

POLITECHNIKA POZNAŃSKA
WYDZIAŁ TECHNOLOGII CHEMICZNEJ
Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej
Zakład Technologii Chemicznej



ROZPRAWA DOKTORSKA

**Reaktywna konwersja składników biomasy
z równoczesną regeneracją kofaktora enzymatycznego**

mgr inż. Karolina Maria Bachosz

*Praca doktorska wykonana w ramach projektu
Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „NanoBioTech”
i przedłożona Radzie Dyscypliny Nauki Chemiczne
Politechniki Poznańskiej
w celu uzyskania stopnia doktora*

Promotor: prof. dr hab. inż. Teofil Jesionowski

Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Jakub Zdarta

Poznań 2022



Rzeczpospolita
Polska



Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Rozprawa doktorska została wykonana w ramach uczestnictwa w projekcie *Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „NanoBioTech”*, realizowanym wspólnie przez trzy jednostki:

- Politechnikę Poznańską,
- Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,
- Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk

w ramach Umowy o dofinansowanie nr POWR.03.02.00-00-I011/16.

Projekt *Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „NanoBioTech”* jest współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014–2020.



Składam najserdeczniejsze podziękowania:

-prof. dr. hab. inż. Teofilowi Jesionowskiemu-

*za zapewnienie możliwości ciągłego rozwoju
i wsparcie na każdym etapie mojej naukowej drogi*

-dr. hab. inż. Jakubowi Zdarta-

*za bezustanną motywację do ciągłego działania,
poświęcony czas oraz wszelką udzieloną pomoc*

-dr inż. Katarzynie Jankowskiej-

-mgr inż. Weronice Badzińskiej-

*za tworzenie fantastycznej atmosfery pracy,
zarażanie pozytywną energią i całe okazane wsparcie*

Z całego serca dziękuję także:

-Mamie, Tacie, Krzyškowi i Michaszkowi oraz wszystkim Najbliższym-
za to, że nigdy we mnie nie zwątpiliście i zawsze staliście u mego boku

-Milenie i Karolinie-
za wyrozumiałość dla mojego ciągłego braku czasu

-Gosi i Ewelinie-
*za to, że byliście, jesteście i będziecie,
a nasz mikroświat jest absolutnie niezniszczalny*

*When everything is too overwhelming
Even if you take a break
It's okay
You're stronger than you think you are*

***Dla moich Dwóch Aniołów Stróżów
Najukochańszych Babć,
które nauczyły mnie jak być silną i dumną***

Lista symboli i znaków

3HBDH	– dehydrogenaza 3-hydroksymaślanowa
ADH	– dehydrogenaza alkoholowa
APTES	– 3-aminopropylotrimetoksylan
ATP	– trifosforan adenozy
CHMO	– monooksygenaza cykloheksanonu
CoA	– koenzym A
CR	– reduktaza karbonylowa
EDS	– energodispersyjna mikroanaliza rentgenowska
EMR	– enzymatyczny reaktor membranowy
ER	– reduktaza enanianowa
FAD	– dinukleotyd flawinoadeninowy
FaldDH	– dehydrogenaza formaldehydowa
FDH	– dehydrogenaza mrówczanowa
FMN	– mononukleotyd flawinowy
FTIR	– spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
G6PDH	– dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa
GDH	– dehydrogenaza glukozy
GlyDH	– dehydrogenaza glicerolu
k_{cat}	– stała katalityczna
K_m	– stała Michaelis-Menten
LDH	– dehydrogenaza mleczanowa
MWCO	– molekularna granica rozdziału (z ang. <i>molecular weight cut-off</i>)
NAD	– dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
NAD ⁺	– forma utleniona dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NADH	– forma zredukowana dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NADP	– fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NADP ⁺	– forma utleniona fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NADPH	– forma zredukowana fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
SSADH	– dehydrogenaza semialdehydu bursztynianowego
TEM	– transmisyjna mikroskopia elektronowa
THFA	– kwas tetrahydrofoliowy
TTN	– liczba obrotów enzymu (kofaktora)
V_{max}	– maksymalna szybkość reakcji
XDH	– dehydrogenaza ksylozy
XR	– reduktaza ksylozy

Spis treści

Lista publikacji naukowych będących podstawą rozprawy doktorskiej.....	8
1. Streszczenie	10
2. Abstract.....	15
3. Wprowadzenie teoretyczne.....	20
3.1 Konwersja biomasy lignocelulozowej	20
3.2 Immobilizacja enzymów – aktualne trendy i kierunki zastosowań	33
3.2.1 Selekcja nośnika a efektywność immobilizacji enzymów	35
3.2.2 Koimmobilizacja enzymów.....	43
3.3 Kofaktory enzymatyczne	51
4. Idea poznawcza i cel pracy	61
5. Opis i dyskusja osiągnięć badawczych.....	65
5.1. Systemy biokatalityczne z dehydrogenazą alkoholową jako enzymem regenerującym NAD ⁺	66
5.2 Systemy biokatalityczne z dehydrogenazą 3-hydroksymaślanową jako enzymem regenerującym NAD ⁺	89
6. Podsumowanie i wnioski	110
7. Perspektywy rozwoju badań	119
8. Literatura.....	121
9. Aktywność naukowa.....	142
Publikacja 1.....	147
Publikacja 2.....	159
Publikacja 3.....	165
Publikacja 4.....	177
Publikacja 5.....	188
Oświadczenia współautorów	203

Lista publikacji naukowych będących podstawą rozprawy doktorskiej

Na podstawie „Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595)” przygotowano listę publikacji, która stanowi spójny, monotematyczny cykl artykułów naukowych z zakresu wytwarzania, charakterystyki oraz zastosowania innowacyjnych systemów koimmobilizowanych enzymów, który stanowi podstawę do nadania stopnia naukowego doktora. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) prac wchodzących w skład przedkładanej dysertacji wynosi 26,34, a łączna wartość punktów MNiSW to 390. Prezentowane prace opublikowano w latach 2019–2022, a ich zestawienie przedstawiono w tabeli poniżej. Ponadto oświadczenia współautorów, które zawierają indywidualny wkład każdego z nich w proces powstawania i publikowania prac stanowią załącznik do rozprawy doktorskiej.

LP.	PUBLIKACJA NAUKOWA	IF	5-LETNI IF	PUNKTACJA MINISTERIALNA
1	Bachosz K. , Synoradzki K., Staszak M., Pinelo M., Meyer A.S., Zdarta J., Jesionowski T., <i>Bioconversion of xylose to xylonic acid via co-immobilized dehydrogenases for conjunct cofactor regeneration</i> , Bioorganic Chemistry, 93 (2019) 102747.	5,307	5,321	100
2	Bachosz K. , Zdarta J., Marczak Ł., Błażewicz J., Jesionowski T., <i>A highly effective approach to cofactor regeneration and subsequent membrane separation of bioconversion products: Kinetic parameters and effect of process conditions</i> , Bioresource Technology Reports, 9 (2020) 100365.	-	-	20

3	Bachosz K. , Piasecki A., Zdarta A., Kaczorek E., Pinelo M., Zdarta J., Jesionowski T., <i>Enzymatic membrane reactor in xylose bioconversion with simultaneous cofactor regeneration</i> , Bioorganic Chemistry, 123 (2022) 105781.	5,307	5,321	100
4	Bachosz K. , Smulek W., Zdarta J., Jesionowski T., <i>A novel strategy for the application of levulinic acid with simultaneous NAD⁺ regeneration and membrane separation of products</i> , Journal of Environmental Chemical Engineering, 10 (2022) 108703.	7,968	-	100
5	Bachosz K. , Zdarta J., Nghiem L.D., Jesionowski T., <i>Multienzymatic conversion of monosaccharides from birch biomass after pretreatment</i> , Environmental Technology & Innovation, 28 (2022) 102874.	7,758	-	70

1. Streszczenie

Wraz z upływem czasu zasoby naturalne ulegają stałemu wyczerpywaniu, dlatego praktyczne wykorzystanie biomasy zyskuje coraz szersze uznanie. Wyodrębnienie oraz konwersja składników biomasy, głównie celulozy i hemicelulozy, w wysokowartościowe związki chemiczne o niskiej masie cząsteczkowej, umożliwia ich zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu czy życia codziennego. Istotną rolę w konwersji składników biomasy odgrywają reakcje katalizowane przez enzymy sklasyfikowane w grupie oksydoreduktaz, zwane dehydrogenazami, wśród których najważniejsze to dehydrogenaza glukozy czy dehydrogenaza ksylozy. Jednakże, powszechne wykorzystanie biokatalizatorów we wspomnianych procesach jest ograniczone głównie ze względu na konieczność doprowadzenia do układów reakcyjnych kofaktorów, które odpowiadają za równoważenie reakcji redoks poprzez przenoszenie elektronów pomiędzy cząsteczkami enzymów i substratów. Praktyczne zastosowanie kofaktorów nikotynoamidowych, w tym dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, jest sporym wyzwaniem ze względu na jego stosunkowo wysoką cenę i małą dostępność komercyjną, a także fakt, że związki te wyczerpują się w trakcie trwania procesów biokatalitycznych. Relatywnie niska dostępność zarówno enzymów, jak i kofaktorów, wysokie koszty ich stosowania, niska stabilność układów biokatalitycznych i ograniczona możliwość ich ponownego wykorzystania jasno wskazują, że należy stale rozwijać koncepcję immobilizacji enzymów i regeneracji kofaktorów.

Dlatego też w ramach monotematycznego cyklu prezentowanych artykułów podjęto się badań, których celem było wytworzenie systemów biokatalitycznych opartych o enzymy z grupy oksydoreduktaz, głównie dehydrogenazy, koimmobilizowane na nośnikach nieorganicznych i membranach filtracyjnych, pod kątem wykorzystania powstałych układów w procesach jednoczesnej konwersji składników biomasy i regeneracji kofaktora enzymatycznego. Opracowanie wspomnianych biokatalizatorów obejmowało dobór nośnika oraz selekcje najkorzystniejszych warunków prowadzenia immobilizacji, a także weryfikację efektywności tego procesu. Ponadto wytworzone układy poddano zaawansowanej charakterystyce fizykochemicznej celem oceny ich właściwości. Niemniej jednak kluczowym aspektem badań było przetestowanie otrzymanych katalizatorów w procesach biokonwersji monosacharydów z jednoczesną regeneracją dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego. Podjęto także próbę separacji finalnych produktów z mieszaniny poreakcyjnej z wykorzystaniem technik

membranowych oraz zdefiniowano zmiany aktywności enzymów w następujących po sobie cyklach reakcyjnych, co determinuje możliwe praktyczne zastosowanie proponowanych systemów. Dodatkową wartość naukową pracy stanowiło sprawdzenie skuteczności opracowanych układów w konwersji składników biomasy prowadzonej z roztworów rzeczywistych.

Podstawę przedkładanej rozprawy stanowi cykl pięciu monotematycznych artykułów naukowych, w których w dogłębny sposób przeanalizowano powyższe zależności, a zaprezentowane dane nie tylko poszerzają aktualny stan wiedzy, ale także stanowią swoiste kompendium będące podstawą do rozszerzenia zastosowania biokatalizatorów w konwersji składników biomasy. W **Publikacji 1** pt. „*Bioconversion of xylose to xylonic acid via co-immobilized dehydrogenases for conjunct cofactor regeneration*” (**Bachosz K.**, Synoradzki K., Staszak M., Pinelo M., Meyer A.S., Zdarta J., Jesionowski T., *Bioorganic Chemistry*, 93 (2019) 102747) przedstawiono badania związane z koimmobilizacją dehydrogenazy ksylozy (XDH) i dehydrogenazy alkoholowej (ADH) na materiale kompozytowym magnetyt-krzemionka pod kątem jednoczesnej konwersji ksylozy do kwasu ksylonowego i regeneracji utlenionej formy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD^+). Najkorzystniejszymi warunkami procesowymi okazały się być: stosunek XDH:ADH 2:1, temperatura 25 °C, pH 7 i czas trwania procesu 60 min. W tych warunkach możliwa była produkcja kwasu ksylonowego z wydajnością ponad 82%, a zastosowanie testowanego systemu pozwoliło na przeprowadzenie biokonwersji ksylozy z wysoką efektywnością w szerokim zakresie pH i temperatury. Możliwe było też wykorzystanie opracowanego systemu podczas 5 cykli reakcyjnych z zachowaniem ponad 60% początkowej aktywności. Dodatkowo w trakcie przechowywania przez 20 dni w 4 °C układ biokatalityczny zachował ponad 65% swoich właściwości katalitycznych.

Badania nad koimmobilizacją dehydrogenazy ksylozy i dehydrogenazy alkoholowej na materiale kompozytowym magnetyt-krzemionka były kontynuowane w ramach **Publikacji 2** pt. „*A highly effective approach to cofactor regeneration and subsequent membrane separation of bioconversion products: Kinetic parameters and effect of process conditions*” (**Bachosz K.**, Zdarta J., Marczak Ł., Błażewicz J., Jesionowski T., *Bioresource Technology Reports*, 9 (2020) 100365). Prowadzone eksperymenty koncentrowały się na określeniu wpływu kolejnych parametrów procesowych, takich jak stosowany roztwór buforowy czy obecność inhibitorów na aktywność wykorzystywanych enzymów. Podjęto również próbę oddzielenia głównego produktu,

a więc kwasu ksylonowego, z mieszaniny reakcyjnej z wykorzystaniem separacji membranowej. Ponadto określono parametry kinetyczne stosowanych biokatalizatorów i stwierdzono, że wartości stałej Michaelis-Menten i maksymalnej szybkości reakcji po unieruchomieniu są odpowiednio o ok. 20% większe i 10% niższe od wartości uzyskanych dla systemu z wolnymi białkami, co wskazuje na zmniejszenie powinowactwa enzymów do substratów. Co więcej, największą ilość pozostałej zredukowanej formy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH) odnotowano, gdy procesy były realizowane z wykorzystaniem buforu TAPSO, jak również wykazano, że kwasy organiczne (tj. kwas octowy czy kwas lewulinowy) mogą znacząco wpływać na obniżenie wydajności biokonwersji. Finalnie potwierdzono, że separacja kwasu ksylonowego z mieszaniny reakcyjnej o pH 9 była możliwa z użyciem membrany nanofiltrycyjnej, a retencja produktu wynosiła około 90%.

Obiecujące rezultaty badań w zakresie separacji produktu końcowego biokonwersji ksylozy z układu reakcyjnego przyczyniły się do opracowania koncepcji koimmobilizacji dehydrogenazy ksylozy i dehydrogenazy alkoholowej na membranie nanofiltrycyjnej XN45 i wykorzystania tego układu w enzymatycznym reaktorze membranowym, co zostało przedstawione w **Publikacji 3** pt. „*Enzymatic membrane reactor in xylose bioconversion with simultaneous cofactor regeneration*” (**Bachosz K.**, Piasecki A., Zdarta A., Kaczorek E., Pinelo M., Zdarta J., Jesionowski T., *Bioorganic Chemistry*, 123 (2022) 105781). W trakcie badań określono zmiany we właściwościach membrany po przeprowadzeniu procesu osadzenia białek, a następnie zastosowano opracowany system biokatalityczny w biokonwersji ksylozy, która w najkorzystniejszych dla enzymów warunkach (5 mM ksylozy, 5 mM formaldehydu, stosunek $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ 1:1 i 60 min reakcji) osiągnęła wydajność 99%. Ponadto potwierdzono, że koimmobilizacja enzymów pozwala na poprawę stabilności białek i możliwe było przeprowadzenie 6 cykli konwersji ksylozy z zachowaniem 90-proc. efektywności. Zaprezentowane dane jasno wskazały, że skuteczna koimmobilizacja białek i zastosowanie enzymatycznego reaktora membranowego wpływają na poprawę stabilności biokatalizatorów, umożliwiając ich wielokrotne wykorzystanie, ale także pozwalają na wytworzenie układu enzymatycznego zdolnego do skutecznej biokonwersji ksylozy, regeneracji kofaktora i jednoczesnej separacji produktu końcowego.

Oprócz zastosowania dehydrogenazy alkoholowej jako enzymu regenerującego kofaktor, w trakcie realizowanych badań podjęto się także wykorzystania dehydrogenazy 3-hydroksymaślanowej (3HBDH) do tego celu, ze względu na fakt, że poza skuteczną

regeneracją kofaktora, umożliwia ona także przekształcenie jednego z inhibitorów procesów konwersji biomasy, jakim jest kwas lewulinowy, do związku o wysokim potencjale użytkowym (kwas 4-hydroksywalerianowy). Dlatego też w **Publikacji 4** pt. „*A novel strategy for the application of levulinic acid with simultaneous NAD⁺ regeneration and membrane separation of products*” (**Bachosz K.**, Smulek W., Zdarta J., Jesionowski T., *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10 (2022) 108703) przedstawiono koncepcję koimmobilizacji dwóch układów: (i) dehydrogenazy 3-hydroksymaślanowej z dehydrogenazą ksylozy oraz (ii) dehydrogenazy 3-hydroksymaślanowej z dehydrogenazą glukozy (GDH) na membranie nanofiltracyjnej XN45 do zastosowania w biokonwersji kwasu lewulinowego oraz ksylozy lub glukozy z jednoczesną regeneracją kofaktora. Podczas badań określono zmiany we właściwościach membrany przed i po unieruchomieniu enzymów. Z kolei praktyczne zastosowanie opracowanych systemów biokatalitycznych pozwoliło na produkcję kwasu 4-hydroksywalerianowego, kwasu ksylonowego i kwasu glukonowego z wydajnościami ponad 98%. Najwyższe efektywności prowadzonych procesów uzyskano, gdy w układzie reakcyjnym znajdowały się enzymy w stosunku XDH:3HBDH (GDH:3HBDH) 1:1, jak również ilość NAD⁺ w odniesieniu do NADH wynosiła 1:1, a początkowy stosunek stężeń ksylozy (glukozy) do kwasu lewulinowego był równy 1:1. Dodatkowo koimmobilizacja białek umożliwiła przeprowadzenie dziesięciu kolejnych cykli katalitycznych i przechowywanie biokatalizatora przez 10 dni bez znaczącego spadku wydajności procesów produkcji kwasów organicznych.

Finalnym etapem badań zrealizowanych w ramach przedkładanej dysertacji było przeprowadzenie konwersji ksylozy i glukozy pochodzących z roztworu rzeczywistego po obróbce wstępnej drewna brzozy. W **Publikacji 5** pt. „*Multienzymatic conversion of monosaccharides from birch biomass after pretreatment*” (**Bachosz K.**, Zdarta J., Nghiem L.D., Jesionowski T., *Environmental Technology & Innovation*, 28 (2022) 102874) zaprezentowano koncepcję multienzymatycznego systemu biokatalitycznego, składającego się z koimmobilizowanych na mezoporowatej krzemionce SBA-15 dehydrogenazy 3-hydroksymaślanowej, dehydrogenazy ksylozy i dehydrogenazy glukozy, zdolnego do konwersji monosacharydów z jednoczesną regeneracją kofaktora. Wyniki analiz fizykochemicznych potwierdziły skuteczność osadzania enzymów na materiale nośnika z wysoką wydajnością. Co więcej, jako najkorzystniejsze warunki, w których możliwe było efektywne prowadzenie konwersji składników roztworu rzeczywistego, wyznaczono temperaturę 21 °C, pH 7, 90 min czasu trwania procesu,

400 mM dodatku kwasu lewulinowego do mieszaniny reakcyjnej oraz stosunek $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ 1:5. Uzyskane dane wskazały na wysokie, przekraczające 95%, wydajności produkcji kwasu ksylonowego, kwasu glukonowego i kwasu 4-hydroksywalerianowego. Opracowany system biokatalityczny został zastosowany podczas dziesięciu kolejnych cykli katalitycznych, a koimmobilizowane enzymy były zdolne do dalszego prowadzenia procesów z wydajnością powyżej 70%, co jednoznacznie wskazuje na znaczny potencjał aplikacyjny zaproponowanego układu.

W przedkładanej rozprawie doktorskiej zaprezentowano koncepcję opracowania różnych systemów multienzymatycznych opartych o dehydrogenazy koimmobilizowane na nośnikach nieorganicznych, w tym materiałach krzemionkowych i materiałach kompozytowych opartych na krzemionce oraz membranach nanofiltrycyjnych. W przypadku wszystkich wytworzonych układów biokatalitycznych skuteczność przeprowadzenia procesu unieruchomienia białek została potwierdzona, a wnikliwa analiza fizykochemiczna pozwoliła na zdefiniowanie zmian we właściwościach materiałów nośników przed i po osadzeniu biokatalizatorów. Zaprojektowane systemy multienzymatyczne znalazły zastosowanie w konwersji składników biomasy, zarówno monosacharydów, jak i inhibitorów, z równoczesną regeneracją kofaktora enzymatycznego NADH/NAD^+ . W trakcie prac zdefiniowano wpływ wybranych parametrów procesowych (czas, temperatura, pH, stosunek enzymów i kofaktorów, początkowa zawartość substratów) na efektywność działania analizowanych par enzymatycznych podczas prowadzonych procesów biokonwersji. Wykazano, że wytworzone systemy biokatalityczne umożliwiają katalizowanie produkcji kwasów organicznych z wysokimi wydajnościami w szerszym zakresie warunków procesowych niż ich natywne odpowiedniki. Dodatkowo potwierdzono skuteczność regeneracji kofaktora, jak również opracowano efektywną metodę separacji głównych produktów końcowych realizowanych przemian. Wykazano także, że zaproponowane systemy biokatalityczne mogą być wykorzystywane podczas kilku cykli reakcyjnych oraz zachowują wysoką stabilność w trakcie przechowywania. Analiza uzyskanych rezultatów pozwoliła także na stwierdzenie, że wytworzone układy multienzymatyczne wykazują wysoki potencjał aplikacyjny i stanowią solidny fundament dla dalszych, jeszcze bardziej zaawansowanych prac w kierunku rozwoju biokatalitycznej konwersji składników biomasy z równoczesną regeneracją kofaktora enzymatycznego.

2. Abstract

With the passage of time, natural resources are constantly depleted, which is why the practical use of biomass is gaining more and more attention. Isolation and conversion of biomass components, mainly cellulose and hemicellulose, into value-added chemical compounds with low molecular weight, enables their application in various industries or everyday life. An important role in the conversion of biomass components is played by reactions catalyzed by enzymes classified in the group of oxidoreductases, called dehydrogenases, among which the most important are glucose dehydrogenase and xylose dehydrogenase. However, the widespread use of these biocatalysts in the above-mentioned processes is limited mainly due to the need to supply cofactors to the reaction systems, which are responsible for balancing the redox reaction by transferring electrons between enzymes and substrates. The practical application of nicotinamide cofactors, including nicotinamide adenine dinucleotide, is a considerable challenge due to the relatively high price and low commercial availability, as well as fact that these compounds are exhausted during biocatalytic processes. Relatively low availability of both enzymes and cofactors, high costs of their application, limited stability of biocatalytic systems and confined possibility of their reuse clearly indicate that the concept of enzyme immobilization and cofactor regeneration should be constantly developed.

Therefore, as part of the presented monothematic cycle of the articles, research was undertaken with the aim to produce enzymatic systems based on biocatalysts from the group of oxidoreductases, mainly dehydrogenases, co-immobilized on inorganic supports and filtration membranes, in terms of the use of the obtained systems in the processes of simultaneous conversion of biomass components and enzymatic cofactor regeneration. The development of the aforementioned biocatalytic systems included the selection of the support and the selection of the most favorable immobilization conditions, as well as the verification of the efficiency of this process. In addition, the produced systems were subjected to advanced physicochemical characterization in order to assess their properties. Nevertheless, the key aspect of the research was to test the obtained catalysts in the processes of bioconversion of monosaccharides with simultaneous regeneration of nicotinamide adenine dinucleotide. An attempt was also made to separate the final products from the post-reaction mixture using membrane techniques. Moreover, changes in enzyme activity in successive reaction cycles were defined, which determines the

possible practical application of the proposed systems. An additional scientific value of the work was to check the effectiveness of the developed systems in the conversion of biomass components carried out from real biomass solutions.

The basis of the submitted dissertation is a series of five monothematic scientific articles in which the above dependencies were thoroughly analyzed and discussed, and the presented data not only extend the current state of knowledge, but also constitute a kind of compendium which contributed to extending use of biocatalysts in the conversion of biomass components. In **Publication 1** entitled "*Bioconversion of xylose to xylonic acid via co-immobilized dehydrogenases for conjunct cofactor regeneration*" (**Bachosz K.**, Synoradzki K., Staszak M., Pinelo M., Meyer A.S., Zdarta J., Jesionowski T., *Bioorganic Chemistry*, 93 (2019) 102747) research was presented related to the co-immobilization of xylose dehydrogenase (XDH) and alcohol dehydrogenase (ADH) on magnetite-silica composite material for simultaneous conversion of xylose to xylonic acid and regeneration of the oxidized form of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺). The most favorable process conditions found out to be: XDH:ADH ratio 2:1, temperature 25 °C, pH 7 and process duration 60 min. Under these conditions it was possible to produce xylonic acid with an efficiency of over 82%, and the use of the tested system allowed xylose bioconversion with high efficiency over a wide range of pH and temperature. It was also possible to apply the developed system in 5 reaction cycles while maintaining over 60% of the initial enzymatic activity. Additionally, during storage for 20 days at 4 °C, the biocatalytic system retained over 65% of its catalytic properties.

The continuation of research on the co-immobilization of xylose dehydrogenase and alcohol dehydrogenase on the magnetite-silica composite material was presented in **Publication 2** entitled "*A highly effective approach to cofactor regeneration and subsequent membrane separation of bioconversion products: Kinetic parameters and effect of process conditions*" (**Bachosz K.**, Zdarta J., Marczak Ł., Błażewicz J., Jesionowski T., *Bioresource Technology Reports*, 9 (2020) 100365). The conducted experiments focused on determining the effect of subsequent process parameters, such as the type of buffer solution used or the presence of inhibitors on the activity of the enzymes. An attempt was also made to separate the main product, which is xylonic acid, from the reaction mixture using membrane separation. In addition, the kinetic parameters of the biocatalysts were determined and it was found that the Michaelis-Menten constant and the maximum reaction rate after immobilization are, respectively, approx. 20% higher and 10% lower than the values obtained for the system with free proteins, which indicates

a decrease in the affinity of enzymes for substrates. Moreover, the highest amount of the remaining reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) was determined when the processes were carried out using TAPSO buffer, and it was also shown that organic acids (i.e. acetic acid or levulinic acid) can significantly reduce the efficiency of bioconversion. Finally, it was confirmed that the separation of xylonic acid from the reaction mixture at pH 9 was possible using a nanofiltration membrane and the retention of the product was about 90%.

Promising research results on separation of the final product of xylose bioconversion from the reaction system contributed to the development of the concept of co-immobilization of xylose dehydrogenase and alcohol dehydrogenase on the XN45 nanofiltration membrane for use of this system in the enzymatic membrane reactor, which was presented in **Publication 3** entitled "*Enzymatic membrane reactor in xylose bioconversion with simultaneous cofactor regeneration*" (**Bachosz K.**, Piasecki A., Zdarta A., Kaczorek E., Pinelo M., Zdarta J., Jesionowski T., *Bioorganic Chemistry*, 123 (2022) 105781). During the research, changes in the properties of the membrane after the protein deposition were determined and then the developed biocatalytic system was used in xylose bioconversion, which under the most favorable conditions for enzymes (5 mM xylose, 5 mM formaldehyde, ratio of NAD⁺:NADH 1:1 and 60 min of reaction) achieved an efficiency of 99%. In addition, it was confirmed that the co-immobilization of enzymes allows to improve the stability of proteins and it was possible to carry out 6 cycles of xylose conversion with 90% efficiency retention. The presented data clearly showed that the effective co-immobilization of proteins and the use of enzymatic membrane reactor can improve the stability of biocatalysts, enable their multiple use, but also facilitate the production of an enzymatic system capable of effective xylose bioconversion, cofactor regeneration and simultaneous separation of the final product.

In addition 3-hydroxybutyrate dehydrogenase (3HBDH) was undertaken in the course of the research as a regenerating enzyme (in exchange for alcohol dehydrogenase), due to the fact that, apart from the effective regeneration of the cofactor, it also enables the transformation of one of the inhibitors of biomass conversion processes, i.e. levulinic acid, into a compound with high utility potential (4-hydroxyvaleric acid). Therefore, in **Publication 4** entitled "*A novel strategy for the application of levulinic acid with simultaneous NAD⁺ regeneration and membrane separation of products*" (**Bachosz K.**, Smulek W., Zdarta J., Jesionowski T., *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10 (2022) 108703) the concept of co-immobilization of two systems:

(i) 3-hydroxybutyrate dehydrogenase with xylose dehydrogenase and
(ii) 3-hydroxybutyrate dehydrogenase with glucose dehydrogenase (GDH) on the XN45 nanofiltration membrane was presented for application in the bioconversion of levulinic acid and xylose or glucose with simultaneous regeneration of the cofactor. During the tests, changes in the properties of the membrane before and after enzyme co-immobilization were determined. Moreover, the use of the developed biocatalytic systems allowed the production of 4-hydroxyvaleric acid, xylonic acid and gluconic acid with yields of over 98%. The highest efficiency of the conducted processes was obtained when enzymes were present in the reaction system in XDH:3HBDH (GDH:3HBDH) ratio of 1:1 as well as $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ ratio was 1:1 followed by initial xylose (glucose) to levulinic acid ratio of 1:1. In addition, co-immobilization of proteins made it possible to carry out ten consecutive catalytic cycles and storage of the biocatalyst for 10 days without a significant decrease in the efficiency of the organic acid production processes.

The final stage of the research carried out as part of the submitted dissertation was the conversion of xylose and glucose from the real solution after pre-treatment of birch wood. In **Publication 5** entitled "*Multienzymatic conversion of monosaccharides from birch biomass after pretreatment*" (**Bachosz K.**, Zdarta J., Nghiem L.D., Jesionowski T., *Environmental Technology & Innovation*, 28 (2022) 102874) concept of a multienzymatic biocatalytic system consisting of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase, xylose dehydrogenase and glucose dehydrogenase co-immobilized on mesoporous silica SBA-15, capable of converting monosaccharides with simultaneous cofactor regeneration was presented. The results of physicochemical analyzes confirmed the effectiveness of deposition of enzymes on the support material with high efficiency. Moreover, the most favorable conditions for the effective conversion of the components of the real solution were the temperature of 21 °C, pH 7, 90 min of the process duration, 400 mM addition of levulinic acid to the reaction mixture and the $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ ratio of 1:5. The obtained data showed high, exceeding 95%, productivity of xylonic acid, gluconic acid and 4-hydroxyvaleric acid. The developed biocatalytic system was also used over ten consecutive catalytic cycles, and the co-immobilized enzymes were able to catalyze the processes with an efficiency of over 70%, which clearly indicates a significant application potential of the proposed system.

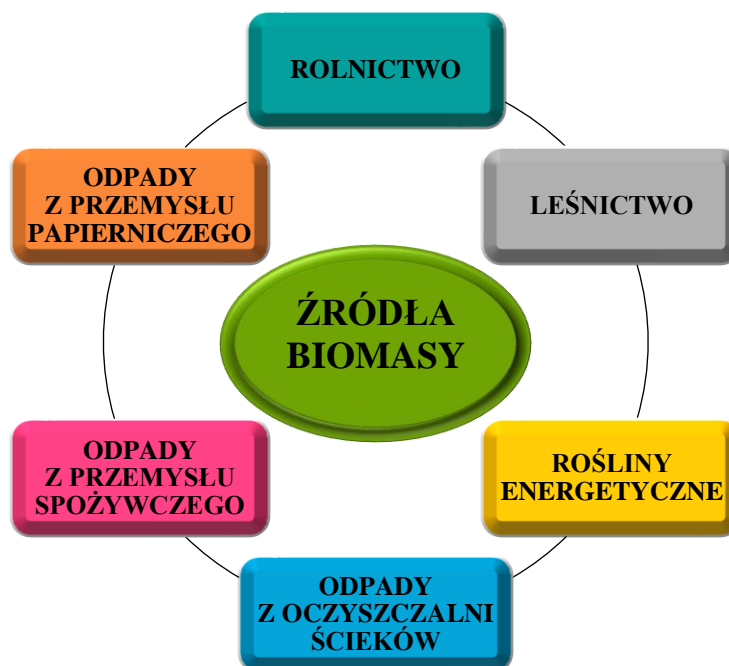
The submitted doctoral thesis presents the concept of developing of various multienzymatic systems based on dehydrogenases co-immobilized on inorganic carriers, including silica materials and composite materials based on silica, and nanofiltration

membranes. For all biocatalytic systems produced, the effectiveness of the protein co-immobilization process was confirmed, and a thorough physicochemical analysis allowed to define changes in the properties of support materials before and after biocatalyst deposition. The designed multienzymatic systems were used in the conversion of biomass components, both monosaccharides and inhibitors, with the simultaneous regeneration of enzymatic cofactor. During the study, the effect of selected process parameters (time, temperature, pH, ratio of enzymes and cofactors, initial substrate content) on the efficiency of all analyzed enzymatic pairs during the bioconversion processes was defined. It has been shown that the proposed multienzymatic systems enable production of organic acids with high yields over a wider range of process conditions than their native counterparts. In addition, the effectiveness of cofactor regeneration was confirmed, as well as an effective method of separation of the main products of the transformations was developed. It was also shown that the produced systems can be used in several reaction cycles and maintain high stability during storage. The analysis of the obtained results allowed to conclude that the proposed biocatalysts show a high application potential and constitute a strong foundation for further, more advanced works towards the development of biocatalytic conversion of biomass components with simultaneous regeneration of the enzymatic cofactor.

3. Wprowadzenie teoretyczne

3.1 Konwersja biomasy lignocelulozowej

Biomasa lignocelulozowa stanowi materiał roślinny lub odzwierzęcy, w którym przechowywana jest energia chemiczna, jak i słoneczna, a wykorzystanie tej energii pozwala na produkcję ciepła, biopaliw o wysokim potencjale energetycznym, a także szerokiej gamy powszechnie stosowanych związków chemicznych. Aktualnie biomasa jest postrzegana jako przyszłościowe i ekonomiczne źródło surowców, mogących znaleźć zastosowanie w wielu różnych gałęziach przemysłu i życia codziennego [1]. Niemniej jednak skomplikowana struktura biomasy i różnorodność składu stanowią poważną przeszkodę w jej efektywnym wykorzystaniu. Jako główne źródło biomasy lignocelulozowej należy wymienić leśnictwo, które pozwala na pozyskanie materiału celulozowego w postaci kory, gałęzi, trocin i wiórów, jak i pozostałych odpadów z obróbki drewna. Istotną rolę w dostarczaniu biomasy odgrywa także rolnictwo, które zapewnia dostęp do surowców, takich jak liście, łupiny i ziarna różnych roślin, przede wszystkim oleistych i strączkowych, jak również słomy zbożowej, bądź też umożliwia hodowanie specjalnych wysokoenergetycznych gatunków roślin, które zawierają duże ilości węglowodanów, stanowiących źródło energii [2-4].

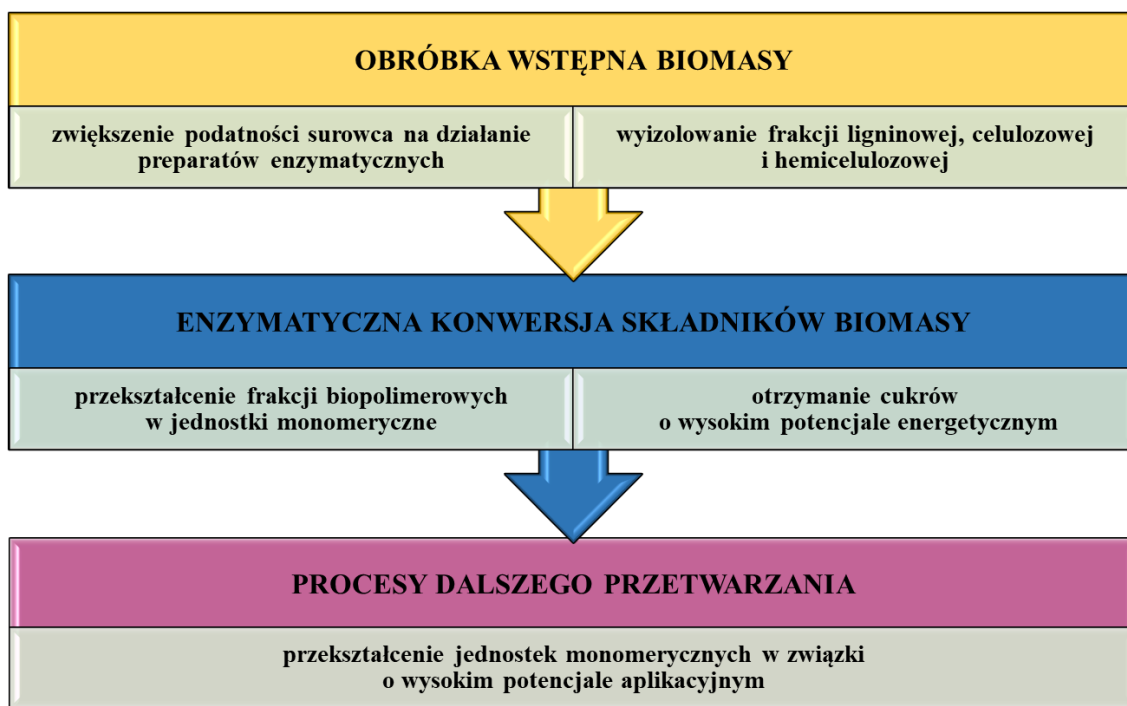


Rys. 1. Potencjalne źródła biomasy lignocelulozowej

Źródłem biomasy mogą być również odpady z przemysłu spożywczego, w postaci wytlóków, pulp lub wywarów, bądź też niejadalne części roślin usunięte w trakcie przetwarzania, jak łuski czy pestki [5]. Co więcej, jako biomasę należy także traktować materiał odzwierzęcy, który stanowią nawozy naturalne, szlamy i ściółki dla zwierząt [6,7]. Potencjalne kierunki pozyskiwania biomasy zostały przedstawione na rys. 1.

Źródło pochodzenia biomasy jest niezwykle istotne, ze względu na fakt, że wpływa ono na zróżnicowanie jej składu. Dużą różnicę zauważa się przede wszystkim w składzie biomasy pochodzącej z obróbki drewna czy roślin energetycznych, zawierającej przede wszystkim celulozę, w porównaniu do biomasy odpadowej, której głównym składnikiem jest hemiceluloza. Co ciekawe, biomasa odzwierzęca może zawierać nawet o 20% więcej hemicelulozy niż biomasa roślinna [8,9]. Pomimo złożoności i niejednorodnego charakteru składu biomasy, tworzą ją trzy główne frakcje: celulozowa (stanowiąca 40–55% składu biomasy), hemicelulozowa (stanowiąca 20–45% składu biomasy) oraz ligninowa (stanowiąca z kolei 10–25%), których uzupełnienie stanowi woda, śladowe ilości minerałów, związków nieorganicznych i białek [10]. Jak wspomniano, zawartość poszczególnych składników zależy głównie od źródła pochodzenia, ale może się ona również różnić w obrębie konkretnej grupy, z której pozyskiwana jest biomasa. Na przykład zróżnicowanie w składzie procentowym może być zauważalne przy zastosowaniu jako źródła biomasy kilku rodzajów drewna, np. miękkiego lub twardego, bądź też różnych gatunków czy części roślin [11].

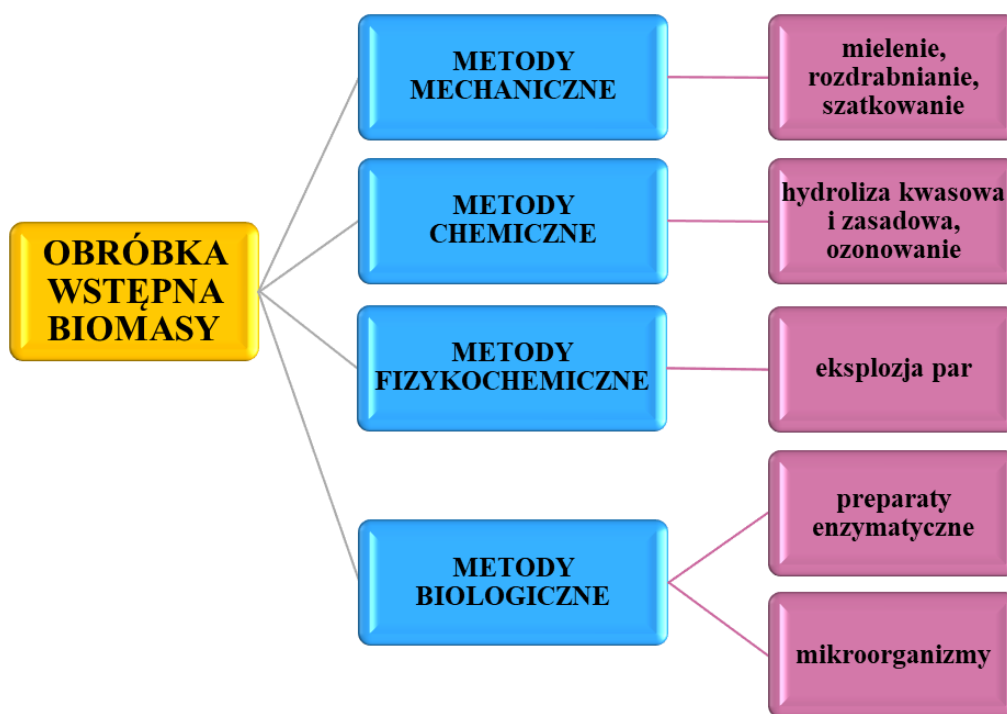
W celu wytworzenia energii biomasa lignocelulozowa może być po prostu spalana, jednak istnieje także możliwość poddania jej procesowi konwersji, w wyniku którego powstają węglowodory, biopaliwa oraz związki o wysokim potencjale użytkowym (z ang. *value-added chemicals*). Na rys. 2 schematycznie przedstawiono etapy przetwórstwa biomasy z wyróżnieniem ich podstawowych założeń procesowych i otrzymywanych produktów. Należy podkreślić, że właściwy proces przekształcania surowca lignocelulozowego musi być poprzedzony obróbką wstępną, która ma na celu zwiększenie dostępności i podatności składników biomasy na dalszą konwersję [12]. Nie istnieje jedna, uniwersalna metoda obróbki wstępnej i przygotowania surowca. W tym celu stosuje się metody mechaniczne, chemiczne, fizykochemiczne lub biologiczne, a także różne kombinacje tych technik (rys. 3) [13].



Rys. 2. Kolejność etapów przetwarzania surowca ligninocelulozowego oraz produkty generowane na każdym z etapów

Wśród metod mechanicznych należy wymienić mielenie, rozdrabnianie czy szatkowanie [8,9,13], natomiast do metod chemicznych zalicza się przede wszystkim hydrolizę kwasową i zasadową, jak również ozonowanie czy przetwarzanie z wykorzystaniem cieczy jonowych [9,12]. Wszystkie z wymienionych technik, a w szczególności hydroliza kwasowa, charakteryzują się wysoką skutecznością obróbki wstępnej, prowadzą do efektywnej eliminacji ligniny i zmniejszenia stopnia polimeryzacji celulozy oraz hemicelulozy, jak również zostały szeroko przetestowane i znajdują zastosowanie w skali przemysłowej. Niemniej jednak należy zauważyć, że podatność polisacharydów na degradację w warunkach chemicznej obróbki wstępnej może prowadzić do otrzymania produktów o niskiej jakości, których dalsze wykorzystanie nie będzie możliwe [13]. Stosowane są także metody fizykochemiczne, które łączą działanie procesów fizycznych i chemicznych, a spośród nich najważniejszą rolę odgrywa obróbka ciśnieniowa połączona z nagłym rozprężaniem par, tzw. eksplozja par (z ang. *steam explosion*) [6,8,12,13]. Niemniej jednak wszystkie te procesy wymagają zastosowania wysokiej temperatury i ciśnienia, użycia skomplikowanej aparatury lub toksycznych związków, dlatego też rosnącym zainteresowaniem cieszą się metody biologiczne, które prowadzone są w łagodnych warunkach procesowych,

z wykorzystaniem stosunkowo prostej aparatury. Do tego, procesy te zużywają niewiele energii, jak i są przyjazne środowisku.



Rys. 3. Metody obróbki wstępnej biomasy lignocelulozowej

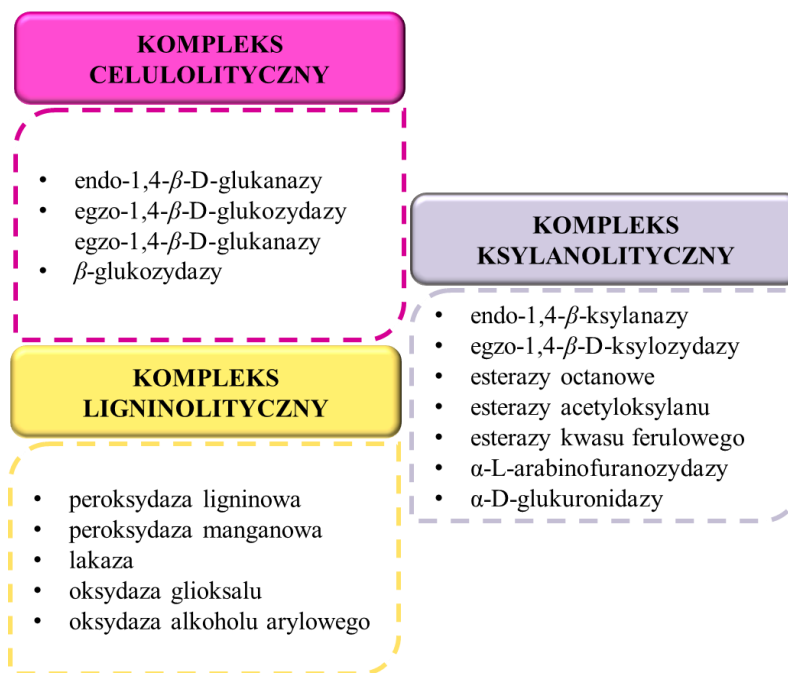
Metody biologiczne korzystają ze zdolności mikroorganizmów do rozkładu ligniny (np. grzyby *Phanerochaete chrysosporium* oraz promieniowce *Nocardia* sp.) i celulozy (np. grzyby brązowej zgnilizny), bądź też obu wspomnianych składników biomasy równocześnie (grzyby białej i czerwonej zgnilizny) w celu zmniejszenia odporności surowca lignocelulozowego na działanie enzymów hydrolitycznych, które znajdują zastosowanie w następnym etapie przetwarzania biomasy. Biologiczna obróbka wstępna może być przeprowadzona z wykorzystaniem hodowli całych mikroorganizmów lub przy użyciu enzymów wyizolowanych bezpośrednio z tych organizmów, takich jak lakazy, peroksydazy, celulazy, galaktozydazy czy amylazy [9]. Najistotniejszą rolę w tym procesie odgrywają enzymy lignolityczne, tj. lakazy, a także peroksydazy ligninowe i peroksydazy manganowe, ze względu na konieczność usunięcia ligniny, która ogranicza dostęp do pozostałych składników. Co więcej, na powierzchni tego biopolimeru może dochodzić do adsorpcji enzymów i w konsekwencji ich dezaktywacji. Ponieważ lignina nie stanowi potencjalnego źródła wartościowych produktów cukrowych czy energetycznych, biologiczna obróbka wstępna skupia się na jej jak najefektywniejszej eliminacji. Należy jednak wyraźnie podkreślić, że bez względu na zastosowaną technikę

obróbki wstępnej, każdy proces prowadzi do otrzymania rozdzielonych od siebie frakcji celulozy, hemicelulozy i ligniny, które dalej mogą być poddawane właściwej konwersji do wysoce użytecznych związków chemicznych.

Po zakończonej obróbce wstępnej i skutecznym wyizolowaniu frakcji celulozowej, hemicelulozowej i ligninowej możliwe jest przeprowadzenie konwersji uzyskanych produktów, czyli przekształcenia naturalnie występujących biopolimerów w jednostki monomeryczne, co w konsekwencji ułatwia dalsze przetwarzanie biomasy do pożądaných produktów [14]. Warto wspomnieć, że procesy konwersji mogą być prowadzone z wykorzystaniem dwóch różnych sposobów, tj. na drodze hydrolizy kwasowej lub z zastosowaniem preparatów enzymatycznych. Wybór metody warunkuje skuteczność przeprowadzonej uprzednio obróbki wstępnej, ponieważ aby zastosować konwersję enzymatyczną niezbędne jest wyeliminowanie jak największej ilości ligniny oraz dostarczenie surowca o wysokiej strawności enzymatycznej, a więc łatwo dostępnego dla biokatalizatorów, tak aby pełnia ich aktywności mogła zostać wykorzystana [15,16]. Podobnie jak w przypadku metod biologicznych w obróbce wstępnej biomasy, także na tym etapie konwersja enzymatyczna gwarantuje niskie zużycie energii poprzez prowadzenie procesów w łagodnych warunkach, jak również ograniczenie wytwarzania toksycznych produktów ubocznych. Nie występują też problemy związane z korozją aparatury [17].

Jak już wspomniano, surowce po obróbce wstępnej biomasy lignocelulozowej są mieszaniną celulozy, hemicelulozy, ligniny i innych związków, jednak nie połączonych ze sobą, które poddaje się depolimeryzacji i/lub konwersji, aby uzyskać związki o praktycznym zastosowaniu w wielu różnych dziedzinach nauki, życia codziennego i przemysłu [18]. Pomimo tego, że lignina jest głównie traktowana jako materiał odpadowy, który dodatkowo ogranicza dostęp preparatów enzymatycznych do polisacharydów i powoduje ich dezaktywację, może być dalej przetwarzana do użytecznych związków chemicznych. W tym celu stosuje się kompleks enzymów oksydacyjnych (kompleks ligninolityczny, rys. 4), w skład którego wchodzi odpowiedzialne za konwersję ligniny peroksydaza ligninowa (EC 1.11.1.14), peroksydaza manganowa (EC 1.11.1.13) i lakaza (EC 1.10.3.2) oraz uczestniczące w produkcji kofaktorów oksydaza glioksalu (EC 1.2.3.5) i oksydaza alkoholu aryłowego (EC 1.1.3.7). Obecność tych dodatkowych enzymów jest niezbędna, ponieważ bez nich niemożliwe jest wytworzenie nadtlenu wodoru, niezbędnego do prawidłowego funkcjonowania peroksydaz oraz tlenu, który umożliwia właściwe działanie lakazy

[19,20]. Wynikiem enzymatycznej konwersji ligniny może być szeroka gama związków chemicznych, wśród których należy wymienić przede wszystkim wanilinę, syringaldehyd, aldehyd koniferylowy, kwas wanilinowy oraz inne kwasy alifatyczne, aromatyczne i fenole [21].



Rys. 4. Kompleksy enzymatyczne stosowane w konwersji składników biomasy

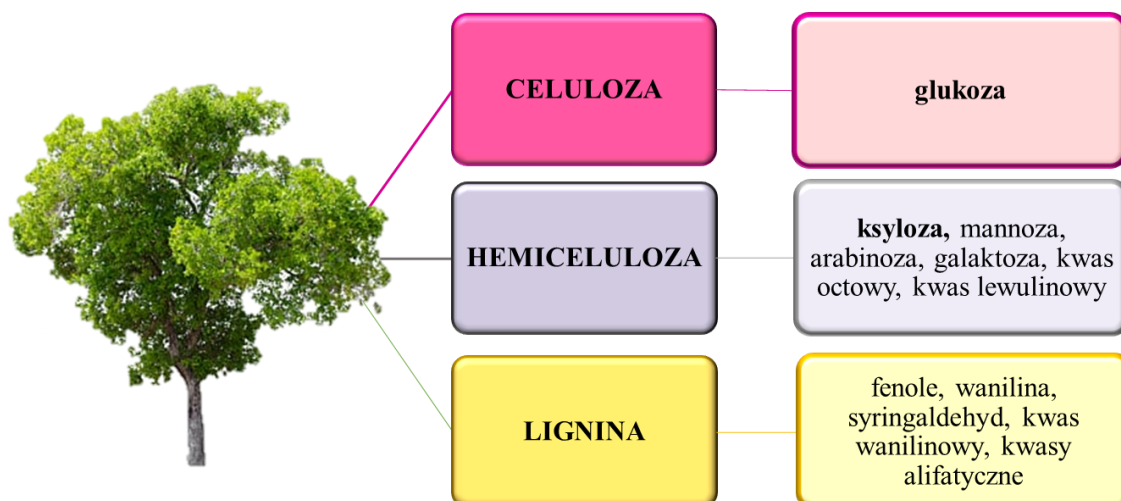
Niemniej jednak składnikami biomasy, które stanowią cenne i główne źródło związków o wysokim potencjale aplikacyjnym są celuloza i hemiceluloza. Ze względu na ich zróżnicowaną i skomplikowaną strukturę, do prawidłowego przeprowadzenia konwersji niezbędne jest zastosowanie kilku synergicznie działających enzymów wchodzących w skład kompleksów celulolitycznych i ksylanolitycznych (rys. 4), co przekłada się na generowanie około 25–30% całkowitych kosztów prowadzonych procesów [6]. Celuloza jest konwertowana przez celulazy, czyli kompleks enzymatycznych należący do klasy hydrolaz – enzymów, które rozkładają wiązania chemiczne przy udziale cząsteczki wody, a w jego skład wchodzi endo-1,4- β -D-glukanazy (EC 3.2.1.4), egzo-1,4- β -D-glukozydazy (EC 3.2.1.74), egzo-1,4- β -D-glukanazy (EC 3.2.1.91) oraz β -glukozydazy (EC 3.2.1.21). Mechanizm działania każdego ze wspomnianych enzymów jest odmienny i zależy od miejsca, w którym rozkładane są wiązania β -1,4-glikozydowe. Endo-1,4- β -D-glukanazy odpowiadają za hydrolizę wiązań w środku łańcucha celulozowego oraz w amorficznych obszarach polisacharydu. Skutkiem ich działania jest powstawanie oligosacharydów (celodekstryn)

[32,33]. Egzo-1,4- β -D-glukanazy hydrolizują łańcuch celulozy od nieredukującego końca i uwalniają cząsteczki disacharydu (dimery glukozy). Tę samą funkcję pełni egzo-1,4- β -D-glukozydazy, jednak ich rolą jest działanie od redukującego końca łańcucha. Warto także dodać, że te enzymy są zdolne do konwersji krystalicznych obszarów celulozy. Dodatkowo niezbędny jest udział β -glukozydaz, które są odpowiedzialne za przekształcenie cząsteczek disacharydu w produkt końcowy konwersji, czyli glukozę [22,23].

Znacznie bardziej skomplikowane jest przeprowadzenie enzymatycznej konwersji hemicelulozy, ze względu na to, że składa się ona z wielu różnych polisacharydów, takich jak ksylany, mannany, glukany, arabinoksylany czy galaktomannany. Najczęściej stosowanymi do konwersji hemicelulozy kompleksami enzymatycznymi są białka ksylanolityczne i mannolityczne, co wynika z faktu, że ksylany i mannany stanowią odpowiednio, od 15 do 30% i 5% wszystkich hemicelulaz tworzących biomasę [24]. W skład podstawowego kompleksu ksylanolitycznego wchodzi co najmniej siedem hydrolaz, w tym endo-1,4- β -ksylanazy (EC 3.2.1.8), egzo- β -1,4-D-ksylozydazy (EC 3.2.1.37), esterazy octanowe (EC 3.1.1.6), esterazy acetyloksylanu (EC 3.1.1.72), esterazy kwasu ferulowego (EC 3.1.1.73), α -L-arabinofuranozydazy (EC 3.2.1.55) oraz α -D-glukuronidazy (EC 3.2.1). Podobnie jak w przypadku kompleksu celulolitycznego, każdy enzym pełni inną funkcję. Endo-1,4- β -ksylanazy, które działają na wewnętrzne, liniowe wiązania β -1,4-glikozydowe i egzo- β -1,4-D-ksylozydazy, odpowiadające za degradację od nieredukującego końca łańcucha polisacharydowego, odgrywają ważną rolę, ponieważ przekształcają ksylan do ksylooligosacharydów, ksylobiozy (dimeru ksylozy) i ksylozy. Istotna jest także obecność esteraz acetyloksylanu, α -L-arabinofuranozydazy i α -D-glukuronidazy, ze względu na to, że biorą one udział w rozrywaniu bocznych łańcuchów, które ograniczają efektywne przeprowadzenie biokonwersji na dalszych etapach [25]. W wyniku działania tych enzymów powstają odpowiednio arabinoza, kwas D-glukuronowy i kwas 4-O-metylo- α -D-glukuronowy. Niezbędne są także pozostałe esterazy, które eliminując grupy acetylowe z łańcuchów ksylanu, prowadzą do powstania kwasu octowego lub kwasów aromatycznych [25,26].

Powstająca z celulozy glukoza, uzyskane z przekształcenia hemiceluloz ksyloza, arabinoza i mannoza, czy wanilina, kwas octowy oraz fenole i pochodne furanu, które stanowią wynik depolimeryzacji ligniny to tylko niektóre z potencjalnych produktów enzymatycznej konwersji składników biomasy do związków o niższej masie cząsteczkowej i wysokiej użyteczności (rys. 5) [27,28]. Należy zauważyć, że wśród

wyżej wymienionych związków większość nadaje się do bezpośredniego szerokiego stosowania w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, chemicznym i biotechnologicznym [29,30]. Co więcej, związki te mogą ulegać dalszym przemianom, w szczególności glukoza i ksyloza, które stanowią największą zawartość procentową roztworów po konwersji biomasy i są platformą do otrzymywania szerokiej gamy substancji.



Rys. 5. Główne produkty enzymatycznej konwersji składników biomasy

Jedną z najczęstszych aplikacji glukozy jest szlak Embdena-Meyerhofa-Parnasa, tj. glikoliza, na którą składa się szereg reakcji biochemicznych, w wyniku których powstaje kwas pirogronowy [31]. Powstające cząsteczki kwasu pirogronowego mogą być dalej konwertowane na drodze fermentacji do etanolu, ditlenku węgla, acetonu, butanolu, izopropanolu, a także kwasu octowego, mrówkowego, masłowego czy mlekowego [32-34]. Można zatem stwierdzić, że potencjał przetwarzania glukozy z wykorzystaniem preparatów enzymatycznych jest ogromny, ze względu na to, że umożliwia uzyskanie różnorodnych związków chemicznych, od alkoholi, kwasów, aldehydów czy ketonów po ditlenek węgla czy wodór.

Interesującym związkiem powstającym w wyniku konwersji glukozy jest także kwas glukonowy, który znajduje zastosowanie głównie w przemyśle spożywczym jako regulator kwasowości oraz w medycynie w leczeniu alergii. Co więcej, jego sole mogą być skutecznie wykorzystywane do uzupełnienia niedoborów wapnia, żelaza, cynku, potasu i sodu [35,36]. Warto zauważyć, że kwas glukonowy jest otrzymywany z glukozy na drodze katalizy enzymatycznej przy użyciu dehydrogenazy glukozowej (GDH; EC 1.1.1.47). Wang i in. [37] pozyskali zdolną do przeprowadzenia konwersji

glukozy GDH z *Pseudomonas plecoglossicida* o aktywności 16,85 U/mg. Należy również zauważyć, że enzym wykazał 100-proc. aktywność w pH 6 i 35 °C, a dodatkowo wprowadzenie do układu reakcyjnego jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} pozytywnie wpływało na właściwości katalityczne enzymu, ponieważ jego aktywność wzrosła o 20%. Dla porównania Karagoz i in. [38] przeprowadzili konwersję glukozy z wykorzystaniem dehydrogenazy glukozowej wyekstrahowanej z *Sulfolobus solfataricus*. 100-proc. efektywność konwersji glukozy uzyskano dla mieszaniny reakcyjnej o pH 8 i w temperaturze 50 °C. Można zatem wywnioskować, że niezwykle istotny wpływ na aktywność GDH ma źródło jej pochodzenia, które warunkuje nie tylko optymalne warunki pracy enzymu, ale także wydajność katalizowanego procesu.

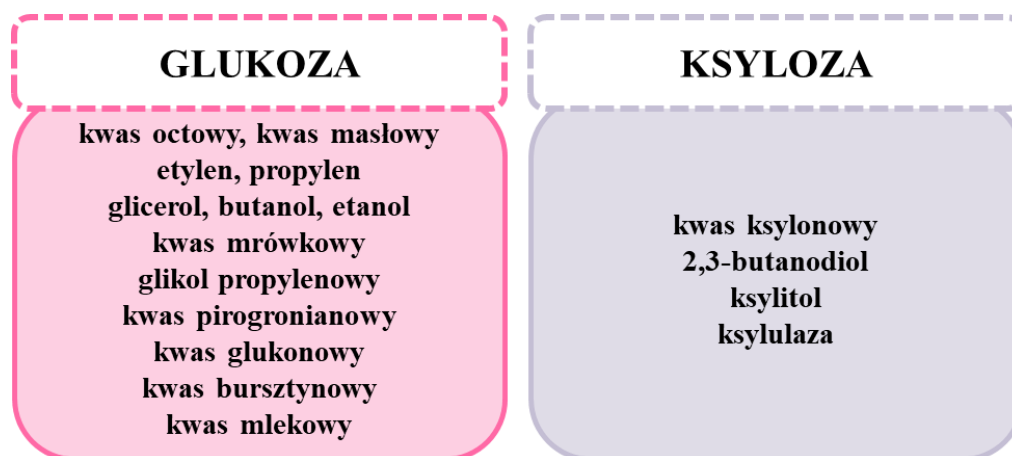
Niezwykle wartościowym produktem konwersji składników biomasy jest także ksyliza, która może być enzymatycznie przekształcana w ksylitol, czyli związek o dużym potencjale aplikacyjnym w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym. Ta pochodna ksylizy jest używana jako zamiennik sacharozy, środek zmniejszający ryzyko próchnicy czy w trakcie leczenia otyłości, cukrzycy lub infekcji dróg oddechowych. Biokatalityczna synteza ksylitolu odbywa się z wykorzystaniem reduktazy ksylizy (XR; EC 1.1.1.21) [39,40]. Zhang i in. [41] pozyskali XR z *Thermomyces lanuginosus*, która charakteryzuje się najwyższą aktywnością, wynoszącą 75 U/mg, w pH 6,5 i temperaturze 50 °C. Co więcej, enzym wykazał relatywnie wysoką aktywność w szerokim zakresie testowanych warunków procesowych, tj. w pH od 4 do 9 i temperaturze od 30 do 70 °C. Pozyskana XR w optymalnych warunkach odznacza się także okresem półtrwania wynoszącym 1386 min. Niemniej jednak wykazano inhibujący wpływ jonów Cu^{2+} , Fe^{2+} oraz Zn^{2+} na właściwości katalityczne białka. Finalnie z wykorzystaniem pozyskanego enzymu uzyskano ksylitol o stężeniu 4,4 g/L. Warto również wspomnieć, że Yang i in. [42] wykorzystali możliwości inżynierii genetycznej i z użyciem genów reduktazy ksylizy zaprojektowali *Saccharomyces cerevisiae*, powszechnie stosowane w przemyśle drożdże, tak aby były zdolne do równoczesnej produkcji ksylitolu i etanolu. Przeprowadzenie procesu konwersji roztworu powstałego po obróbce wstępnej kukurydzy z opracowanymi drożdżami pozwoliło na otrzymanie 0,66 g/L·h ksylitolu, podczas gdy w trakcie kontrolnej reakcji z udziałem reduktazy ksylizy z *Candida tropicalis* uzyskano 0,83 g/L·h ksylitolu. Należy jednak pamiętać, że w procesie z udziałem *Saccharomyces cerevisiae* zachodziła również równoczesna fermentacja, w wyniku której powstawał etanol, którego ostatecznie uzyskano 50,19 g/L, a jego obecność miała wpływ na kinetykę

prowadzonych procesów i preferowanie powstawania jednego z produktów, a w konsekwencji niższą wydajność produkcji ksylitolu.

Spośród możliwych produktów konwersji ksylozy warto wspomnieć także o kwasie ksylonowym, który jest wymieniany wśród 30 najcenniejszych związków chemicznych, które mogą zostać otrzymane w rezultacie przekształcenia składników biomasy lignocelulozowej [43]. Potencjał tej pochodnej ksylozy jest wykorzystywany w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym, jak również w rolnictwie. Kwas ksylonowy znajduje zastosowanie jako prekursor w syntezie D-1,2,4-butanotriolu, bądź też jako biopestycyd oraz środek dyspergujący cement, aby możliwe było zmniejszenie ilości wody w betonie [44,45]. Co więcej, może on także być stosowany w celu zwiększenia wchłaniałości witaminy C lub w systemach dostarczania leków, jak i jako środek wspomagający wybielanie tekstyliów czy płyn do czyszczenia szyb [46-48]. Należy zauważyć, że komercyjna produkcja kwasu ksylonowego sprawia trudności, dlatego jego otrzymywanie ciągle jest ograniczone.

Najczęściej wykorzystywaną metodą syntezy tego kwasu jest konwersja ksylozy do ksylono- γ -laktonu, który następnie ulega spontanicznej hydrolizie do kwasu ksylonowego. Cały proces przebiega z zastosowaniem dehydrogenazy ksylozy (XDH; EC 1.1.1.175) jako biokatalizatora. Wydajność wspomnianej syntezy w znacznym stopniu zależy jednak od pochodzenia wykorzystywanego enzymu. Stosowanie białek pochodzenia bakteryjnego (np. *Pseudomonas fragis* lub *Gluconobacter oxydans*) wymaga uważnej kontroli pH środowiska reakcyjnego, ponieważ są one wrażliwe na kwaśne warunki procesowe [49,50]. Zdecydowanie mniejsze wymagania i relatywnie większą odporność na inaktywację wykazują enzymy pozyskiwane z grzybów (np. *Trichoderma viridea* lub *Pichia querquum*) [51]. Sanchez-Moreno i in. [52] przeprowadzili konwersję ksylozy do kwasu ksylonowego z wykorzystaniem XDH pochodzącej z Gram-ujemnej bakterii *Calulobacter crescentus* i w rezultacie procesu realizowanego przez 2 h (pH 8, 25 °C) z 0,22 mM ksylozy uzyskano produkt z wydajnością ok. 95%. Dla porównania Ramos i in. [53] przeprowadzili ten sam proces w warunkach optymalnych dla XDH pozyskanej z grzyba *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). Enzym był zdolny do produkcji 37,1 g/L kwasu ksylonowego, co przełożyło się na efektywność równą 0,96 g produktu na 1 g użytej ksylozy. Można zatem stwierdzić, że niezależnie od źródła pochodzenia białka, zapewnienie optymalnych warunków procesowych do uzyskania przez nie pełni aktywności katalitycznych pozwala na przeprowadzenie procesów konwersji ksylozy z wysoką efektywnością i pozyskanie satysfakcjonujących ilości

kwasy ksylonowe. Biorąc pod uwagę przedstawione dane należy zauważyć, że zarówno glukoza, jak i ksyloza, stanowią niezwykle szeroką i atrakcyjną platformę do dalszego przetwarzania z wykorzystaniem enzymów, którego skutkiem jest możliwość pozyskania szeregu produktów o wysokim potencjale aplikacyjnym (rys. 6).



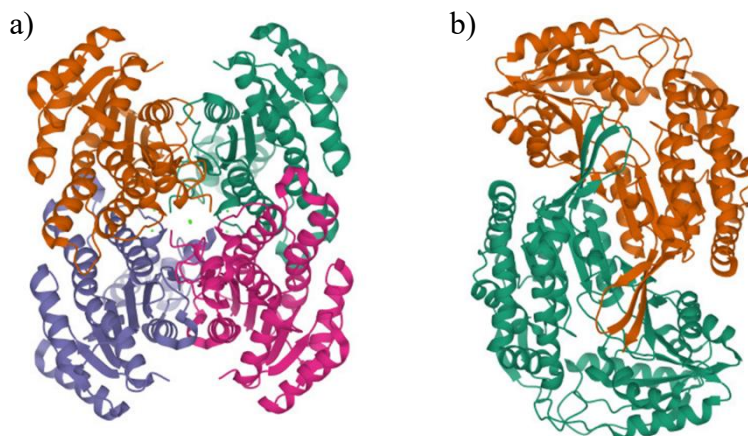
Rys. 6. Wybrane produkty biokonwersji glukozy i ksylozy do związków o wysokiej użyteczności

Jednym z czynników, które wpływają na ograniczenie aktywności preparatów stosowanych w trakcie enzymatycznej konwersji składników biomasy jest powstawanie w trakcie obróbki wstępnej tzw. inhibitorów, a więc związków chemicznych, które mogą zaburzać przebieg procesu i destabilizować białka. Wyróżnić można trzy grupy inhibitorów, które mają znaczenie w zaburzaniu procesów konwersji enzymatycznej i są to związki fenolowe, słabe kwasy alifatyczne (kwas octowy, mrówkowy, lewulinowy) oraz pochodne furanu (furfural, 5-hydroksymetylofurfural). Działanie tych związków ma negatywny wpływ na zmiany w strukturze błony komórkowej mikroorganizmów oraz degradację i inaktywację enzymów biorących udział w procesach konwersji [54]. Dlatego też usuwanie inhibitorów z mieszanin reakcyjnych po obróbce wstępnej jest powszechne, a najczęściej w tym celu wykorzystywane są: adsorpcja np. na węglu aktywnym, rozcieńczanie, wytrącanie lub ekstrakcja tych związków [55-57]. Alternatywę stanowią także metody biologiczne, które opierają się na wykorzystaniu technik inżynierii genetycznej do projektowania mikroorganizmów odpornych na hamujące działanie inhibitorów. Jednak wszystkie te metody są kosztowne, wymagają użycia toksycznych chemikaliów i generują dużą ilość odpadów, które muszą być następnie utylizowane [58].

Jednym z najczęściej występujących inhibitorów jest kwas lewulinowy, który powstaje z heksoz, będących składnikiem budulcowym hemicelulozy. Znajduje on szerokie zastosowanie w przemyśle jako surowiec w syntezie polimerów, inicjator reakcji

polimeryzacji czy prekursor w produkcji farmaceutyków. Co więcej, jego pochodne mogą być stosowane jako elektrolity akumulatorowe, dodatki do paliw, plastyfikatory, a nawet herbicydy [59]. W wyniku przetwarzania kwasu lewulinowego otrzymywany jest kwas 4-hydroksywalerianowy, który jest obiecującym dodatkiem poprawiającym biodegradowalność polimerów, a także stanowi ważny półprodukt w produkcji paliw [60]. Warto zauważyć, że synteza kwasu 4-hydroksywalerianowego jest stosunkowo prosta i polega na uwodornieniu kwasu lewulinowego. Niemniej jednak proces ten wymaga obecności drogich związków metali przejściowych, głównie rutenu, pełniących funkcję katalizatora [61-64]. Ponadto synteza ta wymaga stosowania wysokiej temperatury i rozpuszczalników organicznych, co prowadzi do negatywnego wpływu na środowisko, podczas gdy wydajności tego procesu są stosunkowo niskie.

Alternatywnym rozwiązaniem wydaje się zastosowanie enzymów, które mogą zapewnić wysoką specyficzność substratową i wyeliminować konieczność stosowania nieekologicznych często bardzo drogich odczynników. Biokatalizatorami, które umożliwiają efektywną konwersję kwasu lewulinowego do kwasu 4-hydroksywalerianowego są dehydrogenaza 3-hydroksymaślanowa (3HBDH; EC 1.1.1.30) oraz dehydrogenaza semialdehydu bursztynianowego (SSADH; EC 1.2.1.24), których struktury zostały przedstawione na rys. 7 [65,66].



Rys. 7. Struktury 3D: a) dehydrogenazy 3-hydroksymaślanowej oraz b) dehydrogenazy semialdehydu bursztynianowego

Yeon i in. [67] zaprojektowali sześć różnych mutacji SSADH o wysokiej specyficzności substratowej w celu przeprowadzenia konwersji kwasu lewulinowego do kwasu 4-hydroksywalerianowego. Cztery z sześciu testowanych enzymów wykazały zadowalające właściwości katalityczne, podczas gdy jedna z mutacji pozwoliła na

przeprowadzenie konwersji z wydajnością 7-krotnie większą niż w przypadku białek pochodzących z dzikiego szczepu. Można zatem stwierdzić, że SSADH o specjalnie zaprojektowanych właściwościach mogą stanowić alternatywę dla zdecydowanie częściej wykorzystywanej dehydrogenazy 3-hydroksymaślanowej.

Należy jednak zauważyć, że pomimo większej popularności stosowania 3HBDH, po raz pierwszy wspomniany enzym został zastosowany do konwersji kwasu lewulinowego z roztworu rzeczywistego po obróbce biomasy pochodzącej z odpadów rolniczych, dopiero w pracy opublikowanej w 2021 przez Moon i in. [68]. W badaniach tych, w pierwszej kolejności otrzymano kwas lewulinowy o stężeniu około 25 mM z odpadów ze słomy ryżowej i kolb kukurydzy, a następnie przeprowadzono jego konwersję z użyciem 3HBDH pozyskanej z *Alcaligenes faecalis*. W konsekwencji, po 10 h procesu otrzymano 11,32 mM kwasu 4-hydroksywalerianowego, co oznacza, że efektywność prowadzonej reakcji nie przekroczyła 50%. Niemniej jednak warto zauważyć, że w trakcie produkcji substratu z biomasy pozyskano również mrówczany, które cały czas były obecne w mieszaninie reakcyjnej, co miało negatywny wpływ na aktywność enzymu i przebiegającą reakcję biokatalityczną. Relatywnie niska wydajność nie przeszkadza jednak w stwierdzeniu, że pozyskanie kwasu 4-hydroksywalerianowego z biomasy jest możliwe i wydaje się, że po przeprowadzeniu kolejnych testów istnieje możliwość poprawy skuteczności zaproponowanego systemu enzymatycznego. Na podstawie zaprezentowanych przykładów badań można zatem wywnioskować, że ciekawą alternatywą zneutralizowania negatywnego wpływu inhibitorów na preparaty enzymatyczne może być przekształcanie ich w związki chemiczne o wysokim potencjale aplikacyjnym. Takie rozwiązanie umożliwi nie tylko ograniczenie inhibującego działania na funkcjonowanie białek obecnych w układzie, ale też minimalizuje koszty wynikające z konieczności ich usunięcia z mieszaniny reakcyjnej.

Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy można jednoznacznie stwierdzić, że biomasa jest łatwo dostępnym surowcem, który z powodzeniem można poddać obróbce wstępnej oraz enzymatycznej konwersji w łagodnych warunkach procesowych. W konsekwencji prowadzi to do otrzymania szerokiej gamy produktów o znacznym potencjale użytkowym z wysoką wydajnością i zgodnie z zasadami zielonej chemii. Wydaje się, że biomasa lignocelulozowa może stanowić nieskończone źródło glukozy, ksylozy i innych cukrów, które są cenne pod względem energetycznym, jak również mogą być dalej przetwarzane do wartościowych związków chemicznych. Interesujące wydaje się także poddanie procesowi konwersji inhibitorów powstających w trakcie przetwarzania biomasy, które

również mogą stanowić platformę do otrzymania wysoce użytecznych produktów. Należy podkreślić, że zastosowanie enzymów na każdym etapie przetwarzania biomasy lignocelulozowej jest nie tylko już stosowanym, ale także ciągle perspektywnym rozwiązaniem. Należy jednak pamiętać, że utrata właściwości katalitycznych przez jedno z białek może skutkować obniżeniem efektywności całego procesu, ze względu na konieczności synergicznego działania całego kompleksu enzymatycznego. Dlatego też wydaje się niezbędnym, aby podejmować dalsze prace nad opracowywaniem rozwiązań, które umożliwią zachowanie pełni aktywności katalitycznej enzymów i przetwarzanie biomasy z wysoką efektywnością.

3.2 Immobilizacja enzymów – aktualne trendy i kierunki zastosowań

Zastosowanie enzymów w różnych obszarach przemysłu, w tym w konwersji biomasy lignocelulozowej, wydaje się interesującym i obiecującym rozwiązaniem. Biokatalizatory są aktywne w różnych warunkach procesowych, w zależności od charakterystyki danego białka, jednak reakcje z ich udziałem mogą być prowadzone w środowisku wodnym z wysoką specyficznością, co znacząco ogranicza powstawanie produktów ubocznych i minimalizuje konieczność oczyszczania produktów końcowych [69,70]. Dodatkowo rezultaty badań nad reakcjami enzymatycznymi pozwalają na stwierdzenie, że w porównaniu do tradycyjnej katalizy chemicznej, biokatalizatory cechują się wysoką chemo-, regio- i enancjoselektywnością, jak również nie wymagają stosowania toksycznych i lotnych rozpuszczalników, co wskazuje na zgodność wspomnianych procesów z szeroko rozumianymi zasadami zielonej chemii i zrównoważonego rozwoju [71,72]. Niemniej jednak należy podkreślić, że enzymy charakteryzują się niską stabilnością, szczególnie w warunkach temperatury i pH innych niż optymalne dla danego białka. Co więcej, istotnym ograniczeniem w powszechnym stosowaniu biokatalizatorów jest ich stosunkowo skomplikowany i kosztowny recykling, a w konsekwencji ograniczona możliwość ponownego wykorzystania. Ponadto komercyjna dostępność enzymów jest relatywnie niska, podczas gdy koszty ich uzyskania są wysokie i często wpływają na rezygnację z zastosowania tego typu katalizatorów. Dlatego też wypracowano kilka rozwiązań, które niwelują negatywny wpływ wspomnianych ograniczeń stosowania biokatalizatorów, a wśród nich jednym z najczęściej wykorzystywanych jest immobilizacja enzymów [73].

Immobilizację enzymów definiuje się jako zwiążanie białka z odpowiednio wyselekcjonowanym materiałem nośnika, co w konsekwencji uniemożliwia swobodne

poruszanie się enzymu w mieszaninie reakcyjnej. Unieruchomione białko przyjmuje zatem postać katalizatora heterogenicznego, co znacząco ułatwia jego odzysk i możliwość ponownego wykorzystania w kolejnych cyklach reakcyjnych [74]. Dodatkową zaletą procesu immobilizacji jest jej korzystny wpływ na stabilizację struktury białka, a w konsekwencji na zwiększenie odporności enzymu na inaktywację czy denaturację w trakcie katalizowania procesu w szerokim zakresie temperatury i pH, jak również w obecności substancji inhibujących. Co więcej, unieruchomienie białek często pozwala na zwiększenie efektywności otrzymywania oczekiwanych produktów, w porównaniu do ich natywnych odpowiedników. Warto również podkreślić, że immobilizacja enzymów umożliwia wydłużenie czasu przechowywania unieruchomionych enzymów, ze względu na fakt, że biokatalizatory te relatywnie wolniej ulegają utracie aktywności. Należy również zauważyć, że wprowadzenie opisywanego rozwiązania pozwala na realizację procesów ciągłych i zastosowanie biokatalizatorów w skali większej niż laboratoryjna. Ten fakt jest niezwykle istotny z aplikacyjnego punktu widzenia, ze względu na możliwość stałego dostarczania substratów i odprowadzania produktów reakcji, co w konsekwencji zwiększa wydajność reakcji.

Tabela 1. Zalety i wady procesu immobilizacji enzymów

IMMOBILIZACJA ENZYMÓW	
ZALETY	WADY
stabilizacja struktury biokatalizatora	wymywanie enzymu z nośnika
relatywnie łatwa separacja systemu enzymatycznego i możliwość wielokrotnego użycia	spadek aktywności biokatalizatora
poprawa stabilności termicznej, chemicznej i mechanicznej	potencjalne zmiany strukturalne białka
możliwość prowadzenia procesów ciągłych	ograniczona dyfuzja substratów i produktów
obniżenie kosztów procesów enzymatycznych	straty enzymów w trakcie prowadzenia procesu immobilizacji

Należy jednak zauważyć, że immobilizacja enzymów może spowodować zmiany w strukturze białka i ograniczyć jego właściwości katalityczne poprzez wytworzenie zawady przestrzennej czy też zwiększenie oporów dyfuzyjnych podczas kontaktu między substratem a miejscem aktywnym białka [75,76]. Sumarycznie zestawienie zalet i wad procesu immobilizacji enzymów zostało przedstawione w tabeli 1.

3.2.1 Selekcja nośnika a efektywność immobilizacji enzymów

Kluczowym etapem przeprowadzenia skutecznej immobilizacji enzymów jest dobór odpowiedniego nośnika, jak również bezpośrednio z tym związana selekcja metody unieruchomienia [77]. Należy podkreślić, że niezależnie od metody osadzania białek na nośniku, istnieje szeroka gama materiałów, które mogą być w tym celu stosowane. Podczas wyboru nośnika należy zwrócić uwagę na kilka cech, wśród których powinno się wyróżnić obecność i rodzaj grup funkcyjnych na jego powierzchni, właściwości struktury porowatej, stabilność termiczną i chemiczną oraz komercyjną dostępność (rys. 8). Materiał nośnika powinien charakteryzować się także wysoką odpornością mechaniczną, która jest niezbędna do zachowania stabilności układu enzymatycznego [78]. Dodatkowo rozwój i postęp w tworzeniu innowacyjnych nośników o nowych lub polepszonych właściwościach odgrywa istotną rolę, ze względu na konieczność odpowiedniej koordynacji matrycy ze strukturą enzymu i wykazaniem zdolności do stabilnego związania białka. Dlatego też ważne jest, aby materiał nośnika był podatny na modyfikacje, które mogą umożliwić jego stosowanie z wykorzystaniem różnych technik immobilizacji oraz zapewnić stabilne związanie enzymu [79,80]. Dodatkowo niezbędna jest wspomniana już wcześniej obecność grup funkcyjnych, tj. grupy hydroksylowe czy aminowe, które wykazują wysoką reaktywność wobec biomolekuł, co pozwala na ich stabilne związanie i zapobiega wmywaniu enzymu w trakcie prowadzonych procesów [81]. Co więcej, na wybór nośnika wpływa także jego nierozpuszczalność w medium reakcyjnym oraz charakter powierzchni właściwej i wielkość jego porów [82]. Doskonałym przykładem są nieorganiczne nanocząstki, które zapewniają znaczną powierzchnię właściwą dostępną do unieruchomienia białek, co przekłada się na wzrost skuteczności osadzenia enzymów na materiale. Natomiast duża objętość ich porów pozwala również na immobilizację wewnątrz porów materiału [83]. Znaczący wpływ ma także wielkość porów, która może ukierunkować miejsce związania białka. Zastosowanie materiału o porach mniejszych lub równych wielkości cząsteczki enzymu skutkuje jego unieruchomieniem na zewnętrznej powierzchni materiału, co następnie wpływa na szybsze wmywanie białka i jego niższą ochronę niż w przypadku osadzenia wewnątrz porów. Natomiast w przypadku zastosowanie nośnika o porach większych od cząsteczki białka możliwe jest osadzenie, zarówno we wnętrzu, jak i na powierzchni materiału, co skutkuje skuteczniejszą ochroną biokatalizatora [84].



Rys. 8. Właściwości materiałów stosowanych jako nośniki w procesie immobilizacji enzymów

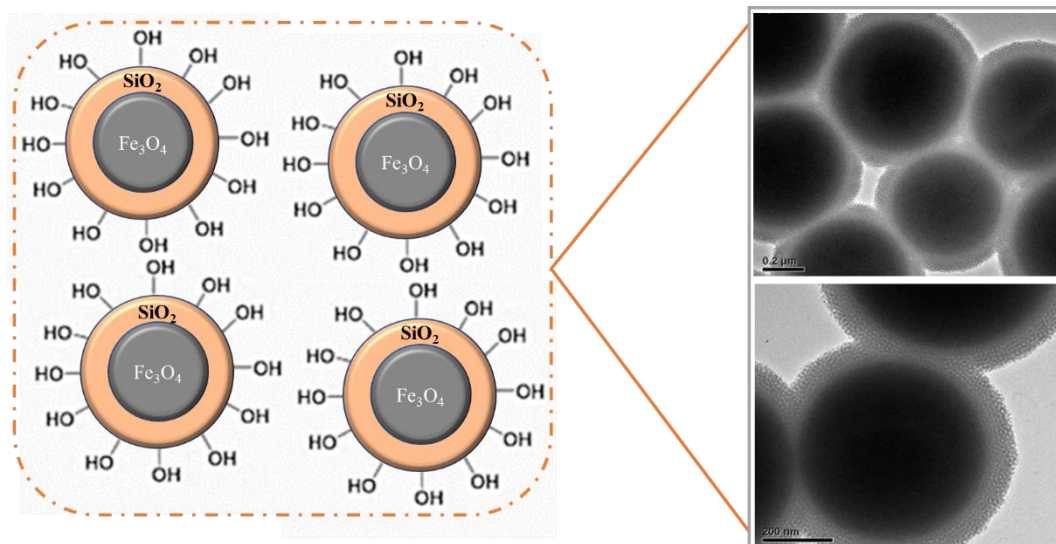
Większość z wyżej wymienionych wymagań stawianych nośnikom w immobilizacji enzymów spełniają materiały krzemionkowe. Najistotniejszą zaletą ich stosowania jest zróżnicowanie, które wynika z mnogości form występowania lub też możliwości zsyntezowania wielu rodzajów krzemionki o zdefiniowanych, pożądanych właściwościach i charakterystyce. Podstawowy podział materiałów krzemionkowych wynika z różnicy w uporządkowaniu ich struktury, w konsekwencji czego można wyróżnić dwie grupy: krzemionki krystaliczne i amorficzne. Co więcej, należy podkreślić, że różnorodność materiałów krzemionkowych wynika także z ich cech fizykochemicznych, morfologicznych i dyspersyjno-strukturalnych, wśród których najważniejsze to kształt i wielkość cząstek, powierzchnia właściwa, rozkład porów i charakter hydrofilowo-hydrofobowy. Niemniej jednak wszystkie wspomniane materiały posiadają na powierzchni grupy hydroksylowe, co wskazuje na możliwość ich stosowania zarówno w immobilizacji adsorpcyjnej, jak również w unieruchomieniu z wykorzystaniem wiązań kowalencyjnych. Dodatkowo krzemionka charakteryzuje się dobrze rozwiniętą powierzchnią właściwą i strukturą porowatą, co przekłada się na

wysoką zdolność sorpcyjną oraz znaczne powinowactwo do osadzenia enzymu na jej powierzchni i/lub wewnątrz porów. Co ważne, właściwości strukturalne materiałów krzemionkowych można dostosować do wymagań immobilizowanego enzymu, ponieważ istnieje możliwość syntezy krzemionki o określonych właściwościach struktury porowatej, które umożliwiają unieruchomienie białka zarówno na powierzchni materiału i/lub w jego porach. Ponadto materiały krzemionkowe charakteryzuje wysoka odporność termiczna, chemiczna i mechaniczna [85]. Zatem wydaje się, że są to argumenty przemawiające za szerokim zastosowaniem krzemionek w immobilizacji enzymów, szczególnie biorąc pod uwagę fakt, że różnorodność tych materiałów pozwala na unieruchomienie szerokiej gamy enzymów i z wykorzystaniem różnych technik.

Osadzanie białek na materiałach krzemionkowych jest szeroko podejmowanym tematem. Istnieją zatem interesujące doniesienia literaturowe w tym zakresie, a jednym z przykładów może być praca Alagoz i in. [82]. W badaniach zimmobilizowali oni dehydrogenazę mleczanową (LDH; EC 1.1.1.27) na mezoporowatej krzemionce zmodyfikowanej za pomocą 3-aminopropylotrimetoksyilanu (APTES) oraz glutaraldehydu, tak aby możliwe było wytworzenie wiązania kowalencyjnego pomiędzy enzymem i nośnikiem. Określono wpływ stężenia modyfikatorów, pH układu, początkowego stężenia enzymu oraz czasu immobilizacji na efektywność prowadzonego procesu, a najkorzystniejszymi warunkami okazały się być odpowiednio: 1% glutaraldehyd, pH 8, 1 mg/mL LDH oraz 120 min trwania procesu. Warto zauważyć, że unieruchomiony enzym wykazał wyższą aktywność w szerszym zakresie pH i temperatury podczas katalizowania procesu utleniania mleczanu do pirogronianu niż jego wolny odpowiednik, co wskazuje na stabilizację struktury enzymu i poprawę jej odporności na działanie czynników denaturujących. Co więcej, na podstawie obliczonego okresu półtrwania, unieruchomiona LDH była o ponad 30% bardziej stabilna niż natywny enzym w 25 °C, a dodatkowo z jej udziałem możliwe było przeprowadzenie 14 następujących po sobie cykli reakcyjnych z zachowaniem 80% początkowej aktywności białka. Ciekawe badania przedstawili także Engelmann i in. [87], którzy opisali unieruchomienie dehydrogenazy alkoholowej (ADH; EC 1.1.1.1) i dehydrogenazy mrówczanowej (FDH; EC 1.2.2.1) na nanokrzemionce z wykorzystaniem szeregu różnych metod immobilizacji. Pierwszą z nich było wytworzenie wiązania kowalencyjnego. W tym celu zmodyfikowano nośnik komercyjnie dostępnymi żywicami ECR309F, ECR204F i ECR206F lub też zastosowano jako modyfikator TRISOPERL o wysokiej porowatości i sferycznej geometrii. Alternatywnie,

przeprowadzono także sieciowanie z wykorzystaniem glutaraldehydu i pułapkowanie w alginianie sodu. Największą wydajność unieruchomiania (ok. 55%), jak również najwyższą wartość zachowanej aktywności enzymów (ok. 70%), uzyskano po przeprowadzeniu immobilizacji kowalencyjnej z nanokrzemionką funkcjonalizowaną TRISOPERL. Jest to najprawdopodobniej spowodowane rozbudowaną strukturą porowatą nośnika, gdyż jego powierzchnia właściwa wynosiła około 750 m²/g. Należy dodać, że immobilizowane enzymy wykazały także znaczną poprawę właściwości katalitycznych, w porównaniu do ich natywnych odpowiedników, co zostało określone na podstawie rezultatów liczby obrotów enzymów, definiowanej jako stosunek gramów wytworzonego produktu do ilości gramów biokatalizatora użytego w reakcji. Dla układu z krzemionką funkcjonalizowaną TRISOPERL liczba obrotów ADH wyniosła 34,7 g produktu na 1 g biokatalizatora, natomiast dla FDH było to 303,1 g/g, podczas gdy wolne enzymy charakteryzowały się odpowiednio wartościami na poziomie 4,3 g/g i 30,4 g/g. Zatem na podstawie uzyskanych rezultatów można stwierdzić, że immobilizacja białek z wykorzystaniem materiałów nanokrzemionkowych oraz odpowiednie zaprojektowanie procesu unieruchamiania może mieć znaczny i pozytywny wpływ na właściwości katalityczne enzymów. Potwierdzenie tych obserwacji przynoszą wyniki uzyskane przez Cumana i in. [88]. W ich badaniach dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa (G6PDH; EC 1.1.1.49) została enkapsulowana w żelu krzemionkowym i poddana testom kinetycznym. Stała Michaelis-Menten (K_m) po procesie immobilizacji wyniosła 0,228 mM, podczas gdy dla wolnego enzymu przyjmuje ona wartość 0,181 mM. Ten rezultat sugeruje, że enkapsulowane białko wykazuje mniejsze powinowactwo do substratu niż jego natywny odpowiednik. Zatem wydaje się, że z kinetycznego punktu widzenia immobilizacja nie powinna wpłynąć korzystnie na poprawę właściwości katalitycznych białka, niemniej jednak pierwszy znaczny spadek początkowej aktywności białka zauważono dopiero po 154 dniach od rozpoczęcia testu stabilności w trakcie przechowywania w 25 °C. Wówczas immobilizowana G6PDH zachowała ok. 80% swojej aktywności, podczas gdy natywny enzym stracił całkowicie właściwości katalityczne po 10 dniach przechowywania, co jest wynikiem gwałtownie postępującej denaturacji wolnego białka.

Interesującym rozwiązaniem, zwiększającym jednocześnie potencjał materiałów krzemionkowych w immobilizacji enzymów wydaje się zastosowanie jako nośnika materiału kompozytowego, w którym rdzeniem jest magnetyt, natomiast warstwę zewnętrzną stanowi krzemionka (rys. 9).



Rys. 9. Struktura materiału kompozytowego magnetyt-krzemionka, na podstawie [89]

Taki rodzaj materiału również charakteryzuje się rozwiniętą powierzchnią właściwą oraz obecnością licznych grup funkcyjnych na powierzchni zdolnych do związania enzymu, jednak jego kluczową zaletą jest możliwość łatwego odseparowania systemu biokatalitycznego z mieszaniny reakcyjnej z użyciem zewnętrznego pola magnetycznego. Wykorzystanie właściwości magnetycznych rdzenia z magnetytu w oddzieleniu immobilizowanych enzymów wiąże się bezpośrednio z poprawą czystości produktów reakcji, jak również z obniżeniem kosztów procesu i możliwością sprawniejszego prowadzenia kolejnych cykli katalitycznych [90]. Dlatego też Zheng i Zhang [91] przeprowadzili immobilizację dehydrogenazy glicerolu (GlyDH; EC 1.1.1.6) na pokrytych krzemionką nanocząsteczkach magnetytu, które dodatkowo zmodyfikowano APTESem i glutaraldehydem, aby możliwe było przyłączenie białka z wytworzeniem wiązań kowalencyjnych. Dowiedziono, że enzym po immobilizacji zachował ponad 80% początkowej aktywności. Dodatkowo analiza kinetyki enzymatycznej wykazała, że unieruchomiona GlyDH oraz jej wolna forma uzyskały prawie taką samą wartość stałej K_m , zarówno w kierunku NAD^+ , jak i glicerolu, co może sugerować, że osadzenie enzymu na nośniku nie wpłynęło znacząco na jego powinowactwo wobec substratu. Niemniej jednak po immobilizacji wartość stałej katalitycznej (k_{cat}) zmniejszyła się z 164 1/s do 113 1/s, w porównaniu do natywnego enzymu, co może być wynikiem występowania oporów dyfuzyjnych w układzie reakcyjnym. Pomimo tego, opracowany biokatalizator charakteryzował się mniejszą wrażliwością na zmiany pH i temperatury, a nawet wykazał ponad 5-krotną poprawę stabilności termicznej w temperaturze 50 °C. Ponadto zaproponowano możliwość ponownego użycia immobilizowanego enzymu

w 10 kolejnych cyklach katalitycznych z niewielką, bo ok. 9-proc. stratą początkowej aktywności. Zatem wydaje się, że nośnik zapewnił skuteczną ochronę białka i stabilizację jego struktury, jak również nie doszło do znacznego wymycia enzymu ze względu na wytworzone wiązania kowalencyjne. Materiał magnetyt-krzemionka został zastosowany jako nośnik w procesie unieruchamiania lipazy także przez Nikolić i in. [92]. Różnicę w przygotowaniu nośnika stanowiła jego modyfikacja. Do funkcjonalizacji powierzchni wykorzystano poli(chlorek diallilodimetyloamoniowy), co oznacza, że także w tym przypadku przeprowadzono immobilizację kowalencyjną. Unieruchomieniu poddano lipazę z *Candida rugosa* (EC 3.1.1.3) z roztworu o wyjściowym stężeniu 0,06 mg/mL, a proces prowadzono przez 2 h w pH 7 i temperaturze otoczenia. Immobilizowane białko nie było podatne na wymywanie w trakcie testów wielokrotnego wykorzystania, co można wywnioskować na podstawie spadku początkowej aktywności enzymu, który wyniósł 20% po dziesiątym cyklu reakcyjnym. Co więcej, unieruchomiona lipaza charakteryzowała się poprawą stabilności termicznej, w porównaniu do jej natywnej formy, zachowując 30% aktywności w 75 °C, podczas gdy wolny enzym został w tej temperaturze całkowicie dezaktywowany. Podobne rezultaty osiągnięto przy zmianie pH środowiska. Immobilizowana lipaza utrzymała ponad 90% swojej początkowej aktywności w pH od 7 do 10, podczas gdy wolny enzym w szerszym zakresie pH gwałtownie tracił swoje właściwości. Zatem unieruchomienie białka pozwoliło na zwiększenie stabilności termicznej i chemicznej lipazy, jak również umożliwiło jej wykorzystanie w następujących po sobie cyklach reakcyjnych.

W celu podkreślenia uniwersalności zastosowania krzemionek jako nośników w procesie immobilizacji enzymów, w tabeli 2 zestawiono przykłady systemów biokatalitycznych wykorzystujących te materiały do osadzenia białek z użyciem różnych technik unieruchomienia. Analiza zaprezentowanych danych pozwala na stwierdzenie, że zdecydowanie najczęściej immobilizacja enzymów odbywa się poprzez tworzenie wiązań kowalencyjnych pomiędzy powierzchnią nośnika a białkiem, a w konsekwencji otrzymane układy enzymatyczne charakteryzują się zachowaniem powyżej 80% początkowej aktywności biokatalitycznej. Opracowywanie takich systemów jest możliwe, ze względu na fakt, że krzemionka posiada na swojej powierzchni liczne grupy funkcyjne i dodatkowo jest podatna na modyfikacje powszechnie dostępnymi związkami, takimi jak APTES czy glutaraldehyd. Co więcej, zastosowanie wiązania kowalencyjnego wydaje się potencjalnie dobrym wyborem, ze względu na zapewnienie stabilizacji struktury białka przez wielopunktowe przyłączenie do nośnika, jak również ograniczenie

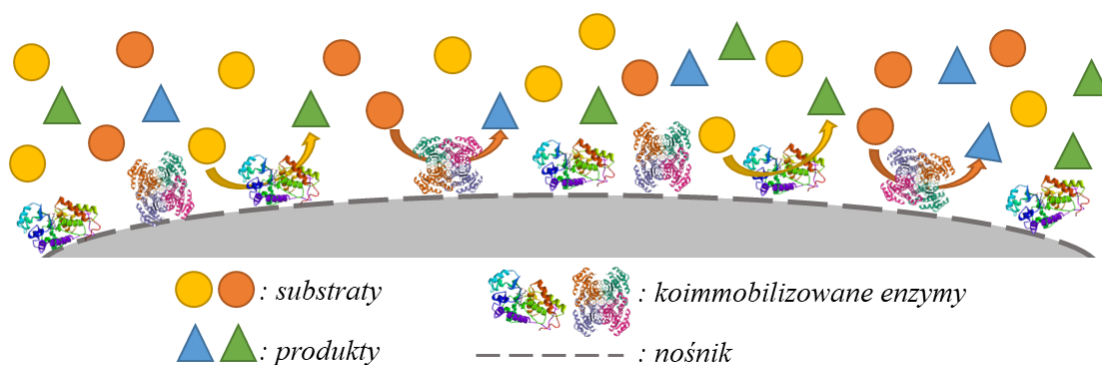
wymywania w trakcie trwania przemian biokatalitycznych. Niemniej ponad 60-proc. zachowanie aktywności biokatalitycznej może zagwarantować także skuteczne przeprowadzenie pułapkowania lub enkapsulacji z wykorzystaniem żelu krzemionkowego lub immobilizacji adsorpcyjnej przy użyciu nanokrzemionki, która charakteryzuje się wysoko rozwiniętą strukturą porowatą. Fakt ten dodatkowo podkreśla różnorodność i uniwersalność stosowania materiałów krzemionkowych. Należy również zwrócić uwagę na to, że większość procesów immobilizacji enzymów może przebiegać w warunkach zbliżonych do temperatury otoczenia (20–30 °C) i w neutralnym pH. Niemniej jednak zawsze należy wziąć pod uwagę charakterystykę białek, które mogą wymagać zastosowania obniżonej lub podwyższonej temperatury czy też kwasowego lub zasadowego środowiska. Rodzaj nośnika ma też znaczny wpływ na czas trwania procesu immobilizacji, jak również ilość enzymu, która może się z nim związać. Na przykład, proces enkapsulacji przebiega relatywnie szybko, ok. 2 h, w porównaniu do immobilizacji kowalencyjnej, która może trwać nawet 24 h. Należy także podkreślić, że bez względu na zastosowaną metodę immobilizacji czy rodzaj nośnika krzemionkowego procesu unieruchamiania enzymów ma wpływ na parametry kinetyczne, które najczęściej wskazują na zmniejszenie powinowactwa do substratu, w porównaniu do natywnych form białek. Niemniej jednak dane dotyczące liczby obrotów enzymów wskazują, że immobilizowane biokatalizatory są w stanie znacznie wydajniej prowadzić procesy biokatalityczne niż ich wolne odpowiedniki. Co więcej, ciekawym rozwiązaniem wydaje się także tworzenie materiałów kompozytowych z magnetytem, szczególnie w perspektywie możliwości łatwej izolacji biokatalizatora z mieszaniny reakcyjnej, co w konsekwencji warunkuje pełniejszą kontrolę nad prowadzonym procesem oraz ponowne wykorzystanie immobilizowanych enzymów. Dlatego też zasadnym wydaje się określenie krzemionek jako uniwersalnych nośników w procesach immobilizacji enzymów.

Tabela 2. Przykłady systemów immobilizowanych enzymów wraz z warunkami immobilizacji i wartościami zachowanej początkowej aktywności oraz parametrami kinetycznymi. (W – wolny enzym; IM – immobilizowany enzym; K_m – stała Michaelis-Menten; V_{max} – maksymalna szybkość reakcji, TTN – liczba obrotów enzymu)

ENZYM	NOŚNIK	METODA	WARUNKI IMMOBILIZACJI	PARAMETRY KINETYCZNE	ZACHOWANA AKTYWNOŚĆ	LIT.
ksylanaza	żel krzemionkowy	adsorpcja	0,5 mg/mL; pH 7; 25 °C; 2 h	-	78%	[93]
lipaza	nanokrzemionka	adsorpcja	2 mg/mL; pH 7,4; 4 °C; 24 h	(W) K_m : 0,80 mM V_{max} : 5,46 U/mg (IM) K_m : 0,66 mM V_{max} : 3,76 U/mg	60%	[94]
dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa	żel krzemionkowy	enkapsulacja	3,75 mg/mL; pH 7,5; temperatura otoczenia; 1 h	(W) K_m : 0,23 mM (IM) K_m : 0,18 mM	100%	[88]
dehydrogenaza mleczanowa	mezoporowata krzemionka	wiązanie kowalencyjne	1 mg/mL; pH 8; 40 °C; 2 h	(W) K_m : 1,02 mM (IM) K_m : 0,64 mM	100%	[82]
dehydrogenaza alkoholowa	nanokrzemionka	wiązanie kowalencyjne	0,5 mg/mL; pH 8; 25 °C; 18 h	(W) TTN: 4,3 (IM) TTN: 34,7	70%	[87]
dehydrogenaza mrówczanowa	nanokrzemionka	wiązanie kowalencyjne	0,5 mg/mL; pH 8; 25 °C; 18 h	(W) TTN: 30 (IM) TTN: 303	70%	[87]
trypsyna	mezoporowata krzemionka	wiązanie kowalencyjne	1 mg/mL; pH 7,5; 37 °C; 3 h	-	40%	[95]
dehydrogenaza glicerolu	krzemionka-magnetyt	wiązanie kowalencyjne	1 mg/mL; pH 7; temperatura otoczenia; 24 h	(W) K_m : 0,16 mM (IM) K_m : 0,17 mM	80%	[91]
lipaza	krzemionka-magnetyt	wiązanie kowalencyjne	0,06 mg/mL; pH 7; temperatura otoczenia; 2 h	-	100%	[92]
oksydaza glukozy	krzemionka-magnetyt	wiązanie kowalencyjne	0,5 mg/mL; pH 7; temperatura otoczenia; 1 h	(W) K_m : 48 mM (IM) K_m : 92 mM	100%	[96]

3.2.2 Koimmobilizacja enzymów

Zgodnie z dostępną wiedzą, w procesach konwersji biomasy istotną rolę odgrywają reakcje kaskadowe, które można zdefiniować jako reakcje, w wyniku których otrzymuje się produkt, będący substratem w jednej lub kilku kolejnych, następujących po sobie reakcjach. Ogromny wpływ mają także procesy multienzymatyczne, do których należy zaklasyfikować wszystkie systemy reakcyjne, w których kilka enzymów jest równocześnie stosowanych do katalizy i generowania jednego lub kilku produktów. Złożoność takich procesów stanowi duże wyzwanie dla układów enzymatycznych, ponieważ wiąże się z synergicznym działaniem wielu biokatalizatorów o różnej charakterystyce. Sprawne przeprowadzenie reakcji kaskadowych czy multienzymatycznych może ułatwić wcześniejsza koimmobilizacja enzymów, którą należy zdefiniować jako przyłączenie dwóch lub więcej enzymów do tego samego nośnika (rys. 10).



Rys. 10. Schematyczne przedstawienie procesu koimmobilizacji enzymów

Należy zauważyć, że takie rozwiązanie prowadzi do jednoczesnego wykorzystania kilku enzymów, co pozytywnie wpływa na wydajność reakcji kaskadowych i multienzymatycznych, głównie ze względu na przesunięcie przebiegu reakcji w kierunku najbardziej pożądanego produktu [97]. Ponadto z ekonomicznego punktu widzenia, niezwykle istotny jest fakt, że koimmobilizacja enzymów ułatwia przeprowadzenie skomplikowanych procesów wieloetapowych w jednym naczyniu reakcyjnym. Koimmobilizacja, analogicznie jak immobilizacja, zapewnia wysoką specyficzność reakcji, jak również umożliwia kontrolowanie jej przebiegu, minimalizując lub nawet całkowicie eliminując tzw. *lag time*. Dzięki zastosowaniu koimmobilizacji możliwe jest też ograniczenie negatywnego wpływu produktów ubocznych o potencjalnym działaniu inhibitującym na enzymy, poprzez przekształcanie

ich w inne związki [98]. Należy jednak podkreślić, że przeprowadzenie koimmobilizacji białek wiąże się z ograniczeniami w dyfuzji i transferze masy. Kluczowym aspektem dla wysokiej efektywności takich systemów jest również określenie najkorzystniejszych warunków procesowych, takich jak pH, temperatura, stosunek koimmobilizowanych enzymów oraz ilość substratów, co jest związane z jednoczesnym stosowaniem kilku enzymów o różnych wymaganiach. Brak odpowiednich warunków do synergicznego działania wszystkich obecnych w systemie reakcyjnym białek może skutkować prowadzeniem procesów z niską efektywnością [99]. Wydaje się ponadto, że podstawą tworzenia omawianych systemów jest właściwe dopasowanie kinetyczne enzymów, aby wszystkie prowadzone reakcje przebiegały z odpowiednią szybkością, a ewentualne wąskie gardło (z ang. *bottleneck*) w procesie było jasno zdefiniowane i jego wpływ na wydajność procesu konwersji został maksymalnie ograniczony [100]. Należy zauważyć, że szeroka gama enzymów, jak również ich duża bioróżnorodność, pozwalają spojrzeć optymistycznie na możliwości konstruowania koimmobilizowanych systemów enzymatycznych, które umożliwią prowadzenie skomplikowanych reakcji kaskadowych i multienzymatycznych z wysoką efektywnością, włączając w to procesy konwersji i przetwórstwa biomasy.

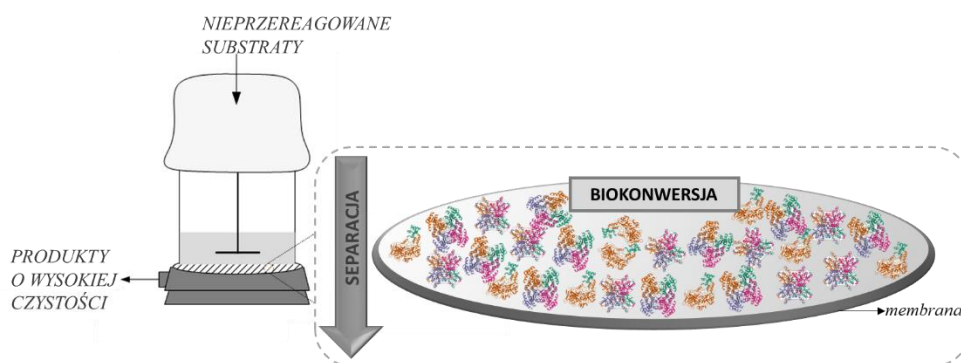
Jednym z przykładów pary enzymatycznej, która może ze sobą współdziałać w celu przeprowadzenia biokonwersji biomasy jest dehydrogenaza ksylozowa z dehydrogenazą alkoholową. Oba enzymy przekształcają powszechnie dostępne substraty (ksylozę, alkohole, ketony, aldehydy) w produkty o wysokiej użyteczności, jak również są aktywne w łagodnych i podobnych dla obu biokatalizatorów warunkach procesowych (temperatura otoczenia, pH 7). Niemniej jednak konieczne jest wprowadzenie do systemu reakcyjnego odpowiedniej ilości substratu dla obu białek oraz zrównoważenie szybkości obu reakcji, co jest możliwe ze względu na szeroką różnorodność źródeł pozyskiwania dehydrogenazy alkoholowej. Wynika to z faktu, że w zależności od pochodzenia tego enzymu parametry kinetyczne ADH mogą się znacznie różnić. Dlatego też możliwe jest odpowiednie dobranie dehydrogenazy alkoholowej, która będzie się charakteryzować stałą Michaelis-Menten zbliżoną do wartości tego parametru dla XDH [101]. Co więcej, należy także określić wpływ substratów, takich jak formaldehyd, na strukturę i aktywność enzymów, a następnie wprowadzić skuteczną ochronę biokatalizatorów przed potencjalną deformacją lub inaktywacją [102]. Przykład pary enzymatycznej poddanej koimmobilizacji zaproponowali także Li i in. [103], którzy unieruchomili reduktazę enanianową (ER; EC 1.3.1.31) i dehydrogenazę glukozową z wykorzystaniem dwóch

różnych metod. Pierwszą z nich było wytworzenie agregatów CLEA (z ang. *cross-linked enzyme aggregates*), a jako czynnika strącającego użyto siarczanu(VI) amonu, podczas gdy środkiem sieciującym był utleniony dekstran. Natomiast drugą zastosowaną techniką była immobilizacja biomimetyczna, która pozwoliła na otrzymanie w jednoetapowym procesie, z udziałem kwasu krzemowego jako prekursora, systemów ER-GDH-krzemionka. Wydajność obu zaproponowanych procesów przekroczyła 90%, a otrzymane układy biokatalityczne charakteryzowały się zwiększoną stabilnością chemiczną i odpornością na zmiany pH, w porównaniu do natywnych form enzymów. Ponadto należy podkreślić, że dla układu ER-GDH-CLEA odnotowano zachowanie 100-proc. aktywności biokatalitycznej przez 14 kolejnych cykli katalitycznych, podczas gdy układ ER-GDH-krzemionka pozwolił na przeprowadzenie tej samej liczby cykli z aktywnością na poziomie 60%. Różnice te mogą wynikać z faktu, że układ ER-GDH-CLEA wykazał większą stabilność, w porównaniu do systemu ER-GDH-krzemionka, co jest związane z niższą podatnością tak przygotowanego enzymu na inaktywację i wynika z zastosowania sieciowania jako metody immobilizacji. Dodatkowo dokonując analizy parametrów kinetycznych procesu wykazano, że układ ER-GDH-CLEA charakteryzuje się większym powinowactwem do substratu i większą maksymalną szybkością reakcji (V_{max}) niż system z krzemionką, ponieważ K_m i V_{max} dla tego systemu wynosiły odpowiednio 3,9 mM i 3,6 $\mu\text{M}/\text{min}$, podczas gdy te same parametry dla ER w układzie ER-GDH-krzemionka przyjęły wartości 1,8 mM i 24,4 $\mu\text{M}/\text{min}$. Godnymi uwagi są także badania zrealizowane przez Sole i in. [104], którzy przeprowadzili koimmobilizację cytochromu P450 (EC 1.14.14.154), który katalizuje reakcję hydroksylowania, wraz z dehydrogenazą glukozową, która bardzo często jest stosowana jako sprzężony enzym w układach regeneracji kofaktorów. Początkowo przeprowadzono zaawansowane testy potencjalnych naturalnych nośników, aby ostatecznie wybrać kilka agaroz, które zostały sfunkcjonalizowane grupami epoksydowymi, aminowymi i aldehydowymi, a następnie zastosowane w koimmobilizacji wspomnianych enzymów. W trakcie prac optymalizacji poddano warunki procesowe dla uzyskania jak najwyższych efektywności immobilizacji i wartości zachowanej aktywności. Użycie epoksy-agarozy, jako nośnika, pozwoliło na zachowanie odpowiednio 83% i 20% początkowej aktywności przez P450 i GDH. Zdecydowanie niższe wartości zachowanej aktywności wykazały enzymy dla układu z amino-agarozą, ponieważ wynosiły one odpowiednio 28% (P450) i 25% (GDH). Z kolei w przypadku zastosowania aldehyd-agarozy możliwe było zachowanie 100-proc.

aktywności obu koimmobilizowanych białek. Wynika to z faktu, że w trakcie osadzania enzymu prowadzonego w 45 °C enzymy wykazały wysokie powinowactwo do związania z tym materiałem nośnika, ze względu na znaczną reaktywność grup aldehydowych względem aminowych grup funkcyjnych enzymu. Ponadto po przeprowadzeniu procesów z wykorzystaniem opracowanych systemów biokatalitycznych określono możliwość ich wielokrotnego użycia. Wszystkie z zaproponowanych układów wykazały zachowanie początkowej aktywności na poziomie 80% po 5 cyklach reakcyjnych, co wskazuje na wytworzenie stabilnych układów oraz znikome wymycie enzymu z nośnika. Zatem wydaje się, że koimmobilizacja białek może być prowadzona z wykorzystaniem szerokiej gamy materiałów oraz metod unieruchomienia, a w konsekwencji możliwe jest uzyskanie układów enzymatycznych zdolnych do skutecznego działania oraz charakteryzujących się zachowaniem relatywnie wysokich aktywności.

Należy jednak zauważyć, że wraz ze wzrostem zainteresowania procesem koimmobilizacji białek ciągłemu rozwojowi ulegają także potencjalne materiały stosowane jako nośniki. Interesującym przykładem w tym względzie wydaje się idea zastosowania enzymatycznych reaktorów membranowych, których działanie polega na prowadzeniu procesów biokonwersji połączonych z separacją membranową składników mieszaniny. Wykorzystanie enzymatycznych reaktorów membranowych ma znaczący potencjał aplikacyjny, szczególnie w perspektywie zastosowań w skali przemysłowej. Dzieje się tak ze względu na obniżenie kosztów procesu oraz zwiększenie ich efektywności, co wynika z możliwości łatwej regeneracji membrany oraz uzyskania produktów o wysokiej czystości [105,106]. W enzymatycznych reaktorach membranowych procesy biokatalityczne mogą być prowadzone w dwóch konfiguracjach. Pierwszą z nich jest wprowadzenie białka (w formie wolnej lub immobilizowanej) do mieszaniny reakcyjnej, a więc reakcja przebiega w całej przestrzeni reaktora, podczas gdy membrana odpowiada wyłącznie za separację produktów procesu. Natomiast innym rozwiązaniem jest zastosowanie membrany jako nośnika w koimmobilizacji enzymów. W takim przypadku membrana odpowiada za pełnienie dwóch funkcji, z których jedną jest skuteczne związanie cząsteczek enzymów, tak aby zapewnić im odpowiednią ochronę i stabilizację z równoczesnym zachowaniem wysokiej aktywności. Unieruchomienie białek może przebiegać z wykorzystaniem metod chemicznych, które oznaczają wytworzenie pomiędzy enzymem a membraną wiązań kowalencyjnych, bądź też z użyciem technik fizycznych, polegających na osadzeniu biokatalizatora na powierzchni i/lub w porach membrany, w wyniku działania oddziaływań

elektrostatycznych, adsorpcyjnych i/lub hydrofobowych. Powoduje to powstanie membrany biokatalitycznej, która może stanowić złożę aktywne w EMR (rys. 11). Równie istotna jest także druga funkcja membrany, która zakłada, że poza funkcją katalityczną, membrana stanowi także selektywną barierę, która umożliwi skuteczne rozdzielenie powstałych w trakcie procesu produktów od nieprzereagowanych substratów oraz innych substancji obecnych w układzie. Siłą napędową, która umożliwi rozdział składników w enzymatycznych reaktorach membranowych może być ciśnienie, potencjał chemiczny i/lub pole elektryczne [107,108].



Rys. 11. Schematyczne przedstawienie enzymatycznego reaktora membranowego z enzymami koimmobilizowanymi na membranie

W zrealizowanych badaniach Gebreyohannes i in. [109] opracowano bioreaktor membranowy, który wykorzystano do zwiększenia wydajności procesów konwersji celulozy i usuwania powstających w czasie reakcji zanieczyszczeń. Na polimerowej membranie z osadzonymi wcześniej nanocząsteczkami magnetycznymi koimmobilizowano endo-glukanazę i β -glukozydazę z wykorzystaniem zewnętrznego pola magnetycznego. Konsekwencją użycia tak przygotowanej membrany był 50-proc. wzrost wydajności prowadzonych procesów, w porównaniu do konwersji prowadzonej w reaktorach okresowych z udziałem wolnych enzymów. Dodatkowo zaprezentowane rozwiązanie ma ogromną zaletę w postaci sprawnej separacji powstającego produktu, co w konsekwencji ogranicza jego inhibujący wpływ na stosowane enzymy. Również potrzeba czyszczenia membrany jest ograniczona, ze względu na zmniejszoną ilość zanieczyszczeń osadzających się na membranie, co jest konsekwencją wysycenia miejsc zdolnych do wiązania zanieczyszczeń przez koimmobilizowane enzymy. Niezwykle interesujące zastosowanie enzymatycznych reaktorów membranowych zaproponowali także Luo i in. [110], którzy unieruchomili trzy enzymy na polimerowej membranie z wykorzystaniem filtracji ciśnieniowej. Unieruchomione dehydrogenazę mrówczanową,

dehydrogenazę formaldehydową (FaldDH; EC 1.2.1.46) i dehydrogenazę alkoholową badano pod kątem efektywności procesu produkcji metanolu z CO₂. Dowiedziono, że zastosowana technika koimmobilizacji pozwoliła na zachowanie pełni aktywności katalitycznej wszystkich osadzonych białek. Dodatkowo po koimmobilizacji przepuszczalność membrany zmniejszyła się o ponad 90%, w porównaniu do czystego materiału, podczas gdy wydajność osadzania enzymu wyniosła około 65%. Może to sugerować unieruchomienie białek nie tylko na powierzchni membrany, ale przede wszystkim w jej porach, co znacząco wpływa na zachowanie stabilności zaproponowanego układu enzymatycznego, ze względu na zapewnienie wysokiej ochrony białek oraz zminimalizowanie ich wymywania w trakcie prowadzonych procesów. Co ciekawe, wolne enzymy pozwoliły na wyprodukowanie do 0,15 mM metanolu w trakcie 10 cykli katalitycznych, podczas gdy unieruchomione białka w trakcie analogicznych testów umożliwiły uzyskanie do 0,25 mM alkoholu. Zatem przedstawione rezultaty badań potwierdzają zasadność stosowania enzymów koimmobilizowanych na membranie, szczególnie w perspektywie ich aplikacji w konwersji składników biomasy, a więc procesach, podczas których powstaje znaczna ilość produktów mogących negatywnie wpływać na aktywność stosowanych biokatalizatorów i w konsekwencji powodujących obniżenie wydajności prowadzonych przemian.

W tabeli 3, celem podkreślenia funkcjonalności opisanego rozwiązania, zestawiono przykładowe systemy koimmobilizowanych enzymów, które powstały z użyciem różnych nośników, takich jak materiały nieorganiczne, polimerowe lub membrany filtracyjne. Co więcej, wśród zaprezentowanych przykładów można zauważyć także różnorodność stosowanych metod unieruchomienia białek, co przełożyło się na osiągnięte przez układy enzymatyczne wydajności prowadzonych przemian. Warto zauważyć znaczną różnicę pomiędzy efektywnościami procesów z udziałem enzymów koimmobilizowanych adsorpcyjnie i z wykorzystaniem wiązania kowalencyjnego. Systemy biokatalityczne oparte na adsorpcji wykazały skuteczność powyżej 70% w katalizowanych przez nie reakcjach. Natomiast enzymy związane z użyciem wiązania kowalencyjnego, bez względu na stosowany nośnik, umożliwiły przeprowadzenie procesów z wydajnością na poziomie ok. 100%. Zatem wydaje się, że w tym przypadku duże znaczenie odgrywa stabilność związania białka i siła wytworzonych oddziaływań, które wpływają na zachowanie aktywności biokatalizatorów i ich wymywanie z nośnika. Dodatkowo należy zauważyć, że nie wykazano wyraźnego związku pomiędzy stosowanym nośnikiem czy też sposobem osadzenia enzymów, a najkorzystniejszymi

warunkami prowadzenia procesu koimmobilizacji. Wydaje się, że zarówno optymalna temperatura, jak i pH środowiska są w pełni zależne od obecnych w układzie biokatalizatorów. Niemniej jednak należy zauważyć, że wybór metody koimmobilizacji ma wpływ na czas trwania procesu. Na przykład zastosowanie enkapsulacji pozwala na przeprowadzenie relatywnie szybkiego (<1 h) unieruchomienia enzymów, które następnie są zdolne do katalizowania przemian z wysoką wydajnością.

Analiza przedstawionych danych wskazuje, że koimmobilizacja enzymów jest niezwykle ciekawym rozwiązaniem, które umożliwia prowadzenie skomplikowanych i wieloetapowych reakcji biokatalitycznych z równoczesnym otrzymywaniem stosunkowo drogich produktów w tańszy i umożliwiający pełniejszą kontrolę procesową sposób. Kluczowym aspektem wydaje się jednak optymalizacja warunków koimmobilizacji, jak również procesu biokonwersji, pod kątem wszystkich zaangażowanych w prowadzenie przemian enzymów, tak aby możliwe było wytworzenie układów charakteryzujących się stabilnością chemiczną i termiczną, a ponadto zdolnych do zachowania wysokiej aktywności oraz ponownego ich wykorzystania w kolejnych cyklach reakcyjnych. Należy również podkreślić zalety wynikające z zastosowania białek unieruchomionych na membranie, co jest niezwykle istotnym rozwiązaniem podczas procesów kaskadowych czy multienzymatycznych, ze względu na możliwość separacji produktów w trakcie prowadzenia tych procesów i uzyskanie związków chemicznych o wysokiej czystości. Niemniej jednak w przypadku tych procesów istotne jest uwzględnienie rodzaju siły napędowej, która umożliwia osadzenie białek na membranie, w szczególności różnych wartości ciśnienia podczas unieruchamiania filtracyjnego. Zatem wydaje się, że na podstawie przedstawionych danych literaturowych można stwierdzić, że koimmobilizacja enzymów z wykorzystaniem różnych rodzajów nośników i metod unieruchomienia umożliwia wydajne przeprowadzenie procesów kaskadowych i multienzymatycznych, a jej potencjał aplikacyjny powinien być rozwijany i testowany w trakcie badań nad m.in. enzymatyczną konwersją składników biomasy.

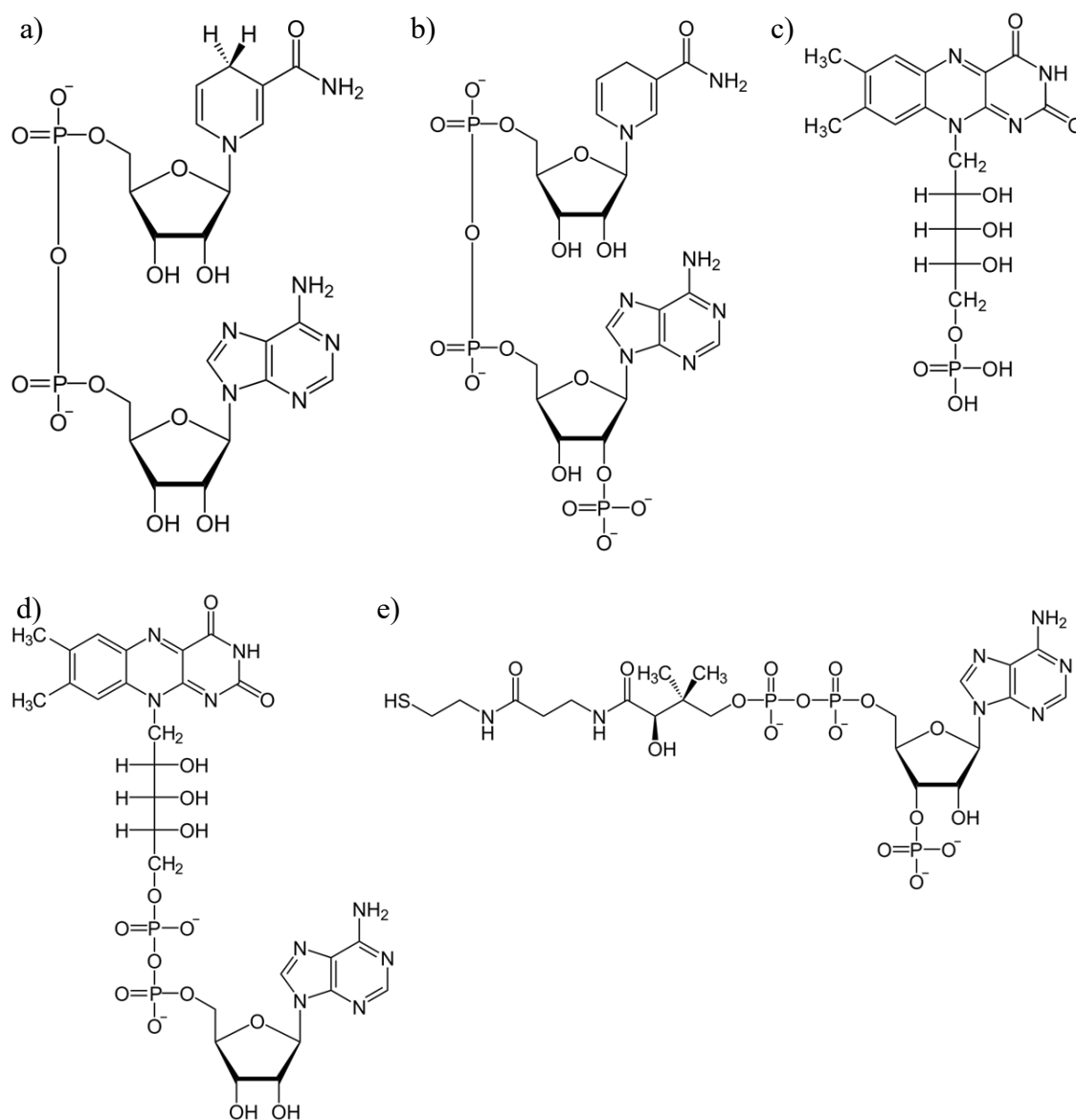
Tabela 3. Przykłady systemów koimmobilizowanych enzymów wraz z ich podstawową charakterystyką i warunkami koimmobilizacji

ENZYM	NOŚNIK	METODA	WARUNKI KOIMMOBILIZACJI	WYDAJNOŚĆ PROCESU KONWERSJI	LIT.
endo-glukanaza (E-G) β -glukozydaza (β -G)	membrana z poli(difluorku winylu) z nanocząstkami magnetycznymi	adsorpcja	E-G: 2,5 mg/mL; β -G: 2,5 mg/mL; pH 4,8; temperatura otoczenia; 10 h	75% (E-G) 75% (β -G)	[109]
dehydrogenaza mrówczanowa (FAD) dehydrogenaza formaldehydowa (FaldDH) dehydrogenaza alkoholowa (ADH)	ultrafiltracyjna membrana polimerowa	adsorpcja	FAD: 10 μ L/mL; FaldD: 0,1 mg/mL; ADH: 0,15 mg/mL; pH 7; temperatura otoczenia; do zebrania całości permeatu	70% (dla wszystkich enzymów)	[110]
oksydaza cholinowa (COx) peroksydaza chrzanowa (HRP)	membrana z nanotlenku cynku	adsorpcja	COx: 1 U/ μ L; HRP: 1 U/ μ L; pH 7,4; temperatura otoczenia; 2 h	97% (COx) 97% (HRP)	[111]
ketoreduktaza (KR) dehydrogenaza glukozowa (GDH)	poli(alkohol winylowy)	enkapsulacja	KR: 4,84 mg/g; GDH: 0,19 mg/g; pH 6,5; 40 °C; 5 min	99% (KR)	[112]
reduktaza enanianowa (ER) dehydrogenaza glukozowa (GDH)	agregaty z dekstranu	CLEA	ER: 7,33 U/mL; GDH: 33,3 U/mL; pH 7,5; 4 °C; 1 h	100% (ER)	[103]
reduktaza enanianowa (ER) dehydrogenaza glukozowa (GDH)	nanokrzemionka	immobilizacja biomimetyczna	ER: 7,77 U/mL; GDH: 27,8 U/mL; pH 7; 4 °C; 3 h	100% (ER)	[103]
syntetaza glutationowa (GS) kinaza polifosforanowa (PPK)	mezoporowata krzemionka	pułapkowanie	GS: 2 mg/mL; PPK: 1 mg/mL; pH 8; temperatura otoczenia; 10 h	83% (GS) 75% (PPK)	[113]
cytochrom P450 (P450) dehydrogenaza glukozowa (GDH)	agaroza	wiązanie kowalencyjne	P450: 1,8 U/g; GDH: 0,8 U/g; pH 8; 45 °C; 1 h	100% (P450) 100% (GDH)	[104]
oksydaza NADPH (NOx) dehydrogenaza glukozowa (GDH)	makroporowata żywica	wiązanie kowalencyjne	NOx: 14,1 U/mg; GDH: 8,3 U/mg; pH 7; 25 °C, 10 h	98% (NOx) 100% (GDH)	[114]

3.3 Kofaktory enzymatyczne

Kofaktory są związkami chemicznymi, którą są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania enzymów i osiągnięcia przez nie pełni zdolności biokatalitycznej. Kofaktory mogą występować w postaci tworzonego z białkiem kompleksu, jak w przypadku większości oksydoreduktaz, bądź też mogą uczestniczyć w reakcji katalitycznej w postaci wolnej. Warto podkreślić, że kofaktory enzymatyczne to zazwyczaj związki niebiałkowe, które zapewniają integralność struktur białkowych. W zdecydowanej większości są to jony metali czy też związki nukleotydowe lub dinukleotydowe [115]. Należy zaznaczyć, że mimo znacznego wpływu kofaktorów na przebieg reakcji katalitycznych, nie są one uznawane za substraty, a tylko wspomagają transport elektronów lub grup funkcyjnych w trakcie przebiegających procesów [116]. Kofaktory enzymatyczne można podzielić na dwie grupy, wśród których należy wymienić koenzymy i grupy prostetyczne. Koenzymy definiuje się jako związki, które łączą się z apoenzymem tylko w trakcie trwania reakcji i przenoszą grupy chemiczne pomiędzy reagentami. Natomiast grupy prostetyczne są trwale związane z enzymem, stanowią jego integralną część i zazwyczaj są to jony (Zn^{2+} , Cu^{2+}) lub cząsteczki organiczne (np. hem). Zatem za najważniejszą różnicę należy uznać fakt, że koenzymy są niestabilnie i niekowalencyjnie związane z białkiem, co skutkuje możliwością łatwego ich oddzielenia od enzymu, bez wpływu na jego strukturę czy denaturację, podczas gdy grupy prostetyczne tworzą z biomolekułami trwale związane kompleksy [117]. Warto podkreślić, że kofaktory pełnią istotną rolę w funkcjonowaniu wszystkich grup enzymów, z wyjątkiem hydrolaz, które nie wymagają ich obecności do osiągnięcia najwyższej aktywności. W reakcjach z udziałem oksydoreduktaz najczęściej wykorzystywanymi kofaktorami są dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NAD), fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADP), mononukleotyd flawinowy (FMN) i dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD), zarówno w postaci zredukowanej, jak i utlenionej. Wspomniane kofaktory są szeroko stosowane ze względu na ich skuteczność w transferze elektronów w reakcjach oksydacyjno-redukcyjnych [118]. Wraz z transferazami najskuteczniej działają trifosforan adenozy (ATP), koenzym A (CoA) i kwas tetrahydrofoliowy (THFA). Natomiast liazy, izomerazy i ligazy w trakcie reakcji biokatalitycznych współpracują z pirofosforanem tiaminy, fosforanem pirydoksalu i koenzymem A. Szeroka gama wykorzystywanych kofaktorów enzymatycznych (rys. 12) wynika bezpośrednio z charakterystyki i struktury białek, które wymagają

przeniesienia określonych grup funkcyjnych, prowadzenia konkretnych reakcji lub wywołania wskazanych zmian w izomeryzacji cząsteczki [119].



Rys. 12. Struktury najpowszechniej stosowanych kofaktorów enzymatycznych:

a) NAD, b) NADP, c) FMN, d) FAD i e) CoA

Jak wspomniano powyżej, w roli kofaktora w reakcjach z udziałem oksydoreduktaz najczęściej udział bierze jedna z dwóch form dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (utleniona bądź zredukowana), w postaci akceptora lub donora elektronów [120]. Na strukturę NAD składają się dwa nukleozydy połączone pirofosforanem. Każdy nukleozyd zawiera pierścień rybozy, niemniej jednak jeden z nich posiada adeninę przyłączoną do pierwszego atomu węgla (pozycja C1'), natomiast w drugim w tej pozycji znajduje się nikotynoamid. NAD występuje w dwóch formach: utlenionej (NAD^+) i zredukowanej

(NADH). Podczas reakcji z udziałem tego kofaktora powstaje para elektronów wodorkowych, z których jeden elektron zostaje przeniesiony na dodatnio naładowany azot w pierścieniu nikotynoamidowym formy NAD^+ , podczas gdy drugi na atom węgla naprzeciwko tego azotu, co z kolei pozwala na produkcję zredukowanego NADH. Wszystkie zmiany struktury kofaktora z udziałem elektronów zachodzą w obrębie pierścienia pirydynowego. Reakcja ta jest łatwo odwracalna, co oznacza, że w odpowiednich warunkach procesowych i w obecności czynników regenerujących NAD może stale zmieniać formę w trakcie trwania procesu, bez równoczesnego wyczerpania tego związku [121,122]. Podobnie jak NAD, fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego jest biologicznym nośnikiem elektronów, zdolnym do ich przyjmowania i oddawania. Struktura NADP różni się od NAD obecnością grupy fosforanowej w pozycji C2' rybozy nukleotydu adeninowego. Analogicznie również cząsteczka fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego występuje w dwóch postaciach: zredukowanej (NADPH) i utlenionej (NADP^+) oraz podobnie jak w przypadku NAD, wszystkie zmiany w strukturze tego związku, podczas przejścia z jednej formy w drugą, zachodzą w obrębie pierścienia pirydynowego [123].

Należy zaznaczyć, że konieczność stosowania kofaktorów w procesach biokatalitycznych w stechiometrycznych ilościach znacząco wpływa na wzrost kosztów prowadzonych reakcji, jak również powoduje konieczność dodawania kolejnych porcji tych związków, ze względu na fakt, że ulegają one wyczerpaniu. Dlatego też jednym z czynników ograniczających stosowanie oksydoreduktaz jako biokatalizatorów w procesach realizowanych na skalę przemysłową jest właśnie konieczność stosowania znacznych ilości kofaktorów. Niemniej jednak rosnące zainteresowanie wykorzystaniem tych enzymów spowodowało potrzebę opracowania nowych i wydajnych systemów, które będą uwzględniały możliwość regeneracji kofaktorów, a w konsekwencji także obniżenie dodatkowych kosztów procesu [124].

Co niezwykle istotne, proponowana metoda regeneracji powinna być korzystna kinetycznie, tak aby nie było konkurencji pomiędzy cząsteczką produktu głównej reakcji, a innymi produktami ubocznymi powstającymi w układzie reakcyjnym [125]. Dodatkowo proces regenerujący nie może utrudniać izolacji produktu końcowego, znacząco zwiększać kosztów prowadzonych przemian, jak również powinien wykorzystywać łatwo dostępne reagenty. Ponadto związki użyte do regeneracji kofaktora muszą być niereaktywne wobec innych składników mieszaniny reakcyjnej oraz głównych produktów konwersji [126,127]. Aktualnie istnieją trzy główne metody regeneracji

kofaktorów, tj. chemiczne, elektrochemiczne i enzymatyczne, a ich wady i zalety zostały sumarycznie zestawione w tabeli 4.

Tabela 4. Zalety i wady różnych metod regeneracji kofaktora enzymatycznego

METODY REGENERACJI	ZALETY	WADY
Chemiczne	brak produktów ubocznych, relatywnie tanie, komercyjnie dostępne odczynniki	niska selektywność, toksyczne reagenty, emisja zanieczyszczeń
Elektrochemiczne	odnawialna energia elektryczna, brak produktów ubocznych	niska selektywność, fouling elektrod, skomplikowana aparatura
Enzymatyczne	wysoka selektywność, przyjazne środowisku, łatwa kontrola procesu	niska stabilność enzymu, stosunkowo wysoki koszt, separacja produktów

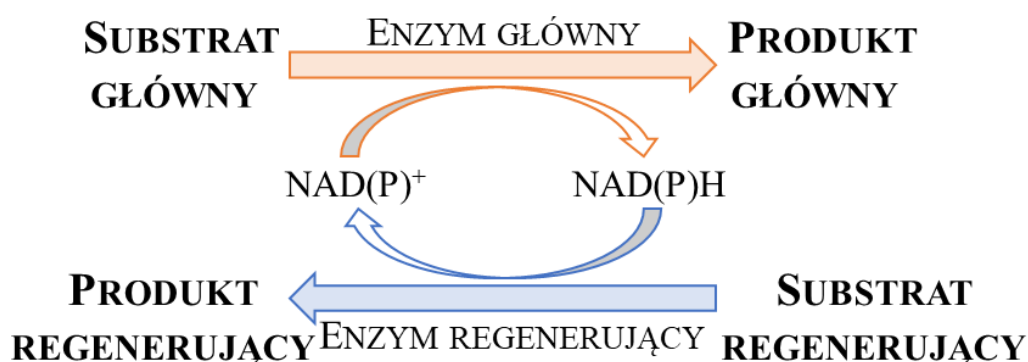
Chemiczne metody regeneracji kofaktora polegają na wprowadzeniu do układu reakcyjnego dodatkowego reagenta, który odpowiada za przeniesienie elektronów z jednej postaci kofaktora do drugiej. Najważniejszym kryterium przy doborze tego związku chemicznego jest odwracalne wiązanie się z kofaktorem oraz zachowanie jednorodności środowiska reakcji [128]. Wśród przykładów stosowanych substancji można wymienić mononukleotyd flawinowy czy mediatory *o*-chinoidowe, tj. tris-(1,10-fenantrolina-5,6-dion) rutenu(II) lub kompleksy pentametylocyklopentadienylowe rodu(III) [129,130]. Warto podkreślić, że chemiczne metody regeneracji są stosunkowo tanie, nie generują produktów ubocznych i można je łatwo monitorować. Spośród wszystkich znanych metod są najprostsze do przeprowadzenia, jednak wprowadzenie dodatkowych substancji chemicznych do układu reakcyjnego może stwarzać ryzyko inaktywacji lub denaturacji enzymów. Należy także dodać, że istotną rolę w ocenie metody regeneracji odgrywa liczba obrotów kofaktora (z ang. *total turnover number*; TTN), która jest definiowana jako całkowita ilość moli produktu uzyskanego w obecności jednego mola kofaktora. W przypadku chemicznych technik recyklingu kofaktora TTN jest stosunkowo niska, ponieważ jej wartość nie przekracza 100 [131].

Dodatkowe substancje nie są natomiast wprowadzane do układu reakcyjnego w przypadku wykorzystania elektrochemicznych metod regeneracji kofaktora. Wspomniane techniki opierają się na reakcjach utleniania i redukcji przy zastosowaniu zewnętrznego źródła prądu, co zapewnia łatwy transport elektronów. Istotne znaczenie w skuteczności tych metod ma dobór odpowiedniego materiału elektrody oraz potencjału

użytego w trakcie procesu. Odpowiedni wybór znacząco wpływa na minimalizację osadzania zanieczyszczeń na powierzchni elektrody, jak również efektywność procesu regeneracji kofaktora. Dla formy utlenionej NAD standardowy potencjał redukcyjny przyjmuje wartość $-0,32\text{ V}$, co skutkuje tym, że w przypadku przyłożenia niższego potencjału, NAD^+ ulegnie szybkiej redukcji, podczas gdy wyższa wartość powinna umożliwić przeprowadzenie utleniania NADH. Niezwykle ważny jest także odpowiedni dobór materiału elektrodowego, o preferowanych właściwościach morfologicznych i rozwiniętej powierzchni właściwej. Jako materiał katodowy najczęściej wykorzystywany jest amalgamat glinu, srebra, złota lub grafit. Natomiast w przypadku materiału anodowego zastosowanie znajduje tlenek cyny(IV) lub platyna [132-136]. W jednej ze swoich prac Ali i in. [137] zaproponowali przeprowadzenie regeneracji NADH z wykorzystaniem niezmodyfikowanych elektrod tytanowych, niklowych, kadmowych i kobaltowych, pracujących przy niskiej wartości potencjału katody, wynoszącej $-0,8\text{ V}$. Warto zauważyć, że każdy z zaproponowanych układów umożliwiał regenerację NADH z wydajnością ponad 80%. Wydaje się zatem, że regeneracja elektrochemiczna powinna być prosta, tania i łatwa do kontrolowania. Jednak w praktyce często występuje zjawisko zanieczyszczenia elektrod i osadzania się na nich składników mieszaniny reakcyjnej, co powoduje znaczne ograniczenia w funkcjonowaniu elektrod i wymusza ich czyszczenie przy użyciu wysokich potencjałów [127].

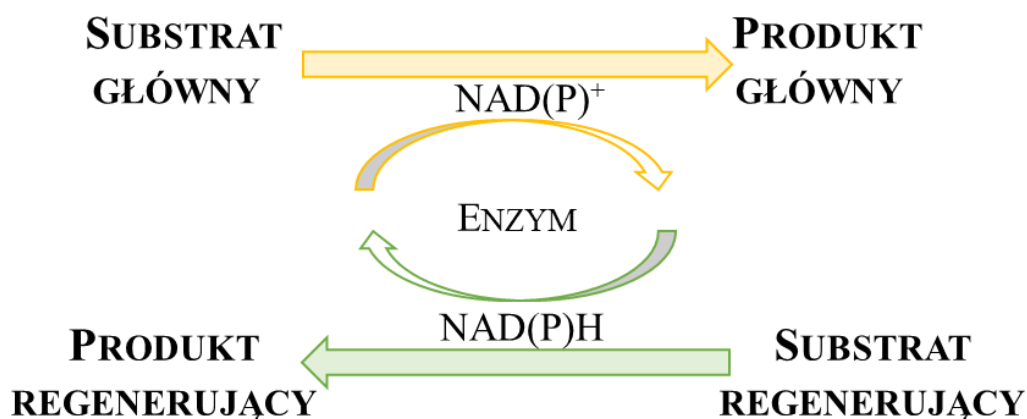
W porównaniu do metod chemicznych i elektrochemicznych, techniki enzymatyczne wykazują wysoką wydajność, a liczba TTN jest rzędu setek do tysięcy, co przekłada się na szczególnie wysoką selektywność i efektywność w regeneracji kofaktora [138]. W większości przypadków metody enzymatycznego recyklingu kofaktora opierają się na wprowadzeniu do układu reakcyjnego dodatkowego enzymu, tak zwanego enzymu sprzężonego (regenerującego, z ang. *coupled-enzyme*), którego zadaniem jest katalizowanie reakcji regenerującej kofaktor, co zostało schematycznie przedstawione na rys. 13. W trakcie prowadzonych procesów zachodzą minimum dwie równoległe reakcje enzymatyczne, w których jedna z form kofaktora ulega wyczerpaniu, a druga jest równocześnie odtwarzana. Takie systemy regeneracji wymagają, aby reakcja odpowiadająca za odtworzenie kofaktora była nieodwracalna i zapewniała termodynamiczną siłę napędową dla obu procesów, czego skutkiem powinien być efektywny recykling [139]. Dlatego też najistotniejszą kwestią projektowania takich układów jest umiejętne dobranie dodatkowego substratu oraz enzymu, który katalizuje jego konwersję i jednocześnie odtworzenie kofaktora. W tym celu wymagane jest

przeprowadzenie testów, których zadaniem jest określenie optymalnych warunków procesowych, pozwalających na prawidłowe funkcjonowanie wszystkich sprzężonych biokatalizatorów obecnych w systemie reakcyjnym. Pod uwagę należy wziąć także wysoką specyficzność i aktywność enzymów oraz komercyjną dostępność i koszty odczynników. Duże znaczenie ma również określenie odpowiednich stosunków enzymów, kofaktorów oraz substratów. Nie jest też możliwe opracowanie skutecznego układu biokatalitycznego, w którym nie jest zachowana równowaga pomiędzy kinetyką głównej reakcji, a parametrami kinetycznymi reakcji regenerującej kofaktor [140].



Rys. 13. Schemat regeneracji kofaktora nikotynoamidoadeninowego z wykorzystaniem sprzężonego układu dwóch enzymów

Możliwe jest także przeprowadzenie recyklingu kofaktora z wykorzystaniem innej strategii, która zakłada zaangażowanie jednego enzymu w katalizowanie zarówno głównej, jak i regeneracyjnej reakcji (rys. 14). Kryterium, które dyskwalifikuje większość białek do zastosowania w tym układzie, jest konieczność posiadania zdolności do wykorzystania dwóch form kofaktora: utlenionej i zredukowanej. Co więcej, biokatalizator powinien być w stanie uczestniczyć w syntezie co najmniej dwóch różnych produktów. Wśród enzymów, które nadają się do zastosowania w tej metodzie jest m.in. dehydrogenaza alkoholowa, ponieważ jest ona w stanie katalizować zarówno utlenianie pierwszo- i drugorzędowych alkoholi do odpowiednich aldehydów czy ketonów poprzez przeniesienie anionu wodorkowego do NAD⁺ z równoczesnym uwolnieniem protonu, jak i reakcję odwrotną [141]. Należy jednak zauważyć, że osiągnięcie termodynamicznej równowagi pomiędzy reakcjami jest bardzo trudne, co wiąże się z koniecznością zwiększenia ilości głównego substratu, tak aby zminimalizować współzawodnictwo pomiędzy konwertowanymi związkami o miejsce aktywne enzymu [142,143].



Rys. 14. Schemat regeneracji kofaktora nikotynoamidoadeninowego z wykorzystaniem wielofunkcyjności jednego enzymu

Jeden z opisanych przykładów takiego rozwiązania stanowi dehydrogenaza alkoholowa z *Lactobacillus brevis* zastosowana przez Leuchs i in. [144] w syntezie enancjomerycznie czystych drugorzędowych alkoholi alifatycznych. W celu poprawy efektywności, jak również możliwości prowadzenia ciągłej syntezy z równoczesną regeneracją kofaktora wprowadzono do układu reakcyjnego sprzężony substrat, tj. 2-propanol, który ulegał konwersji do acetonu, a w trakcie badań przebadano cztery główne substraty, takie jak 2-heptanon, 2-oktanon, 2-nonanon i 2-dekanon, pod kątem ich wpływu na efektywność procesu. Wykazano, że liczba obrotów kofaktora obniżała się wraz ze zmniejszaniem się dostępności substratu, dlatego też konieczne wydaje się regularne dostarczanie kolejnych porcji ketonów. Niemniej jednak dla każdego z prowadzonych systemów regeneracji osiągnięto relatywnie wysokie wartości TTN. Najniższą liczbę obrotów kofaktora uzyskano dla procesu z udziałem 2-nonanonu i wyniosła ona 3000, podczas gdy najwyższą wartość obliczono dla konwersji 2-oktanonu i była ona równa 26000. Otrzymane rezultaty jednoznacznie potwierdzają efektywność opracowanych systemów, jak również zasadność wykorzystania dehydrogenazy alkoholowej jako enzymu zdolnego do skutecznego równoczesnego prowadzenia dwóch różnych reakcji. Z kolei Wang i in. [145] zaprojektowali system regeneracji NAD z zastosowaniem jednego enzymu – reduktazy karbonylowej (CR; EC 1.1.1.184), zdolnej do katalizowania konwersji 4-chloro-3-oksobutanianu etylu w (S)-4-chloro-3-hydroksybutanian etylu i równocześnie przemiany 2-propanolu w aceton. Proces prowadzono przez 22 h z efektywnością reakcji biokatalitycznych równą 93% oraz liczbą obrotów kofaktora wynoszącą 12100. Na podstawie przedstawionych rezultatów można wywnioskować, że zaproponowany system został opracowany wydajnie i działa

skutecznie. Dodatkowe potwierdzenie efektywności proponowanego rozwiązania stanowią dane uzyskane w trakcie testów kinetycznych. Określono, że maksymalna szybkość głównej reakcji konwersji wyniosła 43,7 $\mu\text{M}/\text{mg}\cdot\text{min}$, podczas gdy utlenianie 2-propanolu przebiegło z V_{max} równą 34,4 $\mu\text{M}/\text{mg}\cdot\text{min}$. Zatem wydaje się, że regeneracja została przeprowadzona prawidłowo i może być wydajna przez długi czas.

Jednak biorąc pod uwagę aktualnie dostępną wiedzę należy podkreślić, że większość systemów regeneracji jest oparta na minimum dwóch współistniejących enzymach i ogranicza się do opracowania recyklingu kofaktorów nikotynoamidowych, tj. par redoks $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$, które są najczęściej wykorzystywanymi związkami przy wspomaganie enzymów w procesach biotechnologicznych. Interesujący system enzymatyczny zaproponowali Lee i Yeon [146], którzy przeprowadzili konwersję kwasu lewulinowego do kwasu 4-hydroksywalerianowego z wykorzystaniem NADH-zależnej dehydrogenazy 3-hydroksymaślanowej. Realizując wstępne analizy głównej reakcji wykazano, że możliwe jest wytworzenie kwasu z wydajnością około 39% w trakcie 6 h. Po wprowadzeniu do mieszaniny reakcyjnej kwasu mrówkowego i NAD^+ -zależnej dehydrogenazy mrówczanowej jako substratu i enzymu biorących udział w reakcji regenerującej, efektywność syntezy kwasu 4-hydroksywalerianowego, prowadzonej przez taki sam okres, wzrosła do 100%. Taki rezultat potwierdza jak ogromny wpływ ma wyczerpywanie się kofaktora na efektywność prowadzonych procesów. Z kolei Kohl i in. [147] zaproponowali układ enzymatyczny, który odpowiadał za prowadzenie reakcji kaskadowych dążących do otrzymania oligo- ϵ -kaprolaktonu z jednoczesną samoregeneracją zredukowanej formy kofaktora NADP. Kompleks biokatalityczny składał się z monooksygenazy cykloheksanonu (CHMO; EC 1.14.13.22), dehydrogenazy alkoholowej oraz lipazy. W pierwszym etapie proces polegał na utlenieniu cykloheksanolu do cykloheksanonu przez NADP^+ -zależną dehydrogenazę alkoholową, następnie NADPH -zależna monooksygenaza cykloheksanonu przekształcała cykloheksanon w ϵ -kaprolakton. Finalnie produktem końcowym był oligo- ϵ -kaprolakton wytworzony poprzez polimeryzację z otwarciem pierścienia, która była katalizowana przez lipazę. Zaproponowane reakcje następcze przeprowadzono z relatywnie wysoką efektywnością, ponieważ już po 16 h prowadzenia procesu wydajność biokonwersji cykloheksanolu przekroczyła 80%. Niemniej jednak należy zauważyć, że składniki mieszaniny reakcyjnej miały wpływ na aktywność monooksygenazy cykloheksanonu, a jej inhibicja wzrastała wraz z rosnącą początkową zawartością cykloheksanonu, co wymaga skutecznego rozwiązania przed potencjalnym

zwiększeniem skali procesu. Ponadto ustalono, że maksymalne stężenie substratu, które może zostać przekształcone przez enzym, wynosi 60 mM i jest to graniczne stężenie, które nie powoduje znaczącej utraty aktywności białka. Wydaje się, że potencjalnym rozwiązaniem problemu niskiej stabilności, szybkiej utraty aktywności katalitycznej i ograniczeniem wpływu inhibicji na aktywność enzymu mogłoby być zastosowanie immobilizowanych biokatalizatorów, które często charakteryzują się zwiększoną stabilnością termiczną i chemiczną, jak również odpornością na wpływ warunków otaczającego je środowiska reakcyjnego, w porównaniu do ich natywnych odpowiedników.

Dlatego też Gao i in. [148] przeprowadzili przekształcenie L-arabinitolu w L-ksylulazę przy użyciu NAD^+ -zależnej dehydrogenazy L-arabinitolu (EC 1.1.1.11) z równoczesną regeneracją kofaktora z wykorzystaniem oksydazy NADH (EC 1.6.3.4). Celem poprawy stabilności, enzymy zostały unieruchomione za pomocą alginianu wapnia, a początkowy stosunek białek wynosił 1:1. Immobilizowany biokatalizator umożliwił przeprowadzenie biokonwersji z wydajnością 96%, podczas gdy wolne enzymy były zdolne przekształcić arabinitol z efektywnością nie wyższą niż 33%. Co więcej, po 7 następujących po sobie cyklach katalitycznych osadzone enzymy zachowały ponad 65% początkowej aktywności. Należy jednak zauważyć, że wraz ze zwiększaniem ilości głównego substratu malała wydajność prowadzonych procesów, co mogło wynikać z ograniczonej ilości dostępnych miejsc aktywnych enzymów, których struktura uległa zaburzeniu w konsekwencji przeprowadzonego procesu koimmobilizacji. Dlatego też istotne jest zdefiniowanie wpływu stosunku białek na skuteczność proponowanego systemu, szczególnie biorąc pod uwagę fakt, że różnica między szybkościami tworzenia L-ksylulozy dla układu bez i z reakcją regeneracyjną jest niewielka i wynosi 0,08 mM/min. Równie stabilny, wydajny i mogący być wielokrotnie zastosowany biokatalizator opracowali Zhang i in. [149]. System regeneracji kofaktora enzymatycznego opierał się na jednoczesnej konwersji glicerolu i ksylozy. NAD^+ -zależna dehydrogenaza glicerolu oraz NADH-zależna reduktaza ksylozy zostały koimmobilizowane na nanocząsteczkach poli(metakrylanu metylu-dimetakrylanu etylenu-kwasu metyloakrylowego). Użycie takiej samej ilości (1U) unieruchomionego i wolnego biokatalizatora pozwoliło na otrzymanie 1,3-dihydroksyacetonu o stężeniach odpowiednio 8,2 mM i 7,3 mM. Uzyskane rezultaty korespondowały z liczbą obrotów kofaktora, która wyniosła 82 i 73. Można zatem zauważyć poprawę produktywności i stabilności proponowanego systemu biokatalitycznego, w porównaniu do stosowania

natywnych form białek. Co więcej, immobilizowane enzymy umożliwiły przeprowadzenie 10 cykli katalitycznych z zachowaniem 50% swojej początkowej aktywności. Przeprowadzono także modelowanie w układzie ze stosunkiem enzymów 1:1, które miało na celu oszacowanie optymalnego początkowego stężenia kofaktora wprowadzanego do systemu reakcyjnego. Na podstawie parametrów kinetycznych i z uwzględnieniem potencjalnych efektów hamowania i dezaktywacji enzymów wykazano, że optymalna wartość stężenia kofaktora w mieszaninie reakcyjnej to 0,1 mM i jest to wartość, która jest możliwa do utrzymania na stałym poziomie za pomocą efektywnie działającej regeneracji.

Należy podkreślić, że kofaktory enzymatyczne stanowią element niezbędny do prawidłowego funkcjonowania białek, a w konsekwencji do skutecznego przeprowadzenia przemian biokatalitycznych. Ich wyczerpywanie się w trakcie trwania procesów jest znacznym ograniczeniem, niemniej jednak analiza dostępnej wiedzy w zakresie enzymatycznej regeneracji kofaktorów potwierdza, że wytworzenie i potencjał aplikacyjny takich układów mogą być podstawą do szerszego zastosowania enzymów w syntezie wysoce użytecznych związków chemicznych w skali przemysłowej. Co więcej, skuteczne prowadzenie recyklingu kofaktorów istotnie wpływa na zminimalizowanie kosztów związanych z koniecznością dostarczenia stechiometrycznej ilości kofaktora. Wydaje się również, że immobilizacja białek może być kluczowym elementem w rozwoju enzymatycznych metod regeneracji kofaktorów. Jak wskazują doniesienia literaturowe, przyłączenie enzymów do nośnika pozwala nie tylko na zwiększenie stabilności i wytrzymałości układu, ale także umożliwia pracę biokatalizatorów w szerszym zakresie warunków procesowych lub pozwala na ich łatwe odseparowanie z mieszaniny reakcyjnej.

Biorąc pod uwagę konieczność doprowadzania do układów reakcyjnych kofaktorów enzymatycznych, szczególnie w przypadku procesów katalizowanych przez oksydoreduktazy, wydaje się, że tematyka regeneracji tych związków jest bezpośrednio związana z konwersją składników biomasy. Na podstawie przedstawionego przeglądu literaturowego można zatem wywnioskować, że trudności w wykorzystaniu kofaktorów i enzymów są jednym z czynników mających wpływ na ograniczone użycie biomasy jako surowca w procesach na skalę przemysłową. Dlatego też niezwykle ważne wydaje się podkreślenie istoty podjęcia badań nad opracowywaniem efektywnych systemów enzymatycznych, które będą skuteczne w zastosowaniu w przetwarzaniu biomasy lignocelulozowej z równoczesną regeneracją kofaktorów.

4. Idea poznawcza i cel pracy

Biorąc pod uwagę fakt wyczerpywania zasobów naturalnych koniecznym jest poszukiwanie alternatywnych źródeł surowców. Dlatego też stale rośnie zainteresowanie wykorzystaniem biomasy, z której możliwe jest pozyskanie energii oraz szerokiej gamy chemikaliów. Zastosowanie enzymatycznej konwersji pozwala na przekształcenie surowców roślinnych i odzwierzęcych w produkty o wysokim znaczeniu użytkowym. Jednymi z najpowszechniejszych produktów przetwórstwa biomasy lignocelulozowej są monosacharydy, w tym ksyloza i glukoza, które mogą podlegać dalszym reakcjom katalizowanym enzymatycznie, a ich efektem jest powstanie związków chemicznych o dużym potencjale aplikacyjnym. Jednak praktyczne zastosowanie układów enzymatycznych w procesach związanych z konwersją biomasy wiąże się z szeregiem niedogodności, tj. szybka utrata aktywności katalitycznej, niska stabilność mechaniczna lub ograniczona możliwość ponownego użycia, a także konieczność stosowania kofaktorów enzymatycznych, które są związkami niezbędnymi do osiągnięcia wysokiej aktywności katalitycznej białek, a w trakcie procesów biotechnologicznych ulegają wyczerpaniu. Jednym z potencjalnych rozwiązań, którego celem jest podniesienie potencjału użytkowego biokatalizatorów i usprawnienie prowadzonych procesów konwersji biomasy oraz regeneracji kofaktora jest zastosowanie procesu immobilizacji i/lub koimmobilizacji enzymów.

Dlatego też zgodnie z dostępną wiedzą i aktualnymi doniesieniami literaturowymi postawiono hipotezę badawczą, która zakładała, że koimmobilizowane enzymy są zdolne do efektywnej konwersji wybranych składników biomasy do związków o wysokim potencjale aplikacyjnym oraz prowadzenia jednoczesnej regeneracji kofaktora enzymatycznego. Ponadto dobór odpowiednich warunków procesowych pozwala na uzyskanie wysokich wydajności prowadzonych przemian biokatalitycznych, a właściwa konfiguracja reaktora enzymatycznego może nie tylko podnieść sprawność prowadzonych procesów, ale także zwiększyć czystość mieszanin poreakcyjnych.

Jednakowoż brak dotychczasowych kompleksowych i uniwersalnych rozwiązań zapewniających jednocześnie wysoką sprawność operacyjną i stabilizację enzymów, a także znaczną efektywność realizowanych przemian był główną przyczyną poznawczą podjętych badań. Zatem konieczne są zintensyfikowane wysiłki, celem których jest opracowanie zaawansowanych biosystemów, w których białka dobrane są w taki sposób, aby katalizowane przez nie reakcje mogły równocześnie zostać wykorzystane do

konwersji składników biomasy i jednoczesnej regeneracji kofaktora enzymatycznego. Opracowanie takich systemów biokatalitycznych powinno w znacznym stopniu zwiększyć stabilność enzymów oraz ułatwić ich ponowne wykorzystanie w kolejnych cyklach reakcyjnych. Należy jednak zauważyć, że doniesienia literaturowe podejmujące zagadnienia koimmobilizacji białek, a następnie ich zastosowania w konwersji składników biomasy są niezwykle ograniczone. Co ważne, brakuje też prac z zakresu enzymatycznej regeneracji kofaktora z wykorzystaniem unieruchomionych biokatalizatorów, jak również prowadzenia wspomnianych procesów w enzymatycznych reaktorach membranowych, celem otrzymywania produktów i ich jednoczesnej separacji z mieszaniny reakcyjnej oraz regeneracji kofaktora.

Na podstawie postawionej hipotezy badawczej, a także po wnikliwej analizie istniejących doniesień literaturowych oraz sprecyzowaniu luk technologicznych zdefiniowano cel pracy doktorskiej, którym było wytworzenie układów enzymatycznych opartych o biokatalizatory z grupy oksydoreduktaz, głównie dehydrogenaz, koimmobilizowanych na nośnikach nieorganicznych i membranach filtracyjnych, umożliwiających jednoczesną konwersję składników biomasy i regenerację kofaktora enzymatycznego. Opracowanie wydajnych systemów biokatalitycznych obejmowało dobór odpowiedniego nośnika, techniki immobilizacji, optymalizację warunków prowadzenia koimmobilizacji, a także weryfikację efektywności tego procesu. W trakcie prac wytworzone systemy poddano wnikliwej charakterystyce fizykochemicznej, jednak kluczową częścią badań było przetestowanie opracowanych układów enzymatycznych w procesach biokonwersji wybranych składników biomasy, głównie monosacharydów, z jednoczesną regeneracją kofaktora, jakim był dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy. Istotą tego etapu prac stanowiło otrzymanie systemu reakcyjnego, który pozwoli na przeprowadzenie powyższych procesów z jak najwyższą efektywnością oraz przy użyciu możliwie najmniejszej ilości kofaktora. Dodatkowo jednym z ważniejszych celów badań było podjęcie próby wyodrębnienia finalnych produktów z mieszaniny poreakcyjnej z wykorzystaniem enzymatycznego reaktora membranowego, w celu uzyskania związków o wysokiej czystości. Podjęto też badania nad zdefiniowaniem zmian aktywności enzymów w następujących po sobie cyklach reakcyjnych, co determinuje możliwe praktyczne zastosowanie proponowanych systemów, a dodatkową wartością naukową i użyteczną pracy doktorskiej, stanowiło zdefiniowanie skuteczności opracowanych układów biokatalitycznych w konwersji składników biomasy prowadzonych z roztworów rzeczywistych po obróbce wstępnej.

Ze względu na rozbudowaną strukturę badań i ich wieloaspektowość, cel pracy podzielono na kilka głównych etapów, które realizowano według poniższego planu:

1. Przygotowanie materiału nośnika:

- synteza i modyfikacja mezoporowatej krzemionki SBA-15 oraz materiału kompozytowego $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$,
- odpowiednie przygotowanie i oczyszczenie membran nanofiltracyjnych.

2. Przeprowadzenie procesu koimmobilizacji enzymów na opracowanych wcześniej materiałach:

- dehydrogenazy ksylozowej z dehydrogenazą alkoholową na materiale $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ (XDH/ADH- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$),
- dehydrogenazy ksylozowej z dehydrogenazą alkoholową na membranie nanofiltracyjnej (XDH/ADH-membrana),
- dehydrogenazy ksylozowej z dehydrogenazą 3-hydroksymaślanową na membranie nanofiltracyjnej (XDH/3HBDH-membrana),
- dehydrogenazy glukozowej z dehydrogenazą 3-hydroksymaślanową na membranie nanofiltracyjnej (GDH/3HBDH-membrana),
- dehydrogenazy ksylozowej, dehydrogenazy glukozowej i dehydrogenazy 3-hydroksymaślanowej na krzemionce SBA-15 (XDH/GDH/3HBDH- SiO_2).

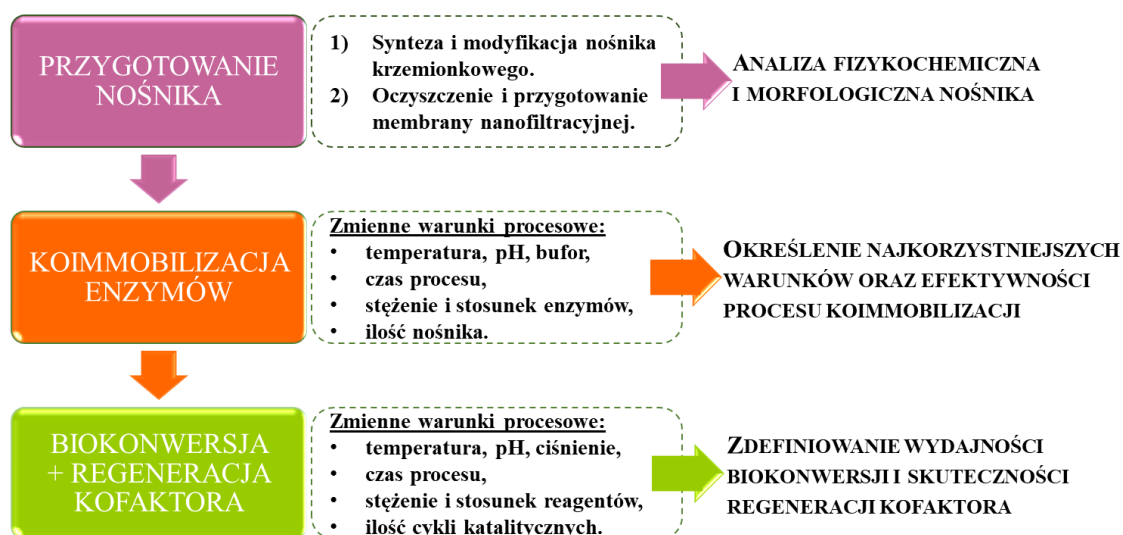
3. Analiza fizykochemiczna otrzymanych systemów biokatalitycznych i weryfikacja efektywności immobilizacji w zmiennych warunkach procesowych poprzez:

- ocenę morfologii i fizykochemii powierzchni,
- charakterystykę grup funkcyjnych,
- analizę składu elementarnego,
- zdefiniowanie charakteru hydrofilowo-hydrofobowego, jak i potencjału elektrokinetycznego,
- ocenę parametrów struktury porowatej.

4. Testy aplikacyjne opracowanych systemów enzymatycznych w procesie konwersji składników biomasy z równoczesną regeneracją kofaktora i wyznaczenie najkorzystniejszych warunków procesowych dla prowadzonych przemian, takich jak:

- temperatura i pH środowiska,
 - ciśnienie w układzie reakcyjnym,
 - czas procesu,
 - stężenie substratów i stosunek kofaktorów,
 - ilość cykli katalitycznych,
 - stabilność w trakcie przechowywania,
 - ocena regeneracji i stabilności kofaktora.
5. Separacja produktu końcowego oraz analiza jakościowa i ilościowa otrzymanych produktów reakcji:
- opracowanie koncepcji i zastosowanie enzymatycznego reaktora membranowego,
 - przygotowanie metodologii analizy produktów reakcji z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas.
6. Próba transferu zaprojektowanych systemów biokatalitycznych z roztworów modelowych na roztwory rzeczywiste.

Na rys. 15 w sposób schematyczny zaprezentowano badania realizowane w niniejszej pracy doktorskiej, wraz z wyszczególnieniem najważniejszych analizowanych zmiennych.



Rys. 15. Schematyczne przedstawienie zakresu badań i etapów realizacji pracy doktorskiej

5. Opis i dyskusja osiągnięć badawczych

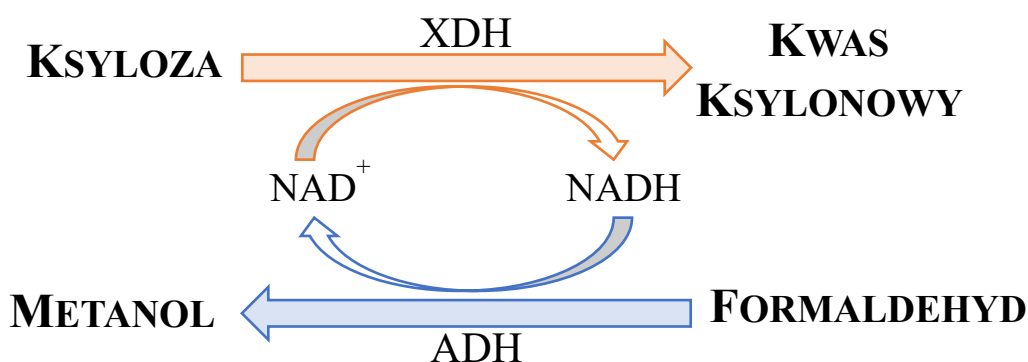
Postawiona w pracy hipoteza badawcza zakłada, że koimmobilizowane enzymy są zdolne do efektywnej konwersji wybranych składników biomasy oraz równoczesnego prowadzenia regeneracji kofaktora enzymatycznego. W ramach przedkładanej dysertacji przeprowadzono badania, których rezultaty stanowiły podstawę do zweryfikowania wstępnych założeń pracy, a także potwierdziły realizację założonego celu. Dlatego też w **Publikacjach 1–3** skupiono się na zaprojektowaniu układów enzymatycznych opartych o dehydrogenazę ksylozy i dehydrogenazę alkoholową, jako enzym regenerujący kofaktor, koimmobilizowanych na wybranych nośnikach różnego pochodzenia. Kluczowe na tym etapie było zdefiniowanie najkorzystniejszych warunków procesowych oraz zastosowanie wytworzonych systemów w konwersji ksylozy i jednoczesnej regeneracji NAD^+ . Natomiast w ramach prac zaprezentowanych w **Publikacjach 4–5** opracowano systemy enzymatyczne, w których z dehydrogenazą ksylozy i dehydrogenazą glukozy sprzężona była dehydrogenaza 3-hydroksymaślanowa, odpowiedzialna za regenerację NAD^+ , ale także umożliwiająca konwersję kwasu lewulinowego, który stanowi inhibitor biokatalizatorów stosowanych w procesie konwersji biomasy. W trakcie tych badań najistotniejsze było określenie wpływu wybranych parametrów procesowych na efektywność prowadzonych procesów konwersji ksylozy i glukozy, jak również porównanie zaprojektowanych systemów z układami, w których obecne były wolne enzymy oraz mieszane formy biokatalizatorów, tzn. jedno z białek brało udział w reakcji w formie natywnej, natomiast drugie w postaci zimmobilizowanej.

Wśród kluczowych aspektów opracowywania nowatorskich systemów enzymatycznych należy wymienić m.in. wybór i przygotowanie nośnika do koimmobilizacji białek. Dobór nośnika podyktowany był jego właściwościami fizykochemicznymi, z których najważniejszą rolę odgrywały rozwinięta powierzchnia właściwa oraz obecność grup funkcyjnych, ze względu na fakt, że wpływają one na potencjalną kompatybilność materiału z enzymami, a wybór odpowiedniej matrycy był niezbędny do opracowania stabilnych układów biokatalitycznych. Co więcej, dobór metody koimmobilizacji, jak również warunków procesowych został wnikliwie przebadany, a finalnie określono efektywność prowadzonych procesów. Opracowane systemy poddano też zaawansowanej analizie fizykochemicznej, aby zdefiniować zmiany zachodzące w strukturze nośnika przed i po naniesieniu enzymów. Następnie w celu

sprawdzenia potencjału użytkowego otrzymanych układów przeprowadzono konwersję monosacharydów z jednoczesną regeneracją NAD^+ , co stanowiło o wysokiej wartości naukowej oraz nowatorskim aspekcie prowadzonych badań. W ramach wykonanych eksperymentów nie tylko określono wpływ zmiennych parametrów procesowych na efektywność biokonwersji ksylozy i glukozy z roztworów modelowych i rzeczywistych oraz efektywną regenerację kofaktorów, ale również podjęto próbę opracowania skutecznej metody separacji produktów końcowych reakcji.

5.1. Systemy biokatalityczne z dehydrogenazą alkoholową jako enzymem regenerującym NAD^+

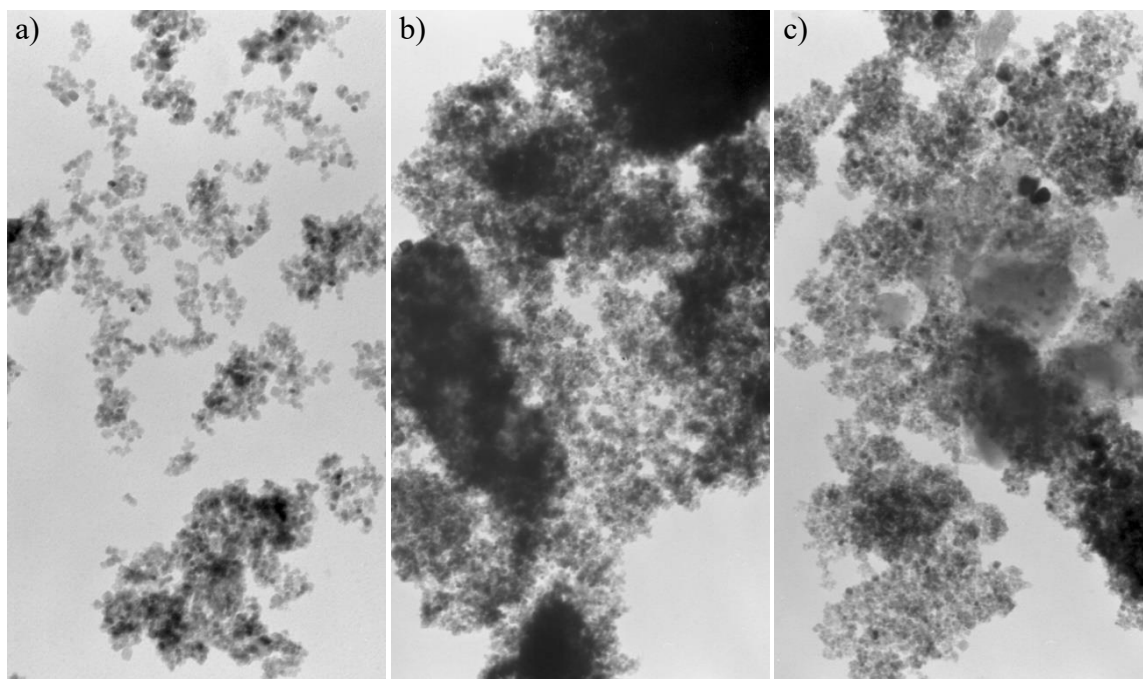
Zastosowanie dehydrogenazy alkoholowej, jako enzymu regenerującego kofaktor w systemach z unieruchomioną dehydrogenazą ksylozy, wydaje się być interesującym rozwiązaniem zwłaszcza pod kątem efektywnej konwersji ksylozy z równoczesną regeneracją NAD^+ . Oba wspomniane biokatalizatory jako substraty wykorzystują powszechnie dostępne związki i są zdolne do osiągnięcia pełni aktywności katalitycznej w łagodnych i zbliżonych warunkach procesowych. Co więcej, ADH jest enzymem pozyskiwanym na szeroką skalę i komercyjnie dostępnym. Istotę stosowania dehydrogenazy alkoholowej stanowi jej zdolność do prowadzenia reakcji konwersji formaldehydu do metanolu w obecności formy zredukowanej dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, która powstaje z NAD^+ w trakcie przekształcania ksylozy w kwas ksyłonowy z wykorzystaniem NAD^+ -zależnej dehydrogenazy ksylozy. Zatem możliwe jest przeprowadzenie wysoce efektywnej konwersji ksylozy z równoczesną regeneracją kofaktora. Na rys. 16 przedstawiono schematycznie przebieg reakcji zachodzących z wykorzystaniem opisywanej pary enzymatycznej XDH/ADH.



Rys. 16. Schemat przedstawiający reakcje przebiegające w układzie biokatalitycznym XDH/ADH

W **Publikacji 1** zaprezentowano rezultaty badań związane z opracowaniem systemu koimmobilizowanych XDH i ADH na materiale kompozytowym $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$. W pierwszym kroku zsyntezowano cząstki magnetytu, mającego stanowić rdzeń nośnika, a następnie naniesiono na nie powłokę krzemionkową. Otrzymany w ten sposób materiał zastosowano w koimmobilizacji adsorpcyjnej dehydrogenazy ksylozy i dehydrogenazy alkoholowej, którą przeprowadzono w buforze MES o pH 7 i w temperaturze 25 °C. W celu scharakteryzowania morfologii oraz wielkości cząstek otrzymanego materiału $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ przed i po koimmobilizacji enzymów wykonano zdjęcia z transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM). Analiza zdjęć TEM wykazała, że wielkość cząstek czystego magnetytu wahała się w zakresie od 10 do 15 nm (rys. 17a), podczas gdy po naniesieniu warstwy krzemionki średnie wielkości cząstek materiału kompozytowego znacznie się zwiększyły, przyjmując wartości od 20 do 30 nm (rys. 17b). Ten rezultat wskazuje na skuteczne przeprowadzenie syntezy materiału magnetyt-krzemionka oraz w konsekwencji zapewnienie dużej powierzchni właściwej do potencjalnego związania enzymu [150]. Co ciekawe, po koimmobilizacji enzymów średnie wielkości cząstek nośnika nie uległy znaczącej zmianie (rys. 17c). Oznacza to, że proces unieruchomienia białek miał znikomy wpływ na wielkość cząstek materiału magnetyt-krzemionka, co może wynikać z osadzenia enzymów także w porach nośnika, a nie tylko na jego powierzchni [151].

Efektywność przeprowadzonej koimmobilizacji enzymów pośrednio potwierdzono z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR). Na widmie FTIR czystego nośnika odnotowano obecność sygnałów pochodzących od drgań rozciągających wiązań Fe–O oraz od drgań rozciągających i zginających wiązań Si–O–Si, co wskazuje na skuteczne zsyntezowanie materiału kompozytowego. Natomiast dla próbki po koimmobilizacji enzymów zaobserwowano, poza sygnałami charakterystycznymi dla materiału nośnika, także pasma pochodzące od drgań rozciągających wiązań amidowych I, II i III, jak również od drgań rozciągających wiązań C–H. Obecność tych sygnałów na widmie materiału po unieruchomieniu enzymów pośrednio potwierdza skuteczne przeprowadzenie koimmobilizacji, co wynika z faktu, że wspomniane wiązania tworzą szkielet białka i stanowią podstawę jego struktury [152]. Dodatkowo z wykorzystaniem metody Bradford określono wydajność koimmobilizacji enzymów, która wyniosła 83%.

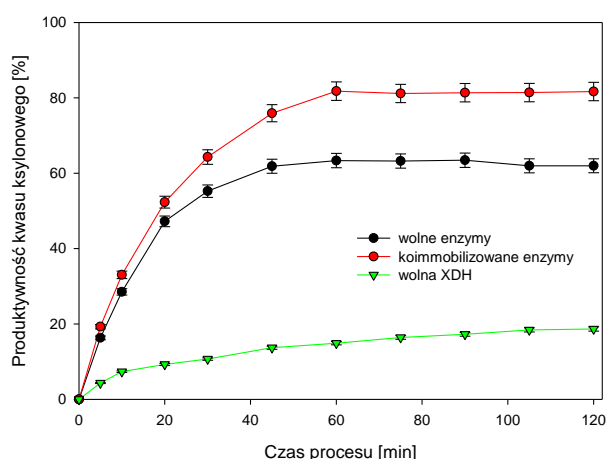


Rys. 17. Zdjęcia TEM: a) wyjściowego magnetytu, b) materiału kompozytowego $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ oraz c) nośnika po koimmobilizacji XDH i ADH

W trakcie prowadzonych badań zdefiniowane zostały także właściwości magnetyczne otrzymanych materiałów. W temperaturze otoczenia, zarówno próbki magnetytu, materiału kompozytowego, jak i nośnika po koimmobilizacji enzymów wykazały właściwości superparamagnetyczne. Należy jednak odnotować, że wraz ze zwiększaniem się grubości warstwy otaczającej magnetyczny rdzeń, malała wartość namagnesowania [153]. Niemniej, zebrane rezultaty wskazują, że wszystkie materiały wykazują właściwości magnetyczne i mogą być łatwo wyizolowywane z mieszaniny reakcyjnej za pomocą zewnętrznego pola magnetycznego, co ma znaczący wpływ na poprawę kontroli procesu.

Po potwierdzeniu efektywności zarówno syntezy materiału kompozytowego magnetyt-krzemionka, jak i koimmobilizacji enzymów, przystąpiono do testów opracowanego systemu biokatalitycznego XDH/ADH- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ w konwersji ksylozy z równoczesną regeneracją kofaktora. Celem jednego z pierwszych przeprowadzonych badań było zdefiniowanie wpływu czasu trwania procesu na jego efektywność (rys. 18). Jak można zauważyć zastosowanie wolnych białek do katalizowania konwersji ksylozy pozwoliło na uzyskanie około 62-proc. wydajności procesu po 2 h jego prowadzenia. Dla porównania wykorzystanie koimmobilizowanych enzymów zapewniło uzyskanie efektywności na poziomie 82% po tym samym czasie. Różnica w produktywności kwasu ksyłonowego jest związana m.in. ze zwiększeniem stabilności układu XDH/ADH po

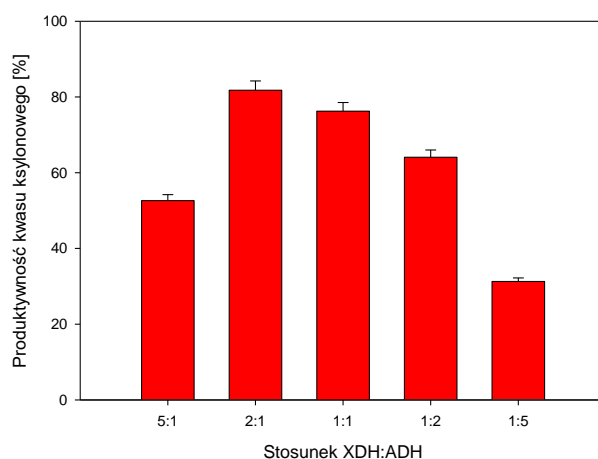
unieruchomieniu białek. Niemniej jednak główną jej przyczyną jest efektywna regeneracja kofaktora, co zapewnia stały dostęp dehydrogenazy ksylozy do kolejnych porcji NAD^+ [154,155]. Znaczenie wpływu recyklingu kofaktora na wydajność prowadzonych procesów podkreślają także rezultaty uzyskane dla procesu konwersji ksylozy prowadzonej przez wolną XDH w układzie bez reakcji regenerującej. Warto bowiem odnotować, że natywna dehydrogenaza ksylozy po 2 h była zdolna do produkcji kwasu ksylonowego z wydajnością zaledwie ok. 20%. Należy również zauważyć, że zarówno w przypadku wolnych biokatalizatorów, jak i ich koimmobilizowanych odpowiedników, maksymalna wartość efektywności procesu zostaje osiągnięta po 1 h, dlatego też z aplikacyjnego punktu widzenia prowadzenie konwersji przez dłuższy czas wydaje się niekorzystne ekonomicznie. W wyniku tych obserwacji postanowiono, że wszystkie dalsze eksperymenty z omawianym układem będą prowadzone przez 1 h.



Rys. 18. Krzywe zależności czasu procesu od produktywności kwasu ksylonowego dla procesów prowadzonych przez wolne i koimmobilizowane XDH/ADH, jak również wolną dehydrogenazę ksylozy

Biorąc pod uwagę zróżnicowanie w aktywności i parametrach kinetycznych dehydrogenazy ksylozy i dehydrogenazy alkoholowej przeprowadzono prace mające na celu określenie najbardziej korzystnego stosunku aktywności enzymów, który pozwoli na osiągnięcie wysokiej efektywności konwersji substratów, jak również zużycie minimalnej ilości białek (rys. 19). Można zauważyć, że wykorzystanie systemu biokatalitycznego, w którym zastosowano XDH:ADH w stosunku 2:1, pozwoliło na uzyskanie maksymalnej wydajności procesu, która wyniosła 82%. Niewiele niższą produktywność kwasu ksylonowego (75%) osiągnięto dla systemu z XDH:ADH w stosunku 1:1. Wydaje się jednak, że różnica w ilości otrzymanego kwasu ksylonowego była na tyle znacząca, że za najkorzystniejszy stosunek aktywności XDH:ADH uznano

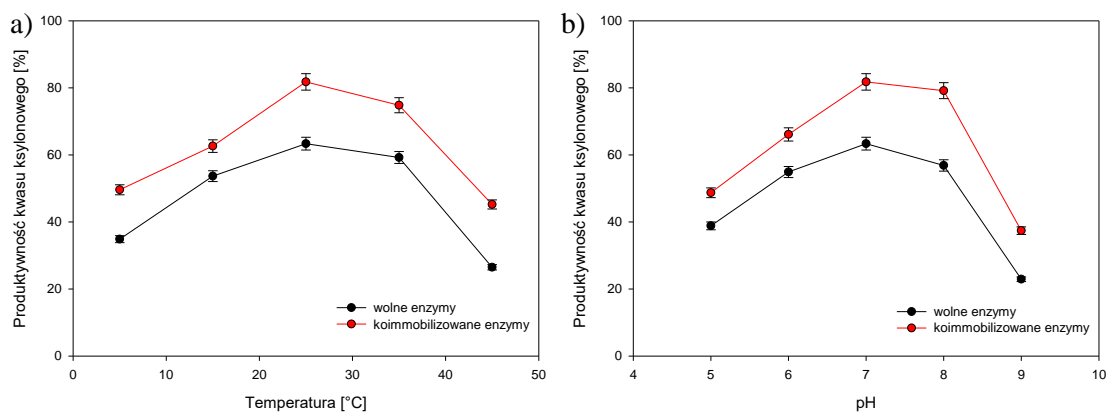
2:1 i dlatego też w dalszej części badań był on konsekwentnie stosowany. Co ciekawe, w przypadku innych proponowanych stosunków XDH:ADH odnotowano znaczne obniżenie wydajności prowadzonych procesów, co mogło być spowodowane niewystarczającą ilością XDH w systemie reakcyjnym (stosunek XDH:ADH 1:1–1:5) lub też nieskuteczną regeneracją NAD^+ , wynikającą z nieodpowiedniej ilości ADH w mieszaninie (stosunek XDH:ADH 5:1). Podobne rezultaty zaobserwowali Zhuang i in. [114], którzy stwierdzili, że unieruchomienie dehydrogenazy glukozy i oksydazy NADH w stosunku 2:1 pozwoliło na uzyskanie najwyższych wydajności podczas produkcji 1,3-dihydroksyacetonu i regeneracji kofaktora. Na podstawie zebranych danych można zatem stwierdzić, że nieznacznie zwiększona ilość XDH w układzie reakcyjnym zapewnia stałą konwersję, zarówno ksylozy w kwas ksylonowy, jak i NAD^+ w NADH, co w konsekwencji powoduje utrzymanie ciągłości w dostarczaniu NADH dla dehydrogenazy alkoholowej, która skutecznie spełnia swoją funkcję podczas prowadzenia wydajnej regeneracji kofaktora.



Rys. 19. Wpływ stosunku aktywności XDH:ADH na produktywność kwasu ksylonowego

Należy zauważyć, że zmiana warunków temperatury i pH procesu na odmienne od najkorzystniejszych dla danych enzymów wpływa zazwyczaj negatywnie na aktywność białek. Dlatego też niezwykle istotne w opracowywaniu wydajnego systemu biokatalitycznego wydaje się zdefiniowanie wpływu tych parametrów na aktywność koimmobilizowanej pary enzymatycznej. Nie należy także zapominać o konieczności określenia warunków procesowych, które będą kompromisem pomiędzy optymalnym środowiskiem dla XDH, jak i dla ADH, tak aby możliwe było skuteczne przeprowadzenie konwersji monosacharydu z równoczesną regeneracją kofaktora. W tym celu wykonano testy konwersji ksylozy z wykorzystaniem wolnych i unieruchomionych

biokatalizatorów w temperaturze w zakresie od 5 do 45 °C, jak również w pH w zakresie od 5 do 9 (rys. 20). Wydajność procesu produkcji kwasu ksylonowego zwiększa się wraz ze wzrostem temperatury oraz pH i osiąga maksymalną wartość (82%) w pH 7 i temperaturze 25 °C. Taki rezultat jest związany z charakterystyką enzymów, które we wspomnianych warunkach osiągają najwyższą aktywność katalityczną. Jednak dalszy wzrost wartości pH i temperatury powoduje zmniejszenie produktywności kwasu ksylonowego. Jednym z powodów takiego stanu rzeczy może być fakt, że ADH wykazuje dużą wrażliwość na zmiany środowiska reakcji w szerszym zakresie pH i temperatury, w porównaniu do XDH, która jest również aktywna w podwyższonej temperaturze i lekko zasadowym pH [156]. Dlatego też, na podstawie zebranych danych, zdecydowano, że eksperymenty z udziałem biokatalizatora XDH/ADH będą prowadzone w pH 7 i temperaturze 25 °C.



Rys. 20. Wpływ: a) temperatury i b) pH na produktywność kwasu ksylonowego z wykorzystaniem wolnych i koimmobilizowanych enzymów

Dodatkowo w całym analizowanym zakresie warunków procesowych wolne i unieruchomione enzymy charakteryzują się zachowaniem zbliżonych profili zależności produktywności kwasu ksylonowego od pH i temperatury. Nie ulega też wątpliwości, że koimmobilizacja enzymów pozwoliła nie tylko na skuteczne przeprowadzenie konwersji ksylozy, ale także wykazano wyższe efektywności konwersji niż w przypadku reakcji prowadzonych przez natywne białka. Jest to efekt silnego związania enzymu z grupami hydroksylowymi krzemionki, co w konsekwencji pozwoliło na wielopunktowe przyłączenie biokatalizatora do nośnika i ustabilizowanie jego struktury. Taka technika immobilizacji ma bezpośredni wpływ na ograniczenie potencjalnej denaturacji białka spowodowanej negatywnym wpływem warunków procesu [157]. Podobne wnioski przedstawili Liu i in. [158], którzy unieruchomili reduktazę wraz z dehydrogenazą

glukozy z wykorzystaniem żelu krzemionkowego, a następnie zdefiniowali skuteczność opracowanego systemu biokatalitycznego w syntezie migdałanu etylu z równoczesną regeneracją NADPH. Uzyskane rezultaty wykazały, że koimmobilizowane białka umożliwiły przeprowadzenie procesów z ponad 60-proc. efektywnością w zakresie temperatury od 35 do 75 °C oraz w pH od 6 do 8.

Niezwykle istotny etap charakterystyki wytworzonego układu obejmował testy mające na celu określenie możliwości jego zastosowania w następujących po sobie cyklach katalitycznych. Należy zauważyć, że po 5 kolejnych reakcjach konwersji ksylozy unieruchomione enzymy zachowały ponad 65% początkowej aktywności. Ten rezultat wskazuje nie tylko na wytworzenie stabilnego wiązania pomiędzy enzymami a nośnikiem, ale także na znaczne ograniczenie wymywania biokatalizatora, co zostało potwierdzone badaniami elucji białek. Dowiedziono bowiem, że w trakcie każdego z cykli katalitycznych ilość wymytych enzymów nie przekroczyła 5%. Stąd też wniosek, że nośnik spełnia swoją funkcję i stanowi ochronę dla unieruchomionego biokatalizatora [159]. Podobne wnioski zostały wyciągnięte przez Pietricola i in. [160], którzy przetestowali dehydrogenazę alkoholową i dehydrogenazę aldehydową unieruchomione na mezoporowatej krzemionce w 3 kolejnych cyklach redukcji wybranych kwasów karboksylowych z zachowaniem 100% początkowej aktywności obu enzymów.

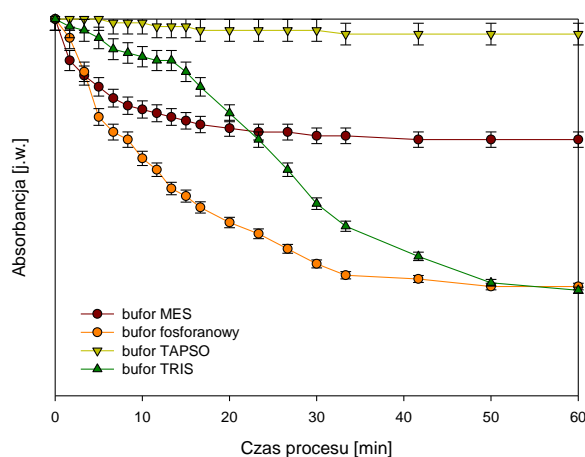
Można zatem podsumować, że w oparciu o analizę rezultatów badań zaprezentowanych w **Publikacji 1**, potwierdzono skuteczność syntezy materiału kompozytowego magnetyt-krzemionka, jak również efektywność unieruchomienia dehydrogenazy ksylozy i dehydrogenazy alkoholowej na przygotowanym nośniku. Najistotniejszym etapem badań było efektywne zastosowanie opracowanego systemu w biokonwersji ksylozy z równoczesną regeneracją kofaktora enzymatycznego. Przeprowadzone testy i analiza ich wyników pozwoliły na zdefiniowanie najkorzystniejszych warunków procesowych, którymi okazały się być pH 7, temperatura 25 °C, 1 h prowadzenia reakcji oraz stosunek aktywności XDH:ADH 2:1. Zapewnienie enzymom takiego środowiska reakcyjnego pozwoliło na otrzymanie kwasu ksylonowego z wydajnością na poziomie 82%. Ponadto dowiedziono, że enzymy po koimmobilizacji charakteryzują się możliwością efektywniejszego przetwarzania ksylozy niż ich natywne odpowiedniki oraz są zdolne do skutecznej regeneracji kofaktora.

Pomimo uzyskania relatywnie wysokiej efektywności procesu biokonwersji ksylozy w pracach zaprezentowanych w **Publikacji 1** z wykorzystaniem układu XDH/ADH–Fe₃O₄–SiO₂, koniecznym wydawało się podjęcie dalszych działań nad poprawą

skuteczności i zmaksymalizowaniem możliwości opracowanego systemu biokatalitycznego. Dlatego też w ramach przygotowania **Publikacji 2** kontynuowano testy nad potencjałem aplikacyjnym pary enzymatycznej XDH/ADH koimmobilizowanej na materiale kompozytowym magnetyt-krzemionka. Przeprowadzono jednak bardziej zaawansowane badania nad wpływem użytego roztworu buforowego na stabilność NADH w mieszaninie reakcyjnej, jak również podjęto się określenia roli potencjalnych inhibitorów w zachowaniu wysokiej stabilności i aktywności katalitycznej enzymów. Co więcej, wykonano testy pozwalające zdefiniować parametry kinetyczne białek wykorzystywanych w omawianym systemie reakcyjnym. Finalnym etapem prac było podjęcie próby wydzielenia głównego produktu z mieszaniny reakcyjnej z wykorzystaniem technik membranowych, co prowadziło do uzyskania kwasu ksylonowego o wysokiej czystości.

W oparciu o aktualne doniesienia literaturowe można stwierdzić, że bufor MES jest obecnie szeroko stosowany w procesach biotechnologicznych. Jednak w ramach badań nad zapewnieniem enzymom najkorzystniejszego środowiska reakcyjnego przetestowano dodatkowo trzy inne, powszechnie dostępne roztwory buforowe o stężeniu 50 mM oraz pH 7 i były to: bufor fosforanowy, bufor TAPSO oraz bufor TRIS. Podczas stosowania buforu TAPSO w trakcie 1 h trwania procesu zaobserwowano brak zmian w absorbancji NADH, co wiąże się bezpośrednio z zachowaniem stałego stężenia tego kofaktora (rys. 21). Nie ulega zatem wątpliwości, że otrzymany wynik był znacznie korzystniejszy niż rezultat uzyskany w środowisku buforu MES, który wykazał obniżenie absorbancji NADH podczas konwersji. Dlatego też przeprowadzono dodatkowe testy w środowisku buforu TAPSO z opracowanym systemem biokatalitycznym, a uzyskane dane wskazały, że jego zastosowanie pozwala na przeprowadzenie biokonwersji ksylozy z 99-proc. efektywnością. Wydaje się zatem, że najkorzystniejsze dla dalszych testów koimmobilizowanych XDH i ADH jest prowadzenie konwersji w obecności buforu TAPSO, który zapewnia odpowiednie środowisko do zachowania wysokiej stabilności enzymów oraz ułatwia skuteczną regenerację kofaktora. Prowadzenie reakcji w obecności pozostałych roztworów buforowych, tzn. buforu fosforanowego i buforu TRIS, nie pozwoliło na zachowanie absorbancji NADH na stałym poziomie. Uzyskane dane mogą wynikać z faktu, że zastosowanie buforu fosforanowego powoduje ograniczenie skutecznego przebiegu regeneracji kofaktora, ze względu na obecność grup fosforanowych, które mogą reagować z pierścieniami pirydynowymi, będącymi częścią struktury dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego [161]. Dodatkowo Li i in. [103]

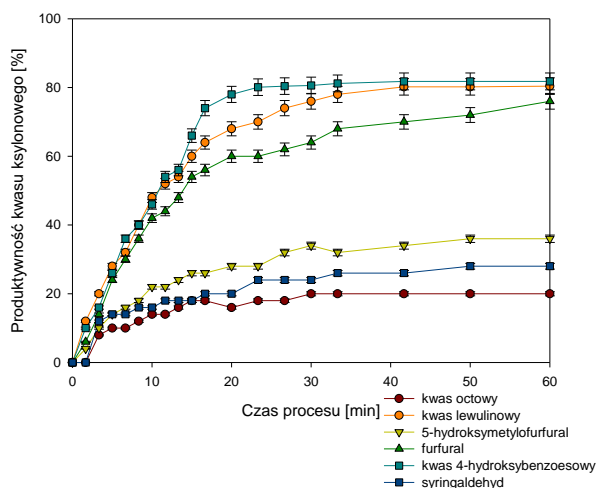
wykazali, że wraz ze wzrostem stężenia stosowanego buforu fosforanowego maleje aktywność katalityczna enzymów obecnych w układzie reakcyjnym. Wykorzystanie buforu TRIS także negatywnie wpłynęło na zachowanie stałej wartości absorbancji NADH w mieszaninie reakcyjnej, co może być wynikiem destabilizacji struktury dehydrogenazy alkoholowej i/lub tworzenia wraz z formaldehydem stabilnych cyklicznych produktów ubocznych, które wpływały inhibitująco na konwersję ksylozy oraz regenerację kofaktora [162].



Rys. 21. Absorbancja NADH w zależności od czasu procesu, z uwzględnieniem rodzaju zastosowanego roztworu buforowego

W perspektywie aplikacji opracowanego systemu biokatalitycznego do konwersji monosacharydów z roztworów rzeczywistych niezwykle ważne wydaje się również określenie wpływu potencjalnych inhibitorów na produktywność kwasu ksylonowego (rys. 22). Dobór związków inhibitujących oraz ich stężenia zostały dokonane na podstawie rzeczywistych ilości tych substancji, które mogą być obecne w roztworach biomasy po obróbce wstępnej [163,164]. W trakcie prac przebadano związki inhibitujące z trzech różnych grup, tj. słabych kwasów organicznych (kwas octowy, kwas lewulinowy), pochodnych fenolu (syringaldehyd, kwas 4-hydroksybenzoesowy) i pochodnych furanu (furfural, 5-hydroksymetylofurfural). Na podstawie analizy uzyskanych rezultatów można wywnioskować, że najmniejszy wpływ na stabilność koimmobilizowanej pary enzymatycznej miał syringaldehyd i kwas 4-hydroksybenzoesowy. Pomimo obecności tych związków w układzie reakcyjnym możliwe było przeprowadzenie konwersji ksylozy z wydajnością powyżej 80%. Odnotowany nieznaczny inhibitujący wpływ tych substancji na efektywność prowadzonych procesów może wynikać z wielkości cząsteczek i obecności w strukturze

grup fenolowych, co ze względu na zawadę przestrzenną utrudnia ich dostęp do miejsc aktywnych enzymów [165]. Relatywnie wysoką produktywność kwasu ksylonowego uzyskano także w systemie z furfurałem, który w środowisku reakcyjnym mógł ulegać przekształceniu do mniej toksycznych związków, takich jak alkohol furfurylowy lub kwas furoinowy i w konsekwencji tego mieć mniej inhibujący wpływ na aktywność XDH i ADH [166].



Rys. 22. Wpływ związków inhibujących z biomasy na produktywność kwasu ksylonowego

Należy jednak zauważyć, że o ponad 50% niższą produktywność kwasu ksylonowego, w porównaniu do wyników uzyskanych dla systemu z syringaldehydem, zaobserwowano gdy w mieszaninie reakcyjnej obecne były kwasy organiczne lub 5-hydroksymetylofurfural. Stosunkowo niewielkie cząsteczki kwasu octowego i kwasu lewulinowego mogą negatywnie wpłynąć na strukturę białek poprzez blokowanie miejsc aktywnych. Dodatkowo budowa cząsteczki 5-hydroksymetylofurfuralu jest zbliżona do ksylozy, dlatego też inhibitor ten mógł konkurować z cząsteczkami substratu o dostęp do miejsc aktywnych dehydrogenazy ksylozy, co skutkowało obniżeniem efektywności prowadzonych przemian [167]. Jednak biorąc pod uwagę stężenie związków inhibujących w roztworach po obróbce wstępnej, należy zauważyć, że najniższą produktywność kwasu ksylonowego uzyskano w obecności substancji inhibującej o największej zawartości w roztworze biomasy. Wydaje się zatem, że konieczne jest podjęcie prac nad ograniczeniem ilości inhibitorów w roztworach rzeczywistych po konwersji biomasy, aby możliwe było osiągnięcie wysokiej skuteczności wszystkich prowadzonych procesów.

Jak już wspomniano zastosowanie buforu TAPSO oraz najkorzystniejszych warunków procesowych dla koimmobilizowanych XDH i ADH, zdefiniowanych uprzednio w **Publikacji 1**, pozwoliło na przeprowadzenie konwersji ksylozy z wydajnością na poziomie 99%, z równoczesną efektywną regeneracją kofaktora NAD⁺. Dlatego też interesującym wydawało się określenie, który z przebiegających w mieszaninie reakcyjnej procesów jest preferowany kinetycznie. Podjęto się zatem wyznaczenia parametrów kinetycznych enzymów stosowanych w prowadzonych reakcjach. W tym celu stała Michaelis-Menten (K_m) oraz maksymalna szybkość reakcji (V_{max}) zostały zdefiniowane, a następnie porównano ich wartości uzyskane dla procesów z udziałem wolnych i koimmobilizowanych enzymów (tabela 5).

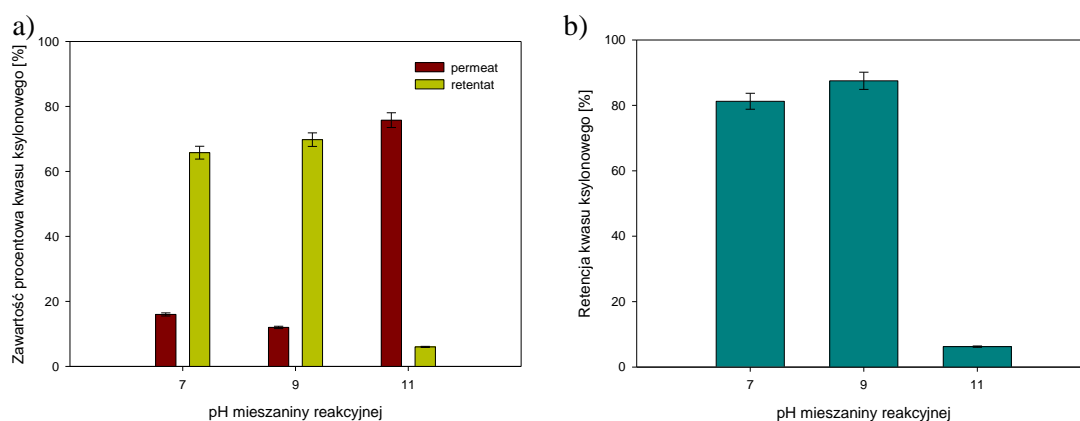
Tabela 5. Parametry kinetyczne wolnych i koimmobilizowanych XDH i ADH

System biokatalityczny	Reakcja	K_m [mM]	V_{max} [U/mg]
wolna XDH	$C_5H_{10}O_5 \rightarrow C_5H_{10}O_6$	0,19±0,03	0,87±0,08
koimmobilizowane XDH		0,23±0,03	0,73±0,09
wolna XDH	NAD ⁺ →NADH	0,43±0,06	0,64±0,05
koimmobilizowana XDH		0,49±0,07	0,57±0,05
wolna ADH	CHOH→CH ₃ OH	7,62±0,83	217,62±17,32
koimmobilizowana ADH		9,43±0,89	189,43±16,94
wolna ADH	NADH→NAD ⁺	0,09±0,01	5,81±0,90
koimmobilizowane ADH		0,14±0,01	5,14±0,91

K_m dla wolnej dehydrogenazy ksylozy wobec ksylozy i NAD⁺ jako substratów przyjęła odpowiednio wartości 0,194 mM i 0,431 mM, podczas gdy korespondujące z nimi maksymalne szybkości reakcji wyniosły 0,87 U/mg i 0,64 U/mg. Natomiast dla enzymów po koimmobilizacji zauważono ponad 15-proc. wzrost wartości stałej Michaelis-Menten oraz około 10-proc. obniżenie wartości V_{max} . Co więcej, podobne zależności odnotowano w przypadku wartości analizowanych parametrów dla koimmobilizowanej i natywnej dehydrogenazy alkoholowej. Otrzymane rezultaty wskazały na zmniejszenie powinowactwa enzymów do substratów dla próbek po koimmobilizacji, co jest charakterystyczne dla większości białek unieruchomionych na nośniku [168,169]. Niemniej jednak z przedstawionych danych wyraźnie wynika, że wartości K_m dla wolnych i koimmobilizowanych enzymów dla reakcji ksylozy i NADH są znacznie niższe niż dla NAD⁺ i formaldehydu, co sugeruje, że opracowany system enzymatyczny jest kinetycznie bardziej ukierunkowany na produkcję kwasu

ksylonowego i regenerację NAD^+ niż na przekształcanie formaldehydu i wytwarzanie NADH, co jest pożądane pod kątem realizacji założonego celu badań.

Finałowym etapem prac nad opracowywanym systemem biokatalitycznym XDH/ADH- Fe_3O_4 - SiO_2 było podjęcie próby wydzielenia produktu głównego, którym jest kwas ksylonowy, z układu reakcyjnego. W tym celu zastosowano separację membranową, a do mieszaniny poreakcyjnej dodano różne ilości NaOH, aby uzyskać roztwory o określonym pH (od 7 do 11). Zmiana pH mieszaniny poreakcyjnej może bowiem wpłynąć pozytywnie na skuteczność retencji kwasu ksylonowego, ze względu na wystąpienia zjawiska odpychania ładunków (z ang. *charge repulsion*) pomiędzy materiałem membrany a rozdzielanym produktem, co wpływa na efektywność rozdziału składników mieszaniny. Dlatego też w trakcie prowadzonych badań określono wpływ pH mieszaniny poreakcyjnej na efektywność rozdziału i retencję kwasu ksylonowego, czego rezultaty zostały przedstawione na rys. 23.



Rys. 23. a) Zawartość kwasu ksylonowego w permeacie i retentacie oraz b) retencja kwasu ksylonowego w zależności od pH mieszaniny reakcyjnej

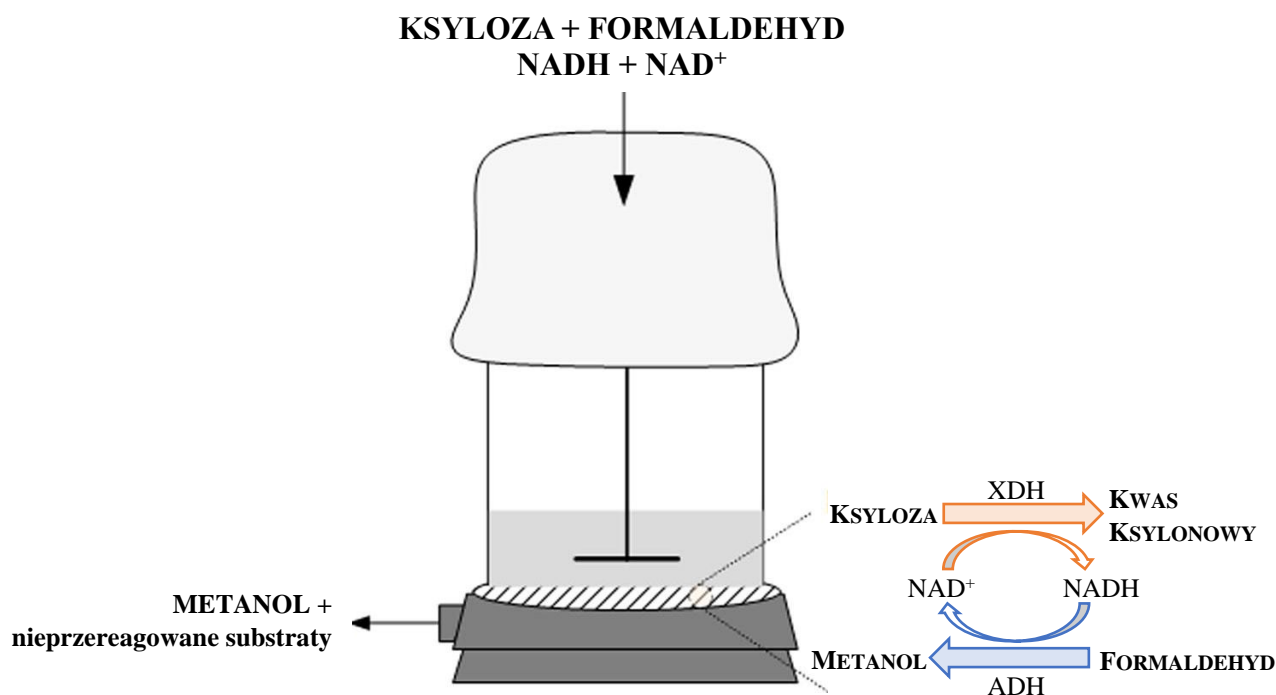
Na podstawie przedstawionych danych można zauważyć, że w środowisku obojętnym (pH 7) oraz lekko zasadowym (pH 9) ilość zatrzymanego w retentacie kwasu ksylonowego wyniosła ponad 80%, podczas gdy dalsze zwiększenie wartości pH skutkowało znacznym obniżeniem jego zawartości w retentacie (mniej niż 10%). Analogiczne wnioski można wysnuć po obliczeniu stopnia retencji głównego produktu, ponieważ najniższą wartość, około 5%, uzyskano dla systemu reakcyjnego pracującego w pH 11. Wysoka przepuszczalność kwasu ksylonowego przez membranę w pH 11 może być spowodowana deformacją porów membrany, poprzez ich pęcznienie i wzrost objętości, co wynika z wysokiego pH środowiska. Należy jednak podkreślić, że w pozostałych testowanych wartościach pH osiągnięto relatywnie wysoki stopień

zatrzymania kwasu ksylonowego nad membraną, szczególnie w przypadku systemu pracującego w pH 9, dla którego stwierdzono, że parametr ten wyniósł ponad 90%. Taki rezultat jest wynikiem wystąpienia zjawiska odpychania ładunków pomiędzy negatywnie naładowaną powierzchnią membrany a anionami kwasu ksylonowego. Ponadto tzw. mechanizm segregacji przesiewowej (z ang. *sieving mechanism*) również wpłynął na uzyskany wynik, ponieważ znacząco ograniczył on przepuszczanie cząsteczek kwasu ksylonowego przez membranę wraz z resztą permeatu. Wystąpienie tego zjawiska było możliwe, ze względu na fakt, że cząsteczka kwasu ksylonowego jest relatywnie duża, a jej średnia masa wynosi ok. 166 Da, w porównaniu do drugiego produktu obecnego w układzie reakcyjnym – metanolu, dla którego ten parametr przyjmuje wartość ok. 32 Da. Zatem wydaje się, że cząsteczki metanolu przechodziły przez membranę, której MWCO (z ang. *molecular weight cut-off*) było odpowiednio dobrane, wraz z resztą permeatu, podczas gdy kwas ksylonowy został zatrzymany nad membraną, w wyniku współdziałania mechanizmu segregacji przesiewowej i zjawiska odpychania ładunków [170]. Uzyskane dane potwierdzają możliwość przeprowadzenia efektywnej konwersji ksylozy z równoczesną regeneracją kofaktora, a następnie skutecznego wydzielenia produktu głównego z mieszaniny reakcyjnej, czego wynikiem było otrzymanie kwasu ksylonowego o wysokiej czystości i możliwości dalszego zastosowania.

Należy zauważyć, że w ramach badań zaprezentowanych w **Publikacjach 1–2** opracowano system biokatalityczny oparty o dehydrogenazę ksylozy i dehydrogenazę alkoholową koimmobilizowane na materiale kompozytowym magnezyt-krzemionka, który pozwolił na przeprowadzenie konwersji ksylozy z 99-proc. efektywnością i jednoczesną regeneracją kofaktora NAD⁺. Wykazano jednak, że zarówno rodzaj zastosowanego medium reakcyjnego, jak i obecność inhibitorów powstających w procesie obróbki wstępnej biomasy w znaczny sposób wpływają na efektywność realizowanych przemian. Niemniej, zebrane dane pozwalają na stwierdzenie, że z kinetycznego punktu widzenia to konwersja ksylozy i recykling NAD⁺ są preferowanymi reakcjami głównymi, co jest pożądane z perspektywy skuteczności omawianego systemu. Finalnie dowiedziono także, że z wykorzystaniem odpowiednio zaprojektowanej separacji membranowej możliwe jest oddzielenie produktu końcowego z zadowalającą skutecznością i uzyskanie kwasu ksylonowego o wysokiej czystości.

Obiecujące rezultaty badań zrealizowanych w pierwszych etapach pracy, a w szczególności potencjał do stworzenia bardziej zaawansowanego systemu

biokatalitycznego, skłoniły do opracowania nowego konceptu łączącego w sobie wszystkie zalety uprzednio wytworzonych układów. Wspomniane wyniki, szczególnie w zakresie separacji kwasu ksylonowego z mieszaniny poreakcyjnej, były jedną z podstaw opracowania rozwiązania, które umożliwiło wykorzystanie enzymatycznego reaktora membranowego do biokonwersji ksylozy z równoczesną regeneracją kofaktora i rozdziałem mieszaniny poreakcyjnej. Duże znaczenie miała także chęć ograniczenia wykorzystywanej aparatury, tak aby nie było konieczne stosowanie osobnych modułów do reakcji biokatalitycznej i separacji produktu końcowego. Dlatego też w ramach kolejnych eksperymentów dehydrogenaza ksylozy i dehydrogenaza alkoholowa zostały unieruchomione na membranie nanofiltrycyjnej, a wytworzony układ stanowił podstawę do skonstruowania nowatorskiego enzymatycznego reaktora membranowego (rys. 24), a uzyskane rezultaty badań zostały opisane w **Publikacji 3**. Wydaje się, że zaprojektowany w ten sposób system ma ogromny potencjał aplikacyjny, a uzyskane rezultaty mogą wpłynąć na poszerzenie możliwości stosowania enzymów wymagających obecności kofaktorów na skalę przemysłową.



Rys. 24. Schematyczne przedstawienie procesów zachodzących w enzymatycznym reaktorze membranowym z układem biokatalitycznym XDH/ADH koimmobilizowanym na membranie nanofiltrycyjnej

W pierwszym etapie badań przygotowano membranę nanofiltrycyjną XN45, którą przed koimmobilizacją XDH i ADH oczyszczono i poddano ocenie pod kątem

przepuszczalności wody i jej przepływu, a więc parametrów determinujących bezpośrednio jej sprawność. Pozbawiony zanieczyszczeń nośnik umieszczono w reaktorze Amicon Millipore 8010, w którym powierzchnia membrany wynosiła 4,90 cm², i przeprowadzono wspomniane testy w temperaturze otoczenia i przy ciśnieniu 4 bar. Obliczono, że wartości przepuszczalności wody oraz jej przepływu dla czystej membrany wynoszą odpowiednio 5,59 L/m²·h·bar i 22,36 L/m²·h, co koresponduje z wartościami przedstawionymi przez producenta materiału [171]. Co więcej, określono także wartość kąta zwilżania dla membrany XN45 za pomocą nanoszonej na powierzchnię kropli wody i był on równy 25.30 ° przed oczyszczeniem wodą i etanolem. Po oczyszczeniu materiału wartość kąta zwilżania uległa znacznej zmianie i wyniosła 43,52 °, co wskazuje na zwiększenie hydrofobowości membrany. Po zdefiniowaniu zmian charakteru materiału w wyniku kondycjonowania podjęto się przeprowadzenia koimmobilizacji XDH i ADH w temperaturze otoczenia pod ciśnieniem 4 bar w środowisku buforu TAPSO o pH 7, wykorzystując powietrze syntetyczne jako siłę napędową procesu. Po osadzeniu enzymów na membranie, jej powierzchnia została dodatkowo pokryta warstwą polidopaminy, która ogranicza wymywanie białek z materiału nośnika. Należy zauważyć, że po przeprowadzeniu procesu koimmobilizacji wartość kąta zwilżania spadła do 29,89 °, natomiast naniesienie warstwy polidopaminy spowodowało, że kąt zwilżania dla finalnej membrany z osadzonymi enzymami wyniósł 12,03 °. Tak istotna zmiana w wartościach kąta zwilżania wynikała z osadzenia na niej białek, które posiadają silnie hydrofilowe grupy funkcyjne w swojej strukturze, a dodatkowo polidopamina jest powszechnie znanym modyfikatorem powodującym hydrofilizację powierzchni materiałów. Należy też podkreślić, że koimmobilizacja enzymów ma wpływ na przepuszczalność membrany, jej hydrofobowość, ładunek powierzchniowy i morfologię [106,172,173], co zostało przeanalizowane, a uzyskane rezultaty zamieszczono w tabeli 6.

Tabela 6. Wartości przepuszczalności wody i jej przepływu dla membrany nanofiltrycyjnej na różnych etapach badań

Nazwa próbki	Przepływ [L/m ² ·h]	Przepuszczalność wody [L/m ² ·h·bar]
Membrana XN45	22,36	5,59
Membrana z koimmobilizowanymi enzymami	7,20	1,80
Membrana po procesie biokonwersji	6,36	1,59

Dla membrany z koimmobilizowanymi XDH i ADH wartości przepuszczalności wody i przepływu były o około 70% mniejsze niż dla czystej membrany. Podobne obserwacje przedstawili Su i in. [174], którzy wykazali ponad 80-proc. spadek przepuszczalności wody dla membrany ultrafiltracyjnej z immobilizowaną dekstraną, w porównaniu do wartości tego parametru dla nośnika przed procesem. Można zatem wywnioskować, że doszło do unieruchomienia enzymów na membranie, co wpłynęło na blokowanie porów materiału i spowodowało zmniejszenie strumienia permeatu i wzrost oporu hydraulicznego [175]. Taki rezultat jest pośrednim potwierdzeniem skuteczności przeprowadzonego procesu unieruchomienia białek.

Jednym ze sposobów potwierdzenia efektywności koimmobilizacji dehydrogenazy ksylozy i dehydrogenazy alkoholowej na membranie nanofiltrycyjnej było także określenie procentowej zawartości pierwiastków chemicznych w badanych próbkach z wykorzystaniem energodispersyjnej mikroanalizy rentgenowskiej, czego rezultaty zostały przedstawione w tabeli 7. Ze względu na pierwotny skład membrany i materiał, z którego została wykonana, czyli amid polipiperazyny, w każdym analizowanym materiale pierwiastkiem o największej zawartości był węgiel. Jego zawartość wahała się od 70,9% dla membrany po konwersji ksylozy do 79,5% dla wyjściowego materiału.

Tabela 7. Zawartość procentowa wybranych pierwiastków chemicznych w analizowanych próbkach

Analizowany pierwiastek	Membrana XN45 [%]	Membrana z XDH/ADH [%]	Membrana z XDH/ADH po procesie biokonwersji [%]
C	79,5	71,4	70,9
O	11,3	10,9	10,4
S	7,2	12,7	14,5
N	1,9	5,0	4,2

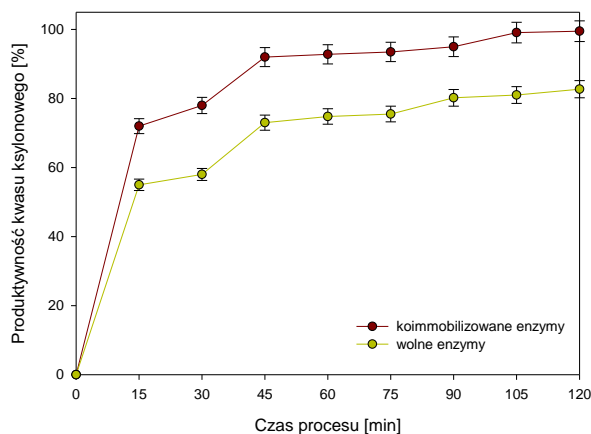
Warto podkreślić znaczny wzrost ilości siarki i azotu dla membrany po koimmobilizacji enzymów. Zwiększenie zawartości tych pierwiastków jest efektem skutecznego unieruchomienia XDH i ADH, ze względu na fakt, że zarówno siarka, jak i azot są obecne w wiązaniach budujących strukturę białek, takich jak mostki disiarczkowe czy wiązania amidowe [176]. Co więcej, po przeprowadzeniu konwersji ksylozy ilość azotu zmalała nieznacznie, co sugeruje stabilne osadzenie białek na nośniku i w konsekwencji ograniczone wymywanie enzymów z membrany. Taki rezultat koresponduje z danymi uzyskanymi w trakcie testów przepływu i przepuszczalności

wody dla materiału nośnika po procesie biokonwersji (tabela 6). Obecne na powierzchni membrany enzymy mogły zapobiec osadzeniu się na niej nieprzereagowanych substratów lub innych związków będących składnikami mieszaniny reakcyjnej, co w konsekwencji spowodowało nieznaczny spadek wartości przepuszczalności wody i jej przepływu, w porównaniu do wartości tych parametrów przed procesem konwersji [177].

Potwierdzenie skuteczności koimmobilizacji dehydrogenazy ksylozy i dehydrogenazy alkoholowej na membranie nanofiltrycyjnej oraz scharakteryzowanie powstałego systemu biokatalitycznego XDH/ADH–membrana pozwoliło na przystąpienie do kolejnego etapu badań, którym było zastosowanie opracowanego układu w konwersji ksylozy z równoczesną regeneracją kofaktora NAD^+ . Ze względu na zastąpienie w roli nośnika nieorganicznego materiału kompozytowego $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ (**Publikacja 1** i **Publikacja 2**) membraną nanofiltrycyjną, testy związane z określeniem wpływu zmiennych warunków procesowych na efektywność procesu konwersji ksylozy musiały zostać poddane ponownej ewaluacji. Należy jednak podkreślić, że zmianie nie uległ stosunek XDH:ADH (2:1) zastosowany w opisanych dotąd badaniach, jak również dowiedziono, że także w tym układzie enzymatycznym bufor TAPSO o pH 7 i temperatura otoczenia były odpowiednimi warunkami immobilizacji pozwalającymi na uzyskanie najwyższej aktywności katalitycznej unieruchomionych na membranie białek.

Wnikliwa analiza wpływu czasu na efektywność procesu konwersji katalizowanej przez koimmobilizowane enzymy (rys. 25) wykazała, że zmianie nie uległ także najkorzystniejszy czas trwania prowadzonych przemian. Po 1 h procesu uzyskano bowiem wysoką wydajność produkcji kwasu ksylonowego wynoszącą ponad 95%. Dalsze prowadzenie konwersji ksylozy pozwoliło na zwiększenie efektywności o 4%, co oznacza, że po 1 h reakcji osiągnięto wysycenie substratu w układzie reakcyjnym, które spowodowało spowolnienie szybkości reakcji [178]. Pomimo tego, że maksymalna wydajność produkcji kwasu ksylonowego została osiągnięta po 2 h, za najkorzystniejszy czas uznano 1 h, co wydaje się właściwe z ekonomicznego punktu widzenia, ze względu na ograniczenie kosztów wynikających z konieczności dłuższego prowadzenia konwersji ksylozy przy niewielkim przyroście efektywności. Należy także zauważyć, że przedstawione wyniki potwierdzają korzyści płynące z przeprowadzenia koimmobilizacji enzymów, ponieważ efektywność procesu z użyciem natywnych form białek była niższa i wyniosła ok. 80%. Wydaje się zatem, że aktywność wolnych enzymów malała w trakcie trwania reakcji, podczas gdy unieruchomione XDH i ADH wykazywały większą

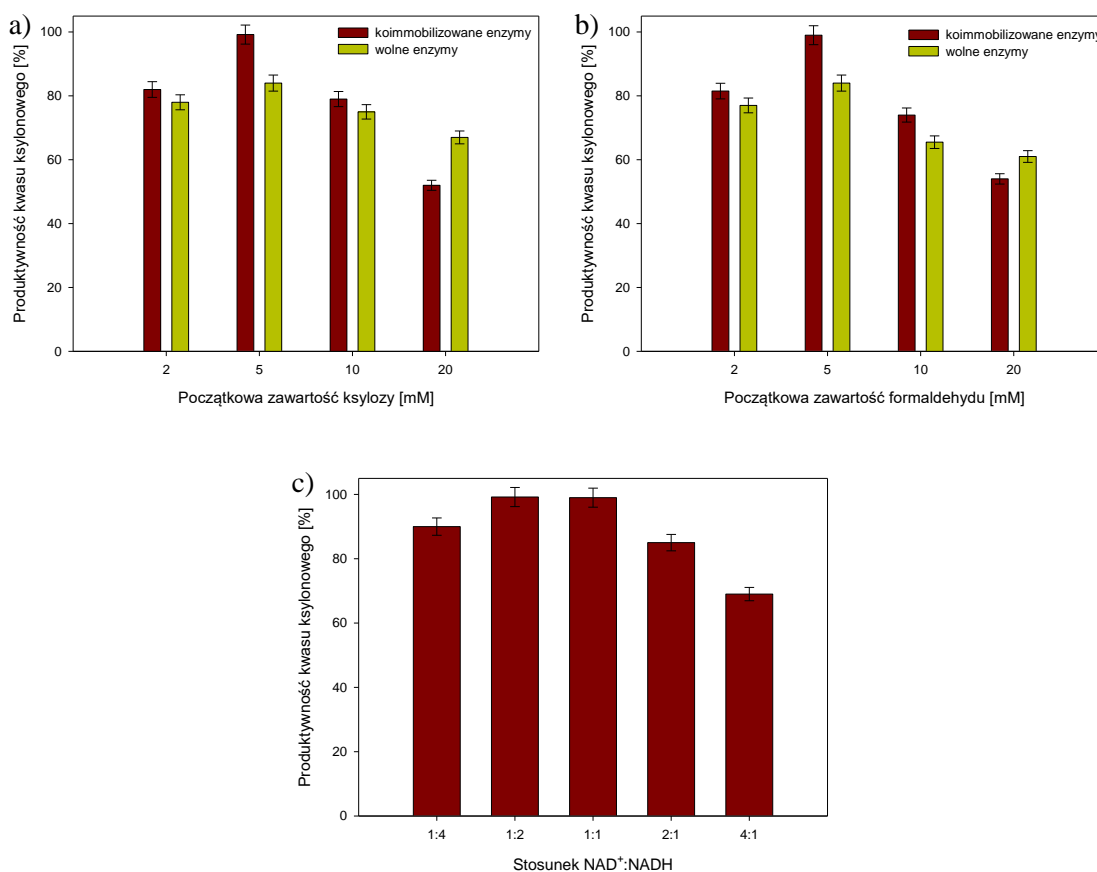
stabilność i mogły być skutecznie wykorzystywane przez dłuższy czas. Taki rezultat jest również związany z faktem, że koimmobilizacja XDH i ADH na membranie ogranicza negatywny wpływ produktów reakcji na hamowanie aktywności enzymów, a co więcej, związanie białek umożliwiło skuteczniejszą regenerację kofaktorów [155,178].



Rys. 25. Krzywe zależności czasu procesu od produktywności kwasu ksylonowego dla wolnych i koimmobilizowanych enzymów

Istotne w prowadzonych badaniach było też wskazanie najkorzystniejszej początkowej zawartości substratów w mieszaninie reakcyjnej, jak również określenie najbardziej odpowiedniego stosunku masowego kofaktorów enzymatycznych, tak aby umożliwić zarówno skuteczną biokonwersję ksylozy, jak i efektywną regenerację kofaktora, przy jednoczesnym jak najmniejszym wykorzystaniu substratów oraz kofaktorów. Na rys. 26 przedstawiono produktywność kwasu ksylonowego w zależności od początkowej zawartości ksylozy i formaldehydu oraz stosunku $\text{NAD}^+:\text{NADH}$. Zebrane dane jasno wskazują, że najwyższą produktywność kwasu ksylonowego zaobserwowano dla mieszaniny reakcyjnej, która początkowo zawierała 5 mM ksylozy oraz 5 mM formaldehydu i w przypadku koimmobilizowanych enzymów wyniosła ona 99%. Co ciekawe, dla systemu z 2 mM substratów wydajność produkcji kwasu ksylonowego również była stosunkowo wysoka, ponieważ przekroczyła 80%. Odnotowany spadek efektywności może być jednak spowodowany niedostateczną ilością doprowadzonego substratu, w stosunku do ilości enzymów obecnych w układzie reakcyjnym. Należy jednak zauważyć, że wraz ze zwiększaniem początkowej zawartości substratów (10 i 20 mM) znacznie malała skuteczność produkcji kwasu ksylonowego, co z kolei może być wynikiem zbyt dużych ilości ksylozy i formaldehydu, w stosunku do możliwości biokatalitycznych dehydrogenazy ksylozy i dehydrogenazy alkoholowej.

Podobne wnioski zaobserwowali Zheng i Zhang [91], którzy unieruchomili dehydrogenazę glicerolu na magnetycznych nanocząsteczkach krzemionki w celu konwersji glicerolu. Z przedstawionych przez nich rezultatów wynika, że zwiększenie stężenia substratu umożliwiło wzrost wartości wydajności reakcji, ale tylko do pewnego momentu, po którym ta tendencja została zahamowana i nie była już obserwowana. Ponadto, w oparciu o analizę wyników własnych, należy zauważyć, że rosnąca ilość formaldehydu w testowanych układach negatywnie wpływa na aktywność białek i hamuje ich działanie poprzez ingerencję w konformację aminokwasów i zaburzenie struktury enzymu [179,180]. Zatem konsekwencją wspomnianych zmian jest obniżenie wydajności konwersji ksylozy. Można jednak wysnuć wniosek, że koimmobilizacja enzymów zapewnia wysoką stabilność i odporność mechaniczną biokatalizatorom, co czyni je mniej podatnymi na inaktywację i inhibicję, niż natywne białka, co przekłada się na wyższą efektywność katalizowanych przemian [114].



Rys. 26. Produktivność kwasu ksylonowego w zależności od początkowej zawartości: a) ksylozy, b) formaldehydu oraz c) stosunku kofaktorów

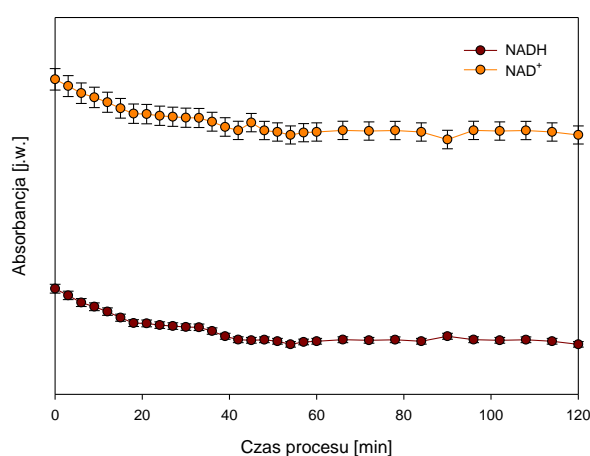
Na podstawie analizy otrzymanych rezultatów można także stwierdzić, że początkowy stosunek masowy kofaktorów w układzie reakcyjnym ma znaczący wpływ

na aktywność realizowanych przemian. W układzie zawierającym kofaktory NAD^+ i NADH w stosunku 1:2 przeprowadzono konwersję ksylozy z wydajnością 99%, podczas gdy w systemie ze stosunkiem $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ 1:1 efektywność produkcji kwasu ksylonowego była nieznacznie niższa i osiągnęła 98%. Co ciekawe, ponad 90-proc. wydajność konwersji uzyskano także dla układu, w którym stosunek kofaktorów wynosił 1:4 na korzyść NADH . Wydaje się zatem, że niezwykle istotne w przypadku omawianej pary enzymatycznej jest, aby w systemie reakcyjnym przeważała zawartość zredukowanej formy kofaktora nikotynamidoadeninowego, co ma znaczny wpływ na prawidłowe funkcjonowanie dehydrogenazy alkoholowej, a w konsekwencji skuteczną regenerację kofaktora. Potwierdzeniem tej obserwacji jest fakt, że zdecydowanie niższe wartości produktywności kwasu ksylonowego uzyskano dla układów z większą początkową ilością NAD^+ .

Zmienne wartości efektywności procesu otrzymane przy różnych stosunkach form kofaktorów mają związek z właściwościami enzymów. Jak wiadomo w zależności od procesu, w którym uczestniczy biokatalizator, rodzaju substratu i jego stężenia, a także źródła pochodzenia enzymu, stała Michaelis-Menten przyjmuje różne wartości. Dla NAD^+ -zależnej dehydrogenazy ksylozy w trakcie konwersji ksylozy, wartość K_m najczęściej waha się od 1 do 10 mM [181,182]. Z drugiej strony, dla NADH -zależnej dehydrogenazy alkoholowej, w konwersji formaldehydu, wartość tego parametru wynosi zwykle od 5 do 10 mM [183,184]. W związku z tym można założyć, że enzymy wykorzystywane w prowadzonych badaniach mają zbliżone wartości stałej Michaelis-Menten i zasadne wydaje się stosowanie stechiometrycznych ilości obu form kofaktorów obecnych w systemie reakcyjnym. Obserwacja ta koresponduje z uzyskaniem wysokich efektywności procesu biokonwersji ksylozy dla układu z NAD^+ i NADH w stosunku masowym 1:1. Wydaje się zatem, że znaczny wzrost ilości którejkolwiek z form kofaktora w układzie reakcyjnym może prowadzić do jego nieefektywnej regeneracji, wynikającej z różnicy w aktywności katalitycznej enzymów, a tym samym powodować obniżenie produktywności kwasu ksylonowego [185].

Po potwierdzeniu możliwości osiągnięcia niemal 100-proc. efektywności konwersji ksylozy w najkorzystniejszych dla systemu XDH/ADH -membrana warunkach założono, że regeneracja kofaktora również przebiega skutecznie. Niemniej jednak konieczne było uzyskanie rezultatów analiz, które potwierdzą postawioną hipotezę, dlatego też dodatkowo oceniono efektywność enzymatycznej regeneracji kofaktora za pomocą spektroskopii UV-Vis. Na rys. 27 przedstawiono wykres zmian absorbancji obu form

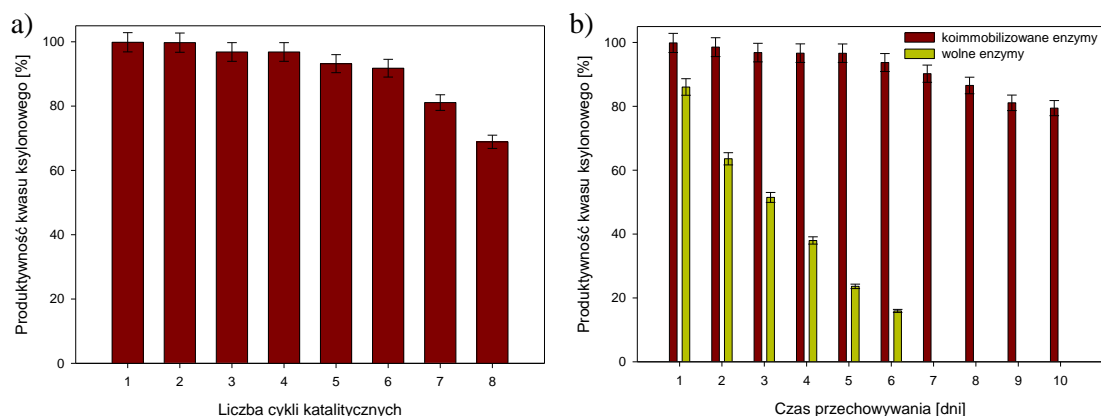
stosowanego kofaktora w czasie trwania konwersji ksylozy. Poprawnie przeprowadzony recykling kofaktora powinien skutkować brakiem zmian ilości każdej z form kofaktora obecnych w mieszaninie reakcyjnej, co wiąże się z zachowaniem absorbancji na tym samym poziomie przez cały czas prowadzenia procesu [185]. Jak można zauważyć, zastosowanie zaproponowanego układu z koimmobilizowanymi enzymami umożliwia utrzymanie niemal stałego poziomu absorbancji, co wskazuje, że stężenia NADH i NAD⁺ nie ulegają znacznym zmianom. Zatem na podstawie rezultatów wykonanej analizy potwierdzono, że opracowany układ biokatalityczny jest stabilny i umożliwia nie tylko wydajną konwersję ksylozy, ale także regenerację kofaktora.



Rys. 27. Absorbancja NADH i NAD⁺ w zależności od czasu trwania procesu konwersji ksylozy

Dodatkowo z aplikacyjnego punktu widzenia niezwykle istotne wydawało się przeprowadzenie testów wielokrotnego zastosowania opracowanego systemu biokatalitycznego (rys. 28a), które wykazały, że system z koimmobilizowanymi enzymami umożliwia przeprowadzenie 8 kolejnych cykli katalitycznych z około 30-proc. obniżeniem produktywności kwasu ksylonowego. Dane te jednoznacznie uwypuklają znaczną przewagę koimmobilizowanych enzymów, w porównaniu do układów z wolnymi białkami. Zbliżone zależności zostały przedstawione przez Zhu i in. [186], którzy zaprezentowali rezultaty badań związanych z immobilizacją lipazy na mikrofiltracyjnej membranie polisulfonowej, a opracowany system biokatalityczny był zdolny do przeprowadzenia 6 cykli hydrolizy trioctanu glicerolu z zachowaniem 90% początkowej aktywności. Podobne wnioski wysunęli także Li i in. [187], którzy unieruchomili lipazę na membranie z poliakrylonitrylu, a powstały układ biokatalityczny był w stanie katalizować 20 cykli reakcyjnych ze stratą zaledwie około 10% swoich początkowych właściwości. Przewaga unieruchomionych XDH i ADH została

potwierdzona także w oparciu o rezultaty testów stabilności wspomnianych biokatalizatorów w trakcie przechowywania w ciągu 10 dni w 4 °C (rys. 28b). Rezultaty badań potwierdziły, że wolne enzymy szybko traciły aktywność i już po siedmiu dniach przechowywania nie wykazywały żadnych właściwości katalitycznych. Natomiast koimmobilizowane białka były zdolne do konwersji ksylozy z wydajnością ponad 90% po 7 dniach przechowywania i przeprowadzeniu sześciu cykli katalitycznych.



Rys. 28. a) Możliwość wielokrotnego zastosowania koimmobilizowanych enzymów w kolejnych cyklach reakcyjnych oraz b) stabilność na przechowywanie w zależności od form białek

W trakcie prowadzonych badań wielokrotnie potwierdzono zasadność stosowania koimmobilizacji XDH i ADH, niemniej jednak biorąc pod uwagę potencjalne powiększanie skali procesu należało przetestować różne konfiguracje systemu biokatalitycznego (wolne enzymy, koimmobilizowane białka oraz biokatalizatory w mieszanej formie, w której jeden z enzymów był w formie wolnej, a drugi w postaci zimmobilizowanej), tak aby zyskać pewność, która z nich wykazuje najwyższą produktywność kwasu ksylonowego w trakcie następujących po sobie cykli reakcyjnych (tabela 8). Na podstawie uzyskanych danych można stwierdzić, że system XDH/ADH–membrana umożliwił przeprowadzenie konwersji ksylozy z 99-proc. wydajnością oraz produktywnością biokatalityczną w pięciu kolejnych cyklach reakcyjnych równą 1,50 mM/U. Stosunkowo wysoką efektywność wykazały także wolne enzymy (86%), niemniej jednak wartość produktywności biokatalitycznej była 3-krotnie mniejsza niż w przypadku ich unieruchomionych odpowiedników. Ta znaczna różnica wynika z faktu, że koimmobilizacja enzymów zapewniła białkom ochronę przed dezaktywacją, a ich związanie z nośnikiem przyczyniło się do możliwości ponownego wykorzystania z równoczesnym zachowaniem wysokiej aktywności, co nie jest możliwe w przypadku stosowania wolnych form enzymów [188]. Uzyskane rezultaty korespondowały zatem

z danymi otrzymanymi w trakcie testów wielokrotnego stosowania systemów biokatalitycznych. Dodatkowo należy również wspomnieć o systemach mieszanych, w których jeden z enzymów występował w postaci wolnej w przestrzeni reaktora, podczas gdy drugi z nich był związany z membraną. Obie zaproponowane konfiguracje wykazały znacznie mniejszą wydajność konwersji ksylozy niż systemy z koimmobilizowanymi i wolnymi enzymami. Jednak wykazana przez nie produktywność biokatalityczna, szczególnie w przypadku unieruchomionej XDH i wolnej ADH, była stosunkowo wysoka, co może się wiązać ze stabilizacją enzymu poprzez jego unieruchomienie.

Tabela 8. Porównanie wydajności konwersji ksylozy i produktywności biokatalitycznej w czterech różnych konfiguracjach systemu enzymatycznego

System biokatalityczny	Konwersja ksylozy [%] ^a	Produktywność biokatalityczna [mM/U] ^b
Natywne enzymy	86,0	0,53
Natywna XDH i immobilizowana ADH	74,4	0,57
Natywna ADH i immobilizowana XDH	80,5	0,92
Koimmobilizowane enzymy	99,8	1,50

^awydajność konwersji ksylozy po 1 cyklu katalitycznym; ^bproduktywność biokatalityczna po 5 cyklach reakcyjnych

Nie podlega jednak wątpliwości, że największy potencjał ze wszystkich zaproponowanych systemów mają enzymy koimmobilizowane na membranie nanofiltrycyjnej. Można zatem stwierdzić, że membrana wykorzystana jako nośnik w prowadzonych badaniach skutecznie spełniła swoją funkcję i zapewniła ochronę unieruchomionym dehydrogenazom przed inaktywacją czy denaturacją wywołaną warunkami procesowymi. Co więcej, naniesiona warstwa polidopaminy skutecznie ograniczyła wymywanie białek z nośnika. Warto także wspomnieć, że membrana nie tylko odegrała ważną rolę jako nośnik dla enzymów, ale także umożliwiła osiągnięcie retencji kwasu ksylonowego na poziomie 90%, co koresponduje z wynikami uzyskanymi w **Publikacji 2**. Niemniej jednak należy podkreślić przewagę rozwiązania zaproponowanego w **Publikacji 3**, w porównaniu do systemu przedstawionego w **Publikacji 2**, która wynika z faktu, że zastosowanie enzymatycznego reaktora membranowego wyposażonego w bioaktywną membranę umożliwia przeprowadzenie równoczesnej biokonwersji ksylozy, regeneracji kofaktora oraz separacji kwasu ksylonowego w jednym naczyniu reakcyjnym. Taka koncepcja może mieć znaczenie

podczas ewentualnego wykorzystania opracowanego systemu biokatalitycznego na skalę przemysłową, ponieważ znacznie ułatwia prowadzenie procesów ciągłych oraz zapewnia właściwe dostarczenie substratów i odprowadzenie produktów reakcji. Wydaje się także, że zachowanie wysokich aktywności białek przez kolejne cykle katalityczne może prowadzić do efektywnej konwersji znacznych ilości ksylozy i formaldehydu także w procesach ciągłych, co również wpływa na wysoki potencjał aplikacyjny proponowanego układu, a jego dodatkową wartość stanowi możliwość uzyskania produktu o wysokiej czystości.

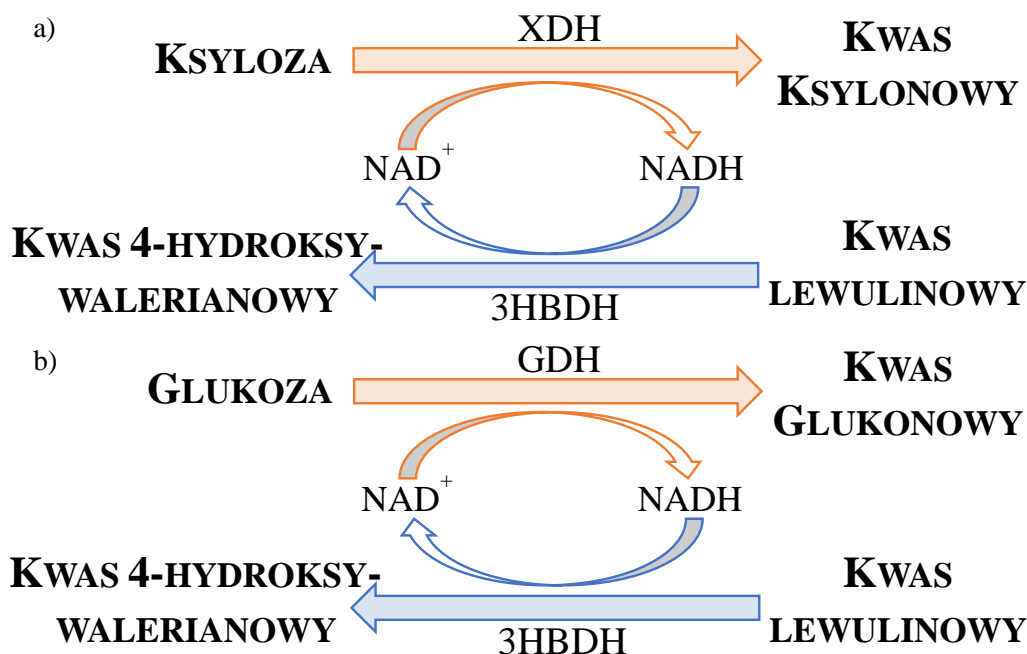
Koimmobilizacja dehydrogenazy ksylozy i dehydrogenazy alkoholowej na membranie nanofiltrycyjnej XN45 zaprezentowana w **Publikacji 3** została zrealizowana celem otrzymania systemu zdolnego do jednoczesnej konwersji ksylozy do kwasu ksylonowego i regeneracji kofaktora prowadzonej w enzymatycznym reaktorze membranowym. Na podstawie wyników analiz fizykochemicznych scharakteryzowano zmiany w strukturze i właściwościach membrany na różnych etapach prowadzonych badań, jak również potwierdzono skuteczność koimmobilizacji enzymów. Ponadto zastosowanie unieruchomionych XDH i ADH w układzie reakcyjnym z 5 mM ksylozy, 5 mM formaldehydu i początkowym stosunkiem masowym $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ 1:1 umożliwiło przeprowadzenie konwersji ksylozy z wydajnością 99%. Dodatkowo wykazano, że unieruchomione enzymy są zdolne do wielokrotnego użycia, a ich stabilność w trakcie przechowywania jest stosunkowo wysoka. Finalnie potwierdzono, że zastosowanie enzymatycznego reaktora membranowego umożliwiło uzyskanie produktu o wysokiej czystości i zminimalizowanie ilości stosowanej aparatury.

5.2 Systemy biokatalityczne z dehydrogenazą 3-hydroksymaślanową jako enzymem regenerującym NAD^+

Przedstawione w **Publikacji 2** rezultaty badań wykazały, że kwas lewulinowy ma znaczny wpływ na aktywność katalityczną enzymów, nie tylko natywnych, ale również immobilizowanych. Dlatego też konieczne wydaje się zneutralizowanie jego inhibitoryjnego działania. Należy zauważyć, że dehydrogenaza 3-hydroksymaślanowa (3HBDH) umożliwia przeprowadzenie efektywnej konwersji kwasu lewulinowego, czyli jednego z najczęściej występujących inhibitorów procesu enzymatycznej konwersji biomasy. Jest to szczególnie istotne, ze względu na potrzebę ograniczenia negatywnego wpływu tego inhibitora, lub jego całkowitego usunięcia, z roztworów po obróbce biomasy. Niemniej jednak należy podkreślić, że prawidłowe funkcjonowanie tego

enzymu, jak również uzyskanie przez niego pełnej aktywności katalitycznej wymaga obecności w układzie reakcyjnym zredukowanej postaci dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH). W wyniku przemiany kwasu lewulinowego w kwas 4-hydroksywalerianowy (także produkt o wysokim potencjale aplikacyjnym) powstaje zatem NAD^+ , dlatego też istotne było dobranie do projektowanego systemu biokatalitycznego enzymu, którego działanie jest zależne od NAD^+ , tak aby możliwe było przeprowadzenie regeneracji kofaktora. Ciekawe wydaje się połączenie 3HBDH z dehydrogenazą glukozy i/lub dehydrogenazą ksylozy, które spełniają to wymaganie. Opracowanie układów enzymatycznych z tymi białkami jest interesującym rozwiązaniem, ponieważ umożliwia jednoczesne przekształcenie monosacharydów, które są głównymi składnikami biomasy, w związki o dużej użyteczności, czyli kwas glukonowy i kwas ksylonowy oraz regenerację kofaktora, co stanowi istotny cel prezentowanych badań. Dodatkowo wprowadzenie dehydrogenazy 3-hydroksymaślanowej do systemu biokatalitycznego było innowacyjnym podejściem, ponieważ stanowiło próbę znalezienia alternatywnego enzymu, innego niż powszechnie stosowana dehydrogenaza alkoholowa, który umożliwił efektywne prowadzenie reakcji regenerującej kofaktor.

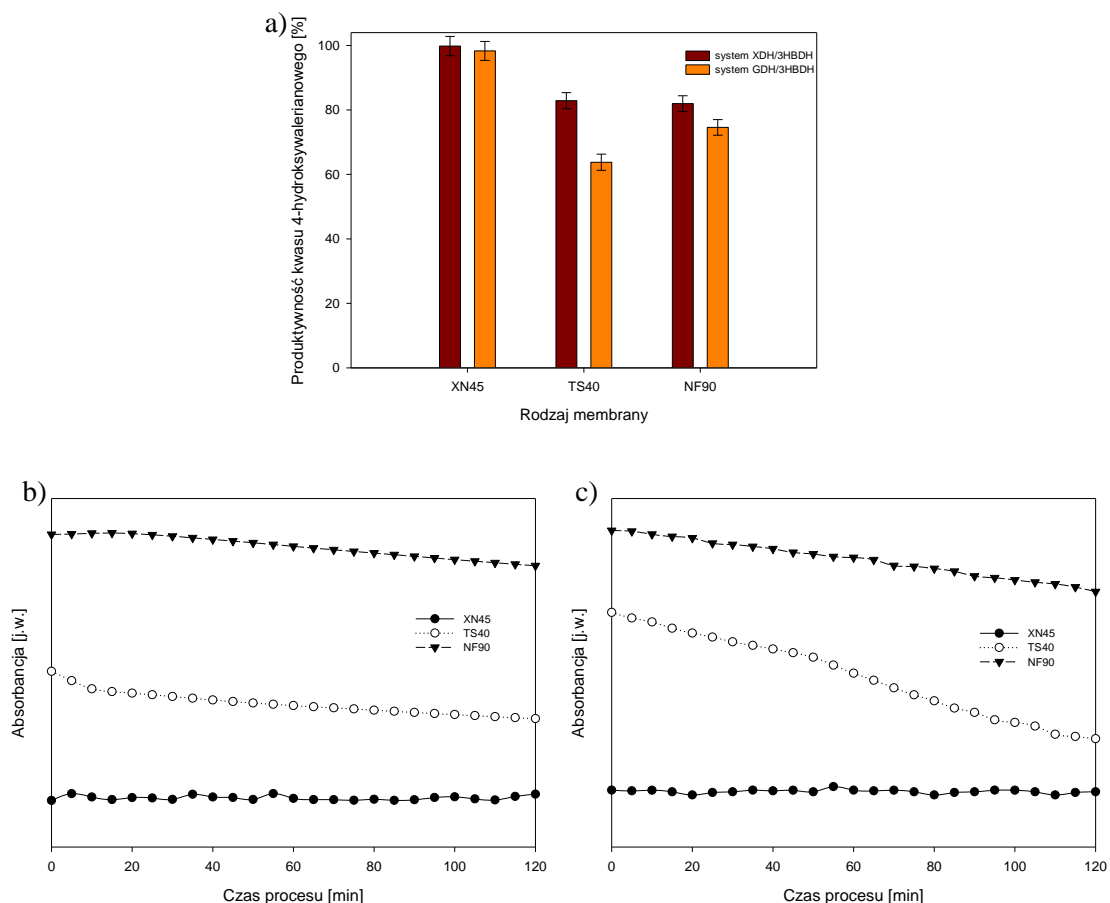
Zatem ze względu na duży potencjał aplikacyjny kwasu 4-hydroksywalerianowego, kwasu glukonowego i kwasu ksylonowego oraz możliwość opracowania wielofunkcyjnego systemu regeneracji kofaktora z równoczesną przemianą inhibitorów ograniczających biokatalityczną konwersję składników biomasy, w **Publikacji 4** podjęto się prac nad koimmobilizacją dehydrogenazy 3-hydroksymaślanowej z dehydrogenazą ksylozy lub dehydrogenazą glukozy na membranie nanofiltrycyjnej (rys. 29). Wybór membrany nanofiltrycyjnej jako nośnika dla enzymów był podyktowany potencjalnym zwiększeniem sprawności układu biokatalitycznego wynikającym z możliwości prowadzenia ciągłego rozdziału produktów końcowych od nieprzereagowanych substratów i innych składników mieszaniny reakcyjnej. W trakcie badań określono wpływ wybranych parametrów procesowych na wydajność produkcji wszystkich trzech kwasów organicznych, a co więcej, porównano efektywność biokonwersji prowadzonej przez koimmobilizowane enzymy ze skutecznością ich natywnych odpowiedników.



Rys. 29. Schemat przedstawiający reakcje przebiegające w układzie biokatalitycznym: a) XDH/3HBDH oraz b) GDH/3HBDH

W pierwszym etapie badań prowadzonych w ramach **Publikacji 4** dokonano doboru materiału nośnika, tak aby możliwe było nie tylko skuteczne osadzenie enzymów na membranie, ale także przeprowadzenie konwersji monosacharydów z wysoką efektywnością oraz skuteczną separacją produktów. W tym celu zastosowano trzy komercyjnie dostępne membrany nanofiltrycyjne: membranę XN45 i membranę TS40, w których warstwę aktywną stanowi amid polipiperazynowy oraz membranę NF90, wykonaną z poliamidu cienkowarstwowego. Zgodnie ze specyfikacją wybrane materiały mogą być stosowane w pH w zakresie 2–11 oraz w maksymalnej temperaturze 45 °C [171], co oznacza, że we wspomnianych warunkach właściwości membrany nie powinny ulegać zmianom. Jak można zauważyć na rys. 30a wykorzystanie membrany XN45 do koimmobilizacji obu systemów biokatalitycznych pozwoliło na uzyskanie ponad 90-proc. produktywności kwasu 4-hydroksywalerianowego. Podczas gdy zastosowanie pozostałych nośników umożliwiło osiągnięcie znacznie niższych efektywności, na poziomie nieprzekraczającym 80%. Wydaje się, że poza rodzajem materiału membrany, istotny wpływ na otrzymane rezultaty miała różnica w wartościach przepływu i przepuszczalności wody. Dla czystej membrany XN45 wartość przepływu wyniosła 22,38 L/m²·h, natomiast dla membran TS40 i NF90 było to odpowiednio 18,72 L/m²·h i 15,20 L/m²·h. Warto także zauważyć, że po koimmobilizacji enzymów wartość

przepływu dla membrany XN45 spadła do 7,09 L/m²·h (system z XDH) i 5,08 L/m²·h (system z GDH), podczas gdy dla membrany TS40 i NF90 parametr ten osiągnął wartość odpowiednio 6,49 i 6,12 L/m²·h dla układu z dehydrogenazą ksylozy oraz 3,95 i 3,81 L/m²·h dla układu z dehydrogenazą glukozy. Zmniejszenie wartości przepływu może wpłynąć na wydłużenie czasu kontaktu substratu z białkami, w konsekwencji czego może nie dojść do wypracowania kompromisu pomiędzy szybkością przepływu przez membranę a czasem kontaktu substratów z unieruchomionymi enzymami. Analiza uzyskanych rezultatów wskazuje na to, że system biokatalityczny z membraną XN45 umożliwił osiągnięcie najkorzystniejszego balansu pomiędzy wspomnianymi parametrami spośród wszystkich testowanych układów.



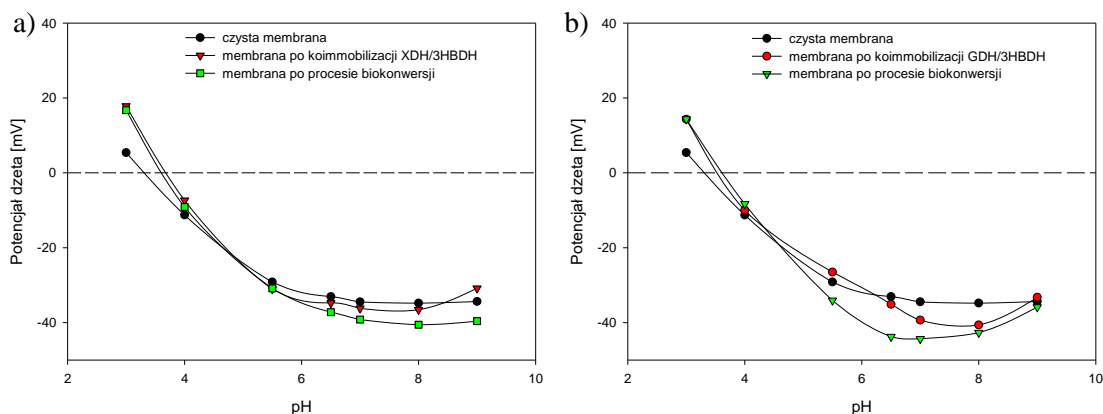
Rys. 30. a) Produktywność kwasu 4-hydroksywalerianowego w zależności od zastosowanego systemu biokatalitycznego unieruchomionego na różnych membranach oraz zmiany absorbancji NAD⁺ w zależności od czasu trwania procesów z wykorzystaniem układów b) XDH/3HBDH i c) GDH/3HBDH

Ze względu na przebiegającą równocześnie z konwersją inhibitora regenerację kofaktora enzymatycznego konieczne było także zdefiniowanie skuteczności analizowanych systemów biokatalitycznych w recyklingu NAD⁺ (rys. 30b i 30c). Jak już

wcześniej wspomniano, przemiana formy zredukowanej w utlenioną kofaktora, i odwrotnie, zapewnia jego skuteczną regenerację, a efektywność tego procesu może zostać potwierdzona na podstawie utrzymania stałego poziomu kofaktorów, co jest równoznaczne z brakiem zmian w wartości absorbancji podczas pomiarów z wykorzystaniem spektrofotometru UV-Vis [189,190]. Zastosowanie systemów biokatalitycznych z enzymami unieruchomionymi na membranie XN45 pozwoliło na zachowanie stałego poziomu absorbancji, a zatem i stężenia kofaktorów, co jednoznacznie wskazuje na to, że regeneracja przebiegała prawidłowo i opracowany układ działa skutecznie. Natomiast w przypadku wykorzystania dwóch pozostałych nośników, czyli membrany TS40 i NF90, wartość absorbancji maleje wraz z upływem czasu trwania procesu. Takie rezultaty wskazują na stopniowe zanikanie jednej z form kofaktora w mieszaninie reakcyjnej i wzrost stężenia drugiej postaci, co w konsekwencji ma znaczący wpływ na spadek wydajności produkcji kwasów organicznych. Podobne obserwacje zostały przedstawione przez Partipilo i in. [191], którzy prowadzili regenerację NADPH z wykorzystaniem oksydoreduktazy glutationu i dehydrogenazy mrowczanowej. Zaobserwowany przez nich stały wzrost stężenia NADP^+ w trakcie trwania procesu sugeruje, że reakcja regeneracji nie przebiegała wystarczająco szybko, aby możliwy był skuteczny recykling kofaktora. W oparciu o analizę otrzymanych wyników zdecydowano, że w dalszych badaniach koimmobilizacja enzymów będzie prowadzona z wykorzystaniem membrany XN45 i dlatego też systemy biokatalityczne wytworzone w oparciu o ten materiał zostały poddane szczegółowej charakterystyce.

Koimmobilizacja XDH i 3HBDH na membranie XN45 została przeprowadzona w temperaturze otoczenia i w środowisku buforu TAPSO o pH 7 z zastosowaniem syntetycznego powietrza o ciśnieniu 2 bar jako siły napędowej procesu. Analogiczne warunki zostały użyte przy koimmobilizacji układu GDH/3HBDH. Jednak ze względu na charakterystykę dehydrogenazy glukozy do systemu wprowadzono enzymy w buforze TAPSO o pH 8. Po osadzeniu białek z wykorzystaniem reaktora Amicon 8010 przystąpiono do zdefiniowania zmian we właściwościach powierzchni membrany przed i po koimmobilizacji enzymów oraz pokryciu warstwą polidopaminy, która pozwoliła na zabezpieczenie systemu biokatalitycznego przed wymyciem białek z nośnika. W tym celu wykonano m.in. pomiary potencjału dzeta „czystych” membran oraz opracowanych systemów biokatalitycznych (rys. 31). Dla materiału nośnika potencjał dzeta w szerokim zakresie badanego pH (3–9) przyjmował ujemne wartości, a punkt izoelektryczny został wyznaczony w pH 3,3. Natomiast w przypadku materiałów po koimmobilizacji enzymów

wartości punktu izoelektrycznego uległy przesunięciu do pH 3,7 (system z XDH) i pH 3,5 (system z GDH). Co więcej, zaobserwowano wzrost wartości potencjału dzeta membran po immobilizacji w silnie kwasowym środowisku (pH 3), w porównaniu do jego wartości dla czystej membrany. Otrzymane dane mogą wydawać się zaskakujące, ze względu na to, że kluczową rolę w osadzeniu enzymów na nośniku odgrywają oddziaływania elektrostatyczne, a po przeprowadzeniu koimmobilizacji wartość punktu izoelektrycznego powinna ulec znaczącej zmianie i dążyć do uzyskania wartości charakterystycznej dla biokatalizatorów [192]. Niemniej jednak należy pamiętać, że unieruchomione białka zostały dodatkowo pokryte warstwą polidopaminy, dla której punkt izoelektryczny wynosi około 3,7, co zostało wykazane m.in. przez Ji i in. [193]. Wydaje się zatem, że pokrycie membrany polidopaminą miało znaczący wpływ na niewielką zmianę w wartości punktu izoelektrycznego.



Rys. 31. Wartość potencjału dzeta czystych membran oraz wytworzonych systemów biokatalitycznych przed i po konwersji, w zależności od pH środowiska dla systemu biokatalitycznego z: a) XDH/3HBDH i b) GDH/3HBDH

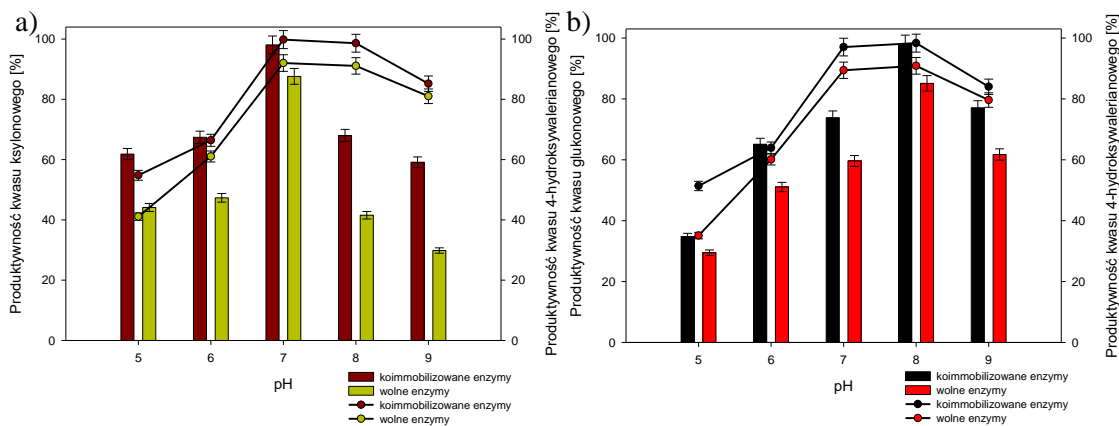
Warto zauważyć, że po przeprowadzeniu pojedynczego cyklu biokonwersji monosacharydów zaobserwowano delikatny spadek wartości potencjału dzeta, co może wynikać z osadzenia się któregoś ze składników mieszaniny reakcyjnej na powierzchni nośnika. Niemniej jednak w trakcie prowadzonych procesów membrana była odpowiedzialna nie tylko za pełnienie funkcji nośnika dla enzymów i udział w procesach produkcji kwasów organicznych, ale także odgrywała ważną rolę w rozdziale produktów końcowych. Ze względu na negatywnie naładowaną powierzchnię membrany możliwe było wykorzystanie zjawiska odpychania ładunków, które pozwoliło na zatrzymanie kwasu 4-hydroksywalerianowego i kwasu ksylonowego lub kwasu glukonowego w retentacie, a w konsekwencji uzyskanie strumienia produktów o wysokim stężeniu

[194]. Należy także zauważyć, że zarówno dla systemu z XDH, jak i układu z GDH po przeprowadzeniu biokonwersji w najkorzystniejszych warunkach procesowych wartości retencji kwasów organicznych wyniosły 95%, 96% i 93%, odpowiednio dla kwasu 4-hydroksywalerianowego, kwasu ksylonowego i kwasu glukonowego. Uzyskane rezultaty wskazują jednoznacznie na opracowanie systemów biokatalitycznych, które umożliwiają przeprowadzenie nie tylko efektywnej konwersji, ale także wysoce skutecznej separacji produktu końcowego.

Po dokonaniu selekcji nośnika, potwierdzeniu efektywności koimmobilizacji enzymów i określeniu zmian we właściwościach powierzchniowych materiału, jak i zdeterminowaniu możliwości separacji produktów końcowych reakcji przystąpiono do wyznaczenia warunków prowadzenia procesów konwersji kwasu lewulinowego i ksylozy lub glukozy z równoczesną regeneracją kofaktora pozwalających na realizację tych przemian z najwyższymi efektywnościami. Na podstawie wyników przeprowadzonych testów dowiedziono, że podczas procesów trwających 2 h możliwa była biokonwersja kwasu lewulinowego oraz ksylozy lub glukozy z wydajnościami powyżej 98%, dlatego 2 h uznano za najkorzystniejszy czas prowadzenia procesu i w nim prowadzono dalsze badania. Zdecydowano także, że dalsze eksperymenty prowadzone będą w temperaturze otoczenia (~21 °C), co wynikało z faktu, że dehydrogenaza 3-hydroksymaślanowa, dehydrogenaza ksylozy i dehydrogenaza glukozy zachowują wysoką aktywność katalityczną w zakresie temperatur od 20 do 30 °C. Wysoka stabilność i prawidłowe funkcjonowanie wspomnianych oksydoreduktaz w warunkach zbliżonych do temperatury pokojowej zostały potwierdzone wcześniej także przez Yeon i in. [195] oraz Stolarczyk i in. [196]. Niemniej jednak należało określić najkorzystniejsze pH środowiska reakcji dla właściwego funkcjonowania opracowanych par enzymatycznych. XDH wykazuje najwyższą aktywność w pH 7 [197], dla GDH jest to pH 8 [198,199], podczas gdy 3HBDH może katalizować reakcje z wysoką skutecznością w szerokim zakresie pH, od lekko kwaśnego do lekko zasadowego [195]. Dlatego też, ze względu na zróżnicowanie preferencji środowiskowych enzymów podjęto badania, w celu określenia wpływu pH na efektywność prowadzonych biokonwersji (rys. 32).

Najwyższe wydajności produkcji kwasu ksylonowego i kwasu 4-hydroksywalerianowego uzyskano w pH 7 i wyniosły one odpowiednio 98% i 99%. Co ciekawe, w całym badanym zakresie pH zaobserwowano stosunkowo wysoką produktywność kwasów organicznych, ponieważ w żadnej z testowanych wartości pH nie osiągnięto wydajności niższej niż 55%. Natomiast w przypadku biokonwersji

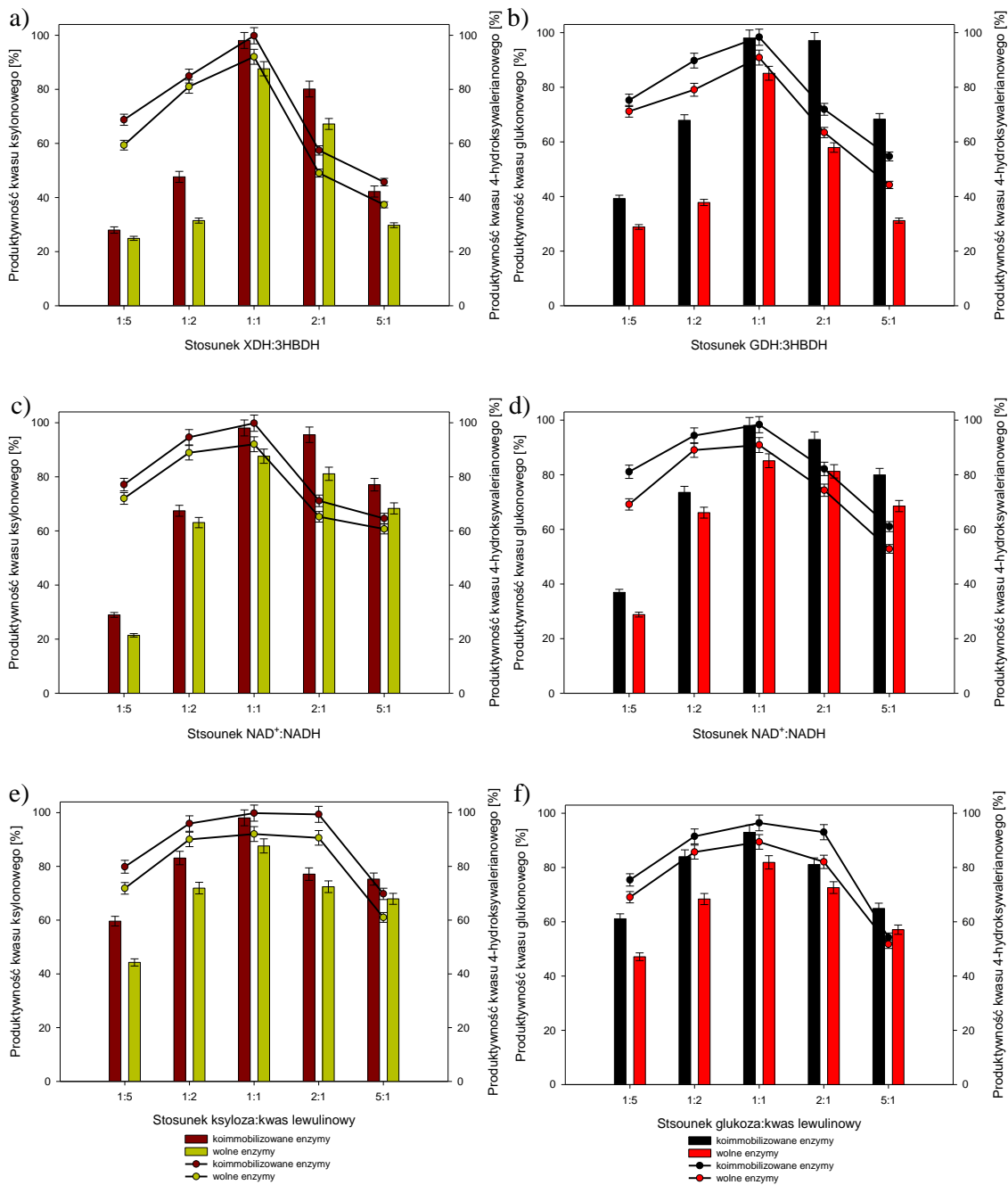
z wykorzystaniem GDH i 3HBDH, 98-proc. efektywność produkcji kwasu glukonowego, jak i kwasu 4-hydroksywalerianowego uzyskano w pH 8, podczas gdy zastosowanie innych wartości pH prowadziło do otrzymania kwasów organicznych ze znacznie niższą wydajnością. Na podstawie otrzymanych rezultatów można także zaobserwować, że w przypadku wolnych enzymów jako biokatalizatorów najwyższą produktywność kwasów uzyskano w pH 7 (dla systemu XDH/3HBDH) oraz pH 8 (dla systemu GDH/3HBDH), co koresponduje z wynikami uzyskanymi dla ich unieruchomionych odpowiedników i wskazuje, że w wyniku przeprowadzenia procesu immobilizacji nie doszło do znaczących zmian w mikrośrodkowisku enzymów. Dodatkowo należy zauważyć, że koimmobilizacja enzymów pozwoliła na uzyskanie zdecydowanie wyższych efektywności prowadzonych procesów niż w przypadku reakcji z wykorzystaniem wolnych form białek, co jasno wskazuje na stabilizację struktury biokatalizatorów po koimmobilizacji. W przypadku produktywności kwasu 4-hydroksywalerianowego, zbliżone wartości wydajności (98% i 99%) osiągnięto w pH 7 i pH 8, co dodatkowo potwierdziło wysoką aktywność 3HBDH w zmiennym pH. Dlatego też na podstawie analizy uzyskanych danych zdecydowano, że procesy z wykorzystaniem systemu XDH/3HBDH–membrana prowadzone będą w pH 7, natomiast układ GDH/3HBDH–membrana wykorzystano do katalizowania konwersji w środowisku o pH 8.



Rys. 32. Wpływ pH środowiska reakcji na efektywność prowadzonych biokonwersji dla systemu biokatalitycznego: a) XDH/3HBDH i b) GDH/3HBDH oraz ich odpowiedników w stanie wolnym (wykres słupkowy obrazuje produktywność kwasu ksylonowego/glukonowego, a wykres liniowy produktywność kwasu 4-hydroksywalerianowego)

W trakcie prowadzenia badań nad opracowywaniem nowego systemu biokatalitycznego, w skład którego wchodzi przynajmniej dwa enzymy, istotne jest

również wskazanie najkorzystniejszych stosunków białek, kofaktorów i substratów względem siebie, które zostają początkowo wprowadzone do mieszaniny reakcyjnej (rys. 33). Na podstawie zebranych danych można zauważyć, że najwyższą produktywność kwasu ksylonowego i kwasu 4-hydroksywalerianowego otrzymano w systemie ze stosunkiem aktywności XDH:3HBDH 1:1, stosunkiem masowym $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ 1:1 oraz początkową zawartością ksylozy i formaldehydu w stosunku 1:1. Co więcej, warto podkreślić, że dla systemów, w których w niewielkiej przewodzie znajdowało się XDH, NAD^+ czy ksyloza, także osiągnięto relatywnie wysokie wydajności realizowanych procesów. Uzyskane rezultaty są bezpośrednio związane z wartościami parametrów kinetycznych osadzonych enzymów, czyli stałej Michaelis-Menten oraz liczby obrotów enzymów (TTN). Oba te parametry są zależne od warunków procesowych i mogą przyjmować różne wartości w zależności od ilości substratu, właściwości i źródła pochodzenia enzymów oraz ilości kofaktora w mieszaninie reakcyjnej. Według dostępnych doniesień literaturowych dla 3HBDH stała Michaelis-Menten przyjmuje wartości od 0,25 do 12 mM, podczas gdy TTN wynosi od 13 do 30 1/s [200-202]. Natomiast dla XDH parametry te przyjmują odpowiednio wartości w zakresach 5–10 mM oraz 16–30 1/s [203,204]. Można więc zauważyć, że dla obu enzymów wartości wspomnianych parametrów są zbliżone, co koresponduje z rezultatami uzyskanymi dla systemu biokatalitycznego, bowiem najwyższej wydajności uzyskano w sytuacji gdy wszystkie analizowane stosunki zmiennych wynosiły 1:1. Analogiczne wnioski można również zaobserwować dla drugiego systemu biokatalitycznego, w którym zastosowano parę enzymatyczną GDH/3HBDH. Najwyższą efektywność produkcji kwasu glukonowego i kwasu 4-hydroksywalerianowego uzyskano dla mieszaniny reakcyjnej, w której zarówno enzymy, kofaktory, jak i substraty znajdowały się w stosunkach 1:1. Podobnie jak w przypadku systemu z XDH, stała Michaelis-Menten i TTN dla GDH są zbliżone do wartości tych parametrów dla 3HBDH i wynoszą odpowiednio 3–12 mM oraz 12–39 1/s [205-208], co wydaje się wyjaśniać, dlaczego wspomniane powyżej układy wykazały najwyższą skuteczność biokonwersji glukozy i kwasu lewulinowego.

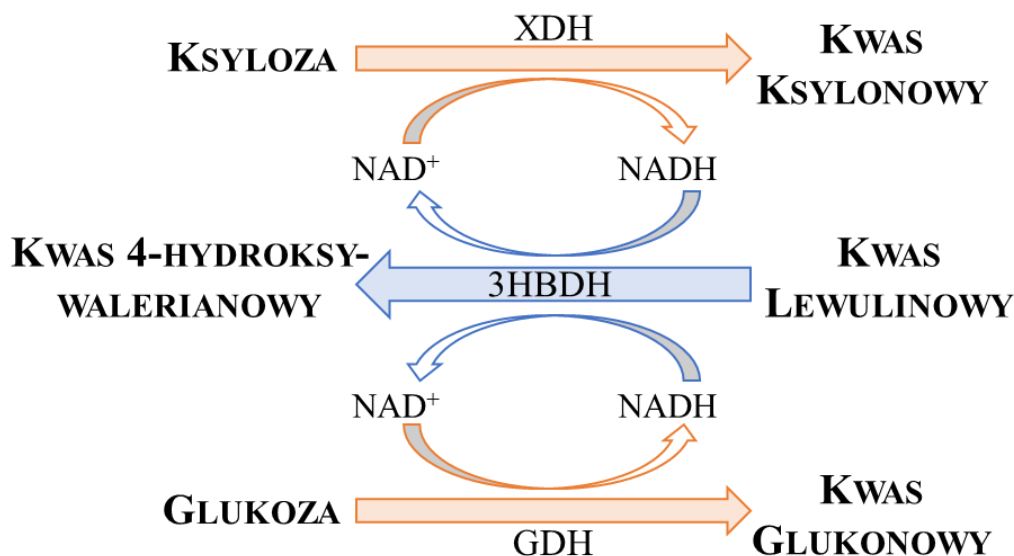


Rys. 33. Produktywność kwasów organicznych w zależności od stosunku: a) XDH:3HBDH, b) GDH:3HBDH, c) NAD⁺:NADH z dehydrogenazą ksyozy, d) NAD⁺:NADH z dehydrogenazą glukozy, e) ksyoza:kwas lewulinowy i f) glukoza:kwas lewulinowy (wykres słupkowy obrazuje produktywność kwasu ksylonowego/glukonowego, a wykres liniowy produktywność kwasu 4-hydroksywalerianowego)

Można zatem podsumować, że w ramach badań opisanych w **Publikacji 4** przeprowadzono proces koimmobilizacji dehydrogenazy 3-hydroksymaślanowej z dehydrogenazą ksyozy lub dehydrogenazą glukozy na membranie nanofiltracyjnej XN45, a następnie otrzymany system biokatalityczny zastosowano w procesach biokonwersji składników biomasy z jednoczesną regeneracją NAD⁺ i separacją

membranową końcowych produktów. Zastosowanie systemów XDH/3HBDH–membrana oraz GDH/3HBDH–membrana w trakcie procesów prowadzonych przez 2 h w mieszaninie reakcyjnej ze stosunkiem enzymów 1:1, kofaktorów $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ 1:1 oraz początkową zawartością substratów w stosunku molowym 1:1 pozwoliło na osiągnięcie produktywności kwasu 4-hydroksywalerianowego, kwasu ksylonowego i kwasu glukonowego na poziomie 98%. Należy także podkreślić, że zastosowanie koimmobilizowanych enzymów umożliwiło uzyskanie wysokich wydajności realizowanych przemian w szerszym zakresie zmiennych warunków procesowych niż w przypadku prowadzenia biokonwersji z udziałem natywnych białek. Dodatkowo dane uzyskane w trakcie testów wydzielania kwasów organicznych z mieszaniny reakcyjnej wykazały retencję produktów końcowych wynoszącą powyżej 90%.

Biorąc pod uwagę potencjał aplikacyjny systemów opracowanych w ramach **Publikacji 4** oraz znajomość składu roztworów rzeczywistych po obróbce/konwersji biomasy zdecydowano o podjęciu próby przygotowania bardziej zaawansowanego układu multienzymatycznego. Ze względu na fakt, że w roztworach po konwersji surowców roślinnych występuje zarówno ksyloza (~49 g/L), jak i glukoza (~10 g/L) uznano, że pożądanym system biokatalityczny powinien zawierać równocześnie enzymy zdolne do konwersji obu monosacharydów. Natomiast jako enzym regenerujący NAD^+ zaproponowano testowaną w **Publikacji 4** dehydrogenazę 3-hydroksymaślanową. Dlatego też do mieszaniny reakcyjnej konieczne było wprowadzenie kwasu lewulinowego, który nie był składnikiem przetwarzanego roztworu rzeczywistego, aby możliwa była realizacja regeneracji kofaktora. Zatem w ramach **Publikacji 5** podjęto się opracowania multienzymatycznego systemu zawierającego trzy enzymy: XDH, GDH i 3HBDH (rys. 34). Niemniej jednak zastosowanie membrany nanofiltrycyjnej jako nośnika wydawało się być czynnikiem generującym zbyt duże skomplikowanie proponowanego systemu biokatalitycznego i ograniczającym jego finalną efektywność. Dlatego też ostatecznie uznano, że materiałem odpowiednim na początkowym etapie badań będzie uniwersalny nośnik, za który uznawana jest mezoporowata krzemionka SBA-15. Co więcej, na podstawie doniesień literaturowych, które wskazują, że popularnym źródłem biomasy lignocelulozowej w Europie są chwasty, takie jak osika (*Populus* sp.) oraz drzewa, w tym brzoza (*Betula* sp.) i wierzba (*Salix* sp.) postanowiono, że obróbce wstępnej i dalszej konwersji zostanie poddane drewno z brzozy, a uzyskany roztwór rzeczywisty zostanie wykorzystany do dalszej konwersji jego składników do produktów o wysokiej użyteczności.



Rys. 34. Schemat przedstawiający reakcje przebiegające z układem biokatalitycznym XDH/GDH/3HBDH–krzemionka

Zgodnie z dostępną wiedzą krzemionka charakteryzuje się dobrze rozwiniętą powierzchnią właściwą i strukturą porowatą, a także posiada wysoką zdolność sorpcyjną, dlatego też jest popularnym nośnikiem w immobilizacji enzymów. Ponadto krzemionka SBA-15 pozwala na osadzanie białek nie tylko na jej powierzchni, ale również w porach, stąd zapewnia dodatkową ochronę dla biokatalizatorów i umożliwia osiągnięcie relatywnie wysokiej stabilności systemu biokatalitycznego w szerokim zakresie zmiennych warunków procesowych [209]. W jednej z opublikowanych dotąd prac nt. produkcji cukrów z biomasy lignocelulozowej Lin i in. [210] zastosowali koimmobilizowane na nanokrzemionce ksylanazę i lichenazę, a opracowany system biokatalityczny wykazał ponad 90-proc. wydajność w konwersji substratów. W celu potwierdzenia doniesień na temat uniwersalności materiału krzemionkowego jako nośnika w immobilizacji enzymów zdefiniowano parametry struktury porowatej przed i po osadzeniu białek. Obliczono, że czysta krzemionka SBA-15 charakteryzuje się powierzchnią właściwą równą 24,28 m²/g, podczas gdy średnia średnica porów wynosi 16,25 nm. Natomiast po przeprowadzeniu koimmobilizacji enzymów nastąpił znaczny spadek wartości powierzchni właściwej i średniej średnicy porów, które przyjęły wartości odpowiednio 5,74 m²/g i 10,35 nm. Zmiany wartości tych parametrów pośrednio świadczą o skutecznym osadzeniu enzymów na powierzchni i w porach krzemionki, co zapewnia dodatkową ochronę enzymów przed negatywnym wpływem czynników procesowych na ich efektywność [211]. Skuteczność koimmobilizacji białek została finalnie potwierdzona także na podstawie analizy rezultatów energodispersyjnej

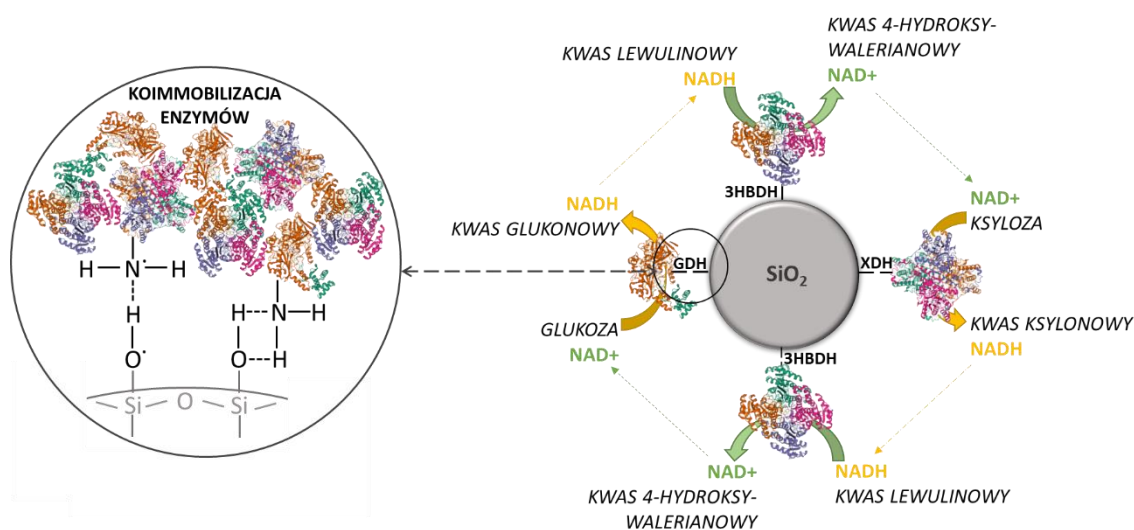
mikroanalizy rentgenowskiej (EDS), która umożliwiła określenie zawartości wybranych pierwiastków chemicznych na powierzchni analizowanych materiałów (tabela 9). Na podstawie analizy widm EDS można zauważyć, że czysta krzemionka SBA-15 składa się głównie z dwóch pierwiastków: tlenu (55,3%) oraz krzemu (43,3%). Jednak po przeprowadzeniu koimmobilizacji enzymów, skład pierwiastkowy uległ zmianie, szczególnie w przypadku zawartości azotu i siarki. Ilości azotu i siarki wzrosły bowiem odpowiednio z 1,4% do 2,0% i z 0,1% do 2,0%, co potwierdziło skuteczne osadzanie białek z wykorzystaniem krzemionki. Wynika to z faktu, że zarówno azot, jak i siarka wchodzi w skład aminokwasów i wiązań, tj. mostki siarczkowe i wiązania amidowe, które stanowią podstawę struktury trzech unieruchomionych dehydrogenaz [176].

Tabela 9. Zawartość procentowa wybranych pierwiastków chemicznych w analizowanych próbkach

Analizowany pierwiastek	Krzemionka SBA-15 [%]	Krzemionka z koimmobilizowanymi enzymami [%]
O	55,3	54,8
Si	43,3	41,0
N	1,4	2,0
S	0,1	2,0
Zn	0,1	0,1

Ze względu na fakt, że koimmobilizacja enzymów została przeprowadzona z wykorzystaniem metody adsorpcyjnej, pomiędzy nośnikiem a enzymami wytworzono głównie oddziaływania fizyczne, w tym siły van der Waalsa, oddziaływania adsorpcyjne oraz wiązania wodorowe (rys. 35). Co niezwykle istotne, powyżej wymienione są raczej słabymi oddziaływaniami krótkiego zasięgu, dlatego też ich obecność nie ma wpływu na zmianę struktury białek, a w konsekwencji miejsca aktywne enzymów są chronione przed zmianami konformacyjnymi, a aktywność katalityczna pozostaje zachowana na wysokim poziomie [212]. Dodatkowo należy wspomnieć, że krzemionka posiada wiele grup hydroksylowych, które świadczą o jej wysokiej hydrofilowości i gotowości do generowania wspomnianych oddziaływań z biokatalizatorem [78]. Należy podkreślić, że w trakcie prowadzonych badań, na widmach FTIR uzyskanych po koimmobilizacji enzymów zaobserwowano niewielkie przesunięcia sygnałów charakterystycznych dla wiązań amidowych I, II i III, w kierunku większych wartości liczby falowej, w porównaniu do widm natywnych enzymów. Taki rezultat sugeruje, że między grupami hydroksylowymi (pochodzącymi z SiO₂) a grupami aminowymi (część reszt

aminokwasowych wchodzących w strukturę enzymu) powstały m.in. wiązania wodorowe, co pozwoliło na przeprowadzenie skutecznej koimmobilizacji XDH, GDH i 3HBDH. Niemniej jednak nie należy zapominać, że możliwe było również osadzanie enzymów w porach materiału, a nie tylko związanie ich z powierzchnią nośnika, co wynika z dopasowania średnicy porów krzemionki i wielkości enzymów [213]. Krzemionka SBA-15 jest mezoporowatym materiałem o średnicy porów równej od kilku do kilkunastu nanometrów, podczas gdy enzymy XDH, GDH i 3HBDH charakteryzują się rozmiarem odpowiednio około 7 nm, 6 nm i 3 nm [214-216].



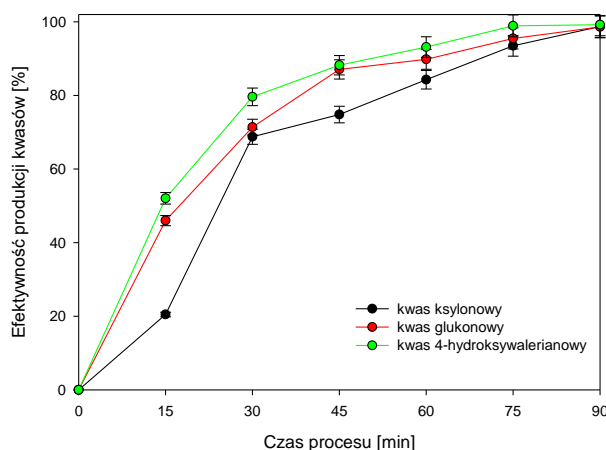
Rys. 35. Mechanizm koimmobilizacji XDH, GDH i 3HBDH z wykorzystaniem nośnika krzemionkowego oraz schemat prowadzonych procesów biokonwersji z równoczesną regeneracją kofaktora NAD⁺

Przy opracowywaniu efektywnego systemu reakcyjnego, w którym stosowane są równocześnie trzy enzymy równie istotne jak opisanie mechanizmu koimmobilizacji białek, jest także określenie optymalnego środowiska pracy wszystkich biokatalizatorów. Zatem niezbędne jest wypracowanie kompromisu pomiędzy szybkością biokonwersji a regeneracją kofaktora. Efektywność opracowanego systemu multienzymatycznego można uznać za wysoką, gdy osiągnięta zostanie maksymalna wydajność prowadzonych procesów konwersji, zrównoważona będzie szybkość wszystkich reakcji, a także uzyskana zostanie wysoka wartość liczby obrotów kofaktora [101]. Jak wcześniej wspomniano do roztworu rzeczywistego powstałego w wyniku obróbki wstępnej drewna brzozy dodatkowo wprowadzono kwas lewulinowy, niewchodzący pierwotnie w jego skład, aby możliwe było przeprowadzenie regeneracji NAD⁺ zużywanego przez dehydrogenazy katalizujące biokonwersję ksylozy i glukozy. Na rys. 35 przemiany form

kofaktora zostały zaznaczone za pomocą strzałek o odpowiednim kolorze (zielona strzałka przedstawia zużycie NAD^+ w trakcie biokonwersji monosacharydów; żółta pokazuje zastosowanie NADH w produkcji kwasu 4-hydroksywalerianowego). Na podstawie zaprezentowanych informacji można stwierdzić, że największy wpływ na efektywność systemu regeneracji kofaktorów ma synergiczne działanie enzymów, które powinny katalizować przemiany z taką szybkością, aby w mieszaninie reakcyjnej nie zabrakło żadnej z form kofaktora. Dlatego też niezwykle ważne jest, aby zrównoważyć szybkości powstawania wszystkich trzech kwasów organicznych. W trakcie prowadzonych badań najwyższą wartość szybkości reakcji odnotowano dla procesu z udziałem 3HBDH i tworzenia NAD^+ , a wyniosła ona 10,62 mM/min. Natomiast szybkość konwersji ksylozy z równoczesnym powstawaniem NADH jest nieco niższa (7,56 mM/min), niemniej jednak NADH jest w układzie reakcyjnym produkowane także podczas biokonwersji glukozy, która zachodzi z szybkością 1,43 mM/min. Wydaje się zatem, że sumaryczna ilość NADH wytworzona przez dwie reakcje konwersji monosacharydów jest w stanie zapewnić odpowiednią ilość kofaktora dla dehydrogenazy 3-hydroksymaślanowej, tak aby możliwe było zrównoważenie konwersji monosacharydów. Dodatkowo należy wspomnieć, że wartość liczby obrotów kofaktora, obliczonej jako liczba moli utworzonych kwasów organicznych w odniesieniu do całkowitej ilości kofaktora w opracowanym systemie biokatalitycznym wyniosła 8814. Ten rezultat potwierdza wysoką sprawność proponowanego systemu multienzymatycznego, szczególnie w porównaniu z innymi metodami recyklingu kofaktorów, takimi jak chemiczne lub elektrochemiczne, które zapewniają osiągnięcie stosunkowo niskich wartości TTN (<100) [131]. Zatem w oparciu o zaprezentowane dane można potwierdzić słuszność stwierdzenia, że zaproponowany system biokatalityczny jest efektywny i spełnia założone wymagania. Dlatego też w dalszej części badań podjęto się określenia najkorzystniejszych warunków stosowania zaprojektowanego układu multienzymatycznego, aby możliwe było osiągnięcie maksymalnej wydajności prowadzonych przemian.

Na rys. 36 przedstawiono krzywe zależności produktywności kwasów organicznych w czasie, które są niezbędne do określenia zmian ilości substratów i produktów podczas trwania reakcji. Jak można zauważyć, od pierwszych minut procesu następuje gwałtowny i znaczny wzrost ilości produktów w mieszaninie reakcyjnej i już po 0,5 h reakcji produktywność wszystkich trzech kwasów organicznych wynosiła ok. 70%. Przez kolejną godzinę procesu wydajność biokonwersji stale wzrastała, aż do uzyskania

najwyższych efektywności po 1,5 h. Należy zauważyć, że dalsze wydłużenie czasu procesu nie spowodowało znacznego zwiększenia produktywności żadnego z kwasów. Zatem najkorzystniejszy czas prowadzenia biokonwersji monosacharydów i kwasu lewulinowego to 1,5 h, podczas którego uzyskano 98-proc. konwersję ksylozy, przeprowadzono przekształcenie glukozy z wydajnością 96% i wyprodukowano kwas 4-hydroksywalerianowy z efektywnością 99%.



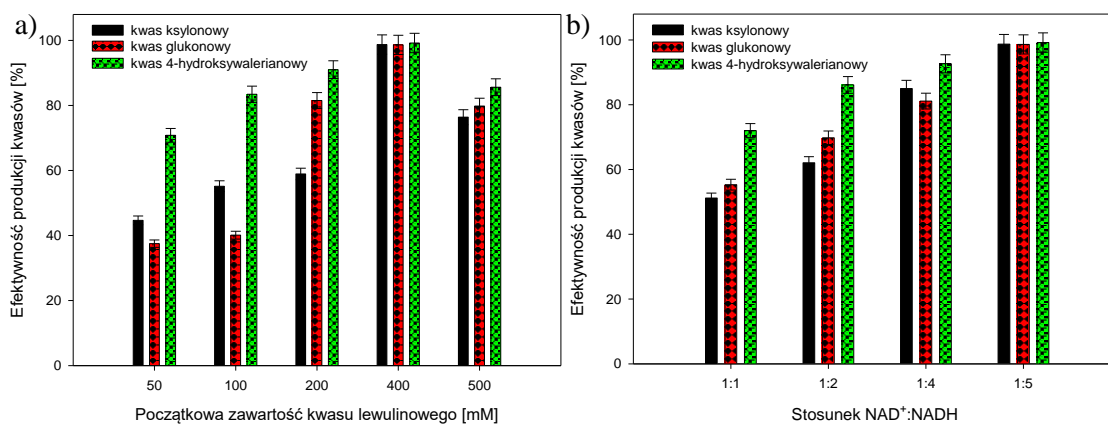
Rys. 36. Krzywe zależności czasu procesu od produktywności kwasów organicznych z wykorzystaniem opracowanego systemu biokatalitycznego XDH/GDH/3HBDH–krzemionka

Co więcej, należy zauważyć, że ze względu na zróżnicowaną charakterystykę obecnych w systemie reakcyjnym białek istotne wydawało się określenie najkorzystniejszej temperatury oraz pH środowiska, w którym zachodziły reakcje. Jak wskazano w **Publikacji 4** za odpowiednią temperaturę dla funkcjonowania trzech dehydrogenaz uznano temperaturę otoczenia (~ 21 °C). Natomiast dużo bardziej skomplikowane okazało się wyznaczenie najkorzystniejszego pH, ze względu na zróżnicowane warunki środowiska korzystne dla dehydrogenazy ksylozy (pH 7) i dehydrogenazy glukozy (pH 8). Niemniej jednak po przeprowadzeniu testów różnica w wydajnościach konwersji glukozy w środowisku o pH 7, w porównaniu do optymalnego pH (pH 8) wyniosła około 5% i była zdecydowanie mniejsza niż w przypadku konwersji ksylozy, która w pH 8 wyniosła o 10% mniej niż w najkorzystniejszych dla XDH warunkach procesowych (pH 7). Dlatego też zdecydowano, że dalsze badania nad opracowywanym systemem multienzymatycznym prowadzono w temperaturze otoczenia i pH 7.

Ze względu na fakt, że początkowe stężenie ksylozy i glukozy w roztworze rzeczywistym wyniosło odpowiednio 49 g/L oraz 10 g/L konieczne było dobranie

odpowiedniego stężenia dodawanego do mieszaniny reakcyjnej kwasu lewulinowego, a następnie także ilości enzymów i stosunku kofaktorów. Na podstawie wcześniejszych badań przedstawionych w **Publikacji 4**, jak również rezultatów uzyskanych m.in. przez Zheng i in. [149] oraz Jia i in. [217] zaobserwowano, że pary enzymatyczne XDH/3HBDH oraz GDH/3HBDH osiągają najwyższe wydajności, gdy są stosowane w stosunku 1:1. Jednak biorąc pod uwagę zawartości ksylozy i glukozy w roztworze wyjściowym do systemu reakcyjnego wprowadzono 20 U XDH oraz 10 U GDH. W konsekwencji czego obliczono, że ilość 3HBDH wprowadzonej do układu w stosunku 1:1 wobec obu wspomnianych powyżej enzymów, powinna wynosić 30 U. Dlatego też ostateczny stosunek XDH:GDH:3HBDH w systemie biokatalitycznym wynosił 2:1:3. Zastosowanie takich ilości dehydrogenaz pozwoliło na osiągnięcie najwyższej produktywności wszystkich trzech kwasów organicznych w układzie z dodatkiem 400 mM kwasu lewulinowego (rys. 37a). Należy podkreślić, że w każdym z badanych układów, w których ilość kwasu lewulinowego była inna niż 400 mM, produkcja kwasu 4-hydroksywalerianowego była znacznie skuteczniejsza niż produktywność kwasu ksylonowego i kwasu glukonowego, co mogło wynikać z niedostatecznej ilości NAD^+ w mieszaninie reakcyjnej, a w konsekwencji powodować hamowanie głównych reakcji biokonwersji monosacharydów, które prowadziły enzymy zależne od tej formy kofaktora [179]. Otrzymane rezultaty wpływu dodatku kwasu lewulinowego korespondowały z rezultatami badań nad wpływem stosunku kofaktorów w układzie reakcyjnym (rys. 37b). Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazały, że w celu przeprowadzenia efektywnej biokonwersji monosacharydów konieczne jest wprowadzenie do systemu znacznej początkowej ilości NADH. Jak można zauważyć najwyższą produktywność wszystkich trzech kwasów uzyskano dla stosunku $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ 1:5. Natomiast im mniej NADH w układzie reakcyjnym, tym niższe wydajności procesu zostały osiągnięte. Otrzymane wyniki łączą się bezpośrednio z danymi nt. ilości enzymów oraz zawartością substratów w mieszaninie reakcyjnej, jak również z szybkościami prowadzonych reakcji. Zbyt mała ilość NADH w układzie odgrywa znaczącą rolę, ponieważ wpływa na nieskuteczność konwersji kwasu lewulinowego, a w konsekwencji niewytworzenie odpowiedniej ilości NAD^+ , czego wynikiem jest nieefektywna regeneracja kofaktora i dalsza ograniczona biokonwersja ksylozy i glukozy. Co ciekawe, Jin i in. [218] przeprowadzili redukcję ksylozy do ksylitolu z jednoczesną biokonwersją glukozy w kwas glukonowy przy użyciu NADPH-zależnej reduktazy ksylozy oraz NADP^+ -zależnej dehydrogenazy glukozy przy wyjściowym stosunku enzymów 1:3

i wykazano, że proces przebiegał najskuteczniej w obecności kofaktorów w stosunku NADPH:NADP⁺ 1:4, co potwierdza istotność znaczenia doboru odpowiednich ilości form kofaktora w zależności do zawartości enzymów i substratów w mieszaninie reakcyjnej.



Rys. 37. Wpływ: a) ilości dodatku kwasu lewulinowego do roztworu rzeczywistego oraz b) stosunku kofaktorów na efektywność prowadzonych biokonwersji

Po wyznaczeniu najkorzystniejszych warunków procesowych, którymi okazały się być temperatura otoczenia, pH 8, 1,5 h prowadzenia biokonwersji oraz dodatek 400 mM kwasu lewulinowego i stosunek masowy NAD⁺:NADH 1:5 przystąpiono do kolejnego etapu badań. Z aplikacyjnego punktu widzenia, jak również ze względu na potencjalne dodatkowe koszty wynikające z konieczności zastosowania nośnika i konieczności przeprowadzenia koimmobilizacji enzymów, zasadne wydaje się określenie najskuteczniejszej formy biokatalizatora. Dlatego też przeprowadzono testy pięciu różnych konfiguracji układu enzymatycznego, a wśród nich przebadano natywne XDH, GDH, i 3HBDH, koimmobilizowane biokatalizatory oraz formy mieszane, które składały się z jednego wolnego enzymu, podczas gdy pozostałe dwa białka zostały unieruchomione. Jak można zauważyć, na podstawie analizy danych przedstawionych w tabeli 10, dla układu z trzema koimmobilizowanymi dehydrogenazami uzyskano najwyższą efektywność produkcji kwasu ksylonowego, kwasu glukonowego i kwasu 4-hydroksywalerianowego, które wyniosły odpowiednio 98%, 95% i 99%. Dodatkowo wysoka aktywność wspomnianych biokatalizatorów została potwierdzona w oparciu o rezultaty obliczonej produktywności biokatalitycznej, która dla koimmobilizowanych biokatalizatorów była zdecydowanie najwyższa (szczególnie dla XDH i 3HBDH) spośród wszystkich badanych konfiguracji systemów enzymatycznych. Uzyskany rezultaty są wynikiem poprawy stabilności enzymów, a w konsekwencji

ograniczeniem negatywnego wpływu środowiska procesowego na aktywność katalityczną stosowanych białek.

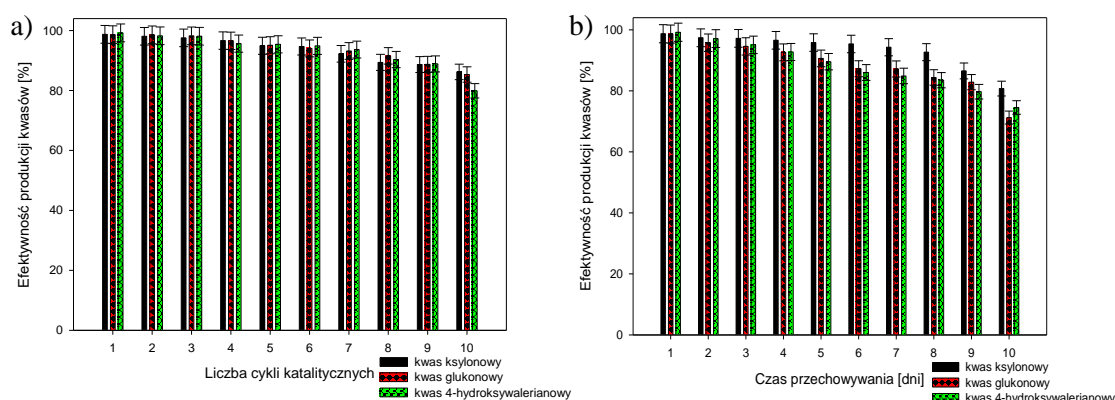
Tabela 10. Efektywność biokonwersji oraz produktywność biokatalityczna różnych kwasów organicznych, w zależności od zastosowanej konfiguracji układów enzymatycznych

System biokatalityczny	Efektywność produkcji kwasów ^a [%]			Produktywność biokatalityczna ^b [mM/U]		
	Kwas ksylonowy	Kwas glukonowy	Kwas 4-hydroksy-walerianowy	Kwas ksylonowy	Kwas glukonowy	Kwas 4-hydroksy-walerianowy
Natywne enzymy	91,3	91,3	84,2	15,1	5,48	11,2
Natywna GDH + koimmobilizowane XDH/3HBDH	94,6	88,3	96,3	15,6	5,30	12,8
Natywna XDH + koimmobilizowane GDH/3HBDH	83,6	87,9	88,7	13,8	5,28	11,8
Natywna 3HBDH + koimmobilizowane XDH/GDH	91,0	95,2	84,1	15,0	5,71	11,2
Koimmobilizowane enzymy	98,7	95,6	99,2	16,3	5,74	13,2

^awydajność konwersji ksylozy po 1 cyklu katalitycznym; ^bproduktywność biokatalityczna po 1 cyklu reakcyjnym

Należy zauważyć, że efektywności produkcji kwasów organicznych uzyskane przez system z wolnymi białkami były relatywnie wysokie, szczególnie biorąc pod uwagę fakt, że enzymy były narażone na działanie wielu inhibitorów obecnych w roztworze rzeczywistym. Wśród nich konieczne jest wskazanie przede wszystkim kwasu octowego, który według doniesień Sun i in. [167] jest stosunkowo małą cząsteczką, w porównaniu do innych związków znajdujących się w mieszaninie reakcyjnej, w konsekwencji czego może konkurować z ksylozą, glukozą czy kwasem lewulinowym o dostępność do miejsc aktywnych enzymów. Niemniej jednak biorąc pod uwagę finalną produktywność biokatalityczną 1 U natywnych enzymów, obliczoną w przeliczeniu na otrzymaną ilość mM kwasów, wykazano, że wpływ środowiska reakcji na aktywność wolnych biokatalizatorów jest znaczący i zastosowanie krzemionki jako nośnika dla enzymów zapewnia dodatkową ochronę, która jest niezbędna do zachowania wysokiej aktywności katalitycznej. Co ciekawe, stosunkowo wysokie wartości produktywności uzyskano dla układów enzymatycznych w postaci mieszanej. Należy jednak zaznaczyć, że w każdym z trzech przypadków najniższe wydajności dla konkretnych kwasów

organicznych uzyskano dla systemów, w których biokatalizator odpowiedzialny za jego konwersję był w postaci wolnej. Taki rezultat stanowi zatem kolejny dowód na słuszność stosowania procesu koimmobilizacji, aby zapewnić wysoką stabilność i odporność układu biokatalitycznego [219]. Dlatego też dalsze badania skoncentrowane na określeniu potencjału opracowanych systemów biokatalitycznych w kontekście możliwości ich wielokrotnego wykorzystania, skupiły się na układzie z trzema enzymami koimmobilizowanymi na materiale krzemionkowym.



Rys. 38. a) Testy wielokrotnego wykorzystania oraz b) stabilności w trakcie przechowywania opracowanego systemu biokatalitycznego XDH/GDH/3HBDH

W perspektywie potencjalnego powiększania skali konieczne było zdefiniowanie zdolności katalitycznych opracowanego układu multienzymatycznego w następujących po sobie cyklach, jak również określenie stabilności w trakcie przechowywania w 4 °C. W związku z tym wytworzony biokatalizator został przetestowany w 10 cyklach reakcyjnych, w najkorzystniejszych dla niego warunkach procesowych. Jak można zaobserwować na rys. 38a, po zakończeniu dziesiątego cyklu, system biokatalityczny był zdolny do skutecznego przeprowadzenia procesów biokonwersji z wydajnością powyżej 80% dla wszystkich trzech analizowanych kwasów organicznych. Ponadto należy podkreślić, że przechowywanie biokatalizatora przez 10 dni w temperaturze 4 °C nie wpłynęło znacząco na stabilność enzymów, czego potwierdzeniem jest fakt, że po tym okresie osiągnięto ponad 70-proc. produktywność analizowanych kwasów. Zatem otrzymane rezultaty potwierdzają wysoką stabilność opracowanego systemu multienzymatycznego. Zbliżone wnioski zostały przedstawione przez Zhou i in. [220], którzy na zmodyfikowanej krzemionce osadzili enzymy zdolne do przeprowadzenia procesu uwodornienia (3S)-3-metylocykloheksanonu z jednoczesną regeneracją kofaktora. Opracowany system biokatalityczny umożliwił przeprowadzenie siedmiu

kolejnych cykli reakcyjnych przy zachowaniu wydajności na poziomie 50%. Ponadto enzymy były zdolne do katalizowania redukcji 3-metylo-2-cykloheksen-1-onu z wydajnością około 90%, podczas gdy biokonwersja glukozy przebiegała z efektywnością około 85% po przechowywaniu biokatalizatora przez 10 dni w temperaturze 4 °C. Dlatego też zasadnym wydaje się stwierdzenie, że opracowany w ramach przedkładanej rozprawy system XDH/GDH/3HBDH–krzemionka ma znaczny potencjał w dalszych badaniach, ze względu na praktyczne aspekty jego zastosowania.

Podsumowując, w ramach badań przedstawionych w **Publikacji 5** dehydrogenaza ksylony, dehydrogenaza glukozy i dehydrogenaza 3-hydroksymaślanowa zostały skutecznie unieruchomione z wykorzystaniem krzemionki SBA-15, a opracowany system biokatalityczny był zdolny do efektywnej biokonwersji monosacharydów z roztworu rzeczywistego otrzymanego po obróbce i konwersji biomasy. Co więcej, określono najkorzystniejsze warunki prowadzenia biokonwersji monosacharydów, którymi okazały się być temperatura 21 °C, pH 7, 1,5 h czasu trwania procesu, dodatek 400 mM kwasu lewulinowego i stosunek $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ 1:5. Podczas prowadzenia reakcji we wspomnianych warunkach możliwe było wyprodukowanie kwasu ksylonowego, kwasu glukonowego i kwasu 4-hydroksywalerianowego z wysokimi wydajnościami przekraczającymi 95%. Ponadto udowodniono, że układ z trzema równocześnie unieruchomionymi enzymami pozwala na osiągnięcie najwyższych efektywności produkcji kwasów organicznych, w porównaniu do systemów z mieszanymi formami biokatalizatora lub natywnymi białkami. Wysoka stabilność i odporność opracowanego układu zostały dodatkowo zweryfikowane na podstawie oceny możliwości zastosowania tego systemu w kolejnych cyklach katalitycznych oraz stabilności podczas przechowywania. Zatem wydaje się, że zaproponowany system XDH/GDH/3HBDH–krzemionka wykazuje znaczny potencjał aplikacyjny w konwersji roztworów rzeczywistych pochodzących z przetwórstwa biomasy.

6. Podsumowanie i wnioski

Badania podjęte w ramach przedkładanej dysertacji służyły przede wszystkim realizacji założonego celu poznawczego, ale dążyły także do potwierdzenia postawionej hipotezy badawczej, która zakładała, że koimmobilizowane enzymy są zdolne do efektywnej konwersji wybranych składników biomasy do związków o wysokim potencjale aplikacyjnym oraz prowadzenia jednoczesnej regeneracji kofaktora enzymatycznego. Dlatego też w trakcie zrealizowanych prac opracowano kilka systemów multienzymatycznych opartych o starannie wyselekcjonowane nośniki oraz wybrane dehydrogenazy, które zostały szeroko scharakteryzowane i opisane w **Publikacjach 1–5**. Ze względu na fakt, że kluczową rolę w realizowanych pracach odgrywała konwersja biomasy, jako główne enzymy wytypowano NAD^+ -zależne dehydrogenazę ksylozy oraz dehydrogenazę glukozy. Natomiast wśród białek zdolnych do regeneracji kofaktora (wykorzystujących NADH do prawidłowego funkcjonowania) przetestowano komercyjnie dostępną i szeroko stosowaną dehydrogenazę alkoholową oraz dehydrogenazę 3-hydroksymaślanową, która poza regeneracją NAD^+ jest też skuteczna w konwersji kwasu lewulinowego, który jest składnikiem roztworów biomasy, a jednocześnie jest inhibitorem procesów jej konwersji. Układy biokatalityczne oparte o dehydrogenazę ksylozy i dehydrogenazę alkoholową unieruchomione na materiale kompozytowym magnetyt-krzemionka lub membranie nanofiltrycyjnej XN45 do jednoczesnej biokonwersji ksylozy i formaldehydu oraz regeneracji kofaktora NAD^+ zostały przedstawione odpowiednio w **Publikacjach 1–2** i **Publikacji 3**. Podczas gdy rezultaty badań nad zastosowaniem dehydrogenazy ksylozy, dehydrogenazy glukozy i dehydrogenazy 3-hydroksymaślanowej osadzonymi na membranie nanofiltrycyjnej XN45 lub mezoporowatej krzemionce SBA-15 zaprezentowane odpowiednio w **Publikacji 4** i **Publikacji 5**. Opracowanie każdego ze wspomnianych systemów biokatalitycznych obejmowało przygotowanie lub syntezę nośnika, skuteczne przeprowadzenie procesu koimmobilizacji enzymów, a następnie zdefiniowanie potencjału aplikacyjnego wytworzonych biokatalizatorów w konwersji biomasy oraz określenie wpływu wybranych parametrów procesowych na efektywność prowadzonych przemian. Istotnym aspektem było też potwierdzenie skuteczności regeneracji kofaktora, a wartość dodaną badań stanowiło zaproponowanie skutecznej metody separacji produktów końcowych z mieszaniny reakcyjnej, aby możliwe było uzyskanie związków o wysokiej czystości. W tabeli 11 w sposób zbiorczy i przeglądowy zaprezentowano

wszystkie systemy multienzymatyczne opracowane w ramach przedkładanej rozprawy doktorskiej, wraz ze wskazaniem najkorzystniejszych warunków prowadzenia koimmobilizacji białek i konwersji składników biomasy oraz uzyskanymi efektywnościami prowadzonych procesów.

Jak już wspomniano, w każdym z opracowanych systemów biokatalitycznych enzymem głównym była dehydrogenaza ksylozy i/lub dehydrogenaza glukozy, podczas gdy jako białka regenerujące, odpowiedzialne za recykling kofaktora NAD⁺, zastosowano dehydrogenazę alkoholową (**Publikacje 1–3**) lub dehydrogenazę 3-hydroksymaślanową (**Publikacje 4–5**). Takie zestawienie biokatalizatorów oznacza, że biokonwersja monosacharydów była traktowana jako reakcja główna, a jej finalnymi produktami były kwas ksylonowy i/lub kwas glukonowy, podczas gdy formaldehyd i kwas lewulinowy zostały wprowadzone do układów reakcyjnych jako substraty w reakcjach regeneracji kofaktora. W trakcie koimmobilizacji systemów multienzymatycznych wykorzystano trzy różne nośniki odznaczające się odmienną charakterystyką fizykochemiczną, strukturą i morfologią, wśród których należy wymienić materiał kompozytowy magnetyt-krzemionka (**Publikacje 1–2**), membranę nanofiltracyjną XN45 (**Publikacje 3–4**) oraz mezoporowatą krzemionkę SBA-15 (**Publikacja 5**). Odpowiednio dobrane właściwości fizykochemiczne nośników, dobrze rozwinięta struktura porowata tych materiałów, jak i obecność reaktywnych grup funkcyjnych były czynnikami decydującymi o ich wyborze, a ze względu na wspomniane właściwości immobilizację przeprowadzono głównie z wykorzystaniem techniki adsorpcyjnej. Zastosowanie materiału kompozytowego magnetyt-krzemionka oraz mezoporowatej krzemionki SBA-15 (**Publikacje 1–2 i Publikacja 5**) pozwoliło na osadzenie enzymów zarówno na powierzchni, jak i w porach nośnika. Natomiast wykorzystanie membrany nanofiltracyjnej (**Publikacje 3–4**) umożliwiło unieruchomienie białek głównie na powierzchni materiału, a w konsekwencji blokowanie jego porów, ze względu na fakt, że immobilizowane enzymy są większe niż pory nośnika. Dlatego też w przypadku zastosowania membrany, osadzone biokatalizatory zostały dodatkowo pokryte warstwą polidopaminy, która pełniła funkcję ochronną przed nadmierną elucją białek z materiału.

Tabela 11. Porównanie systemów biokatalitycznych opracowanych w ramach pracy doktorskiej

	Enzym główny	Enzym regenerujący	Materiał nośnika	Warunki koimmobilizacji	Warunki biokonwersji	Efektywność biokonwersji	Stabilność
Publikacja 1	XDH	ADH	materiał kompozytowy Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	czas: 2 h temperatura: 25 °C bufor MES o pH 7 stosunek XDH:ADH: 2:1	czas: 1 h temperatura: 25 °C bufor MES o pH 7 stosunek substratów: 1:1 stosunek NAD ⁺ :NADH: 1:1	(XA) 82%	5 cykli: >65% 20 dni: >60%
Publikacja 2	XDH	ADH	materiał kompozytowy Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	czas: 2 h temperatura: 25 °C bufor TAPSO o pH 7 stosunek XDH:ADH: 2:1	czas: 1 h temperatura: 25 °C bufor TAPSO o pH 7 stosunek substratów: 1:1 stosunek NAD ⁺ :NADH: 1:1	(XA) 99%	5 cykli: >65% 20 dni: >60%
Publikacja 3	XDH	ADH	membrana nanofiltrycyjna XN45	czas: do zebrania 4,5 mL permeatu temperatura otoczenia ciśnienie: 4 bar bufor TAPSO o pH 7 stosunek XDH:ADH: 2:1	czas: 1 h temperatura otoczenia bufor TAPSO o pH 7 stosunek substratów: 1:1 stosunek NAD ⁺ :NADH: 1:1	(XA) 99%	5 cykli: >90% 10 dni: >80%
Publikacja 4	XDH	3HBDH	membrana nanofiltrycyjna XN45	czas: do 2,5 mL permeatu temperatura otoczenia ciśnienie: 2 bar bufor TAPSO o pH 7 ratio XDH:3HBDH: 1:1	czas: 2 h temperatura otoczenia bufor TAPSO o pH 7 ratio substratów: 1:1 ratio NAD ⁺ :NADH: 1:1	(XA) 98% (4-HV) 99%	10 cykli: >70% 10 dni: >50%
	GDH	3HBDH	membrana nanofiltrycyjna XN45	czas: do 2,5 mL permeatu temperatura otoczenia ciśnienie: 2 bar bufor TAPSO o pH 8 stosunek GDH:3HBDH: 1:1	czas: 2 h temperatura otoczenia bufor TAPSO o pH 8 stosunek substratów: 1:1 stosunek NAD ⁺ :NADH: 1:1	(GA) 98% (4-HV) 98%	10 cykli: >70% 10 dni: >70%
Publikacja 5	XDH GDH	3HBDH	krzemionka SBA-15	czas: 2 h temperatura otoczenia bufor TAPSO o pH 7 stosunek XDH:GDH:3HBDH: 2:1:3	czas: 1,5 h temperatura otoczenia bufor TAPSO o pH 7 stosunek NAD ⁺ :NADH: 1:5	(XA) 98% (GA) 95% (4-HV) 99%	10 cykli: >85% 10 dni: >80%

(XA): produktywność kwasu ksylonowego; (GA): produktywność kwasu glukonowego; (4-HV): produktywność kwasu 4-hydroksywalerianowego

Biorąc pod uwagę warunki procesu koimmobilizacji należy zauważyć, że wszystkie opracowane systemy zostały wytworzone w temperaturach w zakresie od 21 do 25 °C, a więc w warunkach zbliżonych do temperatury otoczenia. Co więcej, większość z proponowanych układów enzymatycznych zostało unieruchomionych w środowisku buforu TAPSO o pH 7, który zapewniał odpowiednią stabilność osadzonym biokatalizatorom i nie miał negatywnego wpływu na stabilność kofaktorów. Jedyne wyjątkiem stanowił system GDH/3HBDH–membrana (**Publikacja 4**), którego wytwarzanie przebiegało w pH 8, z uwagi na charakterystykę dehydrogenazy glukozy, która preferuje lekko zasadowe warunki medium reakcyjnego. Warto zatem podkreślić, że otrzymanie prezentowanych systemów biokatalitycznych przebiegało w łagodnych warunkach i nie wymagało stosowania podwyższonej lub obniżonej temperatury, bądź też skrajnie kwasowego lub zasadowego środowiska, co może negatywnie wpływać na aktywność enzymów. Dodatkowo w ramach badań przedstawionych w **Publikacji 2** dowiedziono znaczenia doboru roztworu buforowego na zachowanie aktywności enzymów oraz późniejszą efektywność biokonwersji, a zebrane dane wskazały bufor TAPSO jako medium zapewniające najwyższą aktywność i stabilność.

Ponadto, niezależnie od stosowanego nośnika, czas trwania koimmobilizacji enzymów był stosunkowo krótki. Unieruchomienie białek z wykorzystaniem nośników krzemionkowych było prowadzone przez 2 h, podczas gdy osadzanie biokatalizatorów na membranie nanofiltrycyjnej przebiegało do zebrania około 90% początkowej objętości roztworu enzymu użytego do immobilizacji, co w zależności od systemu trwało od 2 do 4 h. Efektywność wytworzenia przedstawianych układów multienzymatycznych została potwierdzona na podstawie danych uzyskanych z wykorzystaniem szeregu analiz fizykochemicznych, takich jak spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera, energodispersyjna mikroanaliza rentgenowska oraz spektroskopia UV-Vis, a zebrane dane jasno wskazują, że wydajność koimmobilizacji enzymów we wszystkich analizowanych systemach wyniosła powyżej 80%, co należy uznać za satysfakcjonującą wartość. Należy także zauważyć, że unieruchomienie białek miało wpływ na zmianę właściwości nośników, co jest szczególnie widoczne w przypadku membran nanofiltrycyjnych, dla których wartości przepływu i przepuszczalności wody po procesie koimmobilizacji enzymów były zdecydowanie niższe niż wartości tych parametrów dla czystego materiału. Rezultat ten sugeruje, że biokatalizatory zostały osadzone przede wszystkim na powierzchni nośnika i powodowały blokowanie porów, czego dodatkowym potwierdzeniem były zmiany w parametrach struktury porowatej

stosowanych membran. Ponadto znaczne różnice w wielkości powierzchni właściwej oraz średnicy porów odnotowano w przypadku nośników krzemionkowych przed i po koimmobilizacji, co jasno wskazuje, że białka zostały osadzone także we wnętrzu i potwierdza, że dobór nośnika o odpowiedniej porowatości może zapewnić dodatkową ochroną dla unieruchamianych enzymów. Można zatem podsumować, że opracowane systemy zostały wytworzone efektywnie, a nośniki zostały dobrane w sposób zapewniający nie tylko wysoką sprawność operacyjną unieruchomionym enzymom, ale także ich dodatkową stabilizację w warunkach procesowych.

Kluczowym etapem badań były jednak testy aplikacyjne wytworzonych układów. W pierwszej części prac opracowano systemy biokatalityczne, których podstawę stanowią dehydrogenaza ksylozy i dehydrogenaza alkoholowa koimmobilizowane na nośnikach takich jak materiał kompozytowy magnetyt-krzemionka (**Publikacje 1–2**) oraz membrana nanofiltracyjna (**Publikacja 3**). Wykazano, że zastosowanie obu proponowanych układów w najkorzystniejszych dla nich warunkach (czas trwania procesu 1 h, temperatura 21–25 °C, bufor TAPSO o pH 7, stosunek ksylozy do formaldehydu 1:1 oraz stosunek $\text{NAD}^+:\text{NADH}$: 1:1) umożliwiło przeprowadzenie procesu konwersji ksylozy z wydajnością ponad 99%. Co więcej dowiedziono, że równocześnie z produkcją kwasu ksylonowego skutecznie przebiegała regeneracja kofaktora NAD^+ prowadzona przez NADH -zależną dehydrogenazę alkoholową. Stwierdzono jednak znaczne różnice w wydajności procesów prowadzonych przez unieruchomione i natywne enzymy. W zmiennych warunkach procesowych, szczególnie w przypadku temperatury i pH, odnotowano bowiem pozytywny wpływ koimmobilizacji białek na zachowanie stabilności układu w całym zakresie testowanych parametrów. Z kolei wolne enzymy w skrajnych temperaturach i pH gwałtownie traciły swoje właściwości katalityczne. Potwierdzono także, że reakcjami preferowanymi kinetycznie przez parę enzymatyczną XDH/ADH są konwersja ksylozy do kwasu ksylonowego oraz przekształcanie NADH w NAD^+ , co jest korzystne z punktu widzenia funkcjonalności projektowanych układów. W przypadku systemu $\text{XDH}/\text{ADH}-\text{Fe}_3\text{O}_4-\text{SiO}_2$ określono także wpływ inhibitorów na efektywność biokonwersji ksylozy, a uzyskane dane wykazały, że obecność kwasów organicznych (tj. kwas octowy i kwas lewulinowy) powoduje znaczne obniżenie aktywności biokatalizatorów poprzez blokowanie miejsc aktywnych enzymów. Należy jednak wyraźnie podkreślić, że pomimo różnych konfiguracji stosowanej aparatury, w obu opracowanych systemach, możliwe było przeprowadzenie efektywnej separacji membranowej kwasu ksylonowego i uzyskanie

jego wysokiej czystości. Jednak rozwiązanie przedstawione w **Publikacji 3**, które zakłada wykorzystanie enzymatycznego reaktora membranowego, wydaje się być ekonomicznie korzystniejsze, ze względu na fakt, że biokonwersja ksylozy z regeneracją kofaktora i separacją produktu końcowego przebiega w tym samym czasie w jednym urządzeniu. Z kolei w przypadku układu enzymatycznego unieruchomionego na materiale kompozytowym magnetyt-krzemionka konieczne jest przeniesienie mieszaniny poreakcyjnej do innego modułu, co generuje dodatkowe koszty i powoduje wzrost skomplikowania procesu. Jednak istotną zaletą systemu enzymatycznego opisanego w **Publikacjach 1–2** jest możliwość wydzielenia biokatalizatora z mieszaniny reakcyjnej z wykorzystaniem zewnętrznego pola magnetycznego, co nie wymaga znacznej ingerencji w konstrukcję aparatury, w której przebiegają omawiane procesy.

Z aplikacyjnego punktu widzenia niezwykle ważne jest potwierdzenie możliwości ponownego wykorzystania opracowanych systemów biokatalitycznych w kolejnych cyklach reakcyjnych. W przypadku obu układów możliwe było przeprowadzenie 5 następujących po sobie biokonwersji ksylozy z ok. 65-proc. i 90-proc. wydajnością odpowiednio dla układu XDH/ADH-Fe₃O₄-SiO₂ oraz XDH/ADH-membrana. Dodatkowo przechowywanie unieruchomionych enzymów skutkuje niewielkim spadkiem ich aktywności katalitycznej, co dodatkowo potwierdza stabilizację analizowanych biokatalizatorów w wyniku immobilizacji. Dlatego też wydaje się, że zaproponowane układy biokatalityczne stanowią solidny fundament do rozwoju dalszych prac nad wykorzystaniem koimmobilizowanych enzymów w efektywnej konwersji biomasy.

W drugim etapie prac wytworzono systemy biokatalityczne oparte o dehydrogenazę 3-hydroksymaślanową jako enzym odpowiedzialny za regenerację NAD⁺. W związku z tym w **Publikacji 4** zaprezentowano systemy z 3HBDH i dehydrogenazą ksylozy lub dehydrogenazą glukozy unieruchomionymi na membranie nanofiltracyjnej XN45, a wytworzone układy zostały zastosowane w biokonwersji kwasu lewulinowego i ksylozy lub glukozy z jednoczesnym recyklingiem kofaktora. Uzyskane rezultaty stanowiły motywację do opracowania systemu biokatalitycznego w skład, którego wchodziły trzy enzymy: dehydrogenaza ksylozy, dehydrogenaza glukozy i dehydrogenaza 3-hydroksymaślanowa (**Publikacja 5**), które zostały jednocześnie osadzone na mezoporowatej krzemionce SBA-15. Układ multienzymatyczny przedstawiony w **Publikacji 5** był nie tylko bardziej zaawansowany i złożony niż wytworzone wcześniej

systemy, ale także został przetestowany w konwersji ksylozy i glukozy prowadzonej z roztworu rzeczywistego otrzymanego po obróbce drewna brzozy.

Przeprowadzając testy systemów XDH/3HBDH–membrana oraz GDH/3HBDH–membrana (**Publikacja 4**) wykazano, że ich zastosowanie w temperaturze otoczenia i roztworze buforowym o pH 7 (system z XDH) lub pH 8 (system z GDH) pozwala na produkcję kwasu ksylonowego, kwasu glukonowego i kwasu 4-hydroksywalerianowego z efektywnościami powyżej 98%. Wysoką użyteczność potwierdzono także dla zaproponowanego w **Publikacji 5** układu XDH/GDH/3HBDH–SiO₂, który umożliwił produkcję kwasów organicznych z wydajnościami w zakresie 95–99%. Taki rezultat wydaje się szczególnie satysfakcjonujący, ze względu na skuteczne użycie opracowanego układu w przetwarzaniu składników roztworu rzeczywistego. Niemniej jednak należy podkreślić, że pomimo zbliżonych warunków temperatury i pH prowadzonych procesów zastosowanie układu XDH/GDH/3HBDH–SiO₂ wymagało doprowadzenia do mieszaniny reakcyjnej większej ilości kwasu lewulinowego (400 mM) oraz znacznej zmiany stosunku enzymów i kofaktorów. Wspomniane różnice wynikały z konieczności dostarczenia odpowiedniej ilości dodatkowego substratu, jak i zapewnienia odpowiednich ilości enzymów i kofaktorów w układzie reakcyjnym, co jest związane ze składem poddanego konwersji roztworu rzeczywistego i zmiennych ilości poszczególnych składników. Co więcej, dehydrogenaza 3-hydroksymaślanowa była odpowiedzialna za regenerację NAD⁺, zużywanego równocześnie przez dehydrogenazę ksylozy i dehydrogenazę glukozy, w przeciwieństwie do systemów przedstawionych w **Publikacji 4**, w których procesy biokonwersji ksylozy i glukozy zachodziły osobno. Dlatego też niezbędne było wprowadzenie do mieszaniny reakcyjnej nadmiaru 3HBDH, a w konsekwencji 5-krotnie większej ilości NADH niż NAD⁺.

Ponadto należy podkreślić, że podobnie jak w przypadku omawianych wcześniej systemów z dehydrogenazą alkoholową, również w **Publikacjach 4–5** zastosowanie koimmobilizowanych enzymów umożliwiło uzyskanie wysokich wydajności wytwarzania kwasów organicznych w szerokim zakresie warunków procesowych. Co więcej, prowadzenie biokonwersji monosacharydów w obecności otrzymanych układów pozwoliło na osiągnięcie znacznie wyższych efektywności niż w przypadku procesów katalizowanych przez ich natywne odpowiedniki. Analogicznie jak w przypadku badań przedstawionych w **Publikacjach 1–3** także w przypadku układów opisanych w **Publikacjach 4–5** zaobserwowano pozytywny wpływ koimmobilizacji na możliwość efektywnego zastosowania omawianych systemów w dziesięciu kolejnych cyklach

katalitycznych. Uzyskane rezultaty jasno wskazują także na długoterminową stabilność utworzonych biokatalizatorów. Przechowywanie systemów XDH/3HBDH–membrana i GDH/3HBDH–membrana przez 10 dni w 4 °C umożliwiło prowadzenie konwersji ze skutecznością odpowiednio powyżej 50% i 70%. Natomiast w przypadku układu XDH/GDH/3HBDH–SiO₂ zachowana aktywność była wyższa i wyniosła ponad 80%. Wykazana różnica może wynikać m.in. z ilości enzymów wymytych z nośnika w trakcie prowadzonych reakcji. Białka osadzone zarówno na powierzchni krzemionki, jak i w jej porach są bowiem mniej podatne na elucję niż te unieruchomione na membranie, dla których jedyną ochronę stanowi warstwa polidopaminy, która może ulec przerwaniu. Dodatkowo należy zauważyć, że dla omawianych systemów nie zaobserwowano zmian stężenia kofaktora w trakcie procesów biokonwersji, co pozwoliło na pośrednie potwierdzenie efektywności jego regeneracji.

Biorąc pod uwagę wszystkie przedstawione dane można stwierdzić, że wykazano znaczny potencjał opracowanych systemów biokatalitycznych w konwersji składników biomasy z jednoczesną regeneracją kofaktora enzymatycznego. Należy zauważyć, że wszystkie opracowane systemy biokatalityczne wykazały wysoką efektywność w produkcji kwasów organicznych, co wynika z faktu, że w najkorzystniejszych warunkach procesowych możliwe było prowadzenie biokonwersji składników biomasy z minimum 95-proc. wydajnością. Dodatkowo warto podkreślić, że przekształcanie ksylozy i glukozy wraz z reakcjami regenerującymi kofaktor przebiegało w łagodnych warunkach procesowych, takich jak temperatura otoczenia oraz zbliżone do obojętnego pH. Ponadto we wszystkich testowanych systemach biokatalitycznych określono wpływ stosunku enzymów, kofaktorów oraz substratów na efektywność prowadzonych procesów, tak aby zminimalizować ilość składników niezbędnych do skutecznego przebiegu biokonwersji z równoczesną regeneracją NAD⁺. Zaproponowane systemy multienzymatyczne były nie tylko skuteczne, ale także stanowią innowacyjne rozwiązanie umożliwiające zmniejszenie negatywnego wpływu kwasu lewulinowego, czyli inhibitora procesów konwersji biomasy, bez konieczności usunięcia go z mieszaniny reakcyjnej. Potwierdzono też, że każdy z wytworzonych systemów wykazuje wysoki potencjał aplikacyjny, ze względu na możliwość jego wielokrotnego użycia i znaczną stabilność w trakcie magazynowania. Zatem w ramach przeprowadzonych prac zrealizowano założony cel badań poprzez skuteczne opracowanie układów biokatalitycznych opartych o koimmobilizowane enzymy i umożliwiających jednoczesną konwersję składników biomasy i regenerację kofaktorów

enzymatycznych. Dodatkowo zaprojektowano też skuteczną separację membranową składników reakcji, która pozwoliła na uzyskanie produktów o wysokiej czystości. Uzyskane rezultaty badań pozwalają na stwierdzenie, że opracowane układy mają znaczący potencjał aplikacyjny, który powinien być dalej rozwijany w kierunku powiększenia skali prowadzonych procesów i ich realizacji z wykorzystaniem roztworów rzeczywistych.

7. Perspektywy rozwoju badań

Zależności uzyskane w trakcie realizacji badań nad koimmobilizowanymi systemami multienzymatycznymi potwierdziły, że ich wykorzystanie może stanowić perspektywę efektywnej realizacji szerokiego wachlarza syntez biokatalitycznych w skali przemysłowej. Niemniej jednak, eksperymenty przeprowadzone w ramach przedkładanej dysertacji były badaniami podstawowymi, skupiającymi się na opracowaniu skutecznej metody otrzymywania układów biokatalitycznych oraz określeniu najkorzystniejszych warunków procesowych dla ich aktywnego funkcjonowania. Wydaje się zatem, że konieczne jest prowadzenie dalszych, bardziej zaawansowanych testów, które potwierdzą skuteczność prezentowanych rozwiązań także po ich transferze do większej skali. Dlatego też kolejne prace w zakresie zastosowania koimmobilizowanych systemów multienzymatycznych powinny skupić się na następujących aspektach:

- Wykorzystanie opracowanych układów biokatalitycznych w konwersji roztworów rzeczywistych w skali większej niż laboratoryjna oraz podjęcie próby prowadzenia procesów ciągłych z użyciem enzymatycznych reaktorów membranowych;
- Projektowanie alternatywnych i elastycznych systemów regeneracji kofaktorów, które umożliwią zastosowanie szerokiej gamy enzymów z różnych grup, a w konsekwencji możliwe będzie łączenie i dopasowywanie par białek o zróżnicowanym pochodzeniu i charakterystyce;
- Optymalizacja procesów biokatalitycznych w celu zmaksymalizowania liczby obrotów kofaktorów i stabilności enzymów regenerujących oraz określenie wpływu substratów i produktów reakcji regenerującej na aktywność białek obecnych w układzie reakcyjnym;
- Zaawansowana charakterystyka parametrów kinetycznych stosowanych biokatalizatorów, która stanowi kluczowy warunek przydatności i stabilności opracowywanych systemów, ze względu na konieczność dopasowania szybkości regeneracji kofaktora i głównej reakcji biokonwersji;
- Rozwój technologii separacji związków otrzymywanych podczas biokonwersji składników biomasy, aby możliwe było nie tylko uzyskanie głównego produktu reakcji o wysokiej czystości, ale także skuteczne wydzielenie kofaktorów oraz koproduktów;

- Wytworzenie systemów biokatalitycznych opartych zarówno o koimmobilizowane enzymy, jak i unieruchomione kofaktory enzymatyczne, celem zwiększenia ekonomiki procesów i ułatwienia separacji składników mieszaniny reakcyjnej.

Wydaje się zatem, że istnieje wiele możliwych kierunków dalszego rozwoju badań nad zastosowaniem koimmobilizowanych enzymów w konwersji składników biomasy, a potencjał aplikacyjny tych systemów sugeruje, że powinny one stać się tematem aktualnym i szeroko analizowanym. Szersze użycie zaproponowanych układów multienzymatycznych może mieć bezpośrednie przełożenie na dalszy wzrost atrakcyjności biomasy jako niezwykle wartościowego surowca wykorzystywanego w wielu procesach realizowanych na skalę przemysłową.

8. Literatura

- [1] Jawaid M., Paridah T., Saba N., Introduction to biomass and its composites w: Lignocellulosic fibre and biomass-based composite materials (pod red. Jawaid M., Paridah T., Saba N.), Woodhead Publishing, Sawston, 2017.
- [2] Uliasz-Bocheńczyk A., Mokrzycki E., Biomasa jako paliwo w energetyce, *Rocznik Ochrona Środowiska*, 17 (2015) 900–913.
- [3] Maurya D.P., Singla A., Negi S., An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol, *3 Biotech*, 5 (2015) 597–609.
- [4] Budzyński W., Bielski S., Surowce energetyczne pochodzenia rolniczego. Biomasa jako paliwo stałe, *Acta Scientiarum Polonorum Agricultura*, 3 (2004) 15–26.
- [5] Roszkowski A., Energia z biomasy – efektywność, sprawność i przydatność energetyczna, *Problemy Inżynierii Rolniczej*, 1 (2013) 97–124.
- [6] Barcelos C., Rocha V., Groposo C., Machado de Castro A., Pereira Jr N., Enzymes and accessory proteins involved in the hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production w: *Mycology: Current and future developments, Fungal biotechnology for biofuel production* (pod red. Silva R.), Bentham Books, Sharjah, 2015.
- [7] Leja K., Lewandowicz G., Grajek W., Produkcja bioetanolu z surowców celulozowych, *Biotechnologia*, 4 (2009) 88–101.
- [8] Zheng Y., Pan Z., Zhang R., Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production, *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2 (2009) 51–68.
- [9] Kasprzycka A., Murat A., Paprota E., Tys J., Obróbka wstępna biomasy bogatej w lignocelulozę w celu zwiększenia wydajności fermentacji metanowej, *Acta Agrophysica*, 21 (2014) 51–62.
- [10] Harmsen P., Huijgen W., Bermudez L., Bakker R., Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass (pod red. Harmsen P., Huijgen W., Bermudez L., Bakker R.), Wageningen UR Food & Biobased Research, Wageningen, 2010.
- [11] Kobrycz M., Biomasa jako nośnik energii odnawialnej w: *Ochrona powietrza atmosferycznego: Wybrane zagadnienia* (pod red. Musialik-Piotrowska A., Rutkowski J.), Polskie Zrzeszenie Inżynierów i Techników Sanitarnych, Wrocław, 2012.

- [12] Brodeur G., Yau E., Badal K., Collier J., Ramachandran B., Ramakrishnan S., Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review, *Enzyme Research*, 2011 (2011) 1–17.
- [13] Roy S., Dikshit P.K., Sherpa K.C., Singh A., Jacob S., Rajak R., Recent nanobiotechnological advancements in lignocellulosic biomass valorization: A review, *Journal of Environmental Management*, 297 (2021) 113422.
- [14] Ashokkumar V., Venkatkarthick R., Jayashree S., Chuetor S., Dharmaraj S., Kumar G., Chen W.H., Ngamcharussrivichai C., Recent advances in lignocellulosic biomass for biofuels and value-added bioproducts - A critical review, *Bioresource Technology*, 344 (2021) 126195.
- [15] Dąbkowska K., Chmielewska I., Pilarek M., Szewczyk K., Wpływ metody wstępnej obróbki surowca lignocelulozowego na efektywność hydrolizy enzymatycznej, *Inżynieria i Aparatura Chemiczna*, 4 (2012) 112–114.
- [16] Ioelovich M., Morag E., Study of enzymatic hydrolysis of mild pretreated lignocellulosic biomasses, *Bioresources*, 7 (2012) 1040–1052.
- [17] Pramanik K., Sahu S., Biological treatment of lignocellulosic biomass to bioethanol, *Advances in Biotechnology and Microbiology*, 5 (2017) 1–3.
- [18] Deng F., Amarasekara A.S., Catalytic upgrading of biomass derived furans, *Industrial Crops and Products*, 159 (2021) 113055.
- [19] Żygo M., Prochoń M., Enzymatyczne metody otrzymywania nanowłókien celulozowych, *Eliksir*, 1 (2017) 26–29.
- [20] Hatakka A., Biodegradation of lignin w: Biopolymers. Lignin, humic substances and coal (pod red. Hofrichter M., Steinbüchel A.), Wiley-VCH, Weinheim, 2013.
- [21] Pasinszki T., Krebsz M., Agricultural waste valorization for sustainable biofuel production w: Valorization of agri-food wastes and by-products recent trends, innovations and sustainability challenges (pod red. Bhat R.), Academic Press, Oxford, 2021.
- [22] Alvarez C., Reyes-Sosa F., Diez B., Enzymatic hydrolysis of biomass from wood, *Microbial Biotechnology*, 9 (2016) 1–8.
- [23] Świątek K., Lewandowska M., Świątek M., Bednarski W., Doskonalenie warunków hydrolizy enzymatycznej polisacharydów zawartych w słomie rzepakowej, *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 570 (2012) 107–116.
- [24] Lyczakowski J., Wicher K., Terrett O., Faria-Blanc N., Yu X., Brown D., Krogh K., Dupree P., Busse-Wicher M., Removal of glucuronic acid from xylan is a strategy to

improve the conversion of plant biomass to sugars for bioenergy, *Biotechnology for Biofuels*, 10 (2017) 1–11.

[25] Tokarzewska-Zadora J., Rogalski J., Szczodrak J., Enzymy rozkładające ksylan – charakterystyka i zastosowanie w biotechnologii, *Biotechnologia*, 2 (2005) 163–182.

[26] Wesołowska-Trojanowska M., Targoński Z., Hemicelulazy – właściwości, otrzymywanie i zastosowanie, *Nauki Inżynierskie i Technologie*, 2 (2015) 79–94.

[27] Madadi M., Tu Y., Abbas A., Pretreatment of lignocellulosic biomass based on improving enzymatic hydrolysis, *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 5 (2017) 1–11.

[28] Lee S.M., Cho D.H., Jung H.J., Kim B., Kim S.H., Bhatia S.K., Gurav R., Jeon J.M., Yoon J.J., Kim W., Choi K.Y., Yang Y.H., Finding of novel polyhydroxybutyrate producer *Loktanella* sp. SM43 capable of balanced utilization of glucose and xylose from lignocellulosic biomass, *International Journal of Biological Macromolecules*, 208 (2022) 809–818.

[29] Cho E.J., Trinh L.T.P., Song Y., Lee Y.G., Bae H.J., Bioconversion of biomass waste into high value chemicals, *Bioresource Technology*, 298 (2020) 122386.

[30] Kartik A., Akhil D., Lakshmi D., Gopinath K.P., Arun J., Sivaramakrishnan R., Pugazhendhi A., A critical review on production of biopolymers from algae biomass and their applications, *Bioresource Technology*, 329 (2021) 124868.

[31] El-Mansi E., Ward F., Chopra A., Microbiology of industrial fermentation: Central and modern concepts w: *Fermentation: Microbiology and biotechnology* (pod red. El-Mansi E., Bryce C., Dahhou B., Sanchez S., Demain A., Allman A.), CRC Press, Boca Raton, 2012.

[32] Kamiński W., Tomczak E., Górak A., Biobutanol - production and purification methods, *Ecological Chemistry and Engineering*, 18 (2011) 31–37.

[33] Sikora A., Produkcja wodoru w procesach prowadzonych przez drobnoustroje, *Postępy Mikrobiologii*, 47 (2008) 465–482.

[34] Pawlica-Kaczorowska J., Czaczyk K., Klasyczne bakterie propionowe – taksonomia, warunki hodowlane oraz zastosowanie, *Postępy Mikrobiologii*, 55 (2016) 367–380.

[35] Ramachandran S., Nair S., Larroche C., Pandey A., Gluconic acid w: *Current developments in biotechnology and bioengineering* (pod red. Pandey A., Negi S., Soccol C.R.), Elsevier, Amsterdam, 2017.

[36] Cañete-Rodríguez A.M., Santos-Dueñas I.M., Jiménez-Hornero J.E., Ehrenreich A., Liebl W., Garcia-Garcia I., Gluconic acid: Properties, production methods and

applications — an excellent opportunity for agroindustrial by-products and waste biovalorization, *Process Biochemistry*, 51 (2016) 1891–903.

[37] Wang D.M., Sun L., Sun W.J., Cui F.J., Gong J.S., Zhang X.M., Shi J.S., Xu Z.H., Purification, characterization and gene identification of a membrane-bound glucose dehydrogenase from 2-keto-D-gluconic acid industrial producing strain *Pseudomonas plecoglossicida* JUIM01, *International Journal of Biological Macromolecules*, 118 (2018) 534–541.

[38] Karagoz P., Mandair R., Manayil J.C., Lad J., Chong K., Kyriakou G., Lee A.F., Wilson K., Bill R.M., Purification and immobilization of engineered glucose dehydrogenase: A new approach to producing gluconic acid from breadwaste, *Biotechnology for Biofuels*, 13 (2020) 100.

[39] Mukherjee J., Gupta M., Biocatalysis for biomass valorization, *Sustainable Chemical Processes*, 3 (2015) 1–5.

[40] Wu S., Snajdrova R., Moore J.C., Baldenius K., Bornscheuer U.T., Biocatalysis: Enzymatic synthesis for industrial applications, *Angewandte Chemie International Edition*, 60 (2021) 88–119.

[41] Zhang M., Puri A.K., Wang Z., Singh S., Permaul K., A unique xylose reductase from *Thermomyces lanuginosus*: Effect of lignocellulosic substrates and inhibitors and applicability in lignocellulosic bioconversion, *Bioresource Technology*, 281 (2019) 374–381.

[42] Yang B.X., Xie C.Y., Xia Z.Y., Wu Y.J., Li Bo, Tang Y.Q., The effect of xylose reductase genes on xylitol production by industrial *Saccharomyces cerevisiae* in fermentation of glucose and xylose, *Process Biochemistry*, 95 (2020) 122–130.

[43] Kumar V., Binod P., Sindhu R., Gnansounou E., Ahluwalia V., Bioconversion of pentose sugars to value added chemicals and fuels: Recent trends, challenges and possibilities, *Bioresource Technology*, 269 (2018) 443–451.

[44] Chun B.W., Dair B., Macuch P.J., Wiebe D., Porteneuve C., Jeknavorian A., The development of cement and concrete additive, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 129–132 (2006) 645–658.

[45] Wang X., Xu N., Hu S., Yang J., Gao Q., Xu S., Chen K., Ouyang P., D-1,2,4-butanetriol production from renewable biomass with optimization of synthetic pathway in engineered *Escherichia coli*, *Bioresource Technology*, 250 (2018) 406–412.

[46] Zhou X., Xu Y., Yu S., Simultaneous bioconversion of xylose and glycerol to xylonic acid and 1,3-dihydroxyacetone from the mixture of pre-hydrolysates and ethanol-

fermented waste liquid by *Gluconobacter oxydans*, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 178 (2016) 1–8.

[47] Toivari M.H., Ruohonen L., Richard P., Penttila M., Wiebe M.G., *Saccharomyces cerevisiae* engineered to produce D-xylonate, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88 (2010) 751–760.

[48] Jin D., Ma J., Li Y., Jiao G., Liu K., Sun S., Zhou J., Sun R., Development of the synthesis and applications of xylonic acid: A mini-review, *Fuel*, 314 (2022) 122773.

[49] Tenhaef N., Brusseler C., Radek A., Hilmes R., Unrean P., Marienhagen J., Noack S., Production of D-xylonic acid using a non-recombinant *Corynebacterium glutamicum* strain, *Bioresource Technology*, 268 (2018) 332–339.

[50] Liu H., Valdehuesa K.N.G., Nisola G.M., Ramos K.R.M., Chung W.J., High yield production of D-xylonic acid from D-xylose using engineered *Escherichia coli*, *Bioresource Technology*, 115 (2012) 244–248.

[51] Richard P., Wiebe M., Toivari M., Mojzita D., Ruohonen L., Penttila M., Manufacture of xylonic acid, United States Patent, US 2012/0005788 A1, 2012.

[52] Sanchez-Moreno I., Benito-Arenas R., Motero-Calle P., Hermida C., Garcia-Junceda E., Fernandez-Mayoralas A., Simple and practical multigram synthesis of D-xylonate using a recombinant xylose dehydrogenase, *ACS Omega*, 4 (2019) 10593–10598.

[53] Ramos T.G.S., Justen F., Carneiro C.V.G.C., Honorato V.M., Franco P.F., Vieira F.S., Trichez D., Rodrigues C.M., Almeida J.R.M., Xylonic acid production by recombinant *Komagataella phaffii* strains engineered with newly identified xylose dehydrogenases, *Bioresource Technology Reports*, 16 (2021) 100825.

[54] Li X., Xu R., Yang J., Nie S., Liu D., Liu Y., Si C., Production of 5-hydroxymethylfurfural and levulinic acid from lignocellulosic biomass and catalytic upgradation, *Industrial Crops and Products*, 130 (2019) 184–197.

[55] Du X., Liu Y., Wang J., Cao Y., Fan K., Catalytic conversion of biomass-derived levulinic acid into γ -valerolactone using iridium nanoparticles supported on carbon nanotubes, *Chinese Journal of Catalysis*, 34 (2013) 993–1001.

[56] Gupta S.S.R., Kantam M.L., Selective hydrogenation of levulinic acid into γ -valerolactone over Cu/Ni hydrotalcite-derived catalyst, *Catalysis Today*, 309 (2018) 189–194.

[57] Jing F., Xiaochao G., Yudan X., Yiwen H., Xuebin L., Production of γ -valerolactone from levulinic acid over a Ru/C catalyst using formic acid as the sole hydrogen source, *Science of the Total Environment*, 633 (2018) 426–432.

- [58] Isikgor F.H., Becer C.R., Lignocellulosic biomass: A sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers, *Polymer Chemistry*, 6 (2015) 4497.
- [59] Conti Silva J.A., Grilo L.M., Vasconcelos M.H., Lacerda T.M., Levulinic acid: Perspectives of its biobased production and most promising derivatives w: Production of top 12 biochemicals selected by USDOE from renewable resources (pod red. Chandel A.K., Segato F.), Elsevier, Sao Paulo, 2021.
- [60] Pulidindi I.N., Kim T.H., Conversion of levulinic acid from various herbaceous biomass species using hydrochloric acid and effects of particle size and delignification, *Energies*, 11 (2018) 621.
- [61] Bassi R., Baeza P., Sepulveda C., Ghampson I.T., Camu E., Bruckner A., Bentrup U., Fierro J.L.G., Escalona N., Conversion of levulinic acid over rhenium oxide catalysts: Effect of metal content, *Applied Catalysis A: General*, 625 (2021) 118328.
- [62] Filho J.B.G., Rios R.D.F., Bruziquesi C.G.O., Ferreira D.C., Victoria H.F.V., Krambrock K., Pereira M.C., Oliveira L.C.A., A promising approach to transform levulinic acid into γ -valerolactone using niobic acid photocatalyst and the accumulated electron transfer technique, *Applied Catalysis B: Environmental*, 285 (2021) 119814.
- [63] Guarinos J.M., Cirujano F.G., Rapeyko A., Llabres I., Xamena F.X., Conversion of levulinic acid to γ -valerolactone over Zr-containing metal-organic frameworks: Evidencing the role of Lewis and Brønsted acid sites, *Molecular Catalysis*, 515 (2021) 111925.
- [64] Li C.C., Hsieh C.H., Lin Y.C., Ni/SiO₂ catalysts derived from carbothermal reduction of nickel phyllosilicate in the hydrogenation of levulinic acid to γ -valerolactone: The efficacy of nitrogen decoration, *Molecular Catalysis*, 523 (2021) 111720.
- [65] Yeon Y.J., Park H.Y., Park K., Park H.J., Yoo Y.J., Structural basis for the substrate specificity of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 21 (2016) 364–372.
- [66] Kim D., Sathesh-Prabu C., Yeon Y.J., Lee S.K., High-level production of 4-hydroxyvalerate from levulinic acid via whole-cell biotransformation decoupled from cell metabolism, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67 (2019) 10678–10684.
- [67] Yeon Y.J., Park H.Y., Yoo Y.J., Engineering substrate specificity of succinic semialdehyde reductase (AKR7A5) for efficient conversion of levulinic acid to 4-hydroxyvaleric acid, *Journal of Biotechnology*, 210 (2015) 38–43.

- [68] Moon M., Yeon Y.J., Park H.J., Park J., Park G.W., Kim G.H., Lee J.P., Lee D., Lee J.S., Min K., Chemoenzymatic valorization of agricultural wastes into 4-hydroxyvaleric acid via levulinic acid, *Bioresource Technology*, 337 (2021) 125479.
- [69] Sheldon R.A., Basso A., Brady D., New frontiers in enzyme immobilisation: Robust biocatalysts for a circular bio-based economy, *Chemical Society Reviews*, 50 (2021) 5850–5862.
- [70] Halling P., Gupta M., Measurement and reporting of data in applied biocatalysis, *Perspectives on Science*, 1 (2014) 98–109.
- [71] Choi J., Han S., Kim H., Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects, *Biotechnology Advances*, 33 (2015) 1443–1454.
- [72] Ferrer M., Biocatalysis and biotransformations, *Catalysts*, 8 (2018) 1–6.
- [73] Zahirinejad S., Hemmati R., Homaei A., Dinari A., Hosseinkhani S., Mohammadi S., Vianello F., Nano-organic supports for enzyme immobilization: Scopes and perspectives, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 204 (2021) 111774.
- [74] Xie J., Zhang Y., Simpson B., Food enzymes immobilization: Novel carriers, techniques and applications, *Current Opinion in Food Science*, 43 (2022) 27–35.
- [75] Kujawa J., Głodek M., Li G., Al-Gharabli S., Knozowska K., Kujawski W., Highly effective enzymes immobilization on ceramics: Requirements for supports and enzymes, *Science of the Total Environment*, 801 (2021) 149647.
- [76] Rodrigues R.C., Berenguer-Murcia A., Carballares D., Morellon-Sterling R., Fernandez-Lafuente R., Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other stabilization strategies, *Biotechnology Advances*, 52 (2021) 107821.
- [77] Mohamad N.R., Marzuki N.H.C., Buang N.A., Huyop F., Wahab R.A., An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29 (2015) 205–220.
- [78] Zdarta J., Jesionowski T., Meyer A.S., Pinelo M., A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility, *Catalysts*, 8 (2018) 1–27.
- [79] Bilal M., Iqbal H.M.N., Chemical, physical, and biological coordination: An interplay between materials and enzymes as potential platforms for immobilization, *Coordination Chemistry Reviews*, 388 (2019) 1–23.

- [80] Liu S., Bilal M., Rizwan K., Gul I., Rasheed T., Iqbal H.M.N., Smart chemistry of enzyme immobilization using various support matrices – a review, *International Journal of Biological Macromolecules*, 190 (2021) 396–408.
- [81] Santos J., Barbosa O., Ortiz C., Berenguer-Murcia A., Rodrigues R., Fernandez-Lafuente R., Importance of the support properties for immobilization or purification of enzymes, *ChemCatChem*, 7 (2015) 2413–2432.
- [82] Nguyen H., Kim M., An overview of techniques in enzyme immobilization, *Applied Science and Convergence Technology*, 26 (2017) 157–163.
- [83] Hartmann M., Kostrov X., Immobilization of enzymes on porous silicas - benefits and challenges, *Chemical Society Reviews*, 42 (2013) 6277–6289.
- [84] Matte C., Bordinhão C., Poppe J., Benvenuti E., Costa T., Rodrigues R., Hertz P., Ayub M., Physical-chemical properties of the support immobead 150 before and after the immobilization process of lipase, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28 (2016) 1430–1439.
- [85] Zucca P., Sanjust E., Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms, *Molecules*, 19 (2014) 14139–14194.
- [86] Alagoz D., Toprak A., Varan N.E., Yildirim D., Tukul S.S., Effective immobilization of lactate dehydrogenase onto mesoporous silica, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1 (2022) 1–11.
- [87] Engelmann C., Ekambaram N., Johannsen J., Fellechner O., Waluga T., Fieg G., Liese A., Bubenheim P., Enzyme immobilization on synthesized nanoporous silica particles and their application in a bi-enzymatic reaction, *ChemCatChem*, 12 (2020) 2245–2252.
- [88] Cumana S., Simons J., Liese A., Hilterhaus L., Smirnova I., Immobilization of glucose 6-phosphate dehydrogenase in silica-based hydrogels: A comparative study, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 85–86 (2013) 220–228.
- [89] Rosenholm J.M., Zhang J., Sun W., Gu H., Large-pore mesoporous silica-coated magnetite core-shell nanocomposites and their relevance for biomedical applications, *Microporous and Mesoporous Materials*, 145 (2011) 14–20.
- [90] Tadyszak K., Kertmen A., Coy E., Andruszkiewicz R., Milewski S., Kardava I., Scheibe B., Jurga S., Chybczyńska K., Spectroscopic and magnetic studies of highly dispersible superparamagnetic silica coated magnetite nanoparticles, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 433 (2017) 254–261.

- [91] Zheng M., Zhang S., Immobilization of glycerol dehydrogenase on magnetic silica nanoparticles for conversion of glycerol to value-added 1,3-dihydroxyacetone, *Biocatalysis and Biotransformation*, 29 (2011) 278–287.
- [92] Nikolić M.P., Pavlović K.V., Stanojević-Nikolić S., Maričić A., Srdić V.V., Synthesis and characterization of silica core/multilayered cobalt ferrite-silica shell particles for lipase immobilization, *Materials Research*, 24 (2021) e20210130.
- [93] Alagoz D., Varan N.E., Toprak A., Yildirim D., Tukul S.S., Fernandez-Lafuente R., Immobilization of xylanase on differently functionalized silica gel supports for orange juice clarification, *Process Biochemistry*, 113 (2020) 270–280.
- [94] Kothalawala S.G., Jiao J., Speight R., Song H., Yang Y., Zhang J., Pore architecture influences the enzyme immobilization performance of mesoporous silica nanospheres, *Microporous and Mesoporous Materials*, 338 (2022) 111963.
- [95] Liu J., Liu Y., Jin D., Meng M., Jiang Y., Ni L., Liu Z., Immobilization of trypsin onto large-pore mesoporous silica and optimization enzyme activity via response surface methodology, *Solid State Science*, 89 (2019) 15–24.
- [96] Sulman A.M., Haskell A.K., Tikhonov B.B., Grebennikova O.V., Sidorov A.I., Bronstein L.M., Matveeva V.G., Larger pores dramatically enhance activity of an immobilized enzyme in mesoporous magnetic silica, *Microporous and Mesoporous Materials*, 341 (2022) 112092.
- [97] Peng F., Ou X.Y., Guo Z.W., Zeng Y.J., Zong M.H., Lou W.Y., Co-immobilization of multiple enzymes by self-assembly and chemical crosslinking for cofactor regeneration and robust biocatalysis, *International Journal of Biological Macromolecules*, 162 (2020) 445–453.
- [98] Arana-Pena S., Carballares D., Morellon-Sterling R., Berenguer-Murcia A., Alcantara A.R., Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R., Enzyme co-immobilization: Always the biocatalyst designers' choice...or not?, *Biotechnology Advances*, 51 (2021) 107584.
- [99] Wilson L., Illanes A., Ottone C., Romero O., Co-immobilized carrier-free enzymes for lactose upgrading, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 33 (2022) 100553.
- [100] Bilal M., Hussain N., Americo-Pinheiro J.H.P., Almulaiky Y.Q., Iqbal H.M.N., Multi-enzyme co-immobilized nano-assemblies: Bringing enzymes together for expanding bio-catalysis scope to meet biotechnological challenges, *International Journal of Biological Macromolecules*, 186 (2021) 735–749.

- [101] Marpani F., Sarossy Z., Pinelo M., Meyer A.S., Kinetics based reaction optimization of enzyme catalyzed reduction of formaldehyde to methanol with synchronous cofactor regeneration, *Biotechnology and Bioengineering*, 114 (2017) 2762–2770.
- [102] Vu H.P., Nguyen L.N., Vu M.T., Johir M.A.H., McLaughlan R., Nghiem L.D., A comprehensive review on the framework to valorise lignocellulosic biomass as biorefinery feedstocks, *Science of the Total Environment*, 743 (2020) 140630.
- [103] Li H., Xiao W., Xie P., Zheng L., Co-immobilization of enoate reductase with a cofactor-recycling partner enzyme, *Enzyme and Microbial Technology*, 109 (2018) 66–73.
- [104] Sole J., Caminal G., Schurmann M., Alvaro G., Guillen M., Co-immobilization of P450 BM3 and glucose dehydrogenase on different supports for application as a self-sufficient oxidative biocatalyst, *Journal of the Society of Chemical Industry*, 94 (2018) 244–255.
- [105] Radek A., Tenhaef N., Müller M.F., Brüsseler C., Wiechert W., Marienhagen J., Polen T., Noack, S., Miniaturized and automated adaptive laboratory evolution: Evolving *Corynebacterium glutamicum* towards an improved D-xylose utilization, *Bioresource Technology*, 245 (2017) 1377–1385.
- [106] Giorno L., Drioli E., Biocatalytic membrane reactors: Applications and perspectives, *Trends in Biotechnology*, 18 (2000) 339–349.
- [107] Rios G.M., Belleville M.P., Paolucci D., Sanchez J., Progress in enzymatic membrane reactors – A review, *Journal of Membrane Science*, 242 (2004) 189–196.
- [108] Prazeres D.M.F., Cabral J.M.S., Enzymatic membrane bioreactors and their applications, *Enzyme and Microbial Technology*, 16 (1994) 738–750.
- [109] Gebreyohannes A.Y., Dharmjeet M., Swusten T., Mertens M., Verspreet J., Verbiest T., Courtind C.M., Vankelecom I.F.V., Simultaneous glucose production from cellulose and fouling reduction using a magnetic responsive membrane reactor with superparamagnetic nanoparticles carrying cellulolytic enzymes, *Bioresource Technology*, 263 (2018) 532–540.
- [110] Luo J., Meyer A.S., Mateiu R.V., Pinelo M., Cascade catalysis in membranes with enzyme immobilization for multi-enzymatic conversion of CO₂ to methanol, *New Biotechnology*, 32 (2015) 319–327.

- [111] Pal S., Sharma M.K., Danielsson B., Willander M., Chatterjee R., Bhand S., A miniaturized nanobiosensor for choline analysis, *Biosensors and Bioelectronics*, 54 (2014) 558–564.
- [112] Petrovicova T., Markosova K., Hegyi Z., Smonou I., Rosenberg M., Rebros M., Co-immobilization of ketoreductase and glucose dehydrogenase, *Catalysts*, 8 (2018) 168.
- [113] Cui C., Ming H., Li L., Li M., Gao J., Han T., Wang Y., Fabrication of an in-situ co-immobilized enzyme in mesoporous silica for synthesizing GSH with ATP regeneration, *Molecular Catalysis*, 486 (2020) 110870.
- [114] Zhuang M.Y., Jiang X.P., Ling X.M., Xu M.Q., Zhu Y.H., Zhang Y.W., Immobilization of glycerol dehydrogenase and NADH oxidase for enzymatic synthesis of 1,3-dihydroxyacetone with in situ cofactor regeneration, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93 (2018) 2351–2358.
- [115] Fessel J.P., Oldham W.M., Pyridine dinucleotides from molecules to man, *Antioxidants & Redox Signaling*, 28 (2018) 180–212.
- [116] McIntosh J.A., Owens A.E., Enzyme engineering for biosynthetic cascades, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 29 (2021) 100448.
- [117] Smutok O., Kavetsky T., Katz E., Recent trends in enzyme engineering aiming to improve bioelectrocatalysis proceeding with direct electron transfer, *Current Opinion in Electrochemistry*, 31 (2022) 100856.
- [118] Trisolini L., Gambacorta N., Gorgoglione R., Montaruli M., Laera L., Colella F., Volpicella M., De Grassi A., Pierri C.L., FAD/NADH dependent oxidoreductases: From different amino acid sequences to similar protein shapes for playing an ancient function, *Journal of Clinical Medicine*, 8 (2019) 2117.
- [119] Harris E.D., *Organic w: Encyclopedia of Human Nutrition* (pod red. Caballero B.), Academic Press, Oxford, 2013.
- [120] Han L., Liang B., New approaches to NAD(P)H regeneration in the biosynthesis systems, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34 (2018) 141.
- [121] Kuppuraj G., Sargsyan K., Hua Y.H., Merrill A.R., Lim C., Linking distinct conformations of nicotinamide adenine dinucleotide with protein fold/function, *The Journal of Physical Chemistry B*, 115 (2011) 7932–7939.
- [122] Lan F., Wang Q., Chen H., Chen Y., Zhang Y., Huang B., Liu H., Liu J., Li R., Preparation of hydrophilic conjugated microporous polymers for efficient visible light-driven nicotinamide adenine dinucleotide regeneration and photobiocatalytic formaldehyde reduction, *ACS Catalysis*, 10 (2020) 12976–12986.

- [123] Fisher A.B., Zhang Q., NADPH and NADPH oxidase w: Encyclopedia of respiratory medicine (pod red. Laurent G.J., Shapiro S.D.), Elsevier, Oxford, 2006.
- [124] Wang Z., Sekar B.S., Li Z., Recent advances in artificial enzyme cascades for the production of value-added chemicals, *Bioresource Technology*, 323 (2021) 124551.
- [125] Marsden S.R., Mestrom L., McMillan D.G.G., Hanefeld U., Thermodynamically and kinetically controlled reactions in biocatalysis – from concepts to perspectives, *ChemCatChem*, 12 (2019) 426–437.
- [126] Weckbecker A., Gröger H., Hummel W., Regeneration of nicotinamide coenzymes: Principles and applications for the synthesis of chiral compounds (pod red. Wittmann C., Krull R.), Springer, Berlin, 2010.
- [127] Liao Q., Liu W., Meng Z., Strategies for overcoming the limitations of enzymatic carbon dioxide reduction, *Biotechnology Advances*, 60 (2022) 108024.
- [128] Hollmann F., Arends I.W.C.E., Buehler K., Biocatalytic redox reactions for organic synthesis: Nonconventional regeneration methods, *ChemCatChem*, 2 (2010) 762–782.
- [129] Inouye S., Nakamura M., Hosoya T., Enzymatic conversion of dehydrocoelenterazine to coelenterazine using FMN-bound flavin reductase of NAD(P)H:FMN oxidoreductase, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 587 (2022) 24–28.
- [130] Yan Y.K., Melchart M., Habtemariam A., Peacock A.F.A., Sadler P.J., Catalysis of regioselective reduction of NAD⁺ by ruthenium(II) arene complexes under biologically relevant conditions, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11 (2006) 483–488.
- [131] Liu W., Wang P., Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis, *Biotechnology Advances*, 25 (2007) 369–384.
- [132] Kim Y.H., Yoo Y.J., Regeneration of the nicotinamide cofactor using a mediator-free electrochemical method with a tin oxide electrode, *Enzyme and Microbial Technology*, 44 (2009) 129–134.
- [133] Azem A., Man F., Omanovic S., Direct regeneration of NADH on a ruthenium modified glassy carbon electrode, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 219 (2004) 283–299.
- [134] Jeon S.J., Shin I.H., Sang B.I., Park D.H., Electrochemical regeneration of FAD by catalytic electrode without electron mediator and biochemical reducing power, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15 (2005) 281–286.
- [135] Kim S.H., Chung G.Y., Kim S.H., Vinothkumar G., Yoon S.H., Jung K.D., Electrochemical NADH regeneration and electroenzymatic CO₂ reduction on Cu

nanorods/glassy carbon electrode prepared by cyclic deposition, *Electrochimica Acta*, 210 (2016) 837–845.

[136] Morrison C.S., Armiger W.B., Dodds D.R., Dordick J.S., Koffas M.A.G., Improved strategies for electrochemical 1,4-NAD(P)H₂ regeneration: A new era of bioreactors for industrial biocatalysis, *Biotechnology Advances*, 36 (2018) 120–131.

[137] Ali I., Khan T., Omanovic S., Direct electrochemical regeneration of the cofactor NADH on bare Ti, Ni, Co and Cd electrodes: The influence of electrode potential and electrode material, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 387 (2014) 86–91.

[138] Uppada V., Bhaduri S., Noronha S.B., Cofactor regeneration – an important aspect of biocatalysis, *Current Science*, 106 (2014) 946–957.

[139] Marpani F., Pinelo M., Meyer A.S., Enzymatic conversion of CO₂ to CH₃OH via reverse dehydrogenase cascade biocatalysis: Quantitative comparison of efficiencies of immobilized enzyme systems, *Biochemical Engineering Journal*, 127 (2017) 217–228.

[140] Hummel W., Groger H., Strategies for regeneration of nicotinamide coenzymes emphasizing self-sufficient closed-loop recycling systems, *Journal of Biotechnology*, 191 (2014) 22–31.

[141] de Gonzalo G., Paul C.E., Recent trends in synthetic enzymatic cascades promoted by alcohol dehydrogenases, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 32 (2021) 100548.

[142] Ricca E., Brucher B., Schrittwieser J.H., Multi-enzymatic cascade reactions: Overview and perspectives, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353 (2011) 2239–2262.

[143] Wang X., Saba T., You H.H.P., Howe R.F., Anderson J.A., Shi J., Cofactor NAD(P)H regeneration inspired by heterogeneous pathways, *Chem*, 2 (2017) 621–654.

[144] Leuchs S., Nonnen T., Dechambre D., Na'amnieh S., Greiner L., Continuous biphasic enzymatic reduction of aliphatic ketones, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 88 (2013) 52–59.

[145] Wang L.J., Li C.X., Ni Y., Zhang J., Liu X., Xu J.H., Highly efficient synthesis of chiral alcohols with a novel NADH-dependent reductase from *Streptomyces coelicolor*, *Bioresource Technology*, 102 (2011) 7023–7028.

[146] Lee D., Yeon J.Y., Enantioselective chemoenzymatic synthesis of (R)- γ -valerolactone from levulinic acid, *Process Biochemistry*, 90 (2020) 113–117.

[147] Kohl A., Srinivasamurthy V., Bottcher D., Kabisch J., Bornscheuer U.T., Co-expression of an alcohol dehydrogenase and a cyclohexanone monooxygenase for

cascade reactions facilitates the regeneration of the NADPH cofactor, *Enzyme and Microbial Technology*, 108 (2018) 53–58.

[148] Gao H., Kim I.K., Choi J.H., Khera E., Wen F., Lee J.K., Repeated production of L-xylulose by an immobilized whole-cell biocatalyst harboring L-arabinitol dehydrogenase coupled with an NAD⁺ regeneration system, *Biochemical Engineering Journal*, 96 (2015) 23–28.

[149] Zhang Y., Gao F., Zhang S.P., Su Z.G., Ma G.H., Wang P., Simultaneous production of 1,3-dihydroxyacetone and xylitol from glycerol and xylose using a nanoparticle-supported multi-enzyme system with in situ cofactor regeneration, *Bioresource Technology*, 102 (2011) 1837–1843.

[150] Ibrahim A.S.S., Al-Salamah A.A., El-Toni A.M., El-Tayeb M.A., Elbadawi Y.B., Cyclodextrin glucanotransferase immobilization onto functionalized magnetic double mesoporous core–shell silica nanospheres, *Electronic Journal of Biotechnology*, 17 (2014) 55–64.

[151] Ranjbakhsh E., Bordbar A.K., Abbasi M., Khosropoura A.R., Shams E., Enhancement of stability and catalytic activity of immobilized lipase on silica-coated modified magnetite nanoparticles, *Chemical Engineering Journal*, 179 (2012) 272–276.

[152] Datta S., Christena L.R., Rajaram Y.R.S., Enzyme immobilization: An overview on techniques and support materials, *3 Biotech*, 3 (2013) 1–9.

[153] Cao R., Xu Y., Efficient preparation of xylonic acid from xylonate fermentation broth by bipolar membrane electrodialysis, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187 (2019) 396–406.

[154] Ning C., Su E., Tian Y., Wei D., Combined cross-linked enzyme aggregates (combi-CLEAs) for efficient integration of a ketoreductase and a cofactor regeneration system, *Journal of Biotechnology*, 184 (2014) 7–10.

[155] Su E., Yang M., Ning C., Ma X., Deng S., Magnetic combined cross-linked enzyme aggregates (Combi-CLEAs) for cofactor regeneration in the synthesis of chiral alcohol, *Journal of Biotechnology*, 271 (2018) 1–7.

[156] Dreifke M., Brieler F.J., Fröba M., Immobilization of alcohol dehydrogenase from *E. coli* onto mesoporous silica for application as a cofactor recycling system, *ChemCatChem*, 9 (2017) 1197–1210.

[157] Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R., Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (2007) 1451–1463.

- [158] Liu X.H., Du X., Feng J.R., Wu M.B., Lin J.P., Guan J., Wang T., Zhang Z.H., Co-immobilization of short-chain dehydrogenase/reductase and glucose dehydrogenase for the efficient production of (±)-ethyl mandelate, *Catalysis Letters*, 149 (2019) 1710–1720.
- [159] Vinoba M., Bhagiyalakshmi M., Jeong S.K., Yoon Y.I., Nam S.C., Immobilization of carbonic anhydrase on spherical SBA-15 for hydration and sequestration of CO₂, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90 (2012) 91–96.
- [160] Pietricola G., Dosa M., Ottone C., Fino D., Piumetti M., Tommasi T., Covalent immobilization of aldehyde and alcohol dehydrogenases on ordered mesoporous silicas, *Waste and Biomass Valorization*, 13 (2022) 4043–4055.
- [161] Rover Jr. L., Fernandes J.C.B., de Oliveira Neto G., Kubota L.T., Katekawa E., Serrano S.H.P., Study of NADH stability using ultraviolet-visible spectrophotometric analysis and factorial design, *Analytical Biochemistry*, 260 (1998) 50–55.
- [162] Sigurdardottir S.B., Lehmann J., Grivel J.C., Zhang W., Kaiser A., Pinelo M., Alcohol dehydrogenase on inorganic powders: Zeta potential and particle agglomeration as main factors determining activity during immobilization, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 175 (2019) 136–142.
- [163] Chen H., Fu X., Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 57 (2016) 468–478.
- [164] dos Santos A.C., Ximenes E., Kim Y., Ladisch M.R., Lignin–enzyme interactions in the hydrolysis of lignocellulosic biomass, *Trends in Biotechnology*, 37 (2019) 518–531.
- [165] Mussatto S.I., Roberto I.C., Alternatives of detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: A review, *Bioresource Technology* 93 (2004) 1–10.
- [166] Ask M., Bettiga M., Mapelli V., Olsson L., The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 6 (2013) 1–13.
- [167] Sun C., Xia A., Liao Q., Guo X., Fu Q., Huang Y., Zhu X., Ding L., Chen C., Inhibitory effects of furfural and vanillin on two-stage gaseous biofuel fermentation, *Fuel*, 252 (2019) 350–359.

- [168] Zhou Z., Li G., Li Y., Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate–chitosan beads, *International Journal of Biological Macromolecules*, 47 (2010) 21–26.
- [169] Cooney M.J., Kinetic measurements for enzyme immobilization, *Methods in Molecular Biology*, 1504 (2017) 215–232.
- [170] Morthensen S.T., Sigurdardottir S.B., Meyer A.S., Jørgensen H., Pinelo M., Separation of xylose and glucose using an integrated membrane system for enzymatic cofactor regeneration and downstream purification, *Journal of Membrane Science*, 523 (2017) 327–335.
- [171] <https://www.sterlitech.com> (dostęp: 22.11.2022 r.)
- [172] Giorno L., Donato L., Todisco S., Drioli E., Study of fouling phenomena in apple juice clarification by enzyme membrane reactor, *Separation Science and Technology*, 33 (1998) 739–756.
- [173] Carrin M., Ceci L.N., Lozano J.E., Effects of pectinase immobilization during hollow fiber ultrafiltration of apple juice, *Journal of Food Process Engineering*, 23 (2000) 281–298.
- [174] Su Z., Luo J., Sigurdardottir S.B., Manferrari T., Jankowska K., Pinelo M., An enzymatic membrane reactor for oligodextran production: Effects of enzyme immobilization strategies on dextranase activity, *Carbohydrate Polymers*, 271 (2021) 118430.
- [175] Adikane H.V., Thakar D.M., Studies of penicillin G acylase immobilization using highly porous cellulose-based polymeric membrane, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160 (2010) 1130–1145.
- [176] Zhang J., Ding S., Ge Y., Li Z., Enhanced removal of crystal violet in water using a facile-fabricated and environmental-friendly laccase immobilized composite membrane, *Process Biochemistry*, 98 (2020) 122–130.
- [177] Beier S.P., Enevoldsen A.D., Kontogeorgis G.M., Hansen E.B., Jonsson G., Adsorption of amylase enzyme on ultrafiltration membranes, *Langmuir*, 23 (2007) 9341–9351.
- [178] Morthensen S.T., Meyer A.S., Jørgensen H., Pinelo M., Significance of membrane bioreactor design on the biocatalytic performance of glucose oxidase and catalase: Free vs. immobilized enzyme systems, *Biochemical Engineering Journal*, 117 (2017) 41–47.

- [179] Veesar I.A., Solangi I.B., Memon S., Immobilization of α -amylase onto a calix[4] arene derivative: Evaluation of its enzymatic activity, *Bioorganic Chemistry*, 60 (2015) 58–63.
- [180] Zerín T., Kim J.S., Gil H.W., Song, Hong S.Y., Effects of formaldehyde on mitochondrial dysfunction and apoptosis in SK-N-SH neuroblastoma cells, *Cell Biology and Toxicology*, 31 (2015) 261–272.
- [181] Stephens C., Christen B., Fuchs T., Sundaram V., Watanabe K., Jenal U., Genetic analysis of a novel pathway for D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus*, *Journal of Bacteriology*, 189 (2007) 2181–2185.
- [182] Toivari M., Nygard Y., Kumpula E.P., Vehkomaki M.L., Bencina M., Valkonen M., Maaheimo H., Andberg M., Koivula A., Ruohonen L., Penttila M., Wiebe M.G., Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of D-xylose to D-xylonate, *Metabolic Engineering*, 14 (2012) 427–436.
- [183] Wang H.Y., Xiao D.F., Zhou C., Wang L.L., Wu L., Lu Y.T., Xiang Q.J., Zhao K., Li X., Ma M.G., YLL056C from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a novel protein with aldehyde reductase activity, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101 (2017) 4507–4520.
- [184] Beer B., Pick A., Doring M., Lommes P., Sieber V., Substrate scope of a dehydrogenase from *Sphingomonas species* A1 and its potential application in the synthesis of rare sugars and sugar derivatives, *Microbial Biotechnology*, 11 (2018) 747–758.
- [185] Su W.B., Li F.L., Li X.Y., Fan X.M., Liu R.J., Zhang Y.W., Using galactitol dehydrogenase coupled with water-forming NADH oxidase for efficient enzymatic synthesis of L-tagatose, *New Biotechnology*, 62 (2021) 18–25.
- [186] Zhu X.Y., Chen C., Chen C.P., Gao Q.L., Fang F., Li J., Huang X.J., High-performance enzymatic membrane bioreactor based on a radial gradient of pores in a PSF membrane via facile enzyme immobilization, *RSC Advances*, 6 (2016) 30804.
- [187] Li Y., Wang H., Lu J., Chu A., Zhang L., Ding Z., Xu S., Gu Z., Shi G., Preparation of immobilized lipase by modified polyacrylonitrile hollow membrane using nitrile-click chemistry, *Bioresource Technology*, 274 (2019) 9–17.
- [188] Zdarta J., Pinelo M., Jesionowski T., Meyer A.S., Upgrading of biomass monosaccharides by immobilized glucose dehydrogenase and xylose dehydrogenase, *ChemCatChem*, 10 (2018) 5164–5173.

- [189] Hofler G.T., Fernandez-Fueyo E., Pesic M., Younes S., Choi E.G., Kim Y.H., Urlacher V.B., Arends I.W.C.E., Hollmann F., A photoenzymatic NADH regeneration system, *ChemBioChem*, 19 (2018) 2344–2347.
- [190] Saba T., Burnett J.W.H., Kechagiopoulos J. Li, P.N., Wang X., A facile analytical method for reliable selectivity examination in cofactor NADH regeneration, *Chemical Communications*, 56 (2020) 1231–1234.
- [191] Partipilo M., Ewins E.J., Franlicciardi J., Robinson T., Poolman B., Slotboom D.J., Minimal pathway for the regeneration of redox cofactors, *Journal of American Chemical Society Au*, 1 (2021) 2280–2293.
- [192] Sigurdardottir S.B., Lehmann J., Ovtar S., Grivel J.C., Negra M.D., Kaiser A., Pinelo M., Enzyme immobilization on inorganic surfaces for membrane reactor applications: Mass transfer challenges, enzyme leakage and reuse of materials, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 360 (2018) 2578–2607.
- [193] Ji M., Li X., Omidvarkordshouli M., Sigurdardottir S.B., Woodley J.M., Daugaard A.E., Luo J., Pinelo M., Charge exclusion as a strategy to control retention of small proteins in polyelectrolyte-modified ultrafiltration membranes, *Separation and Purification Technology*, 247 (2020) 116936.
- [194] Sai Prethi P., Hariharan N.M., Vickram S., Rameshpathy M., Manikandan S., Subbaiya R., Karmegam N., Yadav V., Ravindran B., Chang S.W., Awasthi M.K., Advances in bioremediation of emerging contaminants from industrial wastewater by oxidoreductase enzymes, *Bioresource Technology*, 359 (2022) 127444.
- [195] Yeon Y.J., Park H.Y., Yoo Y.J., Enzymatic reduction of levulinic acid by engineering the substrate specificity of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase, *Bioresource Technology*, 134 (2013) 377–380.
- [196] Stolarczyk K., Rogalski J., Bilewicz R., NAD(P)-dependent glucose dehydrogenase: Applications for biosensors, bioelectrodes, and biofuel cells, *Bioelectrochemistry*, 135 (2020) 107574.
- [197] Nygard Y., Maaheimo H., Mojzita D., Toivari M., Wiebe M., Resnekov O., Pesce C.G., Ruohonen L., Penttila M., Single cell and in vivo analyses elucidate the effect of xylC lactonase during production of D-xylonate in *Saccharomyces cerevisiae*, *Metabolic Engineering*, 25 (2014) 238–247.
- [198] Baik S.H., Ide T., Yoshida H., Kagami O., Harayama S., Significantly enhanced stability of glucose dehydrogenase by directed evolution, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61 (2003) 329–335.

- [199] Gao F., Ding H., Xu X., Zhao Y., A self-sufficient system for removal of synthetic dye by coupling of spore-displayed triphenylmethane reductase and glucose 1-dehydrogenase, *Environmental Science and Pollution Research*, 23 (2016) 21319–21326.
- [200] Kabine M., El Kebbaj M.H.S., Hafiani A., Latruffe N., Cherkaoui-Malki M., Hibernation impact on the catalytic activities of the mitochondrial D-3- hydroxybutyrate dehydrogenase in liver and brain tissues of jerboa (*Jaculus orientalis*), *BMC Biochemistry*, 4 (2003) 11.
- [201] Paithankar K.S., Feller C., Kuettner E.B., Keim A., Grunow M., Strater N., Cosubstrate-induced dynamics of D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase from *Pseudomonas putida*, *FEBS Journal*, 274 (2007) 5767–5779.
- [202] Nakashima K., Ito K., Nakajima Y., Yamazawa R., Miyakawa S., Yoshimoto T., Closed complex of the D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase induced by an enantiomeric competitive inhibitor, *Journal of Biochemistry*, 145 (2009) 467–479.
- [203] Toivari M.H., Nygård Y., Penttila M., Ruohonen L., Wiebe M.G., Microbial d-xylonate production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96 (2012) 1–8.
- [204] Lee C.C., Jordan D.B., Stoller J.R., Kibblewhite R.E., Wagschal K., Biochemical characterization of *Caulobacter crescentus* xylose dehydrogenase, *International Journal of Biological Macromolecules*, 118 (2018) 1362–1367.
- [205] Tranulis M.A., Christophersen B., Borrebaek B., Glucose dehydrogenase in beef (*Bos taurus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver: A comparative study, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109B (1994) 427–435.
- [206] Baik S.H., Michel F., Aghajari N., Haser R., Harayama S., Cooperative effect of two surface amino acid mutations (Q252L and E170K) in glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium* IWG3 on stabilization of its oligomeric state, *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (2005) 3285.
- [207] Milburn C.C., Lamble H.J., Theodossis A., Bull S.D., Hough D.W., Danson M.J., Taylor G.L., The structural basis of substrate promiscuity in glucose dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*, *Journal of Biological Chemistry*, 281 (2006) 14796–14804.
- [208] Takanashi M., Shibahara T., Shiraki M., Saito T., Biochemical and genetic characterization of a D(-)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase from *Acidovorax* sp. strain SA1, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97 (2004) 78–81.

- [209] Jin Q., Li X., Deng C., Zhang Q., Yi D., Wang X., Tang Y., Wang Y., Silica nanowires with tunable hydrophobicity for lipase immobilization and biocatalytic membrane assembly, *Journal of Colloid and Interface Science*, 531 (2018) 555–563.
- [210] Lin Y., Jin W., Cai L., Liu X., Qiu Y., Zhang G., Green preparation of covalently co-immobilized multienzymes on silica nanoparticles for clean production of reducing sugar from lignocellulosic biomass, *Journal of Cleaner Production*, 314 (2021) 127994.
- [211] Garcia L.A., Prado J.P.Z., Morales S.A.V., da Cunha Abreu Xavier M., Lopes M.S., da Silva E.S., Maiorano A.E., Gunnewiek R.F.K., Perna R.F., Synthesis and characterization of a novel silica-niobia support for the immobilization of microbial fructosyltransferase aiming at fructooligosaccharides production, *Materials Today Communications*, 31 (2022) 103588.
- [212] Jesionowski T., Zdarta J., Krajewska B., Enzyme immobilization by adsorption: A review, *Adsorption*, 20 (2014) 801–821.
- [213] Califano V., Costantini A., Immobilization of cellulolytic enzymes in mesostructured silica materials, *Catalysts*, 10 (2020) 706.
- [214] Lu J., Takahashi A., Ueda S., 3-Hydroxybutyrate oligomer hydrolase and 3-hydroxybutyrate dehydrogenase participate in intracellular polyhydroxybutyrate and polyhydroxyvalerate degradation in *Paracoccus denitrificans*, *Applied and Environmental Microbiology*, 80 (2014) 986–993.
- [215] Johnsen U., Schonheit P., Novel xylose dehydrogenase in the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*, *Journal of Bacteriology*, 186 (2004) 6198–6207.
- [216] Hyun J., Abigail M., Choo J.W., Ryu J., Kim H.K., Effects of N-/C-terminal extra tags on the optimal reaction conditions, activity, and quaternary structure of *Bacillus thuringiensis* glucose 1-dehydrogenase, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26 (2016) 1708–1716.
- [217] Jia X., Kelly R.M., Han Y., Simultaneous biosynthesis of (r)-acetoin and ethylene glycol from D-xylose through in vitro metabolic engineering, *Metabolic Engineering Communications*, 7 (2018) e00074.
- [218] Jin L.Q., Xu W., Yang B., Liu Z.Q., Zheng Y.G., Efficient biosynthesis of xylitol from xylose by coexpression of xylose reductase and glucose dehydrogenase in *Escherichia coli*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187 (2019) 1143–1157.
- [219] Pietricola G., Tommasi T., Dosa M., Camelin E., Berruto E., Ottone C., Fino D., Cauda V., Piumetti M., Synthesis and characterization of ordered mesoporous silicas for

the immobilization of formate dehydrogenase (FDH), *International Journal of Biological Macromolecules*, 177 (2021) 261–270.

[220] Zhou L., Ouyang Y., Kong W., Ma T., Zhao H., Jiang Y., Gao J., Ma J., One pot purification and co-immobilization of His-tagged old yellow enzyme and glucose dehydrogenase for asymmetric hydrogenation, *Enzyme and Microbial Technology*, 156 (2022) 110001.

9. Aktywność naukowa

Publikacje naukowe:

1. **Bachosz K.**, Synoradzki K., Staszak M., Pinelo M., Meyer A.S., Zdarta J., Jesionowski T., Bioconversion of xylose to xylonic acid via co-immobilized dehydrogenases for conjunct cofactor regeneration, *Bioorganic Chemistry*, 93 (2019) 102747. IF: 5,307, 5-letni IF: 5,321.
2. Jankowska K., Ciesielczyk F., **Bachosz K.**, Zdarta J., Kaczorek E., Jesionowski T., Laccase immobilized onto zirconia-silica hybrid doped with Cu²⁺ as an effective biocatalytic system for decolorization of dyes, *Materials*, 12 (2019) 1252. IF: 3,748, 5-letni IF: 4,042.
3. Zdarta J., **Bachosz K.**, Degórska O., Zdarta A., Kaczorek E., Pinelo M., Meyer A.S., Jesionowski T., Co-immobilization of glucose dehydrogenase and xylose dehydrogenase as a new approach for simultaneous production of gluconic and xylonic acid, *Materials*, 12 (2019) 3167. IF: 3,748, 5-letni IF: 4,042.
4. **Bachosz K.**, Zdarta J., Marczak Ł., Błażewicz J., Jesionowski T., A highly effective approach to cofactor regeneration and subsequent membrane separation of bioconversion products: Kinetic parameters and effect of process conditions, *Bioresource Technology Reports*, 9 (2020) 100365.
5. Zdarta J., Jankowska K., **Bachosz K.**, Kijewska-Gawrońska E., Zgoła-Grześkowiak A., Kaczorek E., Jesionowski T., A promising laccase immobilization using electrospun materials for degradation of tetracycline: Effect of process conditions and catalytic pathways, *Catalysis Today*, 348 (2020) 127–136. IF: 6,562, 5-letni IF: 6,308.
6. Zdarta J., Machałowski T., Degórska O., **Bachosz K.**, Fursov A., Ehrlich H., Ivanenko V.N., Jesionowski T., 3D Chitin scaffolds from the marine demosponge *aplysina archeri* as a support for laccase immobilization and its use in the removal of pharmaceuticals, *Biomolecules*, 10 (2020) 646. IF: 6,064, 5-letni IF: 6,191.
7. Zdarta J., Jankowska K., **Bachosz K.**, Degórska O., Kaźmierczak K., Nguyen L.N., Nghiem L.D., Jesionowski T., Enhanced wastewater treatment by enzyme immobilisation, *Current Pollution Reports*, 7 (2021) 167–179. IF: 8,097, 5-letni IF: 9,656.
8. **Bachosz K.**, Vu M.T., Nghiem L.D., Zdarta J., Nguyen L.N., Jesionowski T., Enzyme-based control of membrane biofouling for water and wastewater purification:

- A comprehensive review, *Environmental Technology & Innovation*, 25 (2022) 102106. IF: 7,758.
9. Machałowski T., Jankowska K., **Bachosz K.**, Smulek W., Ehrlich H., Kaczorek E., Zdarta J., Jesionowski T., Biocatalytic system made of 3D chitin, silica nanopowder and horseradish peroxidase for the removal of 17 α -ethinylestradiol: Determination of process efficiency and degradation mechanism, *Molecules*, 27 (2022) 1354. IF: 4,927, 5-letni IF: 5,110.
 10. **Bachosz K.**, Piasecki A., Zdarta A., Kaczorek E., Pinelo M., Zdarta J., Jesionowski T., Enzymatic membrane reactor in xylose bioconversion with simultaneous cofactor regeneration, *Bioorganic Chemistry*, 123 (2022) 105781. IF: 5,307, 5-letni IF: 5,321.
 11. **Bachosz K.**, Zdarta J., Nghiem L.D., Jesionowski T., Multienzymatic conversion of monosaccharides from birch biomass after pretreatment, *Environmental Technology & Innovation*, 28 (2022) 102874. IF: 7,758.
 12. Stanisz M., **Bachosz K.**, Siwińska-Ciesielczyk K., Kłapiszewski Ł., Zdarta J., Jesionowski T., Tailoring lignin-based spherical particles as a support for lipase immobilization, *Catalysts*, 12 (2022) 1031. IF: 4,501, 5-letni IF: 4,641.
 13. **Bachosz K.**, Smulek W., Zdarta J., Jesionowski T., A novel strategy for the application of levulinic acid with simultaneous NAD⁺ regeneration and membrane separation of products, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10 (2022) 108703. IF: 7,968.

Rozdziały w książkach:

1. **Bachosz K.**, Jankowska K., Zdarta J., Jesionowski T., Enzymatyczna konwersja biomasy w: G. Schroeder, P. Grzesiak (Ed.): *Środowisko i Przemysł Tom VIII, Cursiva*, 2018, 67–106.
2. Jankowska K., **Bachosz K.**, Zdarta J., Jesionowski T., Application of enzymatic-based bioreactors w: M. Ochowiak, S. Woźniowicz, P.T. Mitkowski, M. Doligalski (Ed.): *PAIC 2019, Practical Aspects of Chemical Engineering*, Springer Nature Switzerland AG, 2020, 1–12.
3. Zdarta J., Kaźmierczak K., Jankowska K., **Bachosz K.**, Degórska O., Bilal M., Iqbal H.M.N., Nguyen L.N., Nghiem L.D., Jesionowski T., Nanobiocatalysts for wastewater remediation and redefining of pollutants w: H.M.N. Iqbal, M. Bilal, T.A. Nguyen (Ed.): *Nano-bioremediation: Fundamentals and applications*, Elsevier, 2022, 313–337.

Zgłoszenia patentowe:

1. Zdarta J., **Bachosz K.**, Jesionowski T., Materiał hybrydowy przeznaczony korzystnie do immobilizacji enzymów oraz sposób jego wytworzenia, P.435613, 07.10.2020.

Wystąpienia na konferencjach krajowych:

Wystąpienia ustne

1. Jankowska K., Ciesielczyk F., **Bachosz K.**, Zdarta J., Jesionowski T., Układy tlenkowe ZrO_2-SiO_2 oraz ZrO_2-SiO_2/Cu^{2+} ze zimmobilizowaną lakazą do biodegradacji barwników z roztworów wodnych, IV Interdyscyplinarna Konferencja Nano(&)BioMateriały – od teorii do aplikacji, Toruń, 06–07.06.2019.
2. **Bachosz K.**, Jankowska K., Synoradzki K., Zdarta J., Jesionowski T., Bioconversion of xylose to xylonic acid by co-immobilized dehydrogenases with cofactor regeneration, Interfacial Phenomena in Theory and Practice – The XIVth Summer School for Postgraduate Students, Sudomie, 24–28.06.2019.
3. Zdarta J., Jankowska K., **Bachosz K.**, Kijeńska-Gawrońska E., Jesionowski T., Immobilizowane enzymy w procesach usuwania wybranych zanieczyszczeń środowiskowych, 62 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Warszawa, 02–06.09.2019.
4. **Bachosz K.**, Zdarta J., Jesionowski T., Biokonwersja ksylozy i formaldehydu z zastosowaniem enzymatycznego reaktora membranowego, V Konferencja Naukowa Enzymos: Enzymy w nauce i przemyśle, online, 05.02.2021.
5. **Bachosz K.**, Zdarta J., Jesionowski T., Biokonwersja kwasu lewulinowego w procesie regeneracji kofaktora enzymatycznego, VII Konferencja Naukowa Enzymos: Enzymy w nauce i przemyśle, online, 24.02.2022.

Postery

1. **Bachosz K.**, Zdarta J., Jesionowski T., Biokonwersja ksylozy z wykorzystaniem reaktorów membranowych, 62 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Warszawa, 02–06.09.2019.
2. **Bachosz K.**, Jankowska K., Zdarta J., Jesionowski T., Zastosowanie bioreaktorów enzymatycznych, Drugie Seminarium Praktyczne Aspekty Inżynierii Chemicznej, Zaniemiśl, 16–17.09.2019.

- Zdarta J., Jankowska K., **Bachosz K.**, Kijeńska-Gawrońska E., Jesionowski T., Degradacja substancji farmaceutycznych z wykorzystaniem immobilizowanych enzymów, III Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów BioOrg 2019, Poznań, 07.12.2019.
- Jankowska K., Kijeńska-Gawrońska E., **Bachosz K.**, Zdarta J., Jesionowski T., Pinelo M., Optymalizacja procesu otrzymywania materiałów elektroprzewodzących jako nośników w immobilizacji oksydoreduktaz: Charakterystyka i zastosowanie, III Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów BioOrg 2019, Poznań, 07.12.2019.
- Bachosz K.**, Degórska O., Zdarta J., Jesionowski T., Wpływ parametrów procesowych na efektywność konwersji ksylozy i regenerację kofaktora enzymatycznego, III Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów BioOrg 2019, Poznań, 07.12.2019.
- Degórska O., **Bachosz K.**, Kaźmierczak K., Ciesielczyk F., Zdarta J., Jesionowski T., Nowatorski materiał tlenkowy $ZrO_2-Fe_3O_4$: Synteza, charakterystyka, zastosowanie, III Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów BioOrg 2019, Poznań, 07.12.2019.
- Bachosz K.**, Meyer A.S., Zdarta J., Jesionowski T., Immobilizacja kofaktorów enzymatycznych w procesach jednoczesnej biokonwersji monosacharydów i regeneracji kofaktora, IV Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów BioOrg 2022, Poznań, 03.12.2022.
- Zdarta J., Bilal M., Rybarczyk A., **Bachosz K.**, Jesionowski T., Układy oparte o immobilizowane peroksydazy w konwersji mikrozanieczyszczeń środowiskowych, IV Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów BioOrg 2022, Poznań, 03.12.2022.

Wystąpienia na konferencjach międzynarodowych:

Wystąpienia ustne

- Zdarta J., Jankowska K., **Bachosz K.**, Kijeńska-Gawrońska E., Jesionowski T., Laccase-electrospun materials as biocatalytic systems for application in environmental protection, 5th Edition of Global Conference on Catalysis, Chemical Engineering & Technology, Londyn, Wielka Brytania, 16–18.09.2019.

2. Jankowska K., Zdarta J., Ciesielszyk F., **Bachosz K.**, Jesionowski T., Oxide systems with immobilized laccase as tools for dyes decolorization processes, 5th Edition of Global Conference on Catalysis, Chemical Engineering & Technology, Londyn, Wielka Brytania, 16–18.09.2019.
3. Jankowska K., Su Z., **Bachosz K.**, Pinelo M., Zdarta J., Jesionowski T., Electrospun materials for immobilization of oxidoreductases: Improving of their catalytic activity, Catalysis Virtual 2020, online, 17–18.07.2020.
4. Jankowska K., Grzywaczyk A., **Bachosz K.**, Zdarta J., Jesionowski T., Pinelo M., A new approach for decolorization of textile dyes using laccase immobilized onto electrospun fibers, 12th International Congress on Membranes and Membrane Processes, online, 06–11.12.2020.
5. **Bachosz K.**, Strybel U., Marczak Ł., Bilal M., Iqbal H.M.N., Zdarta J., Jesionowski T., Degradation of selected estrogens by oxidoreductases immobilized onto electrospun fibers of polystyrene/chitosan, 4th International Caparica Conference on Pollutant Toxic Ions & Molecules PTIM'21, Lizbona, Portugalia, 01–04.11.2021.
6. Zdarta J., Jankowska K., **Bachosz K.**, Degórska O., Kaźmierczak K., Zdarta A., Jesionowski T., Multifunctional biocatalytic systems for removal of estrogens from water solutions, Wastewater, Water and Resource Recovery Conference 2022, Poznań, Polska, 10–13.04.2022.

Postery

1. Jankowska K., **Bachosz K.**, Zdarta J., Jesionowski T., Electrospun nanomaterials for enzyme immobilization and biodegradation of environmental pollution, French-Polish Chemistry Congress, Paryż, Francja, 04–06.07.2019.
2. Kaźmierczak K., Jankowska K., **Bachosz K.**, Degórska O., Zdarta J., Jesionowski T., Estrogens removal by immobilized oxidoreductases, 4th International Caparica Conference on Pollutant Toxic Ions & Molecules PTIM'21, Lizbona, Portugalia, 01–04.11.2021.

Staż naukowe:

1. **25.11.2019 – 08.12.2019:** Centre for Technology in Water and Wastewater, School of Civil and Environmental Engineering, University of Technology Sydney, Australia – w ramach projektu NAWA Prom “Współpraca PUT-UTS akceleracją zdolności publikacyjnej doktorantów. Międzynarodowa Wymiana Stypendialna Doktorantów

- i Kadry Akademickiej” Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego.
2. **06.02.2020 – 13.03.2020:** Laboratory of API Synthesis and Central Development Laboratory, Farmak JSC, Kijów, Ukraina – w ramach projektu ORBIS Open Research Biopharmaceutical Internships Support finansowanego ze środków European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 778051.
 3. **01.09.2021 – 30.11.2021:** Katedra Technologii Chemicznej Organicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Śląska, Gliwice, Polska – w ramach uczestnictwa w Interdyscyplinarnych Studiach Doktoranckich „NanoBioTech” współfinansowanych przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014–2020, na podstawie umowy o dofinansowanie nr POWR.03.02.00-00-I011/16.
 4. **01.03.2022 – 31.08.2022:** Department of Biotechnology and Biomedicine (DTU Bioengineering), Technical University of Denmark, Kgs. Lyngby, Dania – w ramach Programu im. Mieczysława Bekkera, finansowanego przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej, na podstawie decyzji o nr BPN/BEK/2021/1/00124/DEC/1.

Projekty badawcze:

1. Kierownik w projekcie finansowanym w ramach Programu im. Mieczysława Bekkera przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej pt. „Koimmobilizacja enzymu i kofaktora enzymatycznego w procesach jednoczesnej konwersji biomasy i regeneracji kofaktora”, zgodnie z decyzją nr BPN/BEK/2021/1/00124/DEC/1.
2. Wykonawca w projekcie SONATA-15 finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki pt. „Biodegradacja estrogenów z wykorzystaniem zaawansowanych systemów biokatalitycznych opartych o immobilizowane oksydoreduktazy” o nr 2019/35/D/ST8/02087.
3. Wykonawca w projekcie POLS finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki w ramach Norweskiego Mechanizmu Finansowego 2014-2021 pt. „Projektowanie nowatorskich systemów enzymatycznych zawierających peroksydazy do usuwania szkodliwych zanieczyszczeń” o nr 2020/37/K/ST8/03805.

Publikacja 1

Bachosz K., Synoradzki K., Staszak M., Pinelo M., Meyer A.S., Zdarta J., Jesionowski T., *Bioconversion of xylose to xylonic acid via co-immobilized dehydrogenases for conjunct cofactor regeneration*, *Bioorganic Chemistry*, 93 (2019) 102747.

Publikacja 2

Bachosz K., Zdarta J., Marczak Ł., Błażewicz J., Jesionowski T., *A highly effective approach to cofactor regeneration and subsequent membrane separation of bioconversion products: Kinetic parameters and effect of process conditions*, Bioresource Technology Reports, 9 (2020) 100365.

Publikacja 3

Bachosz K., Piasecki A., Zdarta A., Kaczorek E., Pinelo M., Zdarta J., Jesionowski T., *Enzymatic membrane reactor in xylose bioconversion with simultaneous cofactor regeneration*, Bioorganic Chemistry, 123 (2022) 105781.

Publikacja 4

Bachosz K., Smulek W., Zdarta J., Jesionowski T., *A novel strategy for the application of levulinic acid with simultaneous NAD⁺ regeneration and membrane separation of products*, Journal of Environmental Chemical Engineering, 10 (2022) 108703.

Publikacja 5

Bachosz K., Zdarta J., Nghiem L.D., Jesionowski T., *Multienzymatic conversion of monosaccharides from birch biomass after pretreatment*, Environmental Technology & Innovation, 28 (2022) 102874.

Oświadczenia współautorów



mgr inż. Karolina Bachosz
Zakład Technologii Chemicznej
Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej
Wydział Technologii Chemicznej
ul. Berdychowo 4, 60-965 Poznań
tel. +48 61 665 3747, fax +48 61 665 3649
e-mail: karolina.h.bachosz@doctorate.put.poznan.pl

Poznań, 2022-11-22

OŚWIADCZENIE O UDZIALE W PUBLIKACJACH NAUKOWYCH

Oświadczam, że jestem pierwszym i wiodącym autorem poniższych publikacji naukowych:

1. **Bachosz K.**, Synoradzki K., Staszak M., Pinelo M., Meyer A.S., Zdarta J., Jesionowski T., *Bioconversion of xylose to xylonic acid via co-immobilized dehydrogenases for conjunct cofactor regeneration*, *Bioorganic Chemistry*, 93 (2019) 102747.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji naukowej obejmował opracowanie koncepcji badań i ich metodologii, przeprowadzenie eksperymentów związanych z koimmobilizacją enzymów i konwersją ksylozy, jak również określeniem wpływu parametrów procesowych na efektywność prowadzonych procesów oraz analizę i interpretację uzyskanych danych, a także przygotowanie wstępnej i finalnej wersji manuskryptu.

2. **Bachosz K.**, Zdarta J., Marczak Ł., Błażewicz J., Jesionowski T., *A highly effective approach to cofactor regeneration and subsequent membrane separation of bioconversion products: Kinetic parameters and effect of process conditions*, *Bioresource Technology Reports*, 9 (2020) 100365.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji naukowej obejmował opracowanie koncepcji badań i ich metodologii, przeprowadzenie eksperymentów związanych z określeniem wpływu substancji inhibitujących i środowiska reakcji na efektywność prowadzonego procesu konwersji ksylozy, jak również zdefiniowanie parametrów kinetycznych i podjęcie próby separacji produktu końcowego oraz analizę i interpretację uzyskanych rezultatów, a także przygotowanie wstępnej i finalnej wersji manuskryptu.

3. **Bachosz K.**, Piasecki A., Zdarta A., Kaczorek E., Pinelo M., Zdarta J., Jesionowski T., *Enzymatic membrane reactor in xylose bioconversion with simultaneous cofactor regeneration*, *Bioorganic Chemistry*, 123 (2022) 105781.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji obejmował opracowanie koncepcji badań i ich metodologii, przeprowadzenie eksperymentów związanych z kondycjonowaniem membrany, koimmobilizacją enzymów, określeniem wpływu parametrów procesowych na efektywność prowadzonej konwersji ksylozy i możliwością ponownego zastosowania wytworzonego systemu biokatalitycznego oraz analizę i interpretację otrzymanych danych, a także przygotowanie wstępnej i finalnej wersji manuskryptu.

4. **Bachosz K.**, Smulek W., Zdarta J., Jesionowski T., *A novel strategy for the application of levulinic acid with simultaneous NAD⁺ regeneration and membrane separation of products*, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10 (2022) 108703.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji naukowej obejmował opracowanie koncepcji badań i ich metodologii, przeprowadzenie eksperymentów związanych z koimmobilizacją enzymów i doбором najkorzystniejszych warunków procesowych do osiągnięcia wysokich efektywności konwersji ksylozy i glukozy oraz analizę i interpretację uzyskanych rezultatów, a także przygotowanie wstępnej i finalnej wersji manuskryptu.

5. **Bachosz K.**, Zdarta J., Nghiem L.D., Jesionowski T., *Multienzymatic conversion of monosaccharides from birch biomass after pretreatment*, *Environmental Technology & Innovation*, 28 (2022) 102874.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji naukowej obejmował opracowanie koncepcji badań i ich metodologii, przeprowadzenie eksperymentów związanych z koimmobilizacją enzymów, określeniem jej efektywności i wyznaczeniem wpływu warunków procesowych na efektywność konwersji ksylozy, glukozy i kwasu lewulinowego z roztworu rzeczywistego oraz analizę i interpretację uzyskanych danych, a także przygotowanie wstępnej i finalnej wersji manuskryptu.

Karolina Bachosz



Prof. dr hab. inż. Teofil Jesionowski
Członek korespondent PAN
Kierownik Zakładu Technologii Chemicznej
WYDZIAŁ TECHNOLOGII CHEMICZNEJ
Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej
ul. Berdychowo 4, 60-965 Poznań
tel. +48 61 665 3720, fax +48 61 665 3649
e-mail: teofil.jesionowski@put.poznan.pl

Poznań, 2022-11-22

OŚWIADCZENIE O UDZIALE W PUBLIKACJACH NAUKOWYCH

Oświadczam, że brałem czynny udział w przygotowaniu poniższych publikacji naukowych, a także jestem w nich autorem korespondencyjnym:

1. Bachosz K., Synoradzki K., Staszak M., Pinelo M., Meyer A.S., Zdarta J., **Jesionowski T.**, *Bioconversion of xylose to xylonic acid via co-immobilized dehydrogenases for conjunct cofactor regeneration*, Bioorganic Chemistry, 93 (2019) 102747.
2. Bachosz K., Zdarta J., Marczak Ł., Błażewicz J., **Jesionowski T.**, *A highly effective approach to cofactor regeneration and subsequent membrane separation of bioconversion products: Kinetic parameters and effect of process conditions*, Bioresource Technology Reports, 9 (2020) 100365.
3. Bachosz K., Piasecki A., Zdarta A., Kaczorek E., Pinelo M., Zdarta J., **Jesionowski T.**, *Enzymatic membrane reactor in xylose bioconversion with simultaneous cofactor regeneration*, Bioorganic Chemistry, 123 (2022) 105781.
4. Bachosz K., Smulek W., Zdarta J., **Jesionowski T.**, *A novel strategy for the application of levulinic acid with simultaneous NAD⁺ regeneration and membrane separation of products*, Journal of Environmental Chemical Engineering, 10 (2022) 108703.
5. Bachosz K., Zdarta J., Nghiem L.D., **Jesionowski T.**, *Multienzymatic conversion of monosaccharides from birch biomass after pretreatment*, Environmental Technology & Innovation, 28 (2022) 102874.

Mój udział w przygotowaniu powyższych publikacji naukowych obejmował opracowanie koncepcji badań, nadzór merytoryczny oraz weryfikację ostatecznych wersji manuskryptów.



dr hab. inż. Jakub Zdarta
Zakład Technologii Chemicznej
Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej
Wydział Technologii Chemicznej
ul. Berdychowo 4, 60-965 Poznań
tel. +48 61 665 3747, fax +48 61 665 3649
e-mail: jakub.zdarta@put.poznan.pl

Poznań, 2022-11-22

OŚWIADCZENIE O UDZIALE W PUBLIKACJACH NAUKOWYCH

Oświadczam, że brałem czynny udział w przygotowaniu poniższych publikacji naukowych:

1. Bachosz K., Synoradzki K., Staszak M., Pinelo M., Meyer A.S., **Zdarta J.**, Jesionowski T., *Bioconversion of xylose to xylonic acid via co-immobilized dehydrogenases for conjunct cofactor regeneration*, Bioorganic Chemistry, 93 (2019) 102747.
2. Bachosz K., **Zdarta J.**, Marczak Ł., Błażewicz J., Jesionowski T., *A highly effective approach to cofactor regeneration and subsequent membrane separation of bioconversion products: Kinetic parameters and effect of process conditions*, Bioresource Technology Reports, 9 (2020) 100365.
3. Bachosz K., Piasecki A., Zdarta A., Kaczorek E., Pinelo M., **Zdarta J.**, Jesionowski T., *Enzymatic membrane reactor in xylose bioconversion with simultaneous cofactor regeneration*, Bioorganic Chemistry, 123 (2022) 105781.
4. Bachosz K., Smulek W., **Zdarta J.**, Jesionowski T., *A novel strategy for the application of levulinic acid with simultaneous NAD^+ regeneration and membrane separation of products*, Journal of Environmental Chemical Engineering, 10 (2022) 108703.
5. Bachosz K., **Zdarta J.**, Nghiem L.D., Jesionowski T., *Multienzymatic conversion of monosaccharides from birch biomass after pretreatment*, Environmental Technology & Innovation, 28 (2022) 102874.

Mój udział w przygotowaniu powyższych publikacji naukowych obejmował opracowanie i konsultacje koncepcji badań i ich metodologii, dyskusję uzyskanych rezultatów, nadzór merytoryczny oraz recenzję i edycję wstępnych wersji manuskryptów.



OŚWIADCZENIE O UDZIALE W PUBLIKACJI NAUKOWEJ

Oświadczam, że brałem czynny udział w przygotowaniu poniższej publikacji naukowej:

1. Bachosz K., Zdarta J., Marczak Ł., **Błażewicz J.**, Jesionowski T., *A highly effective approach to cofactor regeneration and subsequent membrane separation of bioconversion products: Kinetic parameters and effect of process conditions*, Bioresource Technology Reports, 9 (2020) 100365.

Mój udział w przygotowaniu powyższej publikacji naukowej obejmował konsultację merytoryczną oraz edycję wstępnej wersji manuskryptu.



POLITECHNIKA POZNAŃSKA

prof. dr hab. inż. Ewa Kaczorek
Dziekan Wydziału Technologii Chemicznej
Zakład Chemii Organicznej
Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej
Wydział Technologii Chemicznej
ul. Berdychowo 4, 60-965 Poznań
tel. +48 61 665 3671, fax +48 61 665 3649
e-mail: ewa.kaczorek@put.poznan.pl

Poznań, 2022-11-22

OŚWIADCZENIE O UDZIALE W PUBLIKACJI NAUKOWEJ

Oświadczam, że brałam czynny udział w przygotowaniu poniższej publikacji naukowej:

1. Bachosz K., Piasecki A., Zdarta A., **Kaczorek E.**, Pinelo M., Zdarta J., Jesionowski T.,
*Enzymatic membrane reactor in xylose bioconversion with simultaneous cofactor
regeneration*, Bioorganic Chemistry, 123 (2022) 105781.

Mój udział w przygotowaniu powyższej publikacji naukowej obejmował nadzór merytoryczny nad prowadzonymi badaniami oraz recenzję i edycję wstępnej wersji manuskryptu.

E. Kaczorek

dr Łukasz Marczak

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk

ul. Zygmunta Noskowskiego 12/14

61-704 Poznań

e-mail: lukasmar@ibch.poznan.pl

Poznań, 2022-11-22

OŚWIADCZENIE O UDZIALE W PUBLIKACJI NAUKOWEJ

Oświadczam, że brałem czynny udział w przygotowaniu poniższej publikacji naukowej:

1. Bachosz K., Zdarta J., **Marczak Ł.**, Błażewicz J., Jesionowski T., *A highly effective approach to cofactor regeneration and subsequent membrane separation of bioconversion products: Kinetic parameters and effect of process conditions*, Bioresource Technology Reports, 9 (2020) 100365.

Mój udział w przygotowaniu powyższej publikacji naukowej obejmował przeprowadzenie analizy chromatograficznej otrzymanych próbek wraz z interpretacją uzyskanych danych.



Professor Anne S. Meyer
Department of Biotechnology and Biomedicine
DTU Bioengineering
Technical University of Denmark
Soltofts Plads 224, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark
e-mail: asme@dtu.dk

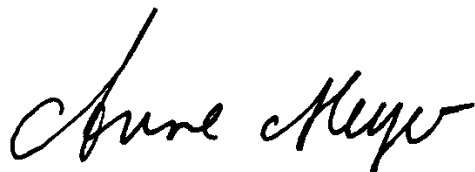
Kgs. Lyngby, 2022-12-06

STATEMENT OF CO-AUTHORSHIP

I confirm the participation in following publication:

1. Bachosz K., Synoradzki K., Staszak M., Pinelo M., **Meyer A.S.**, Zdarta J., Jesionowski T., *Bioconversion of xylose to xylonic acid via co-immobilized dehydrogenases for conjunct cofactor regeneration*, Bioorganic Chemistry, 93 (2019) 102747.

My participation included critical analysis of the obtained data, scientific consultations and substantive verification of the final version of the manuscript.



06-12-2022

Professor Long D. Nghiem
Centre for Technology in Water and Wastewater
School of Civil and Environmental Engineering
University of Technology Sydney, NSW 2220, Australia
e-mail: DucLong.Nghiem@uts.edu.au

Sydney, 2022-11-22

STATEMENT OF CO-AUTHORSHIP

I confirm the participation in following publication:

1. Bachosz K., Zdarta J., **Nghiem L.D.**, Jesionowski T., *Multienzymatic conversion of monosaccharides from birch biomass after pretreatment*, Environmental Technology & Innovation, 28 (2022) 102874.

My participation included critical analysis of the obtained data as well as scientific consultations and substantive verification of the final version of the manuscript.



Prof Long Nghiem



POLITECHNIKA POZNAŃSKA

dr inż. Adam Piasecki
Instytut Inżynierii Materiałowej
Wydział Inżynierii Materiałowej i Fizyki Technicznej
ul. Jana Pawła II 24, 60-965 Poznań
tel. +48 61 665 3777
e-mail: adam.piasecki@put.poznan.pl

Poznań, 2022-11-22

OŚWIADCZENIE O UDZIALE W PUBLIKACJI NAUKOWEJ

Oświadczam, że brałem czynny udział w przygotowaniu poniższej publikacji naukowej:

1. Bachosz K., **Piasecki A.**, Zdarta A., Kaczorek E., Pinelo M., Zdarta J., Jesionowski T.,
*Enzymatic membrane reactor in xylose bioconversion with simultaneous cofactor
regeneration*, Bioorganic Chemistry, 123 (2022) 105781.

Mój udział w przygotowaniu powyższej publikacji naukowej obejmował przeprowadzenie energodispersyjnej mikroanalizy rentgenowskiej oraz wykonanie zdjęć z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu elektronowego.

Adam Piasecki

Professor Manuel Pinelo
Department of Chemical and Biochemical Engineering
DTU Chemical Engineering
Technical University of Denmark
Soltofts Plads 227, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark
e-mail: mp@kt.dtu.dk

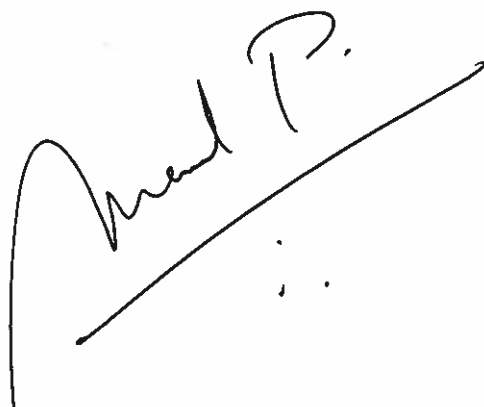
Kgs. Lyngby, 2022-11-22

STATEMENT OF CO-AUTHORSHIP

I confirm the participation in following publications:

1. Bachosz K., Synoradzki K., Staszak M., **Pinelo M.**, Meyer A.S., Zdarta J., Jesionowski T., *Bioconversion of xylose to xylonic acid via co-immobilized dehydrogenases for conjunct cofactor regeneration*, *Bioorganic Chemistry*, 93 (2019) 102747.
2. Bachosz K., Piasecki A., Zdarta A., Kaczorek E., **Pinelo M.**, Zdarta J., Jesionowski T., *Enzymatic membrane reactor in xylose bioconversion with simultaneous cofactor regeneration*, *Bioorganic Chemistry*, 123 (2022) 105781.

My participation included critical analysis of the obtained data as well as scientific consultations and substantive verification of the final version of the manuscript.



Manuel Pinelo



POLITECHNIKA POZNAŃSKA

dr inż. Wojciech Smulek
Zakład Chemii Organicznej
Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej
Wydział Technologii Chemicznej
ul. Berdychowo 4, 60-965 Poznań
tel. +48 61 665 3671, fax +48 61 665 3649
e-mail: wojciech.smulek@put.poznan.pl

Poznań, 2022-11-22

OŚWIADCZENIE O UDZIALE W PUBLIKACJI NAUKOWEJ

Oświadczam, że brałem czynny udział w przygotowaniu poniższej publikacji naukowej:

1. Bachosz K., **Smulek W.**, Zdarta J., Jesionowski T., *A novel strategy for the application of levulinic acid with simultaneous NAD⁺ regeneration and membrane separation of products*, Journal of Environmental Chemical Engineering, 10 (2022) 108703.

Mój udział w przygotowaniu powyższej publikacji naukowej obejmował przeprowadzenie analizy z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas oraz edycję wstępnej wersji manuskryptu.

Wojciech Smulek



POLITECHNIKA POZNAŃSKA

dr inż. Maciej Staszak
Zakład Inżynierii Procesowej
Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej
Wydział Technologii Chemicznej
ul. Berdychowo 4, 60-965 Poznań
tel. +48 61 665 3758, fax +48 61 665 3649
e-mail: maciej.staszak@put.poznan.pl

Poznań, 2022-11-22

OŚWIADCZENIE O UDZIALE W PUBLIKACJI NAUKOWEJ

Oświadczam, że brałem czynny udział w przygotowaniu poniższej publikacji naukowej:

1. Bachosz K., Synoradzki K., **Staszak M.**, Pinelo M., Meyer A.S., Zdarta J., Jesionowski T., *Bioconversion of xylose to xylonic acid via co-immobilized dehydrogenases for conjunct cofactor regeneration*, Bioorganic Chemistry, 93 (2019) 102747.

Mój udział w przygotowaniu powyższej publikacji naukowej obejmował przeprowadzenie analizy statystycznej danych eksperymentalnych wraz z dyskusją uzyskanych rezultatów.

Maciej Staszak

dr inż. Karol Synoradzki

Instytut Fizyki Molekularnej Polskiej Akademii Nauk

ul. Mariana Smoluchowskiego 17

60-179 Poznań

e-mail: karol.synoradzki@ifmpan.poznan.pl

Poznań, 2022-11-22

OŚWIADCZENIE O UDZIALE W PUBLIKACJI NAUKOWEJ

Oświadczam, że brałem czynny udział w przygotowaniu poniższej publikacji naukowej:

1. Bachosz K., **Synoradzki K.**, Staszak M., Pinelo M., Meyer A.S., Zdarta J., Jesionowski T., *Bioconversion of xylose to xylonic acid via co-immobilized dehydrogenases for conjunct cofactor regeneration*, *Bioorganic Chemistry*, 93 (2019) 102747.

Mój udział w przygotowaniu powyższej publikacji naukowej obejmował przeprowadzenie pomiarów właściwości magnetycznych otrzymanego materiału magnetyt–krzemionka oraz opis i dyskusję uzyskanych danych.





POLITECHNIKA POZNAŃSKA

dr inż. Agata Zdarta
Zakład Chemii Organicznej
Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej
Wydział Technologii Chemicznej
ul. Berdychowo 4, 60-965 Poznań
tel. +48 61 665 3671, fax +48 61 665 3649
e-mail: agata.zdarta@put.poznan.pl

Poznań, 2022-11-22

OŚWIADCZENIE O UDZIALE W PUBLIKACJI NAUKOWEJ

Oświadczam, że brałam czynny udział w przygotowaniu poniższej publikacji naukowej:

1. Bachosz K., Piasecki A., **Zdarta A.**, Kaczorek E., Pinelo M., Zdarta J., Jesionowski T.,
*Enzymatic membrane reactor in xylose bioconversion with simultaneous cofactor
regeneration*, Bioorganic Chemistry, 123 (2022) 105781.

Mój udział w przygotowaniu powyższej publikacji naukowej obejmował przeprowadzenie analizy z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas oraz edycję wstępnej wersji manuskryptu.

A. Zdarta