

HORYZONTY NAUKI 2016
– FORUM PRAC DYPLOMOWYCH,
WYDZIAŁ CHEMII UJ, 17–18 MAJA 2016

IMMOBILIZOWANE ALFA-AMYLAZY I CELULAZY
W ZASTOSOWANIACH PRAKTYCZNYCH

IMMOBILIZED ALPHA-AMYLASES AND CELLULASES
IN PRACTICAL APPLICATIONS

Zbigniew Chałupka

Uniwersytet Jagielloński
ul. R. Ingardena 3, 30-060 Kraków
e-mail: zbigniewchalupka92@gmail.com

Abstract

1. Enzymy
 - 1.1. Mechanizm działania
 - 1.2. Kinetyka reakcji enzymatycznych
 - 1.3. Klasyfikacja enzymów
 - 1.3.1. Podział hydrolaz
 2. Enzymy amylolityczne
 3. Celulazy
 4. Przemysłowe zastosowanie α -amylazy i celulaz
 5. Immobilizacja enzymów
 - 5.1. Immobilizacja enzymów przez adsorpcję
 - 5.2. Immobilizacja enzymów przez wiązanie kowalencyjne
 6. Mezoporowate materiały SBA-15 jako nośniki enzymów
- Uwagi końcowe
Piśmiennictwo cytowane
-



Zbigniew Chałupka urodził się w 1992 roku w Wieluniu. W roku 2011 ukończył I Liceum Ogólnokształcące im. Tadeusza Kościuszki w Wieluniu. Uczęszczał do klasy o profilu biologiczno-chemiczno-matematycznym. Po ukończeniu liceum rozpoczął studia chemiczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. W roku 2014 skończył studia I stopnia obroną pracy licencjackiej pt. „Synteza nowej generacji TADDOLi z naturalnych terpenoidów”. Praca była wykonywana w Zespole Chemii Związków Heterocyklicznych i Metaloorganicznych pod opieką dr. Bartosza Trzewika. W tym samym roku

rozpoczął studia II stopnia na tym samym wydziale. Jako specjalizację wybrał: Polimery i kompozyty w Zakładzie Technologii Chemicznej. Badania do pracy magisterskiej „Enzymatyczna hydroliza skrobi na immobilizowanej α -amylazie” rozpoczął w Zespole Chemii Polimerów pod opieką dr hab. Ewy Witek.

ABSTRACT

Today, more and more products made in biotechnological processes involving enzymes. The stability of the enzyme under process conditions are subjected to the immobilization on solid supports, which leads to a heterogeneous biocatalyst that can be used in several cycles or continuous processes. The article discusses the techniques presented in the literature immobilization of enzymes hydrolyzing starch and cellulose. Includes the method of immobilization in/on polymer and inorganic carriers and different ways of binding of the enzyme to a solid support. Particular attention is focused on mesoporous silica (mesoporous silica) (SBA-15) as a very attractive media for biocatalysts. Starch and cellulose are the main components of biomass, which is seen as an alternative raw material for ethanol production, i.e. second generation biofuels. Developing an effective biocatalyst for the conversion of biomass is the challenge of the XXI century.

Keywords: amylolytic enzymes, cellulases, enzyme immobilization, mesoporous silica, SBA-15

Słowa kluczowe: enzymy amylolityczne, celulazy, immobilizacja enzymów, mezoporowate krzemionki, SBA-15

WPROWADZENIE

Obecnie coraz więcej produktów otrzymywanych jest w procesach biotechnologicznych z udziałem enzymów. Celem zwiększenia stabilności enzymów w warunkach procesowych poddaje się je immobilizacji na stałych nośnikach, co prowadzi do otrzymania heterogenicznych biokatalizatorów, które mogą być używane w kilku cyklach lub w procesach ciągłych. W artykule omówiono prezentowane w literaturze techniki immobilizacji enzymów hydrolizujących skrobię i celulozę. Uwzględniono metody immobilizacji na/w nośnikach polimerowych i nieorganicznych oraz różne sposoby wiązania enzymu ze stałym podłożem. Szczególną uwagę skoncentrowano na mezoporowatej krzemionce (mesoporous silica) (SBA-15) jako bardzo atrakcyjnym nośniku biokatalizatorów. Skrobia i celuloza są głównymi składnikami biomasy, która postrzegana jest jako alternatywny surowiec do produkcji etanolu, tj. biopaliwa drugiej generacji. Opracowanie efektywnego biokatalizatora do konwersji biomasy jest wyzwaniem XXI w.

1. ENZYMY

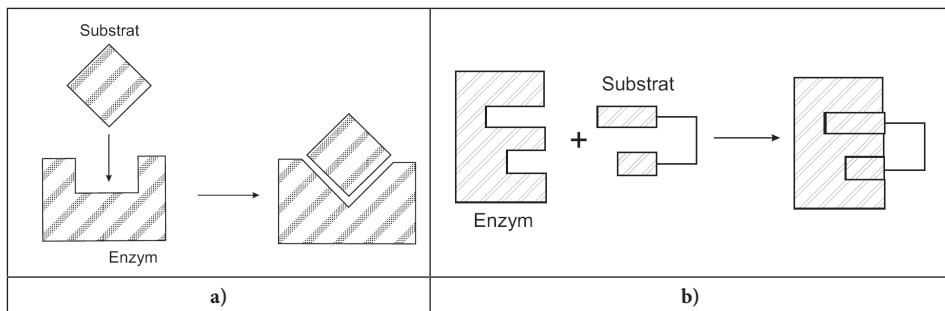
1.1. MECHANIZM DZIAŁANIA

Enzymy występujące w komórkach wszystkich żywych organizmów katalizują reakcje biochemiczne w warunkach fizjologicznych, w których energia wewnętrzna układu jest tak niska, że pokonanie bariery energetycznej stanu przejściowego nie jest możliwe bez udziału biokatalizatora. Enzymy zwiększają szybkość reakcji przynajmniej milion razy, co oznacza, że charakteryzują się ogromną siłą katalityczną nieosiągalną dla chemicznych układów katalitycznych. Działają tak jak wszystkie katalizatory, czyli nie zmieniają stanu równowagi katalizowanej reakcji, ale obniżając energię aktywacji poprzez utworzenie alternatywnej ścieżki zwiększają jej szybkość w danej temperaturze [1, 2].

Inną niezwykłą cechą enzymów jest selektywność procesowa i substratowa. Każdy enzym katalizuje jedną reakcję chemiczną lub kilka reakcji, ale ściśle spokrewnionych i na ogół działa tylko na jeden rodzaj substratu. Enzymy są zdolne do katalizowania nie tylko skomplikowanych reakcji chemicznych, ale i tak prostych jak przeniesienie dwutlenku węgla w organizmie [1]. Anhydroza węglanowa, czyli enzym, który jest za to odpowiedzialny, uwadnia 105 cząsteczek dwutlenku węgla na sekundę. W reakcjach katalizowanych przez enzymy nie są praktycznie generowane produkty uboczne, które nie mogą być wykorzystane w innych reakcjach. Te niezwykle właściwości enzymów są ściśle związane z ich strukturą.

Zdecydowana większość enzymów to białka, jednakże znane są wyjątki (cząsteczki RNA). Struktura enzymów białkowych jest złożona. Obok części białkowej zbudowanej z jednej lub części z kilku makrocząsteczek polipeptydowych zwanej apoenzymem

w wielu enzymach występuje także część niebiałkowa, która zawiera małowczątkowe związki organiczne i jony metali uczestniczące w procesie katalizy nazwane odpowiednio grupą prostetyczną, kofaktorem i koenzymem [3]. Najważniejszą częścią enzymu jest miejsce aktywne, które we wszystkich enzymach zlokalizowane jest w szczelinach lub zagłębieniach. Stanowi ono niewielki procent całej objętości enzymu jednakże jest ono kluczowe przy jego funkcjonowaniu. Znaczna część enzymu nie ma w ogóle kontaktu z substratem. Centrum aktywne jest specjalnie „zaaranżowane” przestrzennie tak aby przyjąć cząsteczkę substratu, co ilustruje model klucza i zamka z roku 1890 zaproponowany przez Emila Fischera (Rys. 1a). Niektóre enzymy nie posiadają ustalonego kształtu miejsca aktywnego, dopasowanie następuje dopiero w momencie związania substratu z centrum aktywnym, taki proces to wymuszone dopasowanie zaproponowany w 1958 przez D.E. Koshland’a Jr. (Rys. 1b).

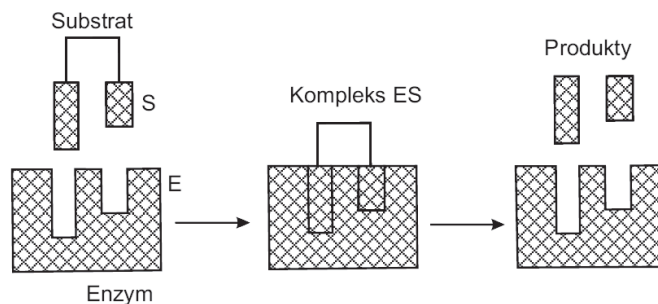


Rysunek 1. Schemat ilustrujący wiązanie enzymu z substratem a) model zamka i klucza b) model wymuszonego dopasowania

Figure 1. A diagram illustrating the binding of the enzyme to the substrate a) the lock and key model b) forced fit model

Wiązania wytwarzane pomiędzy cząsteczką substratu a enzymem są stosunkowo słabe (wiązania wodorowe, oddziaływania jonowe, siły van der Waalsa) [1, 2]. Efektywność procesów katalizowanych przez enzymy związana jest ze zdolnością do specyficznego ułożenia przestrzennego substratów w miejscach aktywnych, co sprzyja tworzeniu i rozrywaniu wiązań chemicznych.

Podczas reakcji enzymatycznej substrat (S) łączy się z enzymem (E) tworząc kompleks przejściowy (ES), po czym produkt, lub produkty reakcji są uwalniane, co ilustruje Rysunek 2.



Rysunek 2. Powstawanie kompleksu enzym-substrat i uwalnianie produktu reakcji
 Figure 2. The formation of the enzyme-substrate and releasing the reaction product

1.2. KINETYKA REAKCJI ENZYMATYCZNYCH

Na Rysunku 3 pokazano typową dla reakcji enzymatycznych zależność szybkości (r) od stężenia substratu (S). Model opracowany przez Michaelisa-Menten poprawnie opisuje kinetykę reakcji o takiej charakterystyce.

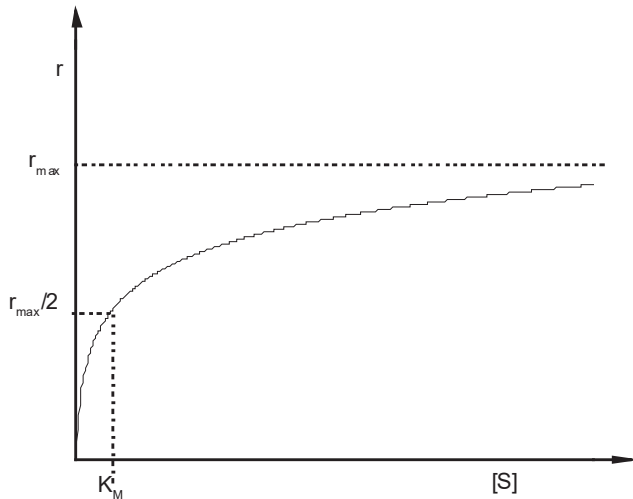
Substrat (S) łączy się z enzymem (E) tworząc kompleks przejściowy (ES) (I), który w dalszej kolejności reaguje z kolejnym substratem, lub daje produkt jeśli reakcja jest jednocząsteczkowa (II).



Po zastosowaniu przybliżenia stanu stacjonarnego dla SE i przekształceniach, a także przy założeniu, że reakcja jest zerowego rzędu otrzymujemy równanie znane pod nazwą równania Michaelisa-Menten (III):

$$r = r_{\max} / (1 + K_M / [S]) \quad (III)$$

gdzie r_{\max} to maksymalna szybkość reakcji, a K_M to stała Michaelisa. Stała Michaelisa jest równa stężeniu substratu S w momencie gdy $r = r_{\max} / 2$ (Rys. 3).



Rysunek 3. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu
 Figure 3. Relationship between the substrate concentration and reaction rate

K_M oraz r_{max} wyznacza się empirycznie podczas pomiarów szybkości dla różnego stężenia substratu (S). Równanie III często spotykane jest w postaci przekształconej do formy (IV):

$$1/r = 1/r_{max} + K_M/r_{max} \cdot 1/[S] \quad (IV)$$

Wydajność reakcji enzymatycznych zależy od wielu czynników, a jednym z nich jest pH środowiska. Jego wartość na wpływ na to w jakiej formie będzie występować enzym. Kolejnym istotnym parametrem mającym wpływ na działanie enzymów jest temperatura. Każdy enzym efektywnie pracuje w temperaturze determinowanej przez charakterystyczne dla niego środowisko fizjologiczne. Wzrost temperatury powoduje przyspieszenie reakcji enzymatycznej, jednak ogrzanie układu do temp. 40–60°C na ogół wywołuje całkowitą dezaktywację większości enzymów na skutek denaturacji, tj. zniszczenia struktury nadcząsteczkowej [2].

1.3. KLASYFIKACJA ENZYMÓW

Zgodnie z ustaleniami Międzynarodowej Unii Biochemicznej (IUB) enzymy podzielono na sześć głównych klas przyjmując jako kryterium typ katalizowanej reakcji i jej substraty. Każdy enzym został opisany specjalnym kodem: *EC.a.b.c.d.*, gdzie małymi literami (*a*, *b*, *c*, *d*) przypisane są odpowiednie numery. Pierwszy z nich (*a*) odpowiada za przyporządkowanie enzymu do jednej z wcześniej wspomnianych sześciu głównych klas, kolejny numer oznacza (*b*) oznacza podklasę, (*c*): podklasę podklasy *b*, natomiast liczba (*d*) określa numer seryjny w podpodklasie *c*.

Główne klasy enzymów to: EC.1: oksydoreduktazy, EC.2: transferazy, EC.3: hydrolazy, EC.4: liazy, EC.5: izomerazy i EC.6: ligazy. Pierwsze z nich katalizują reakcje redox w obecności tlenu, kolejne (transferazy) są odpowiedzialne za reakcje przenoszenia grup funkcyjnych takich jak np. aminowa czy też acylowa. Hydrolazy katalizują rozkład wiązań, m.in. C-O, C-N, C-C. Enzymy z klasy EC.4 podobnie jak hydrolazy katalizują reakcje rozkładu wiązań, jednakże na drodze eliminacji. Zadaniem izomeraz jest katalizowanie wewnątrzcząsteczkowych reakcji izomeryzacji. Ostatnia klasa enzymów to ligazy, które przyspieszają reakcje pomiędzy dwiema cząsteczkami połączone z hydrolizą ATP lub innego trójfosforanowego nukleozydu [4].

1.3.1. Podział hydrolaz

Hydrolazy (EC.3.b.c.d.) dzielą się na trzynaście podgrup: EC.3.1 – działają na wiązania estrowe, EC.3.2 – hydrolizują wiązania glikozydowe, EC.3.3 – wiązania estrowe, EC.3.4 – wiązania peptydowe, EC.3.5 – hydrolizują wiązania C-N, jednakże inne niż wiązanie peptydowe, EC.3.6 – hydrolizują wiązania w bezwodnikach kwasowych, EC.3.7 – hydrolizują wiązania C-C, EC.3.8 – wiązania w halogenkach, EC.3.9 – odpowiedzialne są za rozpad wiązania P-N, EC.3.10 – hydroliza wiązania S-N, EC.3.11 – rozpad wiązania C-P, EC.3.12 – hydroliza wiązania S-S, ostatnia podgrupa – EC.13 katalizuje reakcję rozpadu wiązania C-S [5].

2. ENZYMY AMYLOLITYCZNE

Enzymy amyloリティczne (amylazy, diastazy; EC 3.2.1) jest to klasa enzymów, których zadaniem jest hydroliza skrobi (u roślin) i glikogenu (u zwierząt). W skład amylaz wchodzi α -amylazy (EC 3.2.1.1), β -amylazy (EC 3.2.1.2) oraz glikozydazy (EC 3.2.1.3) [11]. Pierwszy raz diastaza została wyizolowana przez dwóch naukowców Payen'a i Persoz'a w roku 1833 [7]. W kolejnym stuleciu, a dokładniej w roku 1924 Kuhn [8] zaobserwował, że w zależności od typu użytej amylazy otrzymuje się produkty o różnych właściwościach optycznych. Po tym odkryciu postanowiono podzielić amylazy na dwie grupy: α -amylazy i β -amylazy [8, 9]. Blisko 30 lat później opisano po raz pierwszy glikozydazę (wyizolowaną z pleśni *Rizpohus dele-mar*) [10].

Amylazy znajdują zastosowanie na dużą skalę m.in. w procesach fermentacyjnych, przy przetwarzaniu skrobi. Występują również enzymy, które są zdolne do rozkładu skrobi jednakże nie są klasyfikowane jako amylazy, ponieważ oprócz hydrolizy wykazują aktywność w transferze czy też w reakcjach kondensacji. Ostatecznie powstała koncepcja klasyfikacji, zgodnie z którą do amylaz zaliczane są enzymy, które biorą udział w reakcjach hydrolizy skrobi lub glikogenu albo transferu tych związków jednakże bez udziału fosforanów. Z dużą dozą prawdopodobień-

stwa można założyć, iż enzymy amylolityczne i te charakteryzujące się podobnym działaniem są najbardziej rozpowszechnione wśród organizmów żywych, ponieważ występują nie tylko u wyższych roślin i zwierząt, ale i u mikroorganizmów. Godnym odnotowania jest fakt, iż inwertujące typy amylaz występują u roślin wyższych i u niektórych mikroorganizmów, przede wszystkim bakterii, a także grzybów *Phycomycetes* i *Ascomycetes*. Rodzina α -amylaz to enzymy katalizujące hydrolizę (skrobi, glikogenu lub produktów z nich pochodzących), zdolne są także do transferu tych związków. Charakteryzują się tym, iż produktami reakcji są tylko formy α -anomeryczne, także w przypadku transferu [6].

Głównym źródłem energii z jakiego korzysta nasz organizm jest glukoza. W diecie przeciętnego człowieka występuje ona rzadko w czystej formie. Glukoza, którą spożywamy występuje w postaci dimerów, tj. laktozy i sacharozy lub w postaci makrocząsteczek – skrobi i glikogenu. Alfa-amylaza jest enzymem, którego zadaniem jest rozłożenie skrobi do jednostek dwu lub trzy cukrowych. Pierwsza amylaza znajduje się w ludzkiej ślinie i pomaga ona już wstępnie rozłożyć skrobię podczas przeżuwania. Druga produkowana jest przez trzustkę. Ten enzym katalizuje ostatni etap procesu trawienia skrobi. Jednostki dwu i trzy cukrowe są finalnie rozkładane do glukozy przy pomocy enzymów zlokalizowanych w ścianach jelita. Amylaza trzustkowa jest względnie małym enzymem, odpornym na działanie środowiska, w którym się znajduje [11].

Ramassubbu [12] w oparciu o badania dyfrakcji promieni rentgenowskich wyznaczył wymiary komórki kryształu α -amylazy znajdującej się w ślinie uzyskując następujące wartości: $a = 53,200 \text{ \AA}$, $b = 75,400 \text{ \AA}$, $c = 136,600 \text{ \AA}$.

W skład miejsca aktywnego α -amylazy wchodzi trzy aminokwasy: glutaminian 233, asparaginian 197 oraz asparaginian 300 (numery opisują, którym z kolejności jest dany aminokwas w łańcuchu białkowym). To one są odpowiedzialne za rozpad wiązania glikozydowego w cząsteczkach skrobi.

3. CELULAZY

Celulazy są klasą enzymów, które hydrolizują wiązania β -1,4 glikozydowe w łańcuchu celulozowym. Występują one w wielu organizmach żywych począwszy od grzybów, bakterii, poprzez rośliny, a kończąc na zwierzętach. Typowa celulaza składa się z dwóch modułów, katalitycznego i niekatalitycznego. Podjednostka katalityczna posiada ściśle określoną sekwencję aminokwasów, która sprawia, iż enzym jest zdolny do wyżej wymienionej hydrolizy. Druga podjednostka to łańcuch węglowodorowy służący do zakotwiczenia enzymu.

Trzy enzymy działające synergistycznie degradują celulozę do monocukru: (i) *endo*-(1,4)- β -D-glukannglukanohydrolaza (EC 3.2.1.4), która rozpoczyna hydrolizę celulozy poprzez dysocjację obecnych w krystalicznej strukturze celulozy wiązań o charakterze niekowalencyjnym, (ii) *exo*-(1,4)- β -D-glukancelobiohydrolaza (EC 3.2.1.91) hydrolizująca celulozę do celobiozy, (iii) celobiaza (β -glukozydaza)

(EC 3.2.1.21), która bierze udział w ostatnim etapie rozkładu celulozy, tzn. hydrolizuje wiązania 1,4- β glikozydowe celobiozy do glukozy, finalnego produktu tej reakcji [12, 5].

Celobiohydrolazę (EC 3.2.1.91) występującą w grzybie *Trichoderma reesei* badali Abuja i wsp. [14]. Wyniki wskazują, że ciężar cząsteczkowy tego enzymu jest na poziomie 65 kDa. Zbudowany jest z dwóch domen, tj. aktywnego rdzenia (55 kDa) oraz elastycznego, długiego łańcucha glikopeptydowego (10 kDa) służącego do przytwierdzenia enzymu do nierozpuszczalnej celulozy. Badania wykazały także, iż rdzeń ma wymiary $R_g = 2,09$ nm oraz maksymalną średnicę $D_{max} = 6,5$ nm, natomiast cały enzym $R_g = 4,27$ nm i $D_{max} = 18$ nm. Kształt cząsteczki enzymu przypomina kijankę („tadpole-like” structure). Celobiohydrolaza jest zdolna do hydrolizy celulozy mikrokrystalicznej i amorficznej.

4. PRZEMYSŁOWE ZASTOSOWANIE ALFA-AMYLAZY I CELULAZ

Zastosowanie enzymów jako katalizatorów w procesach realizowanych poza ich naturalnym środowiskiem sięga daleko w przeszłość. Zanim uczonym udało się poznać, wyizolować i opisać te niezwykle białka, katalizę enzymatyczną stosowano do produkcji alkoholu etylowego używając drożdży, w których obecna jest dehydrogenaza alkoholowa. Innym przykładem jest produkcja serów podpuszczkowych, do której stosowano podpuszczkę z żołądków bydłych. W wyniku badań realizowanych na szeroką skalę, uczonym udało się opracować metody izolacji i oczyszczania białek enzymatycznych. Poznano mechanizmy ich działania, opracowano metody modyfikacji zmierzające do ich ustabilizowania poza środowiskiem fizjologicznym.

Enzymów nie można otrzymać na drodze syntezy chemicznej. Opracowano szereg metod wytwarzania preparatów enzymatycznych w laboratoriach genetycznych, gdzie prowadzi się hodowlę odpowiednich bakterii lub grzybów, do których wprowadza się gen kodujący i promotor wywołując w ten sposób nadprodukcję danego enzymu. Następnie izoluje się żywe białko enzymatyczne, zatęża, utrwała i otrzymuje gotowy preparat enzymatyczny [15].

Proteazy i α -amylazy to dwa najważniejsze enzymy przemysłowe reprezentujące ponad 70% światowego rynku biokatalizatorów. Zarówno grzyby jak i bakterie stosowane są do wytwarzania α -amylazy, jednakże preparaty otrzymywane z hodowli grzybów są bardziej stabilne niż pozyskiwane z bakterii [16].

Istnieje cały szereg organizmów wytwarzających celulazy, jednakże większość firm (Novozymes, Genencor) wytwarza handlowe celulazy z grzybów strzępkowych *Trichoderma* i *Aspergillus* lub pochodnych szczepów [17].

W krajach wysokorozwiniętych coraz więcej produktów otrzymuje się w procesach biotechnologicznych z udziałem enzymów. Enzymy znalazły szerokie zastosowanie w takich dziedzinach praktyki jak przemysł farmaceutyczny, spożywczy, tekstylny, chemiczny (głównie produkcja detergentów), papierniczy i garbarski [18].

Alfa-amylazy wykorzystywane są w przemyśle na szeroką skalę, począwszy od przemysłu spożywczego, poprzez zastosowanie w produkcji tekstyliów, detergentów, biopaliw kończąc na przemyśle papierniczym.

Enzymatyczna hydroliza skrobi, która jest podstawą wykorzystywania α -amylazy w przemyśle zachodzi w trzech etapach. Pierwszym z nich jest żelowanie, które ma na celu rozpuszczenie ziaren skrobi, drugi etap polega na częściowej hydrolizie tak otrzymanej zawiesiny w celu zmniejszenia jej lepkości; ostatnim etapem jest scukrzanie w którym to otrzymuje się finalne produkty-glukozę i maltozę [19].

Alfa-amylazy najszersze zastosowanie znajdują w przemyśle spożywczym. Wykorzystywane są w procesach pieczenia, browarnictwie, a także produkcji soków owocowych, syropów i innych słodczy [20]. Syrop fruktozowy z kukurydzy jest to mieszanina cukrów kukurydzianych w smaku przypominająca sacharozę, którą to z kolei otrzymuje się z trzciny cukrowej i buraków cukrowych. Tylko pierwszy etap w procesie otrzymywania syropu kukurydzianego jest przeprowadzany z wykorzystaniem α -amylazy, pozostałe są przeprowadzane przez glukoamylazę występującą w grzybach oraz izomerazę glukozową [11]. W piekarstwie α -amylazy są używane z wielu względów. Pierwszym z nich jest fakt dodawania ich w celu rozłożenia skrobi z mąki do dekstryn, które to z kolei są wykorzystywane przez drożdże w procesie fermentacji. Zaletą dodatku amylaz jest zmniejszenie lepkości ciasta, przez co poprawieniu ulega tekstura i produkt dodatkowo zyskuje objętość. Cukry produkowane przez enzymy przyczyniają się do poprawy smaku i koloru wypieków. Kolejnym faktem skłaniającym producentów do wykorzystania tych enzymów w procesach produkcji wypieków jest to, iż produkty te wolniej się starzeją i mają przez to dłuższą datę przydatności do spożycia [20, 21]. Dodatkowo α -amylazy wykorzystywane są w procesach oczyszczania piwa czy też soków owocowych [21].

Detergenty to kolejna z wcześniej wspomnianych gałęzi przemysłu, gdzie zastosowanie znajduje α -amylaza. Wykorzystywana jest ona w pralniach czy też zmywarkach automatycznych do usuwania zanieczyszczeń resztkami jedzenia, które zawierało w sobie skrobię, np. ziemniaki, sosy, czekoladę czy też kremy. Usuwanie zabrudzeń polega na enzymatycznym rozkładzie skrobi do prostszych cukrów [22]. Zastosowanie enzymów w środkach do prania pozwala na pracę detergentów w niskiej temperaturze, natomiast w czyszczeniu przemysłowym pozwala na pracę dodatkowo przy niższych wartościach pH [23].

W dzisiejszych czasach duży nacisk kładziony jest na wykorzystanie biomasy do produkcji biopaliw. Etanol, bo to właśnie on jest najczęściej produkowanym płynnym biopaliwem otrzymywany jest ze skrobi. Ten biopolimer jest wybierany ze względu na jego szeroką dostępność i niską cenę [24].

Przemysł tekstylny: tutaj α -amylazy wykorzystywane są do usuwania kleju na bazie skrobi. Środki klejące w tym między innymi skrobia dodawane są do przędzy w celu ochrony jej w procesie przędzalniczym. Skrobia jest chętnie wykorzystywana jako środek klejący ze względu na jej niską cenę i dostępność [25, 26].

W przemyśle papierniczym α -amylaza wykorzystywana jest do produkcji substancji do pokrywania papieru w celu poprawy jego gładkości i wytrzymałości i odporności na ścieralność. W normalnych warunkach kleik skrobiowy jest zbyt gęsty do pokrywania papieru, dlatego też skrobię poddaje się częściowej hydrolizie z wykorzystaniem α -amylazy otrzymując postać bardziej płynną [19, 27].

Celulazy znajdują coraz więcej zastosowań, wykorzystywane są m.in. w przemyśle papierniczym i tekstylnym. Celulazy dodawane są również do karm dla zwierząt w celu poprawy pracy ich układu pokarmowego. Szczególne zainteresowanie enzymami celulolitycznymi jest jednak związane z możliwością wykorzystania ich w biorafineriach do produkcji etanolu z lignocelulozy. Zużywanie kopalnych surowców oraz zwiększona produkcja gazów cieplarnianych sprawiają, iż aplikacja celulaz w tym kontekście staje się niezmiernie istotna. Bardzo ważnym aspektem jest modyfikacja celulaz pod kątem zwiększenia wytrzymałości termicznej jak i redukcja kosztów jej pozyskiwania. Przewidywania zakładają, iż produkcja 45 miliardów galonów alkoholu etylowego z celulozy osiągnie w roku 2030 poziom 0.20\$ za galon; a celulaza stanie się biokatalizatorem wykorzystywanym na największą skalę w porównaniu z pozostałymi enzymami [17].

5. IMMOBILIZACJA ENZYMÓW

Stosowanie w praktyce enzymów natywnych generuje znaczne koszty z uwagi na fakt, iż enzymy są drogie, czułe na zmiany pH, temperatury oraz czynników denaturujących, a operacje polegające na oczyszczaniu produktów od białka dodatkowo podnoszą cenę finalnego produktu. Osadzenie enzymu na stałym nośniku i uzyskanie katalizatora heterogenicznego zachowującego aktywność w kolejnych cyklach lub w procesie ciągłym oznacza ogromny zysk ekonomiczny [28]. Immobilizowane mogą być nie tylko same enzymy, ale i całe komórki [29].

Termin „immobilizacja enzymów”, zdefiniował Katchalski-Katzir w 1971 r. [30]. Zgodnie z tą definicją enzym uznaje się za immobilizowany, jeżeli zlokalizowany w ściśle określonej przestrzeni obszaru reakcyjnego, jest zdolny przejawiać swoją aktywność oraz może być wykorzystany ponownie lub stosowany w procesach ciągłych.

Należy podkreślić, iż nie istnieje materiał do immobilizacji, który spełniałby wszystkie oczekiwania, dlatego priorytetowymi wymaganiami przy doborze nośnika są wymagania procesowe. Podobnie nie istnieje jeden najkorzystniejszy sposób immobilizacji, z tego powodu dla każdego enzymu nośnik należy dobierać indywidualnie na drodze eksperymentalnej. W wyniku unieruchomienia enzymu na stałym nośniku zostaje znacząco ograniczona jego ruchliwość konformacyjna, co zwiększa stabilność. Jednak wielopunktowe związanie enzymu z nośnikiem może powodować jego dezaktywację w wyniku zmiany geometrii centrum aktywnego [31].

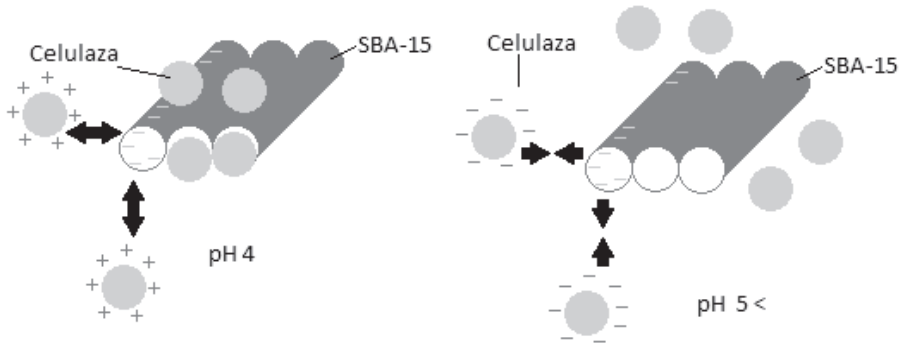
Jako nośniki często wykorzystywane są nierozpuszczalne polimery, albo stałe nośniki nieorganiczne. Enzymy działające w układzie enzym/nośnik działają w sposób odmienny niż te, które działają tylko w otoczeniu substratu i produktu [32]. Zdaniem Singh'a [32], idealny nośnik do immobilizacji enzymów musi charakteryzować się biernością, stabilnością, zdolnością do regeneracji, musi zwiększać specyficzność oraz aktywność enzymu, dodatkowo nie wskazane jest aby na nośniku następowała niespecyficzna adsorpcja i zanieczyszczenie mikroorganizmami. Pożądane jest również, aby w przypadku, gdy produkty reakcji powodują inhibicję enzymu, nośnik ograniczał to zjawisko. Proces immobilizacji wymaga przeprowadzenia dodatkowych operacji na etapie wytwarzania preparatów enzymatycznych, co w sposób oczywisty generuje dodatkowe koszty [33]. Jednakże korzyści z otrzymania aktywnego i stabilnego heterogenicznego biokatalizatora są niewspółmiernie większe niż koszty generowane przez immobilizację. Ogólne, kryteria dotyczące zasad doboru nośnika dla procesów enzymatycznych można sformułować w formie następujących zasad [34]: (i) nośniki hydrofobowe zwiększają szybkość reakcji z hydrofobowym substratem i stabilizują enzym, (ii) nośniki z wieloma centrami zdolnymi do wiązania enzymu zwiększają wytrzymałość termiczną enzymu, (iii) użycie łącznika chroni enzym przed dezaktywacją, (iv) porowatość nośnika może powodować zarówno wzrost aktywności (rozwińnięcie powierzchni heterogenicznego katalizatora) jak i zahamowanie aktywności na skutek znacznych oporów dyfuzyjnych lub niedostępności substratu do centrum aktywnego.

5.1. IMMOBILIZACJA ENZYMÓW PRZEZ ADSORPCJĘ

Immobilizacja enzymów poprzez adsorpcję polega na wytworzeniu wiązań wodorowych, oddziaływań van der Waalsa, bądź też wykorzystaniu oddziaływań hydrofobowych w celu związania enzymu z nośnikiem. Fakt, iż oddziaływania te nie są trwałe, proces jest odwracalny poprzez zmianę pH, temperatury, siły jonowej czy też polarności rozpuszczalnika. Taki sposób wiązania enzymu z powierzchnią nośnika jest bezpieczniejszy dla katalizatora, ponieważ istnieje mniejsze ryzyko dezaktywacji enzymu, niż w przypadku gdy wytwarzane jest wiązanie kowalencyjne enzym-nośnik [35].

W pracy Anri Takimoto i współpracowników [36] immobilizowano celulazę na SBA-15. Naukowcy zbadali wpływ wielkości porów na proces immobilizacji celulazy. Zsyntezowali SBA-15 o porach wielkości 5,4 nm, 8,9 nm oraz 11 nm. Immobilizacja celulazy była prowadzona poprzez bezpośrednie dodanie do roztworu enzymu kilku miligramów SBA-15. Krzemionka nie była modyfikowana na powierzchni. Immobilizacja enzymu tłumaczona była poprzez powstawianie oddziaływań elektrostatycznych nośnik-enzym. Wraz ze wzrostem porów w krzemionce SBA-15 rośnie ilość zaadsorbowanego enzymu, jednakże nie idzie to w parze ze wzrostem aktywności katalitycznej. Okazało się, iż najlepsza dla procesu immobilizacji była krzemionka o wielkości porów 8,9 nm, gdyż jak twierdzą

naukowcy, taki rozmiar porów sprzyja lokowaniu się enzymu bliżej wejść porów niż w przypadku SBA-15 o porach 11 nm. Taki katalizator wykazuje również wysoką aktywność po przechowywaniu go przez 4 tygodnie w temperaturze pokojowej. Badano również wpływ pH na immobilizację i najkorzystniej zachodziła ona dla $\text{pH} = 4$, podczas gdy punkt izoelektryczny celulazy wynosi $\text{pI} = 4,9$. Wpływ pH na immobilizację zobrazowano schematycznie na rysunku poniżej (Rys. 4).



Rysunek 4. Oddziaływań pomiędzy SBA-15 a celulazą w zależności od pH
Figure 4. Interactions between SBA-15 and cellulose, at different pH

W publikacji Quing-Zhou Zhai Si-Jia Sun' [37] wykorzystano mezoporowatą krzemionkę SBA-15 do immobilizacji pepsyny-enzymu hydrolyzującego rozkład białek. W drugiej serii krzemionkę SBA-15 dodatkowo zmodyfikowano za pomocą metylo-trimetoksylosilanu deponując w ten sposób na jej powierzchni grupy metylowe. Przeprowadzono proces immobilizacji poprzez fizyczną adsorpcję enzymu na otrzymanych nośnikach. Okazało się, iż immobilizacja pepsyny zachodzi lepiej w przypadku krzemionki modyfikowanej grupami $-\text{CH}_3$. Dodatkowo badano wpływ siły jonowej na proces immobilizacji. Badania wykazały, iż wraz ze wzrostem siły jonowej spada ilość zaadsorbowanej na nośniku pepsyny.

W innej publikacji, Gómez i inni [38] opisują immobilizację β -glukozydazy otrzymywanej z migdałów. Enzym ten ma masę 130 kDa (dimer). Zaobserwowano, że zazwyczaj immobilizowane enzymy (do roku 2010) mają masę poniżej 50 kDa i średnicę około 4,0 nm. Jest niewiele publikacji mówiących o immobilizacji większych enzymów (średnicy większej niż 5,0 nm). Immobilizowana β -glukozydaza ma średnicę 6,6 nm dla dimeru. Stwierdzono, iż sposób wiązania enzymu z powierzchnią SBA-15 następuje w skutek tworzenia oddziaływań elektrostatycznych, natomiast największa ilość enzymu immobilizuje się przy $\text{pH} = 3,5$.

Na mezoporowatej krzemionce SBA-15 immobilizowano również enzym, któremu poświęcona jest niniejsza praca: α -amylaza. Jak pisze w swojej pracy Quin-Zhou Zhai [39] immobilizację wykonano w oparciu o zjawisko fizycznej adsorpcji, proces prowadzono przez 27h w temp. 30°C . Maksymalna ilość immobilizowanego enzymu w przeliczeniu na 1g SBA-15 w wyniosła 87,5 mg. Układ wykazywał odporność na wysokie pH oraz temperaturę.

W publikacji Kanako Hisamatsu i współpracowników [40] opisano immobilizację α -amylazy na mezoporowatych krzemionkach o różnych kształtach. Deponowanie enzymu na nośniku odbywało się poprzez proces bezpośredniego połączenia krzemionki z roztworem enzymu (układ był umieszczony w rotatorze w temperaturze 4°C, przez 3 h). Pierwszą z nich była krzemionka FSM, (folded sheet mesoporous silica) – przypominająca kształtem pofałdowaną kartkę, drugą KIT-6, krzemionka w kształcie sześciennych brył natomiast ostatnią SBA-15, dwuwymiarowa, heksagonalna krzemionka. Badania wykazały, że ilość zaimobilizowanego enzymu wzrasta wraz ze wzrostem wielkości porów: SBA-15 < KIT-6 < FSM. Jak twierdzą naukowcy FSM w porównaniu do SBA-15 oraz KIT-6 wykazuje największą zdolność adsorpcji enzymu, ponieważ ziarna tej krzemionki posiadają mniejsze wymiary, z drugiej strony natomiast większe pory, które są rozmieszczone w sposób nieregularny i sprzyjają dyfuzji enzymu.

5.2. IMMOBILIZACJA ENZYMÓW PRZEZ WIĄZANIE KOWALENCYJNE

Immobilizacja enzymu polegająca na wytworzeniu wiązania kowalencyjnego pomiędzy nośnikiem a enzymem jest trudnym zabiegiem. Wymaga ona znajomości grup funkcyjnych białka, które mają być wykorzystane do związania enzymu z nośnikiem, należy również uwzględnić fakt, iż podczas tego procesu może nastąpić dezaktywacja enzymu. Ważnym jest aby podczas wyboru grup funkcyjnych enzymu wybrać te, które nie są odpowiedzialne za działanie enzymu, ani za stabilizowanie struktury białka. Najczęściej wykorzystywanymi aminokwasami białkowymi są cysteina (ugrupowanie tiolowe), tyrozyna (ugrupowanie fenolowe), histydyna (ugrupowanie imidazolowe) oraz lizyna (ugrupowanie aminowe). W Tabeli 1 zestawiono najczęściej wykorzystywane grupy funkcyjne w przypadku nośnika i białka, przedstawiono również możliwe do zastosowania czynniki wiążące oraz wartość pH, przy którym następuje wiązanie białka [41].

Tabela 1. Przykłady najczęściej wykorzystywane grupy funkcyjne w przypadku nośnika i białka, czynniki wiążące oraz optymalne pH prowadzenia reakcji

Table 1. Examples of commonly used functional group of the support and protein binding agent, and the optimal pH of reaction

| Grupa funkcyjna nośnika | Grupa funkcyjna białka | Czynnik wiążący/aktywujący | Wartość pH wiązania białka |
|-------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|
| -COOH | -NH ₂ | Karbodiimid | 3,5–4,5 |
| | -COOH | Izocyjanki | 4,0–8,0 |

| Grupa funkcyjna nośnika | Grupa funkcyjna białka | Czynnik wiążący/aktywujący | Wartość pH wiązania białka |
|-------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|
| -NH ₂ | -NH ₂ | Aldehyd glutarowy | 6,0– 8,0 |
| | -NH ₂ | Kwas askorbinowy | 6,0–7,0 |
| | -COOH | Karbodiimid | 3,5–4,5 |
| -OH | -NH ₂ | Diwinylosulfon | 8,0–10,0 |
| | -SH | | 9,0–11,0 |
| | -OH | | 11,0–13,0 |
| | -NH ₂ | Karbodiimid | 8,0–9,5 |
| | -OH | Sole diazoniowe | 6,0–8,0 |

Enzym kowalencyjnie związany z nośnikiem jest odporniejszy na czynniki denaturujące i może pracować w wyższych temperaturach, jednak oprócz zalet tego procesu występują także wady; najistotniejszą z nich jest wcześniej wspomniana dezaktywacja enzymu. Brak autolizy, a także wyeliminowanie agregacji oraz zwiększenie odporności na proteazy to zalety obserwowalne każdorazowo. Dużo bardziej pożądanym jest otrzymanie preparatów stabilnych podczas przechowywania, co jest trudniejsze, ale bardziej pożądane z punktu widzenia handlu [41].

Przykładem przeprowadzonej immobilizacji w sposób kowalencyjny może być praca Sandy Budi Hartono i współpracowników [42], która dodatkowo pokazała wpływ modyfikacji powierzchni mezoporowatej krzemionki na immobilizację enzymu i jego aktywność. Krzemionkę FDU-12 (wielkość porów do 25,4 nm) modyfikowano za pomocą organosilanów: 3-aminopropylotrietoksylanu (APTES), 3-merkaptopropylotrimetoksylanu (MPTMS), winylotrimetoksylanu (VTMS) oraz fenylotrimetoksylanu (PTMS); a następnie immobilizowano celulazę sprawdzając później aktywność katalityczną tak powstałych układów. Najślabszą aktywność wykazywała celulaza immobilizowana na podłożu FDU-12-APTES, ponieważ ugrupowanie aminowe wpływa na strukturę trzeciorzędową enzymu obniżając jego aktywność. Materiał FDU-12-VTMS charakteryzował się natomiast wysokim powinowactwem do enzymu nie zmieniając jego struktury oraz nie blokując centrów aktywnych. Renee Han-Yi wraz ze współpracownikami [43] zbadał dodatkowo wpływ rodzaju oddziaływania enzymu (celulazy) z nośnikiem na jego aktywność. Powierzchnię krzemionki zawierającej duże pory (20–40 nm) zmodyfikowano za pomocą bezwodnika kwasu (3-trietoksylino bursztynowego (TESP-SA). TESP-SA użyty jako łącznik do chemicznego związania mezoporowatej krzemionki z celulazą sprawił, iż układ taki charakteryzował się ponad 80% wydajnością konwersji celulozy do glukozy i zadowalającą stabilnością. W przypadku α -amylazy również zostały poczynione badania związane z kowalencyjnym związaniem na powierzchni krzemionek mezoporowatych. W pracy

Pandya i współpracowników [44] opisane jest badanie wpływu wielkości porów w mezoporowatych krzemionkach na aktywność i stabilność α -amylazy. Immobilizowali oni enzym na krzemionkach o średnicy porów od 26–335 Å i wykorzystywali do hydrolizy skrobi. Powierzchnię krzemionek początkowo zmodyfikowano APTES (50 ml 10% roztworu APTES na 1 g krzemionki), a następnie przeprowadzono immobilizację enzymu używając jako łącznika aldehydu glutarowego (25 ml 2,5% roztworu GA na 1 g krzemionki zmodyfikowanej APTES, pH reakcji wynosiło 6,62). Badania wykazały, iż w materiałach posiadających małe pory aktywność enzymu była niska, ponieważ zdaniem naukowców enzym lokalizował się na zewnętrznej powierzchni materiałów. Enzym immobilizowany na krzemionkach o większych porach wykazywał się podwyższoną aktywnością. Finalnie okazało się iż najbardziej wydajny układ charakteryzował się 80% wydajnością w stosunku do wolnego enzymu. Układy katalityczne charakteryzowały się wyższą stabilnością na zmianę pH i temperatury w stosunku do enzymu nie związanego.

Kolejna publikacja również porusza problem immobilizacji α -amylazy na mezoporowatych krzemionkach (m.in. SBA-15), wiązanie enzymu następuje również w sposób kowalencyjny za pośrednictwem aldehydu glutarowego. Krzemionkę wcześniej również zmodyfikowano APTES. W pracy porównywano wpływ wielkości porów nośnika (76–300 Å) na aktywność enzymu. Badania wykazały iż w przypadku SBA-15 (średnica porów około 60 Å) oraz silica-15-N (nazwa umownie przyjęta przez autorów, średnica porów około 100 Å) enzym był immobilizowany wyłącznie na powierzchni, natomiast w przypadku silica-AC (nazwa umownie przyjęta przez autorów, średnica porów około 300 Å) enzym deponował się w wewnętrznych porach. Aktywność enzymu na nośniku rosła w następującym porządku: silica-AC > silica-N > SBA-15, natomiast jego stabilność: SBA-15 > silica-AC > silica-N. Wykazano również, iż enzym immobilizowany charakteryzuje się mniejszą aktywnością niż enzym niezwiązany [45].

6. MEZOPOROWATE MATERIAŁY SBA-15 JAKO NOŚNIKI ENZYMÓW

Chemiczna modyfikacja powierzchni mezoporowatych krzemionek stwarza możliwości kowalencyjnego związania nośnika z enzymem. 3-aminopropylotrietoksylan (APTES) może służyć jako przykład związku chemicznego do przeprowadzenia takiej modyfikacji. Po zdeponowaniu go na powierzchni krzemionki, grupa $-NH_2$ stwarza możliwość kowalencyjnego związania nośnika z enzymem. W tym celu należy wykorzystać czynnik aktywujący jak np. aldehyd glutarowy, który utworzy z grupami aminowymi zmodyfikowanego nośnika i enzymu zasady Schiffa, łącząc je w sposób trwały ze sobą.

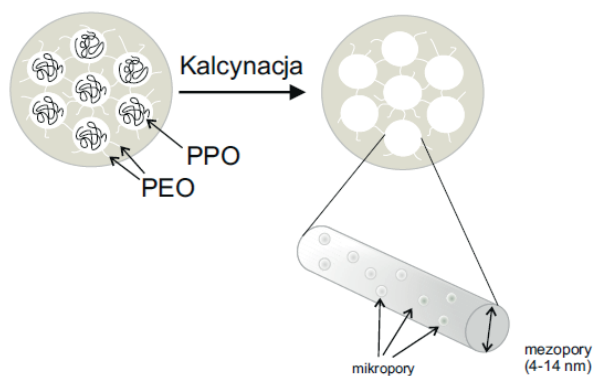
Zeolity posiadające mikropory są najbardziej znanymi materiałami mającymi szereg zastosowań. Jednakowej wielkości pory (zbliżone do rozmiarów cząsteczek) znajdujące się w mikroporowatych krzemionkach oraz dodatkowo dobra stabilność

i selektywność, a także możliwość modyfikacji sprawiają, iż związki te mają szereg zastosowań- służą jako katalizatory, sorbenty czy też membrany filtrujące [46].

Na początku lat 90-tych udało się zsyntezować pierwszą klasę mezoporowatych krzemionek: M41S [47]. Synteza była przeprowadzona przez pracowników firmy Mobil i opierała się ona na wykorzystaniu surfaktantów mających zdolności do samoporzędowania.

Moment ten był punktem zwrotnym w syntezie nowych, zaawansowanych materiałów mezoporowatych. Zastosowania tych układów zostały poszerzone dodatkowo o wykorzystanie ich jako nośników leków, sensorów i wielu innych [46].

Kolejną klasą zsyntezowanych mezoporowatych krzemionek były m.in. materiały SBA (angielski akronim Santa Barbara Acids). Ta nowa rodzina wysoko uporządkowanych krzemionek została otrzymana po raz pierwszy w 1998 roku [48]. Preparatyka polegała na wykorzystaniu jako templaty niejonowego, trójblokowego kopolimeru EOnPOmEOn w kwaśnym środowisku [46]. Wyróżnia się wiele materiałów należących do tej klasy. SBA-1 [49] i SBA-11 [50] o strukturze kubicznej, SBA-12: trójwymiarowa heksagonalna sieć [48], SBA-14 o strukturze lamelarniej [48], SBA-15: dwuwymiarowa struktura heksagonalna [51] oraz SBA-16 [52] struktura sześcienniej klatki (cubic cage). Największym zainteresowaniem cieszy się jednak SBA-15, ponieważ posiada wiele korzystnych cech.



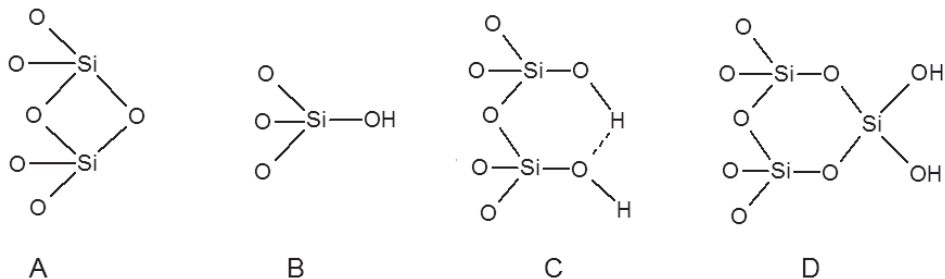
Rysunek 5. Proces syntezy materiału SBA-15 i jego struktura

Figure 5. Synthesis of the material SBA-15 and its structure

SBA-15 jest jak już wcześniej wspomniano materiałem o dwuwymiarowej strukturze heksagonalnej posiadającym zarówno mikro jak i makropory. Wielkość mezoporów zawiera się w przedziale od 4–14 nm [46] natomiast mikroporów od 1,5 do 5 nm [53] i zależy od warunków syntezy. Ściany SBA 15 mają charakter mikroporowaty, a ich grubość wynosi od 3–6 nm. Takie ściany sprawiają, iż SBA-15 wykazuje wysoką hydrotermalną stabilność w przeciwieństwie do innych materiałów jak chociażby MCM-41 (klasa M41S) [54]. Dwuwymiarowe heksagonalne

pory SBA-15 należące do grupy przestrzennej p6mm obserwowane są na dyfrakto-gramie przy niskich wartościach kąta 2θ [46].

Powierzchnia SBA-15 jest pokryta dwoma różnymi rodzajami grup funkcyj-nych. Pierwsze z nich są hydrofobowe: grupy siloksanowe ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$), drugie natomiast hydrofilowe: grupy silanolowe ($\equiv\text{Si-OH}$). Grupy $\equiv\text{Si-OH}$ podzielone są ze względu na swoje otoczenie na: izolowane (atom krzemu z powierzchni posiada trzy wiązania O-Si oraz jedno wiązanie Si-OH), wicynalne (dwie grupy silanolowe są połączone przez mostek z atomem wodoru) oraz geminalne (do jednego atom Si przyłączone są dwie grupy -OH (Rys. 6) [55].



Rysunek 6. Powierzchnia krzemionki SBA-15: A – grupa siloksanowa, B – izolowana grupa silanolowa, C – wicynalna grupa silanolowa, D – geminalna grupa silanolowa

Figure 6. SBA-15 surface: A – siloxane group, B – isolated silanol group, C – the vicinal silanol group, D – geminal silanol group

UWAGI KOŃCOWE

W niniejszej pracy poruszone zostały tylko niektóre aspekty praktycznego zastosowania α -amylaz i celulaz bowiem spektrum zastosowania tych enzymów jest bardzo duże. Mezoporowate krzemionki są jedną z wielu matryc stosowanych w procesach immobilizacji enzymów, ze względu na wiele korzystnych cech (m.in. stabilność temperaturową, możliwość funkcjonalizacji) zostały poruszone w tym artykule.

PODZIĘKOWANIA

Pragnę podziękować Pani Promotor dr hab. Ewie Witek za wsparcie podczas redagowania artykułu oraz ciągłą motywację do wyczerpanej pracy.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] L. Stryer, *Biochemia*, PWN, Warszawa 2003.
- [2] D.W. Atkins, *Chemia fizyczna*, PWN, Warszawa 2007.

- [3] R.K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell, *Biochemia Harpera*, PZWŁ, Warszawa 2006.
- [4] W. Aehle, *Enzymes in industry*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2004.
- [5] G.P. Moss, Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse [online] Dostępny w Internecie <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb> [dostęp: 8.05.2016].
- [6] I. Yamamoto, *Enzyme chemistry and molecular biology of amylases and related enzymes*, The Amylase Research Society of Japan, Tokio 1994.
- [7] A. Payen, J. Persoz, *Ann. Chim. et Phys.*, 1833, **53**, 73.
- [8] R. Kuhn, *Ber.*, 1924, **67**, 1965; *Ann.* 1925, **443**, 1.
- [9] E. Ohlsson, *Z. Physil. Chem.*, 1930, **189**, 57.
- [10] L.L. Phillips, M.L. Caldwell, *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 3559.
- [11] D. Goodsell, Alpha-amylase [online] Dostępny w Internecie <http://pdb101.rcsb.org/motm/74>, [dostęp: 02.03.2016].
- [12] N. Ramasubbu, V. Paloth, Y. Luo, G.D. Brayer, M.J. Levine, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 1996, **52**, 435.
- [13] B. Yang, Z. Dai, S.-Y. Ding, C.E. Wyman, *Biofuels*, 2011, **2**, 421.
- [14] P.M. Abuja, M. Schmuck, I. Pilz, P. Tomme, M. Claeysens, H. Esterbauer *Eur. Biophys. J.*, 1988, **15**, 339.
- [15] T. Ideker, T. Galitski, L. Hood, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2001, **2**, 343.
- [16] H. Mukhtar, Ikram-ul-Haq, *Braz. J. Microbiol.*, 2012, **43**, 1072.
- [17] X.-Z. Zhang, Y.-H. Percival Zhang, *Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications from: Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*, First Edition, John Wiley & Sons, Inc., 2013.
- [18] A.K. Chandel, R. Rudravaram, L.V. Rao, R. Pogaku, M.L. Narasu, *Integrative and Commarative, Biotechnology*, 2007, **13**, 283.
- [19] R. Gupta, P. Gigras, H. Mohapatra, V.K. Goswami, B. Chauhan, *Process Biochem.*, 2003, **38**, 1599.
- [20] S.R. Couto, M.A. Sanromán, *J. Food Eng.*, 2006, **76**, 291.
- [21] M.J. van der Maarel, B. van der Veen, J.C. Uitdehaag, H. Leemhuis, L. Dijkhuizen, *J. Biotechnol.*, 2002, **94**, 137.
- [22] A.K. Mukherjee, M. Borah, S.K. Raí, *Biochem. Eng. J.*, 2009, **43**, 149.
- [23] H.S.O. Olsen, P. Falholt, *J. Surfactants Deterg.*, 1998, **1**, 555.
- [24] Z. Chi, Z. Chi, G. Liu, F. Wang, L. Ju, T. Zhang, *Biotechnol.*, 2009, **Adv 27**, 423.
- [23] H. Feitkenhauer, *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, **33**, 250.
- [24] S. Ahlawat, S.S. Dhiman, B. Battan, R.P. Mandhan, J. Sharma, *Process Biochem.*, 2009, **44**, 521.
- [25] P.M. Bruinenberg, A.C. Hulst, A. Faber, R.H. Voogd, *A process for surface sizing or coating of paper*, [w:] European Patent Application, 1996.
- [26] S. Datta, L.R. Christena, Y.R. Sriramulu Rajaram, *Biotech*, 2013, **3**, 1.
- [27] H.Y. Kawaguti, E. Manrich, H.H. Sato, *Biochem. Eng. J.*, 2006, **29**, 270.
- [28] E. Katchalski-Katzir, *Trends in Biotechnology*, 1993, **11**, 471.
- [29] J. Bryjak, *Wiadomości Chemiczne*, 2004, **58**, 691.
- [30] B.D. Singh, *Biotechnology expanding horizons*, Kalyani, India, 2009.
- [31] S.F. D'Souza, *Curr. Sci.*, 1998, **77**, 69.
- [32] L. Cao, *Immobilized enzymes: past, present and prospects. In: Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2006.

- [33] B.M. Brena, F. Batista-Viera, *Immobilization of Enzymes, from: Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, Second Edition, Totowa, Madrid 2006.
- [34] A. Takimoto, T. Shiomi, K. Ino, T. Tsunoda, A. Kawai, F. Mizukami, K. Sakaguchi, *Micropor. Mesopor. Mat.*, 2008, **11**, 601.
- [35] Q.-Z. Zhai, S.-J. Sun, *Russ. J. Phys. Chem. A*, 2014, **88**, 2243.
- [36] J.M. Gómez, M.D. Romero, T.M. Fernández, S. García, *J. Porous. Mater.*, 2010, **17**, 657.
- [37] Q.-Z. Zhai, *Asian J. Chem.*, 2014, **26**, 2736.
- [38] K. Hisamatsu, T. Shiomi, S. Matsuura, T.Y. Nara, T. Tsunoda, F. Mizukami, K. Sakaguchi, *J. Porous. Mater.*, 2012, **19**, 95.
- [39] J. Bryjak, *Zarys technologii otrzymywania im mobilizowanej lakazy i tyrozynazy o podwyższonej stabilności operacyjnej*, Tytuł Projektu: „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym” Nr POIG.01.03.01-00-158/09-06.
- [40] S.B. Hartono, S.Z. Qiao, J. Liu, K. Jack, B.P. Ladewig, Z. Hao, G.Q.M. Lu, *J. Phys. Chem., C* 2010, **114**, 8353.
- [41] R.H.-Y. Chang, J. Jang, K.C.-W. Wu, *Green Chem.*, 2011, **13**, 2844.
- [42] P.H. Pandya, R.V. Jasra, B.L. Newalkar, P.N. Bhatt, *Micropor. Mesopor. Mat.*, 2005, **77**, 67.
- [43] H.M. Mody, K.H. Mody, R.V. Jasra, H.J. Shin, R. Ryong, *IJC-A*, 2002, **41A**, 1795.
- [44] V. Meynen, P. Cool, E.F. Vansan, *Micropor. Mesopor. Mat.*, 2009, **125**, 170.
- [45] C.T. Kresge, M.E. Leonowics, W.J. Roth, J.C. Vartuli, *US Patent* 5 098 684, 1992.
- [46] D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 6024.
- [47] H.-M. Kao, J.-D. Wu, C.-C. Cheng, A.S.T. Chiang, *Micropor. Mesopor. Mater.*, 2006, **88**, 319.
- [48] J.M. Kim, G.D. Stucky, *Chem. Commun.*, 2000, **13**, 1159.
- [49] D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G.H. Frederickson, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, *Science*, 1998, **279**, 548.
- [50] P. Van Der Voort, M. Benjelloun, E.F. Vansant, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 9027.
- [51] A. Galarneau, H. Cambon, F. Di Renzo, R. Ryoo, M. Choi, F. Fajula, *New. J. Chem.*, 2003, **27**, 73.
- [52] K. Cassiers, T. Linssen, M. Mathieu, M. Benjelloun, K. Schrijnemakers, P. Van Der Voort, P. Cool, E.F. Vansant, *Chem. Mater.*, 2002, **14**, 2317.
- [53] R. Ojeda-López, I.J. Pérez-Hermosillo, J.M. Esparza-Schulz, A. Cervantes- Uribe, A. Dominguez-Ortiz, *Adsorption*, 2015, **21**, 659.

Praca wpłynęła do Redakcji 20 lipca 2016

