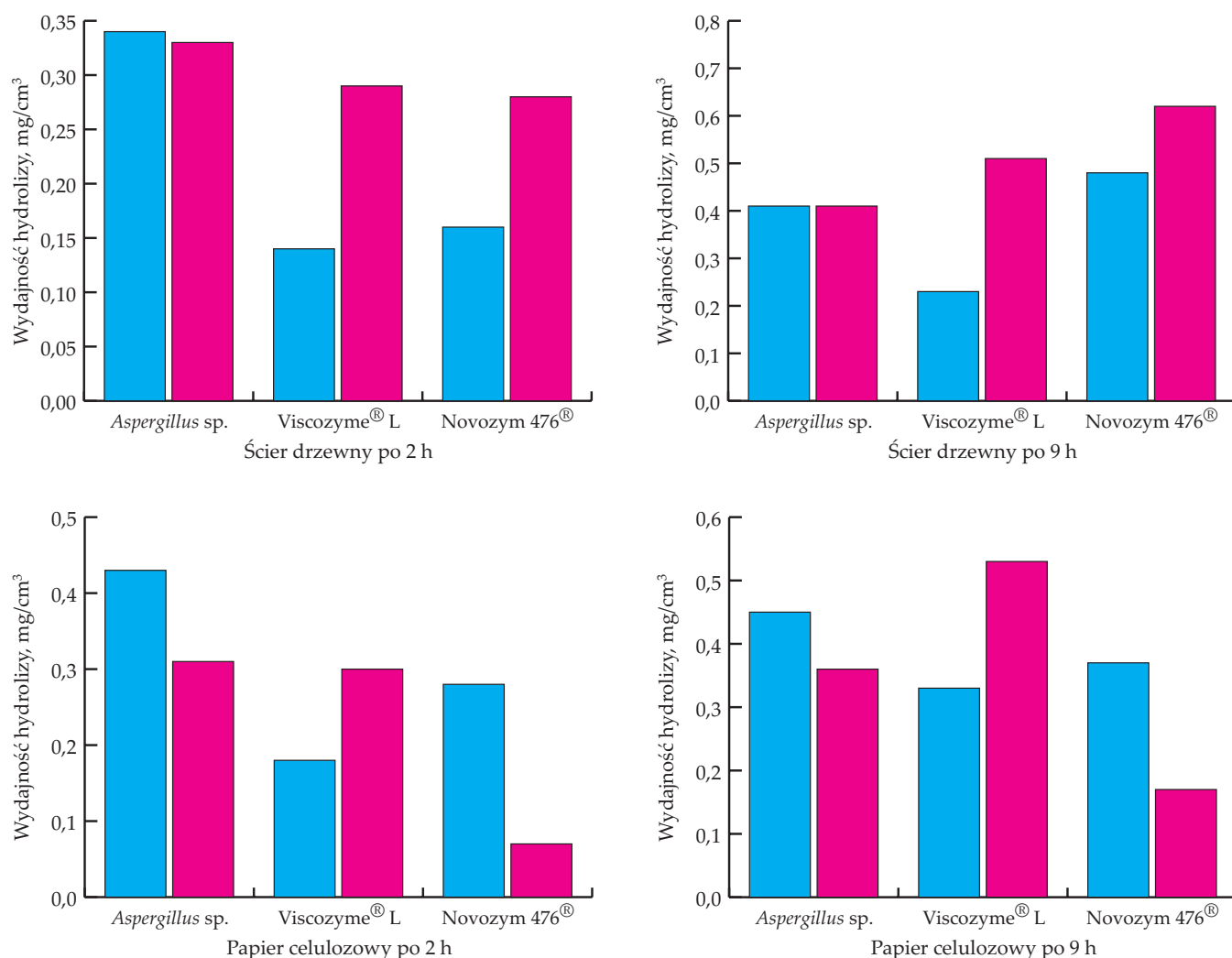
Rys. 7. Zależność stężenia cukrów redukujących od czasu reakcji hydrolizy papieru celulozowego katalizowanej enzymem Novozym 476®: ■ – enzymem w postaci natywnej; ● – enzymem immobilizowanym na nośniku p(NVF-EGDMA): I cykl reakcji

Fig. 7. Dependence of reducing sugars concentration on the time of cellulose paper hydrolysis catalyzed by Novozym 476®: ■ – native enzyme; ● – enzyme immobilized on p(NVF-EGDMA) carrier: reaction cycle I

katalityczna immobilizowanego enzymu *Aspergillus* sp. w procesie hydrolizy ścieru drzewnego utrzymywała się na poziomie aktywności enzymu natywnego. W procesie hydrolizy papieru celulozowego większą aktywność immobilizowanego enzymu obserwowano jedynie w wypadku Viscozyme® L. Immobilizowany *Aspergillus* sp. charakteryzował się nieznacznie mniejszą wydajnością niż enzym w postaci natywnej, natomiast aktywność immobilizowanego Novozymu 476® była o ok. 20 % mniejsza niż enzymu w postaci natywnej.

T a b e l a 2. Stałe szybkości reakcji hydrolizy ścieru drzewnego i papieru celulozowego katalizowanych komercyjnymi enzymami Viscozyme® L, Novozym 476®, *Aspergillus* sp., w postaci natywnej i enzymami immobilizowanymi na nośniku p(NVF-EGDMA)  
T a b l e 2. Reaction rate constants for hydrolysis of wood pulp and cellulose paper catalyzed by commercially available enzymes Viscozyme® L, Novozym 476®, *Aspergillus* sp., native and immobilized on p(NVF-EGDMA) carrier

		Ścier drzewny			Papier celulozowy		
		Stała szybkości, mg · cm <sup>3</sup> · min <sup>-1</sup>					
		$k_1 \cdot 10^3$	$k_2 \cdot 10^4$	$k_3 \cdot 10^3$	$k_1 \cdot 10^3$	$k_2 \cdot 10^4$	$k_3 \cdot 10^3$
<i>Aspergillus</i> sp.							
Immobilizowany na p(NVF-EGDMA)	Natywny	2,9	1,1	–	7,3	1,0	–
	I cykl	5,3	1,7	–	3,8	1,1	–
	II cykl	3,0	7,6	–	2,9	4,3	–
	III cykl	2,9	5,9	–	3,2	4,8	–
Viscozyme® L							
Immobilizowany na p(NVF-EGDMA)	Natywny	2,9	3,0	–	2,9	2,7	0,4
	I cykl	5,1	3,4	1,1	5,1	2,3	1,1
	II cykl	2,2	5,1	1,1	2,2	4,2	1,0
	III cykl	10,0	3,0	–	2,0	2,2	–
Novozym 476®							
Immobilizowany na p(NVF-EGDMA)	Natywny	1,8	7,5	–	5,5	1,9	–
	I cykl	4,0	7,7	–	0,8	1,2	–



Rys. 8. Wydajność reakcji hydrolizy (mg glukozy/cm<sup>3</sup>) papieru i ścieru drzewnego katalizowanych enzymami *Aspergillus sp.*, Viscozyme® L i Novozym 476®: ■ – enzym natywny, ■ – enzym immobilizowany

Fig. 8. Hydrolysis yield of wood pulp and cellulose paper (mg glucose/cm<sup>3</sup>) catalyzed by enzymes *Aspergillus sp.*, Viscozyme® L and Novozym 476®: ■ – native enzyme, ■ – immobilized enzyme

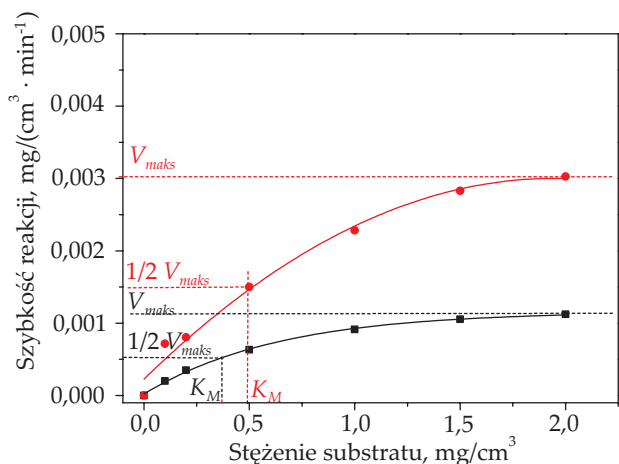
### Wyznaczenie stałej Michaelisa

Wartości stałych Michaelisa wszystkich badanych enzymów, zarówno w postaci immobilizowanej, jak i natywnej, zestawiono w tabeli 3. Przykładowy wykres Michaelisa-Menten przedstawia rys. 9. Na podstawie zebranych wyników można stwierdzić, że immobilizowane enzymy

Viscozyme® L i Novozym 476® wykazują większe powinowactwo do papieru celulozowego niż ścieru drzewnego, natomiast immobilizowany *Aspergillus sp.* wykazuje porównywalne powinowactwo do obu materiałów. Stabilność kompleksu enzym-substrat (ES) w wypadku większości heterogenicznych biokatalizatorów jest większa niż stabilność kompleksu ES enzymów w postaci natywnej.

T a b e l a 3. Stałe Michaelisa w reakcjach hydrolizy papieru celulozowego i ścieru drzewnego katalizowanych komercyjnymi enzymami Viscozyme® L, Novozym 476®, *Aspergillus sp.*, immobilizowanymi na nośniku p(NVF-EGDMA) i w postaci natywnej

		$K_M$		
		Viscozyme® L	Novozym 476®	<i>Aspergillus sp.</i>
Ścier drzewny	Enzym natywny	0,37	0,39	0,39
	Enzym immobilizowany	0,49	0,56	0,36
Papier celulozowy	Enzym natywny	0,45	0,41	0,44
	Enzym immobilizowany	0,40	0,30	0,35



Rys. 9. Wykres Michaelisa-Menten ( $K_M$  – stała Michaelisa,  $V_{maks}$  – szybkość maksymalna reakcji) hydrolizy ścieru drzewnego katalizowanej Viscozyme® L: ■ – enzymem w postaci natywnej; ● – enzymem immobilizowanym na nośniku p(NVF-EGDMA): I cykl reakcji

Fig. 9. Sample Michaelis-Menten graph ( $K_M$  – Michaelis constant,  $V_{maks}$  – maximum rate of reaction) of wood pulp hydrolysis catalyzed by Viscozyme® L: ■ – native enzyme; ● – enzyme immobilized on p(NVF-EGDMA) carrier: reaction cycle I

## WNIOSKI

Wykazano, że enzymy celulolityczne mogą być z powodzeniem immobilizowane na nośniku polimerowym zawierającym silnie polarne grupy formamidowe, a proces immobilizacji na ogół korzystnie wpływa na aktywność i stabilność immobilizowanych enzymów. Otrzymane heterofazowe biokatalizatory efektywnie hydrolizują surowce celulozowe i zachowują aktywność w trzech kolejnych cyklach reakcji. W celu uzyskania optymalnej wydajności reakcji hydrolizy enzymy celulolityczne należy dobierać indywidualnie dla każdego z materiałów celulozowych.

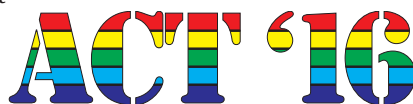
## LITERATURA

- [1] Philippidis G.P., Smith T.K., Wyman C.E.: *Biotechnology and Bioengineering* **1993**, 41, 846. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260410903>
- [2] Ciechańska D., Wietecha J., Kucharska M. i in.: *Polimery* **2014**, 59, 383. <http://dx.doi.org/10.14314/polimery.2014.383>
- [3] Penczek S., Pretula J., Lewiński P.: *Polimery* **2013**, 58, 835. <http://dx.doi.org/10.14314/polimery.2013.835>
- [4] Florjańczyk Z., Dębowski M., Chwojnowska E. i in.: *Polimery* **2009**, 54, 611.
- [5] Gupta R., Lee Y.Y.: *Biotechnology and Bioengineering* **2008**, 102 (6), 1570. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.22195>
- [6] Arantes V., Saddler J.N.: *Biotechnology for Biofuels* **2010**, 3, 4. <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-3-4>
- [7] Sánchez C.: *Biotechnology Advances* **2009**, 27, 185. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
- [8] Menon V., Rao M.: *Progress in Energy and Combustion Science* **2012**, 38, 522. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peccs.2012.02.002>
- [9] Merino S.T., Cherry J.: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **2007**, 108, 95. [http://dx.doi.org/10.1007/10\\_2007\\_066](http://dx.doi.org/10.1007/10_2007_066)
- [10] Ortega N., Busto M.D., Perez-Mateos M.: *International Biodeterioration and Biodegradation* **2001**, 47, 7. [http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00101-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00101-3)
- [11] Boukraa-Oulad Daoud F., Kaddour S., Sadoun T.: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, 75, 93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.08.019>
- [12] Cengiz S., Cavas L., Yurdakoc K.: *Applied Clay Science* **2012**, 65–66, 114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2012.06.004>
- [13] Cheng Z.F., Wu C., Yang W., Xu T.: *Journal of Membrane Science* **2010**, 358, 93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2010.04.036>
- [14] Ogeda T.L., Silva I.B., Fidale L.C. i in.: *Journal of Biotechnology* **2012**, 157, 246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.11.018>
- [15] Liu J., Cao X.: *Biochemical Engineering Journal* **2013**, 79, 136. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.07.009>
- [16] Cervero J.M., Skovgaard P.A., Felby C. i in.: *Enzyme and Microbial Technology* **2010**, 46, 177. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.10.012>
- [17] Robertson D.E., Steer B.A.: *Current Opinion in Chemical Biology* **2004**, 8, 141. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.02.010>
- [18] Fernández-Lafuente R., Hernández-Jústiz O., Mateo C. i in.: *Biomacromolecules* **2001**, 2, 95. <http://dx.doi.org/10.1021/bm000072i>
- [19] Bickerstaff G.F.: "Immobilization of Enzymes and Cells, Methods in Biotechnology", Humana Press, Totowa N.J., 1997.
- [20] Katchalski-Katzir E.: *Trends in Biotechnology* **1993**, 11, 471. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90080-S](http://dx.doi.org/10.1016/0167-7799(93)90080-S)
- [21] Rodrigues R.C., Ortiz C., Berenguer-Murcia A. i in.: *Chemical Society Reviews* **2013**, 42, 6290. <http://dx.doi.org/10.1039/C2CS35231A>
- [22] Garcia-Galan C., Berenguer-Murcia A., Fernandez-Lafuente R., Rodrigues R.C.: *Advanced Synthesis and Catalysis* **2011**, 353, 2885. <http://dx.doi.org/10.1002/adsc.201100534>
- [23] Guzik U., Hupert-Kocurek K., Wojcieczyńska D.: *Molecules* **2014**, 19, 8995. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules19078995>
- [24] Cao L.: *Current Opinion in Chemical Biology* **2005**, 9, 217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.02.014>
- [25] Guisan J.M.: "Methods in biotechnology: immobilization of enzymes and cells", 2nd, Humana Press, Totowa N.J., 2006.
- [26] Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G. i in.: *Enzyme and Microbial Technology* **2007**, 40, 1451. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>
- [27] Minter S.D.: "Enzyme stabilization and immobilization: methods and protocols. Methods in molecu-



- lar biology”, Humana Press, Totowa N.J., 2011.
- [28] Sassolas A., Blum L.J., Leca-Bouvier B.D.: *Biotechnology Advances* **2012**, 30, 489.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>
- [29] Ince A., Bayramoglu G., Karagoz B. i in.: *Chemical Engineering Journal* **2012**, 189–190, 404.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2012.02.048>
- [30] Krzyczmonik P., Socha E., Skrzypek S.: *Bioelectrochemistry* **2015**, 101, 8.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.06.009>
- [31] Cieńska M., Bryjak J., Liesiene J.: *PhD Interdisciplinary Journal* **2013**, 1, 13.
- [32] Bryjak J.: *Wiadomości chemiczne* **2004**, 58 (9–10), 691.
- [33] Seto F., Muraoka Y., Akagi T. i in.: *Journal of Applied Polymer Science* **1999**, 72, 1583.  
[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19990620\)72:12<1583::AID-APP11>3.0.CO;2-0](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19990620)72:12<1583::AID-APP11>3.0.CO;2-0)
- [34] Kato K., Ikada Y.: *Biotechnology and Bioengineering* **1996**, 51, 581.  
[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960905\)51:5<581::AID-BIT10>3.0.CO;2-L](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960905)51:5<581::AID-BIT10>3.0.CO;2-L)
- [35] Drevon G.F., Urbanke C., Russell A.J.: *Biomacromolecules* **2003**, 4, 675. <http://dx.doi.org/10.1021/bm034034l>
- [36] Konieczna-Molenda A., Kochanowski A., Wala-  
szek A. i in.: *Chemical Engineering Journal* **2009**, 146, 515. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2008.11.009>
- [37] Karagoz B., Bayramoglu G., Altintas B. i in.: *Biore-source Technology* **2011**, 102, 6783.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.050>
- [38] Tała T., Sokołowska K., Świder J. i in.: *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2015**, 149, 494.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2015.04.112>
- [39] Świder J., Tała A., Sokołowska K. i in.: *Journal of Molecular Structure* **2015**, 1102, 42.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.08.039>
- [40] Barański A., Konieczna-Molenda A., Łagan J.M., Proniewicz L.M.: *Restaurator* **2003**, 24, 36.  
<http://dx.doi.org/10.1515/REST.2003.36>
- [41] Proniewicz L.M., Paluszkiwicz C., Weselucha-Bir-  
czyńska A. i in.: *Journal of Molecular Structure* **2001**, 596, 163.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2860\(01\)00706-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2860(01)00706-2)
- [42] Miller G.L.: *Analytical Chemistry* **1959**, 31 (3), 426.  
<http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>
- [43] Li J., Du Y.M., Liang H.B. i in.: *Journal of Applied Poly-  
mer Science* **2006**, 102, 4185.  
<http://dx.doi.org/10.1002/app.24555>

INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I BARWNIKÓW w TORUNIU  
ODDZIAŁ FARB I TWORZYW w GLIWICACH  
zaprasza do udziału w XII Międzynarodowej Konferencji  
**ADVANCES IN COATINGS TECHNOLOGY**  
(POSTĘPY W TECHNOLOGII FARB I LAKIERÓW)



która odbędzie się w Sosnowcu, w dniach 8–10 listopada 2016 r.

Tematyka Konferencji:

- **Nowości w zakresie bazy surowcowej dla wyrobów lakierowych**
  - żywice (nowe polimery, polimery „inteligentne”, biopolimery, systemy hybrydowe)
  - pigmenty
  - napełniacze (w tym funkcjonalne)
  - środki pomocnicze i modyfikatory (w tym biocydy)
- **Nowoczesne i przyjazne środowisku technologie wytwarzania wyrobów lakierowych**
  - wodorocieńczalne, *high solids*, proszkowe, utwardzane radiacyjnie (UV/EB), funkcjonalne: przeciwporostowe i antykorozyjne, powłoki „inteligentne”: higieniczne, nanostrukturalne, samoczyszczące, antygraffiti, biopowłoki, nanotechnologie
- **Analiza i badania wyrobów lakierowych oraz powłok**
- **Aparatura do produkcji wyrobów lakierowych**
- **Zagadnienia ekologiczne (uwarunkowania legislacyjne)**
- **Kierunki rozwojowe rynku**

Językiem konferencji będzie język angielski/polski, z simultanicznym tłumaczeniem.

Czas prezentacji referatu – 20 min.

**Tytuł referatu, plakatu** wraz z jego skrótem oraz biografią osoby prezentującej powinny być dostarczone w terminie do **31 maja 2016 r.**

**Oplata konferencyjna** dla osoby wygłaszającej referat lub prezentującej plakat wynosi 1000 zł + 23 % VAT.

**Miejsce konferencji:** Centrum EXPO SILESIA, Sosnowiec, ul. Braci Mieroszewskich 124.

**Informacje:** mgr inż. Anna Pajak – Komitet Organizacyjny Konferencji ACT'16, tel.: +48 (32) 231 9043, fax: +48 (32) 231 2674, e-mail: [a.pajak@impib.pl](mailto:a.pajak@impib.pl), Instytut Inżynierii Materiałów Polimerowych i Barwników, Oddział Zamiejscowy Farb i Tworzyw, ul. Chorzowska 50A, 44-100 Gliwice

[www.impib.pl](http://www.impib.pl)