

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR INŻ. KATARZYNY CZYŻEWSKIEJ

Rozprawa doktorska zatytułowana „Immobilizacja powierzchniowa i objętościowa enzymów działających w systemie kaskadowym” nawiązuje do najnowszych trendów przemysłowej biokatalizy. W pracy zaproponowano podejście trójenzymatyczne, umożliwiające produkcję 1) mleka bezlaktozowego wykazującego podwyższoną słodkość wynikającą z enzymatycznej hydrolizy laktozy, której oba produkty - glukoza i galaktoza wykazują wyższy indeks słodkości w stosunku do samej laktozy, a także 2) mleka bezlaktozowego o obniżonej zawartości cukrów. Pierwszy produkt pozyskiwano w obecności komercyjnego preparatu β -galaktozydazy Nola™Fit 5500. Produkcja drugiego odbywała się przy udziale dwóch kolejnych enzymów, oksydazy glukozowej oraz katalazy. Produkty końcowe uzyskane zgodnie z zaproponowanym podejściem enzymatycznym, kierowane są dla osób chcących wyeliminować laktozę ze swojej codziennej diety, zwracających uwagę na kaloryczność bezlaktozowych produktów mlecznych, a także konsumentów odbierających zwiększoną słodkość mleka bezlaktozowego jako czynnik dyskwalifikujący.

Schemat postępowania zaprezentowany w niniejszej rozprawie doktorskiej bezpośrednio nawiązuje do krytycznych wymogów stawianych przemysłowej biokatalizie produktów spożywczych. W badaniach wykorzystano enzymy bezpieczne dla zdrowia konsumentów, posiadające status GRAS. Z uwagi na specyfikę substratu (mleko krowie), zastosowano rozwiązanie opierające się na niskotemperaturowej biokatalizie ($\leq 15^{\circ}\text{C}$), mogącej odbywać się np. podczas transportu lub przechowywania mleka. W celu poprawy bilansu ekonomicznego przedstawionych procesów enzymatycznych zaproponowano dwie strategie tworzenia immobilizowanych preparatów enzymatycznych, membran katalitycznych oraz kapsulek hydrożelowych. W ich tworzeniu wykorzystano nośniki, tj. regenerowana celuloza, nylon, alginian sodu, nie wpływające na właściwości produktów spożywczych. Uzyskane wyniki przedstawiają ciąg działań związanych z charakterystyką natywnych enzymów (aktywność, stabilność, opis kinetyczny) oraz ich form immobilizowanych (wydajność wiązania, stabilność operacyjna, możliwość ponownego wykorzystania, opis kinetyczny). W badaniach wykorzystywano roztwór laktozy i glukozy sporządzony w 0,1M buforze HEPES pH 6,6 oraz mleko krowie.

Enzymatyczną hydrolizę laktozy przeprowadzono z udziałem natywnej oraz immobilizowanej β -galaktozydazy Nola, w 15°C . W badaniach skupiono się nad oceną wpływu produktów reakcji (glukozy i galaktozy) na aktywność β -galaktozydazy oraz opisem kinetycznym uwzględniającym interakcje pomiędzy wszystkimi składnikami medium. W przypadku formy natywnej preparatu Nola, stwierdzono obecność inhibicji kompetycyjnej galaktozą oraz podkreślono aktywujące oddziaływanie glukozy. Przeprowadzone eksperymenty wskazały na możliwość znoszenia inhibicji galaktozą w obecności tożsamyh stężeń glukozy. Podczas immobilizacji β -galaktozydazy Nola wykorzystano podejście powierzchniowego i objętościowego unieruchamiania

enzymów. W pierwszym przypadku, utworzone membrany katalityczne odznaczały się niską aktywnością enzymatyczną, wynikającą z mało efektywnego wiązania enzymu z powierzchniowymi grupami membran, z regenerowanej celulozy oraz nylonu. Badania prezentujące wysoką stabilność badanej β -galaktozydazy w obecności jonów Ca^{2+} potwierdziły sposobność tworzenia efektywnych preparatów enkapsulowanych na bazie alginianu sodu. Utworzone kapsułki mogły być wykorzystywane kilkakrotnie w przeciągu 6 cykli, zapewniających ponad 90% rozkład laktozy w czasie od 2 do 4 godzin. Badania kinetyczne wykazały utrudnione znoszenie inhibicji galaktozą w obecności tożsamyh stężeń glukozy, które było obserwowane dla enzymu natywnego. Uzyskane wyniki przyczyniły się do opracowania opisu matematycznego przedstawiającego model inhibicji kompetycyjnej galaktozą z jednoczesną inhibicją kompetycyjną i aktywacją glukozą. Zaproponowany model znalazł potwierdzenie dla obu form β -galaktozydazy. Przeprowadzone badania podkreśliły wyższość analizowanego preparatu Nola w stosunku do innych odpowiedników, w kontekście aktywności temperaturowej i stabilności względem jonów dwuwartościowych.

W etapie redukcji nadmiernej słodkości mleka bezlaktozowego zaangażowane były dwa enzymy działające w układzie one-pot, oksydaza glukozy oraz katalaza. Strategia enzymatycznego utleniania glukozy realizowana była w 12°C, w obecności natywnych oraz immobilizowanych enzymów, utworzonych w postaci membran katalitycznych oraz kapsulek alginianowych. Etap tworzenia co-immobilizowanych preparatów enzymatycznych poprzedziła charakterystyka pojedynczych enzymów, zarówno w formie natywnej jak i immobilizowanej, w myśl zasady mówiącej, że wydajność podjednostkowego układu determinowana jest jego najsłabszym elementem.

Wyniki badań przeprowadzonych z udziałem enzymów natywnych zwróciły uwagę na istotność warunków procesowych, tj. sposób napowietrzania oraz regulacji pH medium. Niezbędne jest ciągle napowietrzanie medium sprężonym powietrzem oraz regulacji pH z udziałem $CaCO_3$ (bufor HEPES) lub NaOH (mleko krowie). Wykazano, iż w zaproponowanym układzie kaskadowym, rola katalazy ogranicza się do znoszenia skutków inhibicji produktowej poprzez szybki rozkład H_2O_2 , natomiast jej wpływ na utrzymanie zwiększonego stężenia tlenu w mieszaninie reakcyjnej jest marginalny. Dodatkowo, wykorzystanie enzymów natywnych pozwoliło dobrać właściwe proporcje stężeń oksydazy glukozy i katalazy, zapewniające efektywne projektowanie i tworzenie preparatów co-immobilizowanych. Pojedyncza immobilizacja chemiczna oksydazy glukozy i katalazy na regenerowanej celulozie i nylonie wykazała różnice w stopniu powinowactwa enzymów do powierzchniowych grup nośnika. Obserwacja ta stała się przyczyną wprowadzenia dwóch strategii tworzenia membran katalitycznych, tj. jednoczesnej i etapowej co-immobilizacji chemicznej. Ostatecznie, forma membran katalitycznych z co-immobilizowaną oksydazą glukozy i katalazą została odrzucona, z uwagi na niską efektywność wiązania oksydazy glukozy z powierzchniowymi grupami funkcyjnymi zaproponowanych nośników. Procedurę tworzenia co-enkapsulowanego preparatu oksydazy glukozy i katalazy wzbogacono o sieciowanie

międzycząsteczkowe karbodiimidem, z uwagi na niski stopień retencji oksydazy glukozowej w tradycyjnych kapsułkach alginianowych. Uzyskany preparat charakteryzował się wysoką aktywnością i stabilnością (czas połowicznego zaniku aktywności wynosił 12 dni) w analizowanych warunkach procesowych (12°C, pH 6,6, napowietrzanie sprężonym powietrzem). Co-enkapsulowane enzymy mogły być ponownie wykorzystywane przez 9 kolejnych cykli. Rozkład glukozy do poziomu zapewniającego odczuwalne zredukowanie nadmiernej słodkości następował w czasie 5 - 7 godzin.

Większość badań zaprezentowanych w rozprawie prowadzono w buforze HEPES o pH odpowiadającym odczynowi mleka. Porównanie efektów badań przeprowadzonych w buforze oraz mleku krowim potwierdziło sposobność przedłożenia wyników eksperymentalnych uzyskanych dla roztworów buforowych na medium rzeczywiste (szczególnie w kontekście opisu kinetycznego i charakterystyki immobilizowanych enzymów). Testy organoleptyczne potwierdziły zwiększoną słodkość mleka bezlaktozowego uzyskanego na drodze enzymatycznej z β -galaktozydazą Nola oraz istotne zredukowanie poziomu słodkości mleka bezlaktozowego traktowanego co-enkapsulowaną oksydazą glukozową i katalazą. Prowadzenie drugiego etapu badań (z oksydazą glukozową i katalazą) na mleku wymusiło modyfikację przestrzeni reaktora, w postaci mechanicznego rozbijacza piany, niwelującego nadmierne pienienie mleka, będące następstwem napowietrzania mleka sprężonym powietrzem. Realizacja biokatalizy w mleku wymusiła również zmianę sposobu regulacji pH medium reakcyjnego, z CaCO_3 na 1M NaOH, z uwagi na niską rozpuszczalność węglanu wapnia w mleku krowim.

Eksperymenty prowadzone z udziałem natywnych oraz immobilizowanych form enzymów dostarczyły pakietu danych (opis kinetyczny, dobór warunków procesowych, stratega co-immobilizacji), stanowiących przydatne narzędzie w trakcie modelowania procesów reaktorowych związanych z biokatalizą przemysłu mleczarskiego.