

# **Enzymatyczna funkcjonalizacja bakteryjnej nanocelulozy**

mgr inż. Monika Kaczmarek

Promotor: dr hab. inż. Aneta Białkowska, prof. uczelni

Promotor pomocniczy: dr inż. Karolina Ludwicka

## STRESZCZENIE

W obliczu wyzwań współczesnego przemysłu i medycyny, związanych z dynamicznym rozwojem cywilizacyjnym, istnieje stale rosnące zapotrzebowanie na innowacyjne rozwiązania technologiczne pozwalające przezwyciężyć pojawiające się problemy techniczne, ekonomiczne oraz środowiskowe. W ostatnich latach szeroko eksplorowanym obszarem badań nowoczesnej inżynierii materiałowej jest projektowanie i wytwarzanie nowych materiałów funkcjonalnych, które są wyraźnie zorientowane na spełnianie określonych zastosowań. Wśród nich na szczególną uwagę zasługują te na bazie polimerów naturalnych, na przykład bakteryjnej nanocelulozy (BNC), która posiada unikatowe właściwości fizykochemiczne i mechaniczne, a ponadto jest przyjazna dla środowiska, biodegradowalna i nietoksyczna. Do niewątpliwych atrybutów tego materiału należą m.in. wyjątkowa czystość chemiczna, wysoki stopień krystaliczności (80-90%) oraz polimeryzacji (2000-18000), silne uwodnienie (>90%) i wysoce zorganizowana nanowłóknista struktura przestrzenna, decydująca o jego interesujących parametrach mechanicznych.

Bakteryjna celuloza jest z powodzeniem wykorzystywana w stanie natywnym, jednakże aby zwiększyć jej funkcjonalność prowadzi się intensywne badania nad modyfikacją właściwości tego biomateriału, tak aby dostosować je do określonych potrzeb i aplikacji. W tym celu najczęściej stosuje się efektywne, stosunkowo proste i ekonomicznie uzasadnione metody chemiczne i/lub fizyczne. Ich wadą jest jednak stosowanie szkodliwych związków chemicznych i agresywnych warunków reakcji, które negatywnie wpływają na właściwości biologiczne biomateriału oraz środowisko naturalne. Alternatywę dla tych metod stanowi przyjazna środowisku i wysoce specyficzna modyfikacja enzymatyczna bakteryjnej nanocelulozy, która idealnie wpisuje się w strategię rozwoju nowoczesnej inżynierii materiałowej.

Wykorzystanie białek katalitycznych do modyfikacji właściwości użytkowych materiałów opiera się na bezpośredniej metodzie kontrolowanej hydrolizy i/lub przyłączenia reaktywnych grup funkcyjnych do struktury biopolimeru lub pośredniej, zakładającej zastosowanie celulozy bakteryjnej jako matrycy do immobilizacji enzymów. Jedną z bardziej interesujących grup enzymów stosowanych do modyfikacji BNC są niedawno odkryte oraz mało dotychczas zbadane lityczne polisacharydowe monooksygenazy (LPMO), zdolne do oksydacyjnego rozszczepiania wiązań  $\beta$ -1,4-glikozydowych tzw. opornych polisacharydów. Prowadzi to do włączenia w strukturę bakteryjnej celulozy wysoce reaktywnych ugrupowań chemicznych zawierających tlen, w tym grup karboksylowych i/lub hydroksylowych, tym samym poszerzając możliwości dalszej funkcjonalizacji tego materiału.

Głównym celem badań prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej była ukierunkowana enzymatyczna modyfikacja bakteryjnej nanocelulozy, produkowanej przez szczep *Komagataeibacter xylinus* E26, która opierała się na zastosowaniu litycznej polisacharydowej monooksygenazy, *NcLPMO9C*. Enzym ten pochodzi z grzyba *Neurospora crassa* i wykazuje specyficzną działalność względem atomu C4 wiązania  $\beta$ -1,4-glikozydowego celulozy.

Zmodyfikowany enzymatycznie materiał (oxBNC) poddano następnie charakterystyce strukturalnej, morfologicznej i fizykochemicznej oraz zweryfikowano jego potencjał aplikacyjny jako skutecznego nośnika do unieruchamiania enzymów.

W pierwszej kolejności dokonano standaryzacji substratu BNC, polegającej na doborze właściwej metody przygotowania i wstępnej obróbki materiału. Wyboru dokonano na podstawie analizy kinetyki wiązania *NcLPMO9C* do różnych form celulozy (tj. homogenatu oraz mokrych, suchych i liofilizowanych błon) oraz ilości miejsc oksydacji wygenerowanych w strukturze badanego biopolimeru. Niniejszy etap pozwolił na ustalenie, że suszenie sublimacyjne to metoda nie ograniczająca dostępności enzymu do substratu BNC i pozwalająca na osiągnięcie największej wydajności ich enzymatycznego utleniania, przy założeniu określonych kryteriów projektowych.

W kolejnym kroku zaprojektowano i zoptymalizowano matematycznie, z zastosowaniem metodologii powierzchni odpowiedzi (RSM), innowacyjną reakcję utleniania błon BNC przez *NcLPMO9C*. Odpowiedni dobór warunków prowadzenia procesu pozwolił na maksymalizację wydajności oksydacji, przy jednoczesnym ograniczeniu zużycia enzymu i kosubstratu (nadtlenku wodoru) oraz czasu trwania reakcji (powstało około 40  $\mu$ M miejsc utlenień BNC). Wykazano także, że alkaliczna modyfikacja bakteryjnej nanocelulozy, czyli merceryzacja, która wpływa na obniżenie stopnia krystaliczności tego polimeru, decyduje o zwiększeniu wydajności procesu enzymatycznego utleniania, nawet 4-krotnie w przypadku potraktowania celulozy 13% roztworem NaOH (powstało około 160  $\mu$ M miejsc utlenień).

Efektywność enzymatycznej funkcjonalizacji bakteryjnej nanocelulozy oceniono również na podstawie zmian cech morfologicznych i strukturalnych materiałów natywnych (oxBNC) oraz merceryzowanych (oxMBNC). W tym celu wykorzystano zaawansowane techniki mikroskopowe i spektroskopowe, w tym SEM, ATR-FTIR, oraz dyfraktometrię rentgenowską (XRD). Wybrane metody pozwoliły na zobrazowanie topografii powierzchni utlenionego polimeru, określenie zmian powstałych w strukturze morfologicznej włókien celulozowych, identyfikację charakterystycznych grup funkcyjnych oraz ocenę stanu uporządkowania struktury BNC (stopnia krystaliczności).

W celu weryfikacji skuteczności zmian wprowadzonych na drodze enzymatycznego utleniania w strukturę bakteryjnej nanocelulozy zbadano jej podatność na degradację i zdolności

adsorpcyjne. Udowodniono, że zaproponowana metoda funkcjonalizacji BNC doprowadziła do otrzymania materiału bardziej podatnego na degradację w środowisku naturalnym (glebie) oraz hydrolizę enzymatyczną z zastosowaniem komercyjnego preparatu celulolitycznego, a także odznaczającego się lepszymi właściwościami adsorpcyjnymi (o około 20%) niż ich nieutlenione odpowiedniki.

W ostatnim etapie badań zweryfikowano potencjał aplikacyjny utlenionej enzymatycznie bakteryjnej nanocelulozy jako matrycy do immobilizacji enzymów, w niniejszej pracy lizozymu, czyli jednego z ważniejszych z biotechnologicznego punktu widzenia białek katalitycznych. Udowodniono, że oxBNC stanowi skuteczny nośnik do unieruchamiania enzymów, pozwalający na związanie na jej powierzchni o ok. 20% większej ilości lizozymu niż ma to miejsce w przypadku materiału niemodyfikowanego. Otrzymane kompozyty BNC(oxBNC)-LYS poddano analizie ATR-FTIR, oceniając skuteczność przeprowadzonej immobilizacji oraz określono właściwości użytkowe uzyskanych układów katalitycznych, takie jak zachowana aktywność hydrolityczna, parametry kinetyczne i stabilność. Zasadność unieruchamiania lizozymu na oxBNC potwierdzono w badaniach aktywności przeciwbakteryjnej oraz antyoksydacyjnej. W toku przeprowadzonych badań wykazano, że kompozyty oxBNC-LYS wykazują dużą stabilność podczas przechowywania oraz charakteryzują się lepszą zdolnością do hamowania wzrostu bakterii *B. subtilis* i *E. coli* oraz neutralizacji wolnych rodników w porównaniu do wyjściowych materiałów.

Oprócz wykazanych w niniejszej pracy walorów użytkowych zmodyfikowanej na drodze enzymatycznej bakteryjnej nanocelulozy, ten eko-innowacyjny materiał może również znaleźć zastosowanie nowatorskich systemach pakowania i przechowywania produktów spożywczych, jako aktywne i/lub inteligentne opakowania do żywności, biotechnologii i ochronie środowiska (biosensory, biofiltry), a nawet medycynie (implanty resorbowalne, matryce do kontrolowanego uwalniania leków, czy też rusztowania komórkowe w inżynierii tkankowej).