

WSPÓŁCZESNE MOŻLIWOŚCI STOSOWANIA NANOTECHNOLOGII W DOSKONALENIU KATALIZY ENZYMATYCZNEJ

Małgorzata Lewandowska, Natalia Kordala,
Włodzimierz Bednarski

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Streszczenie. W opracowaniu przedstawiono nowe kierunki doskonalenia biokatalizy z wykorzystaniem nanomateriałów. Scharakteryzowano ich właściwości oraz metody modyfikacji ukierunkowane na skuteczność wiązania biokatalizatorów i efektywność ich działania. Szczególną uwagę zwrócono na procedury immobilizacji enzymów w strukturze nanonośników, wskazując na selekcyjną rolę wielkości nanoporów oraz pozyskanie nowych właściwości tak skonstruowanego biokatalizatora, np. zwiększonej stabilności czy szybkości transportu substratu do enzymu i produktu reakcji na zewnątrz. Przedstawiono korzyści wynikające z zastosowania nanonośników o właściwościach magnetycznych – ułatwiających procedury wydajnego odzysku katalizatora po przeprowadzonej reakcji, zapobiegających tym samym zanieczyszczeniu produktu finalnego białkiem enzymatycznym. Poruszono temat biokatalizy w układach dwufazowych, wskazując na funkcjonalność proponowanych rozwiązań – tj. ułatwionego dotarcia molekuł enzymu do powierzchni międzyfazowej, np. olej/woda. Omówiono rolę środowiska nanonośników w odniesieniu do unieruchamianych enzymów, podając liczne przykłady badań dowodzących pozytywnego wpływu struktury powierzchni nanomateriałów na właściwości i stabilność wiązanych biokatalizatorów. Wskazano na korzyści związane ze stosowaniem nanobiokatalizy w praktyce – sprzyjające ograniczeniu kosztów, eliminacji procesów chemicznych oraz poprawie bezpieczeństwa produkowanej żywności.

Słowa kluczowe: enzymy, biokataliza, nanonośniki

WSTĘP

Postęp w biotechnologii przemysłowej znajduje potwierdzenie między innymi we wzrastającym zainteresowaniu produkcją oraz przemysłowym stosowaniem preparatów enzymatycznych. Źródłem większości z nich (ok. 90%) są mikroorganizmy. Obecnie kilkaset produktów dostępnych na rynku otrzymuje się z wykorzystaniem biokatalizy enzymatycznej [Illanes i in. 2012]. Poprawa bezpieczeństwa produkowanej żywności wymaga podjęcia przedsięwzięć zmierzających do upowszechnienia katalizy enzymatycznej w celu eliminowania procesów chemicznych [Głód i in. 2014].

Uzasadnione jest jednakże ciągle jej doskonalenie z uwzględnieniem aspektów technologicznych i ekonomicznych.

W tym zakresie aktualny pozostaje problem słabej stabilności operacyjnej biokatalizatorów. W celu jej poprawy stosowane są np. metody modyfikacji białek enzymatycznych lub DNA [Illanes i in. 2012].

Ważnym zagadnieniem jest również dążenie do zmniejszenia kosztów pozyskiwania i stosowania preparatów enzymatycznych w produkcji żywności, detergentów, farmaceutyków oraz biopaliw. Sprzyja temu postęp w zakresie technik immobilizacji enzymów przyczyniający się do ich wielokrotnego wykorzystania [Govardhan 1999, Wang i in. 2005, Nair i in. 2007, Guncheva i in. 2014].

W poprawie efektywności procesów enzymatycznych znaczące są osiągnięcia inżynierii bioreaktorowej oraz inżynierii środowiska katalizowanych reakcji [Mahapatro i in. 2004]. Przykładem postępu w wyżej wymienionym zakresie może być zastosowanie hydrolaz w tak zwanej odwróconej syntezie. Znane jest zastosowanie proteaz w katalizie syntezy wiązań peptydowych, karbohydrolaz w reakcji transgalaktozylacji oraz lipaz katalizujących reakcje estryfikacji i transestryfikacji [Hasan i in. 2006, Miletić i in. 2010, Park i in. 2010, Say i in. 2011].

W produkcji preparatów enzymatycznych o oczekiwanych cechach, np. aktywności, selektywności, specyficzności substratowej, stosowana jest inżynieria białek, w której dominują techniki komputerowe, miejscowo ukierunkowana mutageneza oraz procedury ewolucji molekularnej [Illanes i in. 2012].

Do najnowszych rozwiązań w obszarze omawianej problematyki zaliczyć można stosowanie metod nanotechnologicznych. Konsekwencją tych możliwości jest coraz powszechniej stosowana nanobiokataliza [Wang 2006, Kim i in. 2007, Fang i in. 2011, Ansari i Husain 2012, Zhang i in. 2013b]. Postęp w tym zakresie dotyczy głównie nowych technik immobilizacji enzymów w nanostrukturyzowanych matrycach. Charakteryzują się one rozwinętą powierzchnią, co ułatwia ich wiązanie z enzymami, większym poziomem upakowania, a tym samym korzystniejszą aktywnością biokatalizatora w przeliczeniu na jednostkę masy lub objętości.

Jedną ze szczególnie korzystnych właściwości nanostrukturyzowanych materiałów jest ich wielkość mierzona w nanometrach, a więc podobna do wielkości molekuł enzymów. Dominanta ta w połączeniu z innymi korzystnymi cechami nanomateriałów, takimi jak przewodność elektryczna czy oddziaływanie magnetyczne, może być podstawą zaliczenia tych nośników do grupy sprzyjającej poprawie stabilności aktywności immobilizowanych enzymów. Ponadto fizyczne właściwości nanonośników ułatwiają dyfuzję

i mobilność substratów, co sprzyja wysokiej aktywności związanych białek enzymatycznych [Kim i in. 2006a, Liu i in. 2009, Illines i in. 2012].

Do dobrze poznanych nanomateriałów zalicza się: nanorurki węglowe, grafen, tlenki cynku, cyrkonu, krzemu, żelaza oraz złoto i srebro [Kim i in. 2007, Ali i Winterer 2010, Husain i in. 2011, Wang i in. 2011, Ansari i in. 2012, Zhang i in. 2013a, Guncheva i in. 2014, Pavlidis i in. 2014].

Interesujące wydają się również procedury modyfikacji wspomnianych matryc w celu poprawy skuteczności wiązania z enzymami bez ujemnego oddziaływania na ich aktywność. Znane są metody otrzymywania nanokompozytów spełniających wspomniane kryteria [Xu i in. 2001, Crespilho i in. 2006, Lee i in. 2007, Zhao i in. 2011].

Zasygnalizowana we wstępie problematyka jest przedmiotem niniejszego opracowania. Na podstawie informacji z dostępnej literatury przedstawiono przykłady metod otrzymywania nanobiokatalizatorów, charakterystykę ich właściwości oraz kierunki zastosowania.

METODY WIĄZANIA ENZYMÓW W STRUKTURACH NANONOŚNIKÓW

Część znanych procedur wiązania enzymów polega na zastosowaniu systemów mikroemulsji woda/olej, nazywanych także odwróconą micelą. Sprzyjają one polimeryzacji nanocząsteczek w fazie wodnej lub na międzyfazowej powierzchni olej/woda [Wang i in. 2005, Kim i in. 2008]. Do mankamentów tej metody zalicza się trudności w kontrolowaniu wielkości odwróconych miceli, a tym samym liczby molekuł enzymu w każdej z nich, co decyduje o właściwościach otrzymanych nanobiokatalizatorów.

Inna technika wiązania enzymów, znana pod nazwą *single enzyme nanoparticles* (SENs), polega na zastosowaniu organiczno-nieorganicznego polimeru hybrydowego o grubości mniejszej od kilku nanometrów. W omawianej procedurze stosuje się trzy następujące etapy [Kim i in. 2008]:

- modyfikowanie powierzchni enzymów w wodzie z udziałem pochodnych monomerów akrylamidu (akrylolatacja),
- tworzenie polimeru winylowego na powierzchni enzymów w środowisku heksanu,
- ortogonalna polimeryzacja otrzymanych łańcuchów polimerów z zastosowaniem krzyżowej kondensacji silanolu.

Wyniki badań uzyskane przez Yanga i innych [2008] wskazują na dużą stabilność oksydazy glukozowej modyfikowanej techniką SENs w szerokim zakresie pH (pH 5,5–9,0) i temperatury (60–70°C) w środowisku rozpuszczalników organicznych w porównaniu do enzymu natywnego.

W charakterystyce wyżej wymienionego postępowania zwraca się uwagę na trudności związane z rozpuszczaniem w heksanie modyfikowanych w fazie wodnej enzymów. W celu wyeliminowania tych niedogodności wykorzystuje się surfaktanty, które współtworzą odwrócone micelle i ułatwiają rozprowadzenie enzymów w rozpuszczalniku organicznym. Procedury SENs stosuje się również do unieruchamiania enzymów w strukturach nanoporowatych [Kim i in. 2006b].

Tradycyjne wiązanie enzymów w nanoporowatych nośnikach, aby ograniczyć ich zatykanie, wymaga dopasowania wymiarów porów do wielkości cząsteczek białka

enzymatycznego. Obecnie wiadomo, że może to być szczególnie korzystne w sytuacji, gdy promień otworu wejścia do porów jest zbliżony do wielkości enzymu. Przyczynia się to do uwięzienia enzymu i zwiększenia liczby punktów aktywnych umożliwiających jego związanie w nanoporach nośnika. Wykazano również, że po immobilizacji pojedynczych cząsteczek enzymu w nanoporach, np. krzemionki, dochodzi do ich modyfikacji i jednoczesnego ustabilizowania w połączeniu z nośnikiem. Okazało się, że wielkość porów we wspomnianym nośniku może stanowić kryterium selekcyjonujące oraz prowadzić do uzyskania nowych właściwości biokatalizatora, takich jak szybkość transportu substratu do enzymu i produktu reakcji na zewnątrz, z jednoczesną jego stabilizacją [Kim i in. 2008].

Nanonośniki, charakteryzujące się wielkością porów 2–50 nm, są atrakcyjnym medium do wiązania enzymów metodą adsorpcji. Jej niedoskonałość dotyczy względnie łatwego wymywania zaadsorbowanych enzymów z nośników.

W celu zapobiegania wymywania enzymów tradycyjnie usprawnia się wiązanie kowalencyjne, poprawiając siły łączenia cząsteczek enzymów z wewnętrzną powierzchnią nanoporowatych nośników [Han i in. 2002].

Ostatnio do skutecznego wiązania enzymów z nanonośnikami zaproponowano metodę zwaną *ship-in-a bottle*. W tym postępowaniu uzyskuje się poprawę wydajności ich unieruchamiania oraz aktywności poprzez efektywne zapobieganie wymywaniu/uwalnianiu enzymów. Procedura jest dwuetapowa. W etapie pierwszym doprowadza się do wysokiego stopnia związania/adsorpcji enzymów z nośnikiem. Następnie (etap II) traktuje się otrzymany układ aldehydem glutarowym, który kowalentnie wiąże cząsteczki enzymów, a otrzymane agregaty są uwięzione w nanoporach zastosowanego materiału. W opisanym postępowaniu niezbędny jest właściwy dobór nośników. Jednym ze stosowanych w tym celu jest krzemionka (mesocellular mesoporous silica – MMS) mająca niekonwencjonalną strukturę składającą się ze sferycznych, mesocelularnych porów o średnicy 37 nm połączonych z mezoporami o średnicy 13 nm. Te drobne połączenia porów efektywnie zapobiegają uwalnianiu agregatów enzymów i stąd nazwa metody „*ship-in-a bottle*”. Niekiedy jest nazywana *nanoscale enzyme reactor* – NER.

W jednym z interesujących wariantów przygotowania agregatów stosuje się magnetyczne nanocząsteczki, które łączy się z agregatami enzymów powiązanych krzyżowo. Otrzymany system enzymatycznego reaktora jest bardzo stabilny i może być stosowany w recyklingu z możliwością zastosowania separacji magnetycznej [Kim i in. 2008].

Potwierdzeniem korzystnych cech tego systemu jest NER-lipaza unieruchomiona w magnetycznych nanocząsteczkach, wykazująca dobrą odporność na działanie proteaz. Wiadomo, że proteazy nieodwracalnie inaktywują inne enzymy, które są często obecne w środowisku reakcji biokatalizy, np. w płynach biologicznych, ekstraktach komórkowych lub we wprowadzanych biosensorach i sprzęcie.

Większość enzymów związanych w systemach NER nie jest podatna na proteolizę. Jest to spowodowane utrudnioną penetracją proteaz do krzyżowo powiązanych agregatów enzymów wprowadzanych w struktury nanonośników. Liczne kowalencyjne wiązania pomiędzy molekułami enzymów również współuczestniczą w kształtowaniu ich odporności na działanie enzymów proteolitycznych.

Wskazana metoda immobilizacji enzymów jest stosowana w konstrukcji nanobiokatalizatorów przydatnych między innymi w biosensorach, syntezie peptydów oraz w analizach proteomicznych [Kim i in. 2008].

IMMOBILIZACJA ENZYMÓW W NANOMAGNETYCZNYCH NOŚNIKACH

Atrakcyjność właściwości oraz szerokie możliwości zastosowania nanomagnetycznych nośników znajdują potwierdzenie w literaturze [Johnson i in. 2008, Netto i in. 2013]. Cytowani autorzy wykazali, że mogą one być zastosowane w immobilizacji większości aplikowanych w praktyce enzymów.

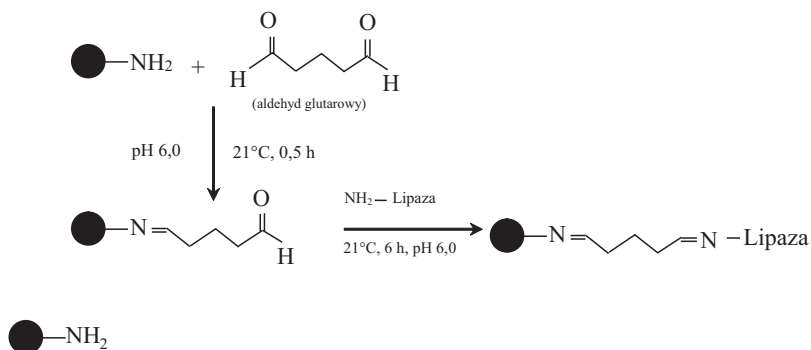
Najczęściej stosowanymi nanonośnikami są magnetit – Fe_3O_4 , oraz maghemit – $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Różnią się one strukturą i wielkością aktywnej powierzchni decydującej o zdolnościach adsorpcji molekuł białek enzymatycznych [Netto i in. 2013].

Interesujące są możliwości i procedury otrzymywania kompozytów nanonośników magnetycznych z tradycyjnymi, np. krzemionką, chitozanem, agarem lub złotem. Umożliwia to rozszerzenie zakresu ich zastosowania w przemyśle spożywczym, przemyśle farmaceutycznym oraz medycynie [Netto i in. 2013, Talbert i Goddard 2013].

Korzystne proporcje powierzchni do objętości magnetycznych nanonośników sprzyjają dużej wydajności wiązania enzymów oraz ich specyficzności katalitycznej. Dodatkowo oddziaływanie pola magnetycznego wspomaga możliwości wydajnego odzysku kompleksu enzymów i w ten sposób zapobiega zanieczyszczeniu produktu finalnego białkiem enzymatycznym.

W niektórych procedurach zwraca się uwagę na możliwości oddziaływania na właściwości omawianych nośników, np. zmniejszenie oporów migracyjnych. Potwierdzeniem tego jest przykład oddziaływania ultradźwiękami na karbonyłek żelaza w środowisku dekaliny. Otrzymane w tych warunkach, utrwalone amorficzne nanocząsteczki Fe_2O_3 wykorzystano w immobilizacji lipazy z *Candida rugosa*, stosowanej w modyfikacji lipidów. Zaproponowana metoda jest mało skomplikowana i umożliwia otrzymanie biokatalizatorów o dużej stabilności aktywności w dłuższym okresie ich stosowania [Ansari i Husain 2012].

Innym przykładem procedury wiązania lipazy z *Candida rugosa* jest jej immobilizacja na chemicznie modyfikowanej i aktywowanej aldehydem glutarowym powierzchni kuleczek nanonośnika (rys. 1).



Rys. 1. Schemat immobilizacji lipazy na magnetycznych nanonośnikach, modyfikowanych aldehydem glutarowym w reakcji krzyżowej [Marszał i Siódmiak 2012]

Fig. 1. Scheme of lipase immobilization onto the surface of magnetic beads using glutaraldehyde cross-linking reaction [Marszał i Siódmiak 2012]

Interesującą propozycją jest immobilizacja lipazy z *Pseudomonas cepacia* na magnetycznych nośnikach, które otrzymano po koprecypitacji chlorków żelazowych i żelazawych w środowisku alkalicznym w warunkach hydrotermicznych oraz aktywacji karboimidem. Wydajność wiązania białek enzymatycznych wyniosła 90%, a otrzymany biokatalizator charakteryzował się dużą stabilnością termiczną [Mak i in. 2009].

Kolejnym przykładem potwierdzającym przydatność tej grupy nośników jest immobilizacja β -galaktozydazy z *Aspergillus niger* na nośniku ze związków żelaza i chitozanu. Otrzymano go, stosując elektrostatyczną adsorpcję chitozanu na powierzchni cząsteczek Fe_2O_4 , pozyskanych po koprecypitacji jonów Fe^{2+} i Fe^{3+} . Na tak otrzymanym nanokompozycie immobilizowano wspomniany enzym, stosując aldehyd glutarowy jako składnik sieciujący. Skuteczność procesu immobilizacji optymalizowano, analizując wpływ takich czynników, jak: czas, dawka enzymu, stężenie aldehydu glutarowego oraz kwasowość środowiska. Otrzymany w ten sposób biokatalizator wykazywał korzystniejszą stabilność aktywności w porównaniu do enzymu natywnego, uzależnioną od modyfikacji wymienionych warunków. Zastosowano go w procesie otrzymywania galaktooligosacharydów z laktozy [Pan i in. 2009, Ansari i Husain 2012].

Pozytywne efekty uzyskano także po immobilizacji α -amylazy na nośniku z Fe_2O_3 , wyrażone poprawą stabilności operacyjnej w procesie hydrolizy skrobi. Na uwagę zasługują także korzystniejsze od enzymu natywnego właściwości α -amylazy z *Bacillus subtilis* immobilizowanej na ZrO_2 [Ansari i Husain 2012].

BIOKATALIZA W UKŁADACH DWUFAZOWYCH

Większość stosowanych w przemyśle preparatów enzymatycznych traci zdolności biokatalityczne w dwufazowych środowiskach niemieszających się reagentów. Zastosowanie w tym celu nanobiokatalizatorów okazało się korzystne, ponieważ usprawniło dotarcie molekuł enzymu do powierzchni międzyfazowej, np. olej/woda. W ten sposób katalityczne zdolności enzymów uległy znaczącej poprawie, gdyż nanobiokatalizator stał się równomiernie dostępny dla substratów umiejscowionych w obu fazach [Wang i in. 2005, Kim i in. 2008].

Międzyfazowe układy enzymatyczne uzyskuje się zarówno w postaci monowarstwy, jak i poliwarstwowo. Wyższą aktywność wykazują biokatalizatory tworzące możliwe cienkie układy. Sprzyjają one poprawie transportu przez barierę na powierzchni i tym samym zapobiegają gromadzeniu się reaktantów przy aktywnych miejscach enzymów.

Biokatalizatory w ten sposób związane z nośnikiem wykazują większą stabilność w porównaniu do enzymów natywnych, dowolnie rozmieszczonych w środowisku dwufazowym olej/woda. Przyczynia się to także do zmniejszenia międzyfazowego stresu wywołanego aktywnością skoniugowanych enzymów działających jak wielocząsteczkowe surfaktanty. Stabilność międzyfazowa związanych enzymów może być poprawiona poprzez dodatek stabilizatorów, takich jak polioleje lub sacharydy, które zwiększają aktywność i stabilność biokatalizatorów [Kim i in. 2008].

Interesującym przykładem poprawy stabilności operacyjnej enzymów działających na granicy faz olejowej i wodnej jest procedura preparowania nanostrukturyzowanej lipazy z *Candida rugosa* zaproponowana przez Saya i innych [2011].

WPLYW NANOŚRODOWISKA NA STABILNOŚĆ ENZYMÓW

Obecnie wiadomo, że oddziaływanie środowiska na stabilność enzymów jest specyficzne dla różnych biokatalizatorów. Wykazano na przykład, że chymotrypsyna rozprzestrzenia się w formie nanowarstwy na powierzchni nanorurki węglowej, podczas gdy peroksydaza sojowa w tych samych warunkach występuje w postaci trójwymiarowej konformacji [Kim in. 2008].

Nanocząstki kobaltynu niklowego zastosowano jako składnik podłoża produkcyjnych podczas otrzymywania enzymów celulolitycznych z *Aspergillus fumigatus*, co przyczyniło do znacznego wzrostu ich produktywności i termostabilności [Srivastava i in. 2014].

Stwierdzono także, że o właściwościach enzymów decydują kształt i struktura nano- nośników. Dowiedziono, że stabilność termiczna peroksydazy sojowej w 100-procentowym roztworze metanolu jest większa po związaniu na nanorurkach węglowych niż po zastosowaniu w tym celu płytek grafitowych. Różnice te tłumaczy się różną wewnętrzną krzywizną nanorurek, które zwiększają liczbę miejsc predysponowanych do wiązań kowalencyjnych pomiędzy molekułami białek enzymatycznych z wewnętrzną powierzchnią nanorurek. Wykazano, że wiązania kowalencyjne oddziałują przeciwdenaturująco i między innymi dlatego tak otrzymane biokatalizatory wykazują poprawę stabilności w porównaniu do enzymów natywnych [Kim i in. 2008]. Potwierdziły to badania prowadzone z udziałem β -galaktozydazy unieruchomionej na funkcjonalizowanych nanomolekułach ditlenku krzemu. Wielopunktowe powiązanie kowalencyjne enzymu z nośnikiem przyczyniło się do poprawy stabilności termicznej oraz operacyjnej enzymu [Verma i in. 2012].

Podobne konkluzje sformułowali Husain i inni [2011], prowadząc badania z wykorzystaniem β -galaktozydazy immobilizowanej na nanocząsteczkach ZnO, dowodząc jednocześnie większej odporności tak przygotowanego enzymu na hamowanie aktywności produktem reakcji (galaktozą).

W ocenie właściwości rybonukleazy A, związanej na krzemionkowych nanocząsteczkach, wykazano wpływ wielkości i kształtu nanocząsteczek na stabilność wiązanych enzymów. Okazało się, że enzym był mniej stabilny po związaniu z nośnikiem niż natywny w roztworze. Można to wyjaśnić w ten sposób, że rybonukleaza A była inaktywowana na powierzchni nanocząsteczek, co spowodowane było elektrostatyczną interakcją między białkiem enzymatycznym i ujemnie naładowanymi nanocząsteczkami nośnika. Destabilizujący wpływ ujemnych ładunków obserwowano także w przypadku chymotrypsyny, której aktywność była inhibitowana przez aniononaładowane nanocząsteczki złota [Kim i in. 2008].

Oddziaływanie nośnika na właściwości nanobiokatalizatorów można doskonalić poprzez modyfikację zdolności adsorpcyjnych nośnika. Potwierdzeniem mogą być wyniki badań Zhanga i in. [2013a] dotyczące modyfikacji mono- i poliwarstwowych nanorurek węglowych. Również doświadczenia prowadzone przez Ansari i innych [2012] nad modyfikacją struktury nanocząstek srebra z wykorzystaniem glutaraldehydu wskazują na poprawę skuteczności wiązania β -galaktozydazy z *Aspergillus oryzae* w utworzonej nanomatrycy, a także korzystniejszą termo- i pH-stabilność tak przygotowanego immobilizowanego biokatalizatora.

O wpływie struktury powierzchni nanośników na właściwości wiązanych enzymów mogą świadczyć wyniki badań Gunchevej i innych [2014], w których lipazę *Candida rugosa* unieruchamiano na dwóch różniących się strukturą nanozwiązkach ZrO₂. Otrzymane nanobiokatalizatory różniły się aktywnością, stabilnością oraz enancjoselektywnością.

WNIOSKI

Wzrastające znaczenie biokatalizy w przemyśle spożywczym, przemyśle farmaceutycznym oraz produkcji biopaliw uzasadnia aktualność tej problematyki w działalności naukowo-badawczej.

Rozwój technik immobilizacji białek enzymatycznych i postęp w zakresie inżynierii środowiska reakcji generują znaczący postęp wyrażany doskonaleniem właściwości enzymów, w tym głównie poprawą ich stabilności operacyjnej. Ważnym elementem w zasygnalizowanej strategii jest także dążenie do zmniejszenia kosztów pozyskiwania i stosowania biokatalizatorów.

Przedstawione w artykule przykłady potwierdzają możliwości poprawy efektów stosowania biokatalizy ze szczególnym uwzględnieniem nowych procedur wykorzystujących dorobek nanotechnologii.

Należy zauważyć, że nanobiokataliza jest nowym obiecującym obszarem badawczym prowadzącym do lepszego poznania i doskonalenia procesów biotransformacji z uwzględnieniem zarówno potrzeb przemysłu, diagnostyki w ochronie zdrowia, jak i monitoringu środowiska.

LITERATURA

- Ali M., Winterer M., 2010. ZnO nanocrystals: surprisingly alive. *Chem. Mater.* 22, 85–91.
- Ansari S.A., Husain Q., 2012. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnol. Adv.* 30, 512–523.
- Ansari S.A., Satar R., Alam F., Alqahtani M.H., Chaudhary A.G., Naseer M.I., Karim S., Sheikh I.A., 2012. Cost effective surface functionalization of silver nanoparticles for high yield immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and its application in lactose. Hydrolysis. *Proc. Biochem.* 47, 2427–2433.
- Crespilho F.N., Gica M.E., Floresu M., Nart F.C., Oliveira Jr. O.N., Brett C.M.A., 2006. A strategy for enzyme immobilization on layer-by-layer dendrimer–gold nanoparticle electrocatalytic membrane incorporating redox mediator. *Electrochem. Commun.* 8, 1665–1670.
- Fang Z., Zhang F., Zeng H.Y., Guo F., 2011. Production of glucose by hydrolysis of cellulose at 423 K in the presence of activated hydrotalcite nanoparticles. *Biores. Technol.* 102, 8017–8021.
- Głód D., Adamczak M., Bednarski W., 2014. Wybrane aspekty zastosowania nanobiotechnologii w produkcji żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 5(96), 36–52.
- Govardhan C.P., 1999. Crosslinking of enzymes for improved stability and performance. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 331–335.

- Guncheva M., Paunova K., Dimitrov M., Yancheva D., 2014. Stabilization of *Candida rugosa* lipase on nanosized zirconia-based materials. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 108, 43–50.
- Han Y.-J., Watson J.T., Stucky G.D., Butler A., 2002. Catalytic activity of mesoporous silicate-immobilized chloroperoxidase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 17, 1–8.
- Hasan F., Shah A.A., Hameed A., 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 235–251.
- Husain Q., Ansari S.A., Alam F., Azam A., 2011. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. *Int. J. Biol. Microbiol.* 49(1), 37–43.
- Illanes A., Cauherff A., Wilson L., Castro G.R., 2012. Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresour. Technol.* 115, 48–57.
- Johnson A.K., Zawadzka A.M., Deobald L.A., Crawford R.L., Paszczynski A.J., 2008. Novel method for immobilization of enzymes to magnetic nanoparticles. *J. Nanopart. Res.* 10, 1009–1025.
- Kim J., Grate J.W., Wang P., 2006a. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem. Eng. Sci.* 61, 1017–1026.
- Kim J., Jia H., Lee C., Chung S., Kwak J.H., Shina Y., Dohnalkova A., Kim B.-G., Wang P., Grate W.J., 2006b. Single enzyme nanoparticles in nanoporous silica: a hierarchical approach to enzyme stabilization and immobilization. *Enzyme Microbiol. Technol.* 39(3), 474–480.
- Kim M.I., Kim J., Lee J., Jia H., Na H.B., Youn J.K., Kwak J.H., Dohnalkova A., Grate J.W., Wang P., Hyeon T., Park H.G., Chang H.N., 2007. Crosslinked enzyme aggregates in hierarchically-ordered mesoporous silica: A simple and effective method for enzyme stabilization. *Biotechnol. Bioeng.* 96, 210–218.
- Kim J., Grate J.W., Wang P., 2008. Nanobiocatalysis and its potential applications. *Trends Biotechnol.* 26(11), 639–646.
- Lee J.H., Hwang E.T., Kim B.C., Lee S.M., Sang B.I., Choi Y.S., Kim J., Gu M.B., 2007. Stable and continuous long-term enzymatic reaction using an enzyme-nanofiber composite. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 1301–1307.
- Liu W., Zhang S., Wang P., 2009. Nanoparticle-supported multi-enzyme biocatalysis with *in situ* cofactor regeneration. *J. Biotechnol.* 139, 102–107.
- Mahapatro A., Kumar A., Kalra B., Gross R.A. 2004. Solvent free adipic acid/1,8 octanediol condensation polymerization characterized by *Candida antarctica* B lipase. *Macromolecules* 37, 35–40.
- Mak K.H., Yu C.Y., Kuan I.C., Lee S.L., 2009. Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase onto magnetic nanoparticles for biodiesel production. *Sci. Technol. Vision.* 5, 19–23.
- Marszał M.P., Siódmiak T., 2012. Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto magnetic beads for kinetic resolution of (*R,S*)-ibuprofen. *Catal. Commun.* 24, 80–84.
- Miletić N., Abetz V., Ebert K., Loos K., 2010. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on polystyrene nanoparticles. *Macromol. Rapid. Commun.* 31, 71–74.
- Nair S., Kim J., Crawford B., Kim S.H., 2007. Improving biocatalytic activity of enzyme-loaded nanofibers by dispersing entangled nanofiber structure. *Biomacromolecules* 8, 1266–1270.
- Netto C.G.C.M., Toma H.E., Andrade L.H., 2013. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 85–86, 71–92.
- Pan C., Hu B., Li W., Sun Y., Ye H., Zeng X., 2009. Novel and efficient method for immobilization and stabilization of β -D-galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe_3O_4 -chitosan nanoparticles. *Mol. Catal. B Enzym.* 61, 208–215.
- Park A.R., Oh D.K., 2010. Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1279–1286.

- Pavlidis I.V., Patila M., Bornscheuer U.T., Gournis D., Stamatis H., 2014. Graphene-based nanobiocatalytic systems: recent advances and future prospects. *Trends Biotechnol.* 32(6), 312–320.
- Say R., Keçili R., Biçen Ö., Şişman F.Y., Hür D., Denizli A., Ersöz A., 2011. A novel nanoprotein particle synthesis: Nanolipase. *Process Biochem.* 46, 1688–1692.
- Talbert J.N., Goddard J.M., 2013. Characterization of lactase-conjugated magnetic nanoparticles. *Process Biochem.* 48, 656–662.
- Srivastava N., Rawat R., Sharma R., Oberoi H.S. Srivastava M., Singh J., 2014. Effect of nickel–cobaltite nanoparticles on production and thermostability of cellulases from newly isolated thermotolerant *Aspergillus fumigatus* NS (class: Eurotiomycetes). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 174, 1092–1103.
- Verma M.L., Barrow C.J., Kennedy J.F., Puri M., 2012. Immobilization of β -d-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on functionalized silicon dioxide nanoparticles characterization and lactose hydrolysis. *Int. J. Biol. Macromol.* 1, 50(2), 432–437.
- Wang L., Zhu G., Wang P., Zhang Newby B.M., 2005. Self-assembling of polymer-enzyme conjugates at oil/water interfaces. *Biotechnol. Prog.* 21, 1321–1328.
- Wang P., 2006. Nanoscale biocatalyst systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 574–579.
- Wang Q., Zhou L., Jiang Y., Gao J., 2011. Improved stability of the carbon nanotubes-enzyme bioconjugates by biomimetic silicification. *Enzyme Microb. Technol.* 49, 11–16.
- Xu J., Zeng F., Wu S., Liu X., Hou C., Tong Z., 2001. Gold nanoparticles bound on microgel particles and their application as an enzyme support. *Nanotechnology* 18, 265–273.
- Yang Z., Si S., Zhang C., 2008. Magnetic single-enzyme nanoparticles with high activity and stability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 169–175.
- Zhang C., Luo S., Chen W., 2013a. Activity of catalase adsorbed to carbon nanotubes: Effects of carbon nanotube surface properties. *Talanta* 113, 142–147.
- Zhang C., Wang H., Liu F., Wang L., He H., 2013b. Magnetic core-shell $\text{Fe}_3\text{O}_4@C\text{-SO}_3\text{H}$ nanoparticle catalyst for hydrolysis of cellulose. *Cellulose* 20, 127–134.
- Zhao X., Lv L., Pan B., Hang W., Hang S., Zhang Q., 2011. Polymer-supported nanocomposites for environmental application: A review. *Chem. Eng. J.* 170, 381–394.

NOVEL APPLICATIONS OF NANOTECHNOLOGY IN THE IMPROVING OF ENZYMATIC CATALYSIS

Summary. Enzymes are natural biocatalysts on a nanometer scale and are used in various industrial processes and products, including pharmaceuticals and detergents. Their application is being extended into new fields: the design of functional nanocomposites, fine-chemical synthesis, biosensors and bioremediation. However, the short lifespan of enzymes limits their application. There have been many approaches to improve enzyme stability. One of such methods is immobilization onto or into large structures, through simple adsorption, covalent attachment or encapsulation. New opportunities for enzyme stabilization, offering improved intrinsic and operational stabilities, have arisen with the development of nanomaterials and nanostructured materials. These materials can ensure large surface areas, pore sizes tailored to protein molecular dimensions, functional surfaces, multiple sites for interaction or attachment and facilitated diffusion and activity. This paper describes the perspective of materials and methods to improve the biocatalytic activity. Based on the available information and a literature search of selected examples of nanobiocatalyst production methods, their property characteristics and application directions were presented. Particular

attention was paid to the procedure of enzyme immobilization on/in nanostructured materials, indicating the screening role of nanopore sizes and the influence of nanomaterials on the structure and function of proteins. Thus, a modified enzyme was characterized by maximized stability with the additional advantages of possible modulation of the catalytic specificity and lower transfer resistance to respond to the diffusion problem and lower operational cost. This review also presents the benefits of using magnetic nanoparticles in enzyme immobilization which include easy separation of an enzyme complex from the reaction mixture, thereby preventing the enzyme contamination of the final product. Moreover, biocatalysis in two-phase systems and the effect of the nanoscale environment on enzyme stability was described. Nanobiocatalysis has emerged as a rapidly growing area. The mobility, solution behaviors and interfacial properties of nanoscale materials can introduce unique properties to nanoscale biocatalyst systems, which may develop into a crucial class of biocatalyst that differs from traditional immobilized enzymes in terms of preparation and catalytic efficiency. Nanobiocatalysis has potential application in various fields, such as proteomic analysis, biofuel production and in other environmental and biomedical areas. In the future, new mechanisms and phenomena may continue to appear.

Key words: enzymes, biocatalysis, nanoparticles