



Wybrane zagadnienia z enzymologii niekonwencjonalnej

Część II – Charakterystyka środowiska reakcji oraz biokatalizatorów stosowanych w enzymologii niekonwencjonalnej

Tadeusz Antczak, Mirosława Szczęsna-Antczak
Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, Łódź

Selected issues of non-conventional enzymology Part II – Characterization of reaction media and biocatalysts applied in non-conventional enzymology

Summary

Burgeoning scientific literature proves that enzymes can catalyze chemical reactions in non-conventional media, are active against liquid, solid or gaseous substrates, retain their catalytic function in organic solvents, biphasic systems composed of organic solvent and water and supercritical fluids. Non-aqueous media appeared to be a promising alternative as an environment for the reactions catalyzed by enzymes. The possibility of carrying out enzymatic processes in such unusual milieus enlarged the range of applications of biocatalysis, and solved many problems witnessed by pharmaceutical, food and chemical industries. The paper describes both advantages and disadvantages of non-conventional media, and presents the examples of practical uses of selected enzymes (lipases, proteases, oxidoreductases, glycosidases) in these systems. The details on medium composition and the form of the biocatalyst are included.

Key words:

non-conventional media, enzymes, lipases, proteases, oxidoreductases, glycosidases.

Adres do korespondencji

Tadeusz Antczak,
Instytut Biochemii
Technicznej,
Politechnika Łódzka,
ul. Stefanowskiego 4/10,
90-924 Łódź;
e-mail:
tad45an@snack.p.lodz.pl

1. Wstęp

Po raz pierwszy jako niewodne medium katalizy enzymatycznej zastosowano rozpuszczalniki organiczne. Próby te wykonano

już na początku XX w. (1). Ponowiono je w latach trzydziestych, stosując lipazę trzustkową do syntezy estrów (2,3). Po kilkudziesięciu latach, dopiero w latach sześćdziesiątych, pojawiły się w literaturze naukowej ponowne informacje o zastosowaniu lipaz do syntezy estrów w środowisku rozpuszczalników organicznych (4). Od tej pory, początkowo dość wolno, problematyka biokatalizy w środowisku niewodnym zaczęła być rozwijana w wielu laboratoriach na całym świecie. Do 1987 r. opublikowano około 150 prac naukowych dotyczących zastosowania środowisk niewodnych, głównie rozpuszczalników organicznych, w procesach biokatalizy (5). Brak jest źródła, które zawierałoby pełne (zbiorcze) informacje na temat wszystkich zastosowań niewodnych mediów w biokatalizie, ale wystarczy przegląd niektórych dostępnych obecnie baz danych, aby stwierdzić, że liczba artykułów, patentów oraz innych opracowań z tej dziedziny, sięga wielu tysięcy i rośnie każdego roku w zawrotnym tempie.

2. Zalety i wady środowisk niewodnych

Duża dynamika wzrostu liczby publikowanych corocznie opracowań dotyczących biokatalizy w mediach niewodnych wynika z ogromnej użyteczności tych środowisk w rozszerzaniu zakresu możliwych zastosowań biokatalizatorów, a tym samym w rozwiązywaniu wielu problemów przemysłu farmaceutycznego, spożywczego i chemicznego.

Prowadzenie katalizy enzymatycznej w środowisku niewodnym odznacza się szeregiem zalet, do których przede wszystkim należy zaliczyć (6-8):

- możliwość prowadzenia biotransformacji związków nierozpuszczalnych w wodzie, np. produkcja biopaliwa, tłuszczów dietetycznych i substytutów masła o niskiej temperaturze topnienia;

- możliwość stosowania tanich preparatów enzymów hydrolitycznych (lipazy, proteazy czy glikozydazy) jako katalizatorów w reakcjach syntezy (gdyż eliminacja wody ze środowiska zmienia kierunek reakcji z hydrolizy na syntezę), np. do otrzymywania estrów o pożądanych właściwościach smakowych i zapachowych, składników smarów i paliw, prekursorów feromonów, peptydowych prekursorów leków oraz oligosacharydów o właściwościach prebiotycznych;

- możliwość uzyskiwania produktów o określonej konfiguracji (środowisko odpowiedniego rozpuszczalnika może ukierunkować stereospecyficzność enzymów), np. leków (ibuprofen, o właściwościach przeciwzapalnych) i herbicydów;

- zabezpieczenie przed zakażeniami mikrobiologicznymi (środowiska niewodne nie sprzyjają rozwojowi większości drobnoustrojów);

- nieduże nakłady inwestycyjne, np. koszt instalacji w przypadku prowadzenia reakcji enzymatycznej w medium organicznym jest niższy od kosztów instalacji dla syntez chemicznych wymagających z reguły wysokiej temperatury i podwyższonego ciśnienia.

Procesy prowadzone w środowiskach niewodnych posiadają też zalety generalnie przypisywane zjawiskom, w których wykorzystuje się biokatalizatory, a mianowicie:

- optymalne wykorzystanie surowców z uwagi na dużą efektywność katalizy enzymatycznej;

- prowadzenie procesów w warunkach energooszczędnych (temp. 30-60°C);

- ograniczenie puli produktów ubocznych, co ułatwia oczyszczanie;

- ułatwienie prowadzenia procesów ciągłych lub zawracania katalizatora do ponownego użycia, szczególnie w przypadku stosowania immobilizowanych enzymów.

Jednakże prowadzenie biokatalizy w środowiskach niewodnych niesie ze sobą następujące problemy:

- aktywność enzymów w środowiskach niewodnych (szczególnie w polarnych rozpuszczalnikach organicznych) jest często wielokrotnie niższa niż w wodzie;

- kiedy substraty reakcji są nierozpuszczalne w środowisku hydrofobowym istnieje konieczność prowadzenia procesu w bardziej polarnych rozpuszczalnikach organicznych, a te nie są dopuszczone w produkcji żywności;

- utrudniona jest regeneracja i zawracanie kofaktorów enzymów (problem dotyczy szczególnie coraz częściej stosowanych oksydoreduktaz) oraz ograniczona jest możliwość stosowania żywych komórek drobnoustrojów, dla których środowisko rozpuszczalników organicznych jest często silnie toksyczne (9,10);

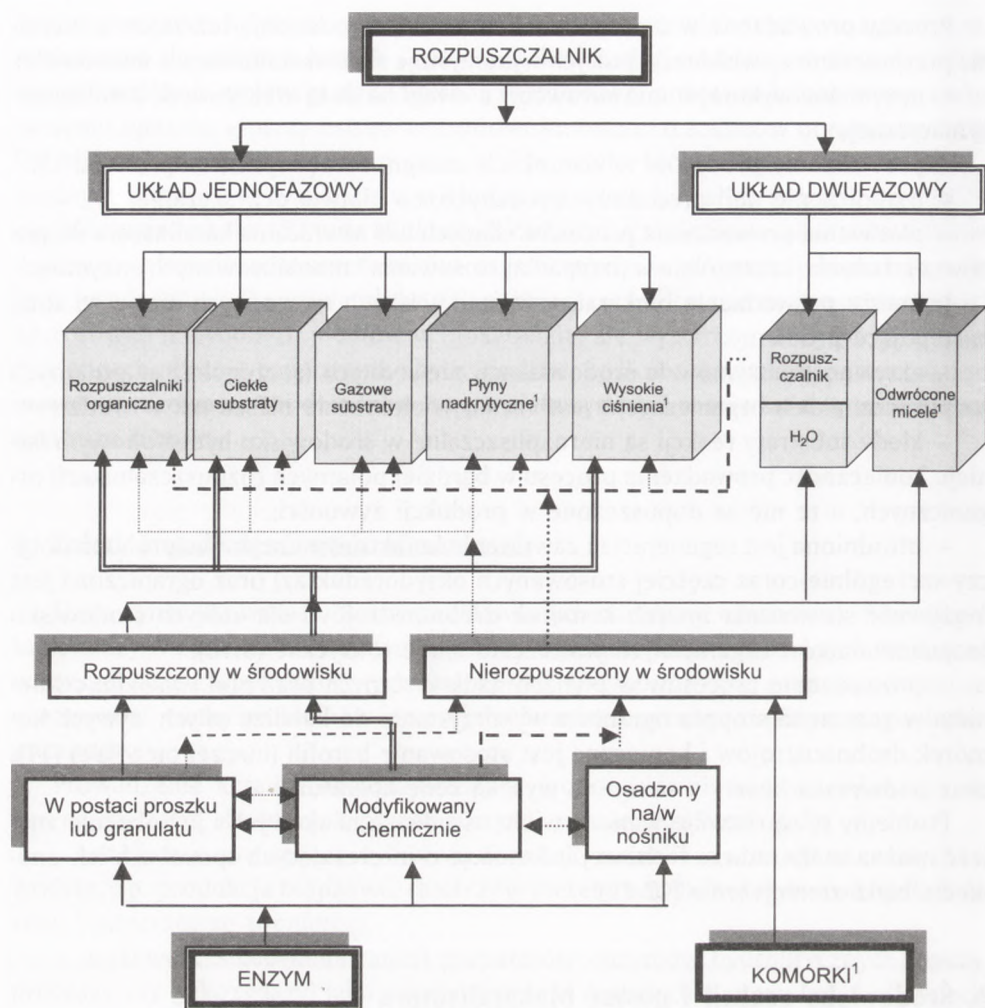
- prowadzenie procesów w płynach nadkrytycznych oraz pod wysokim ciśnieniem w znacznym stopniu ogranicza wykorzystanie do katalizy całych, żywych komórek drobnoustrojów i konieczne jest stosowanie barofili (inaczej piezofile) (11), oraz podwyższa koszty z uwagi na wysoką cenę aparatury.

Problemy te są rozwiązywane w wielu ośrodkach naukowych i już obecnie znaleźć można w literaturze fachowej informacje o interesujących sposobach ich omięcia bądź zmniejszenia (12-17).

3. Środowisko reakcji i postać biokatalizatora

W licznych badaniach z zakresu enzymologii niewodnej udowodniono, że reakcje można prowadzić w środowiskach: rozpuszczalników organicznych lub dwufazowych układów rozpuszczalnik organiczny–woda, płynów nadkrytycznych, jak również w obecności samych substratów występujących w formie cieczy, ciała stałego lub gazu (18-22).

Powiązania pomiędzy postacią biokatalizatora a medium, w którym może on działać zaprezentowano na rysunku 1. W schemacie tym pojęcie układu dwufazowego, zgodnie z piśmiennictwem, dotyczy jedynie faz dwóch rozpuszczalników. Nie uwzględnia ono, np. nierozpuszczalnej postaci katalizatora jako dodatkowej, trzeciej fazy układu reakcyjnego.



Rys. 1. Różnorodność preparatów katalizatora i środowisk ich działania ((8) zmodyfikowane).
 ¹Ograniczone zastosowanie w przypadku stosowania całych komórek.

4. Dobór rozpuszczalnika organicznego jako środowiska reakcji enzymatycznej

Stosując enzymy lub całe komórki mikroorganizmów w procesach katalizy zachodzących w środowisku wodnym dokładnie oznacza się zazwyczaj stężenia: jonów wodorowych, substratów, produktów, aktywatorów, inhibitorów i innych składników mieszaniny reakcyjnej, a nie mierzy, równie precyzyjnie, będącego w nadmiarze stężenia rozpuszczalnika, ponieważ reakcje „zawsze” zachodzą w wodzie. Sytu-

acja jest diametralnie różna jeżeli biokatalizę zamierzamy prowadzić w środowisku innym niż woda. Wówczas, optymalny dla katalizy rozpuszczalnik i jego stężenie należy dobrać spośród wielu możliwych, oferowanych przez przemysł. W bogatej na ten temat literaturze wskazuje się, że – nie bez powodu – rozpuszczalnikami najpowszechniej stosowanymi jako niewodne środowisko reakcji są rozpuszczalniki organiczne (9,23-31).

4.1. Kryteria doboru rozpuszczalnika

Dotychczas nie wiadomo, co decyduje o przydatności lub nieprzydatności danego rozpuszczalnika jako środowiska biokatalizy dla danej reakcji. Brak jednoznacznych reguł, które pomogłyby przewidzieć wszystkie niuanse „zachowań” różnych białek (preparatów) enzymatycznych, czy szerzej biokatalizatorów, w środowisku różnych rozpuszczalników niewodnych. Wiadomo tylko, że białka enzymatyczne w sposób indywidualny „optymalizują” wewnętrzne upakowanie swego łańcucha polipeptydowego oraz indywidualny jest też sposób i zakres ich oddziaływania z otoczeniem (32). Wiadomo również, że cząsteczki rozpuszczalnika organicznego mogą w różnorodny sposób oddziaływać z molekułą danego białka. Mogą one specyficznie wiązać się z enzymem i nie dopuszczać do tworzenia kompleksu enzym-substrat, mogą zmieniać stan równowagi katalizowanej reakcji, wchodzić w reakcję z enzymem, stabilizować lub destabilizować enzym oraz na rozmaite inne sposoby wpływać na szybkość katalizowanej reakcji. Obecnie znane jest jedynie kryterium doboru rozpuszczalnika organicznego, sformułowane w sposób dość ogólny przez Laane i in. (5,33): *[Dobry] (...) rozpuszczalnik powinien mieszać się w sposób ograniczony z wodą oraz zakłócać warstwę wody niezbędnej enzymu w stopniu możliwie najmniejszym.*

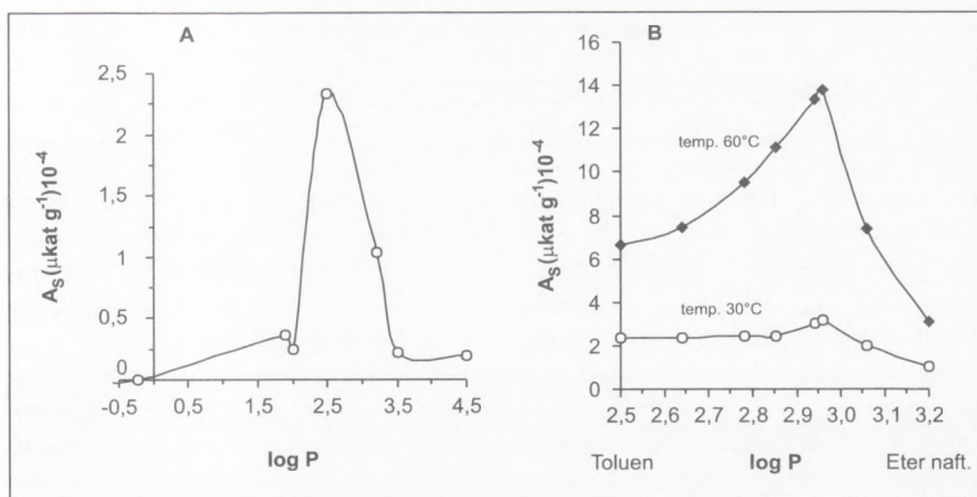
Poszukując kryteriów doboru rozpuszczalników odpowiednich i uniwersalnych dla różnych enzymów w poszczególnych reakcjach, sięgano do chemicznych i fizycznych właściwości rozpuszczalników, takich jak: skład chemiczny, gęstość, lepkość, stała dielektryczna, punkt krzepnięcia, punkt topnienia, aktywność protono-donorowa, moment dipolowy, zdolność do tworzenia wiązań wodorowych, polaryzowalność, rozpuszczalność w wodzie, współczynnik rozpuszczalności Hildebranda. Próbowano, lecz bez sukcesu, znaleźć korelację między tymi cechami rozpuszczalników a wykazywaną przez enzym w ich środowisku aktywnością (34-37).

Przydatne natomiast przy doborze rozpuszczalnika okazało się kryterium polarności medium, liczone jako suma stałych hydrofobowych poszczególnych atomów, wyrażone jako tzw. „log P” (*partition coefficient*). Parametr ten określany jest też definicją (stosowaną w praktyce) jako ujemny logarytm ze współczynnika podziału danej substancji między oktanol i wodę. Laane i in. (5) obliczył wartości log P dla 107 najczęściej stosowanych w biotechnologii rozpuszczalników. Podobne dane – w znacznie szerszym zakresie – można znaleźć w Internecie, np. (38). Jednakże to kryterium polarności nie jest uniwersalne, ponieważ nie rozróżnia ono

chemicznej natury rozpuszczalnika, a jedynie jego skład atomowy. Rozpuszczalniki organiczne zbudowane z takiej samej liczby atomów, np. węgla, tlenu i wodoru są opisywane przez liczbowo taki sam współczynnik $\log P$, pomimo że mogą być różnymi związkami chemicznymi. W charakterystyce substancji zawierających grupy mogące ulegać jonizacji zaleca się do określania ich hydrofobowości liczenie tzw. $\log D$ (*distribution coefficient*), parametru będącego funkcją $\log P$, pK_a i pH środowiska, co ułatwiają dostępne w handlu programy komputerowe. Natomiast stosowanie parametru $\log P$ poleca się gdy porównywane są substancje obojętne, o zbliżonej budowie chemicznej, np. grupy węglowodorów alifatycznych lub aromatycznych czy eterów alifatycznych, itp. Typowa krzywa zależności aktywności enzymu od $\log P$ rozpuszczalnika – podawana w pracach Laane i in. (5,33) – ma kształt sigmoidalny, co wskazuje, że uzdolnienia katalityczne enzymu wzrastają wraz z podwyższaniem się hydrofobowości środowiska. Rozpuszczalniki organiczne o niskich wartościach $\log P$ nie są zatem dobrym środowiskiem dla reakcji enzymatycznych. Według Laane, aktywność enzymów jest najwyższa gdy $\log P > 4$. Opisany przez Lanne i in. przebieg funkcji $E = f(\log P)$, gdzie E oznacza aktywność enzymu, jest zatem zbliżony do hiperbolicznego kształtu zależności rozpuszczalności rozpuszczalnika organicznego w wodzie (R_1) (lub wody w rozpuszczalniku, R_2) od polarności danego rozpuszczalnika $\{R_{1(2)} = f(\log P)\}$ (39). Sugerowało to niewątpliwie decydujący wpływ tych parametrów na aktywność enzymu, a także prostotę opisu matematycznego. Taki opis wykluczał jednak możliwość występowania maksimum aktywności enzymów w środowisku rozpuszczalników organicznych o średniej polarności, tzn. o $\log P$ w zakresie 1-4.

W pracy (40) dotyczącej syntezy laktonów po raz pierwszy opisano, że enzym (wewnątrzkomórkowa lipaza *Mucor*) wykazywać może maksymalną aktywność katalityczną w środowisku rozpuszczalników organicznych, dla których wartość $\log P$ waha się pomiędzy wartościami 2-4,5 (rys. 2). Tę właściwość lipaz potwierdzono w dalszych pracach (41-43).

Podobne efekty uzyskano niedawno w badaniach enancjoselektywnej estryfikacji flurbiprofenu butanolem. Lipaza z *Candida rugosa* wykazywała w tej reakcji wyższą aktywność w izooktanie ($\log P = 4,5$) niż w n -nonanie ($\log P = 5,1$) (44). Jednak dwie inne lipazy (*Mucor javanicus* i trzustkowa) działały najefektywniej w rozpuszczalniku o najwyższej hydrofobowości (n -nonan). Autorzy sugerowali indywidualny, aktywujący wpływ rozpuszczalnika o rozgałęzionej budowie (izooktanu) na cząsteczkę lipazy *Candida rugosa*. Wskazuje to na złożoność zjawisk zachodzących w mediach niewodnych i konieczność indywidualnego doboru polarności i rodzaju środowiska organicznego dla każdej prowadzonej reakcji. Generalizując, jeżeli siła wiązania warstwy wody niezbędnej z enzymem jest duża, to może on wykazywać aktywność katalityczną także w rozpuszczalnikach mieszających się z wodą (tzn. o niskiej wartości $\log P$). Jednakże siła wiązania, rejony występowania i grubość warstwy wody niezbędnej jest cechą indywidualną enzymu, uzależnioną od przestrzennej struktury białka oraz ilości i usytuowania w jego strefie powierzchniowej polar-



Rys. 2. Wpływ polarności środowiska organicznego (log P) na aktywność (A_S) lipazy *M. circinelloides* w reakcji syntezy heksadekanolidu (40). A – Synteza prowadzona w środowisku różnych rozpuszczalników temp. 30°C; B – Synteza prowadzona w różnych mieszaninach toluenu i eteru naftowego.

nych grup funkcyjnych (9). Ponieważ dotychczas poznano struktury przestrzenne niewielu enzymów, jest oczywiste, że w zasadzie nadal wybór najlepszego rozpuszczalnika dokonywany jest żmudnymi, empirycznymi metodami.

Kuo i in. (45) stwierdził, że podczas selekcji rozpuszczalnika organicznego powinno uwzględniać się także inne elementy nie brane pod uwagę przez Laana i in., a mianowicie: postęp i dynamikę reakcji, polarności substratów oraz produktów pośrednich i końcowych, specyficzność enzymu, wzajemne oddziaływanie faz środowiska reakcji oraz „toksyczność” rozpuszczalnika względem enzymu.

Dotychczas, rozważając temat wyboru niewodnego środowiska reakcji, ograniczono się do zagadnień dotyczących oddziaływania jednego (pojedynczego) rozpuszczalnika organicznego na aktywność enzymu. W wielu przypadkach okazuje się, że optymalnym środowiskiem reakcji jest mieszanina rozpuszczalników. Nie chodzi tu o stosowanie niewielkich dodatków tzw. kosolwentów, tzn. substancji, które mogą zwiększać aktywność enzymów modyfikując korzystnie strukturę warstwy wody niezbędnej enzymu (zagadnienia omówiono w części I artykułu), ale o dobranie składu mieszaniny kilku rozpuszczalników, w której biokatalizator wykazuje wysoką (maksymalną) aktywność. Oczywiście aktywność tę można dalej próbować dodatkowo zwiększać, stosując substancje modyfikujące warstwę wody niezbędnej danego enzymu. Przykładem tego typu badań były poszukiwania optymalnego środowiska dla reakcji syntezy laktonu kwasu 16-hydroksyheksadekanowego (heksadekanolidu) katalizowanej przez lipazę *M. circinelloides*, opisane w pracy (40). Wartość log P dla mieszaniny złożonej z dwóch rozpuszczalników obliczyć można wg wzoru (5):

$$\log P_{\text{mieszaniny}} = x_1 \log P_1 + x_2 \log P_2 \quad [1]$$

gdzie: x_1 i x_2 – liczba moli pierwszego i drugiego rozpuszczalnika, $\log P_1$ i $\log P_2$ – polarność pierwszego i drugiego rozpuszczalnika.

Po wyselekcjonowaniu dwóch rozpuszczalników (toluenu, $\log P = 2,5$ i eteru naftowego, $\log P = 3,2$), w których enzym ten wykazywał najwyższe aktywności, zastosowano mieszaniny tychże rozpuszczalników w różnych proporcjach i prowadzono w nich reakcję. Optymalnym środowiskiem dla omawianej reakcji okazała się mieszanina o polarności opisanej wartością $\log P$ równą 2,95.

Poprzez dobór odpowiedniego rozpuszczalnika kontrolować można zatem kierunek reakcji i efektywność działania enzymów lecz, co więcej także całkowicie zmieniać ich selektywność. Z tego powodu poszukuje się wciąż nowych zastosowań dla znanych handlowych preparatów enzymów badając ich katalityczne właściwości w różnych niekonwencjonalnych środowiskach. Ten kierunek badań (zwany w literaturze anglojęzycznej *solvent* lub *medium engineering*) dostarcza, obok inżynierii białek, alternatywnych rozwiązań dla procesów biokatalizy. Okazuje się, że lipazy i proteazy w środowisku o obniżonej zawartości wody wykazują fenomenologiczne właściwości. Proteazy, np. w odpowiednio dobranym środowisku organicznym, katalizują syntezę estrów wyższych kwasów tłuszczowych, a zatem wykazują aktywność przypisywaną lipazom i esterazom. Lipazy natomiast mogą katalizować reakcje syntezy peptydów, zatem wykazują aktywność proteaz. Jednakże w przeciwieństwie do proteaz, które syntezują peptydy prawie wyłącznie z izomerów L-aminokwasów, lipazy przyspieszają również reakcje syntezy, w których substratami są D-izomery aminokwasów (46). Jest to szczególnie istotne, gdyż D-aminokwasy są składnikami niektórych peptydów biologicznie aktywnych. Na przykład lipaza *Candida rugosa* w układzie dwufazowym woda-chlorek metylenu katalizuje syntezę N-fenacetylo-L-cysteinylo-D-waliny (prekursora penicyliny G).

Badania mające na celu poszukiwanie optymalnego, niewodnego środowiska reakcji są tanie i względnie proste w wykonaniu. Ich zasadniczą wadą jest niewielki jeszcze poziom wiedzy teoretycznej na temat właściwości białek w wielu niewodnych środowiskach. Sprawia to, że dotychczas nie jest wiadomo ostatecznie, co decyduje o przydatności lub nieprzydatności danego rozpuszczalnika jako środowiska biokatalizy. Dotyczy to zwłaszcza możliwości teoretycznego przewidywania optymalnego rozpuszczalnika lub mieszaniny rozpuszczalników organicznych, choć takie próby wielokrotnie podejmowano (5,34-37). Dlatego, dobór niewodnego środowiska reakcji (rozpuszczalnika organicznego) realizowany jest wciąż w zasadzie wyłącznie doświadczalnie. Pomimo ogromnego, w ciągu ostatnich 10 lat, rozszerzenia wiedzy biotechnologicznej, również w zakresie „inżynierii środowiska reakcji”, dotychczas intuicja i wyobraźnia badacza, czyli po prostu tzw. „nos”, decyduje niejednokrotnie o postępie badań w tej dziedzinie.

4.2. Hydrofobowe środowisko reakcji

Ku wielkiemu zaskoczeniu wielu naukowców okazało się, że bardzo często najlepszym, niewodnym środowiskiem dla przemian enzymatycznych są rozpuszczalniki hydrofobowe, a zatem te, które swą chemiczną naturą najmniej przypominają wodę. Dotyczy to zwłaszcza reakcji, w których substraty są nierozpuszczalne w wodzie, lub dla których możliwość przesunięcia równowagi reakcji metodami chemii organicznej (np. przez dodanie nadmiaru jednego z substratów, usuwanie produktu, np. estru lub wody za pomocą destylacji mieszaniny azeotropowej lub użycie środka odwadniającego) jest istotnie ograniczona. Z tego powodu problem pojawia się gdy jeden z substratów jest polarny, w niewielkim tylko stopniu rozpuszczalny w apolarnym, hydrofobowym środowisku, gdyż rozpuszczenie substratu warunkuje możliwość utworzenia wiązania pomiędzy centrum aktywnym enzymu a substratem (czyli powstanie kompleksu przejściowego). Energia tego wiązania jest głównym „motorem napędowym” powodującym ogromny wzrost tempa reakcji (47). Problem małej rozpuszczalności wysoko polarnych substancji w rozpuszczalnikach apolarnych, dotyczy np. reakcji, w których substratem jest glicerol – jego dostępność katalityczną można jednakże zwiększyć wprowadzając do hydrofobowego środowiska reakcji żel krzemionkowy spełniający w tych warunkach funkcję „rezerwuaru” tego słabo rozpuszczalnego substratu (48). Podobne problemy dotyczą też otrzymywania różnych estrów sacharydów należących do tzw. „zielonych” detergentów lub farmaceutyków, których tworzenie katalizowane jest przez lipazy. Substratami są w tym przypadku, nierozpuszczalne w środowisku apolarnym cukry, oraz kwasy tłuszczowe. Zastosowanie organicznych rozpuszczalników, w których rozpuszczają się cukry, mija się z celem, ponieważ estry otrzymywane w takim środowisku nie są dopuszczane do spożycia. Rozwiązaniem może być stosowanie sacharydów w postaci ich pochodnych acetalowych (49) lub acylowych (48), rozpuszczalnych w środowisku hydrofobowym, lub prowadzenie procesu w układzie dwufazowym: woda-rozpuszczalnik apolarny, albo niewielki dodatek do hydrofobowego medium rozpuszczalnika polarnego. Rozpuszczalnikiem spełniającym wymienione kryteria (tzn. nietoksyczność i polarność) jest dwutlenek węgla stosowany w postaci cieczy w stanie nadkrytycznym (rozd. 8).

Wbrew pierwszym, mylnym prognozom okazało się, że w środowisku rozpuszczalników apolarnych enzymy wykazują wysoką termostabilność. Wiele enzymów, np. lipazy, proteinazy, rybonukleazy i inne, jest odpornych w tym środowisku na działanie warunków ekstremalnych, np. temperatury podwyższonej do 100-140°C (42,50-52). Mechanizm stabilizacji białek przez apolarne środowisko w podwyższonej temperaturze nie jest do końca poznany. Wiadomo, że znaczące udziały energii stabilizacji pochodzą z oddziaływań elektrostatycznych między polarnymi i zjonizowanymi grupami (wiązania wodorowe, oddziaływania pomiędzy dipolami i parami jonowymi) oraz efektów hydrofobowych, w których udział biorą niepolarne reszty aminokwasów. Fizyczna natura oddziaływań hydrofobowych, z uwagi na to, że stwierdzono znaczny w nich udział sił van der Waalsa, jest obecnie rozważana jako

pochoząca ze zmian entropii i entalpii. Oszacowanie wpływu temperatury, ciśnienia, ładunku i aktywności wodnej na swobodną energię stabilizacji białek do dziś pozostaje problemem do rozwiązania (32).

Generalnie, apolarne rozpuszczalniki organiczne, z racji swoich właściwości (tzn. braku zdolności do tworzenia wielokrotnych wiązań wodorowych), generują zmiany konformacyjne białek powodujące silne oddziaływania elektrostatyczne wewnątrz molekuł, czego efektem jest usztywnienie ich struktury. Powoduje to ograniczenie możliwości konformacyjnych zmian cząsteczek enzymów w trakcie katalizy, co w ostatecznym efekcie przekłada się na obniżenie ich aktywności. Jednakże, elementami sprzyjającymi zachowaniu aktywnej struktury enzymów, np. lipaz w środowisku apolarnym, jest „usztywniające” oddziaływanie warstwy wody niezbędnej (zagadnienia te poruszano w części I artykułu) oraz odpowiednia budowa centrum aktywnego enzymu. Hydrofobowy charakter tego centrum sprawia, że substancje o podobnym, hydrofobowym charakterze mogą wykazywać działanie ochronne względem tego rejonu białka (6,47). Dla przykładu, w pracach (42,50) opisano związaną z mycelium lipazę *Mucor circinelloides*, która ogrzewana przez godzinę w temperaturze 100°C w środowiskach: eteru naftowego, cykloheksanu, heptanu oraz benzenu zachowywała ok. 90% aktywności wyjściowej, podczas gdy w środowisku wodnym ulegała ona denaturacji już po minutowej inkubacji w tej temperaturze. Enzym ten, jak opisano w cytowanej pracy, wykazywał tak wysoką stabilność w środowisku wymienionych węglowodorów, których polarność, wyrażona w log P, zawarta jest w przedziale 2,0-8,8. Skłoniło to autorów artykułu do wniosku, że właśnie te rozpuszczalniki powinny być „preferowane” podczas wyboru niewodnego środowiska zapewniającego optymalne działanie enzymu z *Mucor*.

5. Przykłady enzymów stosowanych w środowisku niewodnym

5.1. Lipazy

Biologiczną funkcją lipaz jest katalizowanie w środowisku wodnym hydrolizy triacylogliceroli (tłuszczów prostych) do kwasów tłuszczowych i glicerolu lub do produktów przejściowych: diacylogliceroli i monoacylogliceroli. Reakcja ta jest odwracalna. Zmieniając środowisko z wodnego na niewodne można tak pokierować reakcją, by – w obecności lipaz – przebiegała w kierunku syntezy (53,54).

W zależności od stężenia wody w środowisku lipazy mogą katalizować następujące reakcje: hydroliza lub synteza estrów kwasów karboksylowych, estrów tiolowych, amidów; transestryfikacja estrów kwasów karboksylowych, aminoliza oraz synteza acetalu i peroksykwasów (6). Z uwagi na tak szerokie spektrum działania lipaz prace dotyczące tych enzymów były genezą i są niezmiennie kołem napędowym rozwoju enzymologii niekonwencjonalnej.

Dotychczas lipazy znalazły praktyczne zastosowania w przemyśle spożywczym, włókienniczym, chemicznym i farmaceutycznym do:

- hydrolizy tłuszczów jadalnych (otrzymywanie, mydła, gliceryny, emulgatorów) (55-57);
- otrzymywania bioemulgatorów (mono- i diacyloglicerydy – najlepsze emulgatory spożywcze, estry sacharydów) (58,59);
- produkcji substytutu masła kakaowego z oleju palmowego i kwasu stearynowego lub palmitynowego (60);
- produkcji tłuszczów dietetycznych (tłuszczów zawierających kwasy tłuszczowe o krótszych łańcuchach) (61-63);
- produkcji kosmetyków (estry kwasów wielonienasyconych) (64);
- produkcji leków (65-68);
- produkcji środków zapachowych (estry kwasów karboksylowych o krótkich łańcuchach, składniki naturalnego piżma – laktony) (40,69-71);
- produkcji smarów i składników paliw (estry wyższych kwasów tłuszczowych, estry sacharydów) (72-74);
- otrzymywaniu i recyklingu tworzyw sztucznych (ϵ – kaprolaktam i alifatyczne poliestry) (75-76).
- w enancjo- i stereoselektywnych syntezach oraz rozdziale mieszanin racemicznych (*kinetic resolution* oraz *dynamic resolution*) różnych związków (65-71,77-79).

5.2. Proteazy

Proteazy w środowisku wodnym katalizują hydrolityczne rozszczepienie wiązania peptydowego. W medium niewodnym, w warunkach termodynamicznie sprzyjających (obniżona zawartość wody), katalizują reakcje rewersji, w wyniku których powstają peptydy lub estry aminokwasów (80,81). W przeciwieństwie do metod chemicznej syntezy peptydów zastosowanie proteaz wyklucza zjawisko racemizacji oraz, z uwagi na ich wysoką specyficzność działania, nie wymaga stosowania ochronnych grup funkcyjnych łańcuchów bocznych aminokwasów w peptydach.

Do najczęściej wykorzystywanych enzymów proteolitycznych należy zaliczyć chymotrypsynę, subtilyzynę, termolizynę i papainę. Stosując preparaty tych enzymów w środowisku niewodnym można otrzymać zarówno peptydy o znanych właściwościach, np. takie, jakie powstają w efekcie hydrolizy naturalnie występujących białek lub są produktami metabolizmu komórek, jak i nowe, biologicznie aktywne substancje nie występujące w świecie ożywionym. Metodą syntezy enzymatycznej otrzymać można obecnie całą grupę fizjologicznie aktywnych substancji o właściwościach: antybiotycznych i antywirusowych, inhibitorów i regulatorów enzymów oraz substancji immunoaktywnych. Na przykład chymotrypsynę i amidazę penicylinową wykorzystano – z dużą efektywnością – w systemie dwufazowym woda-rozpuszczalnik organiczny do syntezy zarówno peptydów jak i estrów (82).

W skali przemysłowej proteazy wykorzystuje się w środowisku niewodnym m.in. do produkcji dwupeptydu będącego prekursorem popularnego słodzika Aspartam (*N-L-alpha-Aspartyl-L-phenylalanine 1-methyl ester*) (83) oraz do syntezy jabłczanu tyrozyny – podstawowego składnika kremów samoopalających (84).

5.3. Oksydoreduktazy

Oksydoreduktazy, w porównaniu z enzymami należącymi do klasy hydrolaz, katalizują bardziej złożone reakcje redukcjno-oksydacyjne wymagające obecności kofaktorów (przenośników elektronów i protonów), które zwykle nie są rozpuszczalne w środowisku organicznym oraz wymagają regeneracji. Dlatego często jako źródło tych enzymów stosuje się całe, żywe komórki mikroorganizmów, jak również kultury tkankowe i komórkowe roślin z aktywnym systemem regeneracji kofaktorów (85,86).

Źródłem oksydoreduktaz są np. komórki *Rhizopus arrhizus* oraz *Aspergillus niger* – stosowane na skalę przemysłową do regioselektywnej hydroksylacji steroidów w środowisku niewodnym. Hydroksylują one progesteron, co zastępuje około połowę z 37 etapów konwencjonalnej syntezy chemicznej podczas otrzymywania 11- α -hydroksyprogesteronu. Również na skalę przemysłową z udziałem enzymów komórek *Pseudomonas* sp. prowadzi się selektywną hydroksylację kwasu nikotynowego w pozycji 6. Z kolei dwuoksygenazy zawarte w komórkach *Pseudomonas* sp. katalizują syntezę asymetrycznych dwuhydroksypochodnych aromatycznych, również te procesy prowadzone są na skalę przemysłową (7). Natomiast dehydrogenazy alkoholowe z drożdży i trzustki zostały zastosowane do asymetrycznej redukcji ketonów w układzie odwróconych myceli zapewniających regenerację kofaktora (87,88). Wreszcie peroksydazę użyto do katalizy reakcji sulfooksydacji tioanizoli w środowisku rozpuszczalników organicznych (89).

Zainteresowanie przemysłu chemicznego oksydoreduktazami dynamicznie wzrasta z uwagi na możliwość zastępowania szeregu szkodliwych dla środowiska technologii procesami katalizowanymi enzymatycznie (tzw. *green chemistry* (90)).

5.4. Glikozydazy

Oligosacharydy pełnią wiele istotnych funkcji w żywych organizmach. Glikozydazy hydrolitycznie rozszczepiają wiązania cukrowe w oligo- i polisacharydach. Natomiast w środowisku o obniżonej zawartości wody tworzą wiązania glikozydowe na drodze odwróconej hydrolizy lub transglikozylacji, co umożliwia uzyskanie nowych oligocukrów (91,92). Ten sposób otrzymywania oligosacharydów, będących ważnymi składnikami żywności, a także leków, pozwala zaniechać stosowania uciążliwych metod chemicznych, tym bardziej, że połączenie tylko trzech różnych monosachary-

dów dwoma różnymi wiązaniami glikozydowymi w większości przypadków stanowi poważny problem dla syntezy chemicznej. Regio- i stereospecyficzna chemiczna synteza oligosacharydów jest metodą żmudną, wymagającą skomplikowanych procedur blokowania i odblokowywania reaktywnych grup hydroksylowych, co powoduje, że w większej skali proces jest nieopłacalny. Realną alternatywą uzyskiwania nowych oligosacharydów jest zatem ich synteza enzymatyczna. Prowadzić ją można przy wykorzystaniu tanich i łatwych w stosowaniu preparatów hydrolaz glikozydowych, które w środowisku o obniżonej aktywności wodnej, zawierającym substrat o wysokim stężeniu lub dodatek rozpuszczalnika organicznego mieszającego się z wodą, wykazują, w zależności od specyficzności, właściwość katalizowania reakcji syntezy oligosacharydów lub transglikozylacji.

Stosując sacharozę jako substrat oraz β -fruktofuranazydazę zsyntezowano na przykład różne oligosacharydy w środowisku acetonitryl-woda (93). W innej pracy (94) opisano zastosowanie glikozylotransferazy w środowisku eteru bis-2-metoksyetylowego (MEE) do glikolizacji dwuhydroksyaromatycznych pochodnych katecholu przy zastosowaniu sacharozy jako donora glikozyłowego. Z kolei tani preparat glikoamylazy wykorzystano w układzie dwufazowym woda-rozpuszczalnik organiczny do syntezy dwu- i trój-sacharydów – proces przebiegał z 90% wydajnością (95).

6. Biokataliza w środowisku bez rozpuszczalników

Z przemysłowego punktu widzenia korzystne jest prowadzenie syntezy w środowisku samych ciekłych substratów (56,96). Minimalizuje to objętość reaktora, co obniża koszty procesu. Wyeliminowanie rozpuszczalników organicznych jest ważne również z tego względu, że stosowanie ich często stwarza problemy w zakresie bezpieczeństwa pracy, czystości produktów, zanieczyszczenia środowiska, także wymóg ich regeneracji zwiększa koszty produkcji. Wiele procesów katalizowanych przez enzymy jest prowadzonych właśnie tym sposobem (tzn. bez rozpuszczalników) na skalę przemysłową. Tak otrzymuje się np. namiastkę masła kakaowego z taniego oleju palmowego oraz trójstearynianu glicerolu (transestryfikacja) lub kwasu stearynowego (acydoliza) (96).

Metody „bez rozpuszczalników” wymagają jednak, aby substraty w temperaturze procesu znajdowały się w fazie ciekłej lub gazowej, co często stwarza konieczność jej podwyższenia, a jest to niekorzystne dla stabilności enzymów. Lotność substratów w niższych temperaturach można także uzyskać prowadząc proces pod zmniejszonym ciśnieniem lub stosując niewielki dodatek substancji obniżających punkt topnienia w przypadku substratów stałych.

7. Biokataliza z wykorzystaniem substratów gazowych

Biokataliza z zastosowaniem gazowych substratów ma miejsce, wówczas gdy drobnoustrój lub enzym znajduje się w fazie stałej, a substrat lub substraty w fazie gazowej (97,98). Sposób ten jest wykorzystywany w biofiltrach do dezodoryzacji powietrza odlotowego w zakładach hodowli zwierząt, przy utylizacji odpadów mięsnych i rybnych oraz w uciążliwych dla otoczenia zakładach produkcji środków spożywczych, a także do usuwania rozpuszczalników i innych zanieczyszczeń z gazów odlotowych emitowanych w wytwórniach farb i lakierów, malarni, odlewni, wytwórni płyt wiórowych i wielu innych. Głównym elementem biofiltru jest warstwa porowatego materiału filtracyjnego zasiedlonego przez mikroorganizmy zdolne do biologicznego rozkładu zanieczyszczeń gazowych.

W przypadkach tej odmiany biokatalizy jako katalizator stosowane są immobilizowane enzymy. Kataliza nie przebiega bezpośrednio w fazie gazowej. Gazowe substraty ulegają rozpuszczeniu w warstwie wody stanowiącej mikrootoczenie enzymu i tam zachodzi właściwa reakcja. Zapewnia to łatwą i dokładną kontrolę zawartości wody w biokatalizatorze, eliminuje wymywanie enzymu i kofaktora oraz zapewnia ich większą trwałość (99).

W praktyce, stosując gazowe substraty, wykonano w skali półtechnicznej próby syntezy lotnych aldehydów, ketonów i estrów (w tym zapachowych) za pomocą: preparatów lipaz Novozyme 435 i Lipozyme IM 200 (NovoNordisk), kutynazy (*cutinase*) oraz lipazy z *Candida rugose* (Sigma) (100,101). W innym przypadku, wykorzystując oksydazę alkoholową koimmobilizowaną z koenzymem na DEAE-celulozie (102), a także na albuminie usieciowanej aldehydem glutarowym (103) przeprowadzono procesy utleniania etanolu i metanolu do aldehydów.

Przyszłość tej metody zależy od rozszerzenia ilości dostępnych, tanich preparatów termostabilnych enzymów, gdyż uzyskanie w fazie gazowej wysokiego stężenia większości substratów wymaga zazwyczaj podwyższenia temperatury procesu. W celu obniżenia temperatury procesu można go także prowadzić pod zmniejszonym ciśnieniem (104).

8. Biokataliza w płynach nadkrytycznych

Płyny nadkrytyczne (*supercritical fluids*), są to ciecze o temperaturze i ciśnieniu powyżej punktu krytycznego (304°K i 7,38 MPa dla CO₂). Cechuje je gęstość porównywalna z gęstością cieczy w warunkach normalnych, wysoka ściśliwość oraz, co najważniejsze, niska wartość współczynnika lepkości i wysoka wartość współczynnika dyfuzji. Parametry płynu nadkrytycznego jako rozpuszczalnika (tzw. *solvating power*) są łatwe do kontroli przez zmianę ciśnienia i/lub temperatury. Natomiast charakterystyczne dla tego środowiska: niska lepkość i wysoka wartość współczynnika dyfuzji (wielokrotnie wyższa niż cieczy) zwiększają znacząco szybkość transportu mas, co korzystnie wpływa na kinetykę procesów (22).

Płyny nadkrytyczne, szczególnie ciekły CO₂, są bardzo interesującą alternatywą niewodnego medium reakcji enzymatycznych w stosunku do rozpuszczalników organicznych (22,105,106). Są one nietoksyczne, niepalne i nieszkodliwe dla środowiska naturalnego. Typowe warunki procesów prowadzonych w środowisku płynów nadkrytycznych to: temperatura 40-70°C i ciśnienie 10-20 MPa.

Stosując nadkrytyczny CO₂ opracowano proces interstryfikacji oleju palmowego (107), katalizowany przez lipazy, prowadzący do uzyskania namiastki masła kakaowego oraz randomizacji tegoż surowca – otrzymując w efekcie nowe glicerydy mogące znaleźć zastosowanie do produkcji margaryn (108). Badano także możliwości utleniania fenoli przez oksydazę polifenolową i cholesterolu przez oksydazę cholesterolową, a także konwersji p-nitrofenylofosforanu do p-nitrofenolu katalizowanej przez alkaliczną fosfatazę. Opracowano procesy syntezy chiralnych związków biologicznie aktywnych: ibuprofenu i glicydu (7). Wydajności przemian zachodzących w nadkrytycznym CO₂ były zbliżone do wydajności uzyskiwanych w rozpuszczalnikach organicznych.

Ciecze nadkrytyczne mogą być zastosowane również do ekstrakcji niektórych produktów przemian metabolicznych, takich jak np. etanol lub kwasy karboksylowe. Jednakże obecnie jest mało prawdopodobne, aby medium to znalazło większe zastosowanie w praktyce do prowadzenia biotransformacji, w których wykorzystywane są żywe komórki drobnoustrojów, gdyż stwierdzono duży, inhibicyjny wpływ wysokiego ciśnienia na życiowe funkcje drożdży (22).

Reasumując, technologie, w których wykorzystuje się płyny w stanie nadkrytycznym wychodzą naprzeciw dominującym obecnie trendom ograniczenia stosowania rozpuszczalników organicznych, charakteryzujących się często nadmierną toksycznością i zastępowania ich efektywnymi zamiennikami, nieszkodliwymi fizjologicznie i obojętnymi dla środowiska. Cechy takie posiadają właśnie niektóre substancje w stanie nadkrytycznym, a szczególnie CO₂. Najbardziej cennymi zaletami płynącymi z zastosowania płynów nadkrytycznych jest ich nieszkodliwość dla środowiska naturalnego oraz możliwość zintegrowania procesów: właściwej reakcji i separacji. Jednakże, niezmiernie istotnymi wadami są: znaczne zużycie energii oraz wysoki koszt aparatury wysokociśnieniowej.

9. Biokataliza pod wysokim ciśnieniem

Ciśnienie jest parametrem fizycznym wpływającym na szybkość przebiegu reakcji oraz na właściwości substratów. Pierwsze próby wykorzystania podwyższonego ciśnienia do sterylizacji mleka pochodzą z końca XIX w. Ciśnienie hydrostatyczne rzędu 300-600 MPa powoduje inaktywację drobnoustrojów. Wpływa ono negatywnie na biosyntezę białek, wywołuje niekorzystne zmiany w biomembranach i powoduje degradację organelli komórkowych (109).

Zbadano, że najwrażliwsze na podwyższanie ciśnienia hydrostatycznego w białkach enzymatycznych są oddziaływania hydrofobowe. Dlatego najbardziej podatne na

denaturację są czwartorzędowe struktury białek. Przy ciśnieniach powyżej 200 MPa, o tym czy zmiany struktury trzeciorzędowej białek będą miały charakter odwracalny decyduje szybkość kompensacji ciśnienia. Natomiast przy bardzo wysokich ciśnieniach zachodzą dodatkowo zmiany struktury drugorzędowej białek i mają one zwykle charakter nieodwracalny. Stwierdzono jednakże, że przy ciśnieniach rzędu 50-350 MPa wiele enzymów, takich jak: lipazy, β -galaktozydazy i inwertaza, nie tylko wykazuje aktywność katalityczną, lecz także jest bardziej stabilna w wysokiej temperaturze. Te cechy enzymów stwarzają nowe możliwości prowadzenia procesów technologicznych w warunkach ekstremalnych (110,111).

10. Stosowanie enzymów rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych

Natywne białka enzymatyczne są zasadniczo nierozpuszczalne w środowisku rozpuszczalników apolarnych. Można je jednakże przeprowadzić w formę rozpuszczalną poprzez ich chemiczną modyfikację substancjami o charakterze detergentów. Takahashi i in. (112) oraz Jene i in. (113) kowalencyjnie podstawiając związki o charakterze surfaktantu do wolnych grup aminowych katalazy, otrzymali formy tego enzymu rozpuszczalne i aktywne w rozpuszczalnikach apolarnych. Natomiast Mogi i in. (114) używali katalitycznie aktywne kompleksy białka lipazy *Rhizopus japonicus* z surfaktantem. Z kolei Inada i in. (115) do modyfikacji lipazy, katalazy, chymotrypsyny oraz peroksydazy zastosowali glikol polietylenowy, otrzymując rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych i aktywne formy tych enzymów. Również Fukunaga i in. (116) uzyskali rozpuszczalną w apolarnych rozpuszczalnikach formę lipazy *Pseudomonas* sp. modyfikując ją za pomocą dioleinianu glukozylglutaminianowego. Do modyfikacji polarności mikrootoczenia lipazy *Candida rugosa* zastosowano z kolei dekstran, który niekowalencyjnie połączony z enzymem pozytywnie wpływał na szybkość estryfikacji (R,S)-ibuprofenu w środowisku rozpuszczalników organicznych (117).

Właściwości modyfikowanych białek enzymatycznych, podobnie do ich natywnych form ulegają zmianom, gdy wodne środowisko reakcji zastępowane jest niewodnym. Zmienić się może m.in. ich specyficzność, ulega też często obniżeniu optymalna temperatura ich działania (nawet poniżej zera) (105).

Niektóre wewnątrzkomórkowe lipazy są rozpuszczalne w środowisku apolarnych rozpuszczalników organicznych. W pracach (43,118) po raz pierwszy opisano lipazy *Mucor circinelloides* i *Mucor racemosus* wykazujące tę fenomenologiczną właściwość, nie opisaną dotychczas w literaturze. Stwierdzono mianowicie, że homogenne preparaty tych enzymów, w formie natywnej (tzn. nie modyfikowanej chemicznie) są dobrze rozpuszczalne i wysoko aktywne w reakcjach syntezy estrów kwasów karboksylowych w środowisku toluenu.

Otrzymanie enzymów rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych i aktywnych w tym środowisku stanowi pośredni dowód możliwości istnienia życia bio-

logicznego, które może funkcjonować w warunkach nienaturalnych (*unusual environment*), w tym w rozpuszczalnikach innych niż woda.

11. Zakończenie

Enzymologia niekonwencjonalna, rozwija się obecnie bardzo intensywnie pomimo niewystarczających podstaw teoretycznych, które wyjaśniałyby dostatecznie, na poziomie molekularnym, obserwowane zjawiska. Poruszone w pracy zagadnienia stanowią przekrój tematyki z tego zakresu prezentowanych na łamach czasopism naukowych. W tym miejscu, w ostatnich latach zadano pytanie: dlaczego tak późno ta dziedzina wiedzy zainteresowała uczonych? Przecież, jak wspomniano na wstępie, już ok. 1900 r. pojawiła się pierwsza publikacja z tej dziedziny, a w latach trzydziestych 20. stulecia – dwie następne, które tak jak pierwsza, niestety, nie zostały zauważone i docenione. Gdyby tamte prace wzbudziły większe zainteresowanie uczonych zapewne moglibyśmy dziś wiedzieć wiele więcej. Z dzisiejszej perspektywy ocenia się, że brak zainteresowania tą tematyką wynikał z ówczesnego poziomu wiedzy. Nie zauważono wtedy nic nadzwyczajnego i użytecznego w tym, że lipazy są katalitycznie aktywne w środowisku organicznym, ponieważ syntezę estrów można było z powodzeniem prowadzić w obecności katalizatorów chemicznych. Równocześnie, nie wiedzano wówczas, że aktywność biologiczna wielu syntetyzowanych substancji (np. leków, środków owado- i chwastobójczych) zależy w tak dużym stopniu od ich konfiguracji przestrzennej, a katalizatory chemiczne nie są dostatecznie selektywne (7). Zarówno przemysł chemiczny jak i spożywczy oraz farmaceutyczny nie miały zatem zapotrzebowania na stereospecyficzne syntezy. Potrzeba taka pojawiała się dopiero w latach sześćdziesiątych i to było zaczątkiem rozwoju niekonwencjonalnej enzymologii.

Praca finansowana była z grantu Komitetu Badań Naukowych PBZ KBN 021/P06/99/22.

Literatura

1. Kastie J. H., Loevenhart A. S., (1900), *Amer. Chem., J.*, 24, 491.
2. Rona F., Ammon R., (1932), *Biochem.*, 249, 446.
3. Velluz L., (1939), *Bull. Chem. Biol.*, 21, 814.
4. Fukumoto J., Iwai M., Tsujisaka Y., (1964), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 10, 257-265.
5. Laane C., Boeren S., Vos K., Veeger C., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 81-87.
6. Kazlauskas R. J., Bornscheuer U. T., (1998), *Biotransformations with lipases*, *Biotechnology 2nd ed. vol 8^a, Biotransformation I*, Ed. D. R., Kelly, Wiley-VCH, Weinheim, 37-191.
7. Antczak T., Szcześnie-Antczak M., Bielecki S., (2001), *Niekonwencjonalne procesy biotechnologiczne*, w: *KOD. Korzyści, oczekiwania, dylematy biotechnologii*, red. T. Twardowski, A. Michalska, Wyd. Edytor, Poznań, 108-143.
8. Antczak T., Krystynowicz A., Galas E., (1989), *Kosmos*, 38, 95-110.
9. Zaks A., (1991), *Enzymes in organic solvents*, in: *Biocatalysts for industry*, Ed. J. S. Dordick, Plenum Press, New York, Londyn, 161-180.

10. Andersson M., Holmberg H., Adlercreutz P., (1998), *Biotechnol. Bioeng.*, 57, 79-86.
11. Abe F., Horikoshi K., (2001), *Trends Biotechnol.*, 19, 102-108.
12. Secundo F., Carrea G., Vecchio G., Zambiacchi F., (1999), *Biotechnol. Bioeng.*, 64, 624-629.
13. Schmidt A., Vereyken I., Held M., Witholt B., (2001), *J. Mol. Catal., B*, 11(4-6), 455-462.
14. Jaschke A., Seeling B., (2000), *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4, 257-262.
15. Itoh T., Akasaki E., Kudo K., Shirakami S., (2001), *Chem. Lett.*, 3, 262-263.
16. Erbedinger M., Ni X-W., Halling P. J., (2001), *Biotechnol. Bioeng.*, 72, 69-76.
17. Leon R., Fernandes P., Pinheiro H. M., Cabral J. M. S., (1998), *Enzyme Microb. Technol.*, 23, 483-500.
18. Adlercreutz P., (1994), *Biocatalysis in non-conventional media. Applied Biocatalysis*, Eds. J. M. S. Cabral, D. Best, L. Boross, J. Tramper, Harwood Academic Publishers GmbH, Chur, Switzerland, 279-298.
19. Adlercreutz P., (2000), *Biocatalysis in non-conventional media*, ed. 2nd, *Applied Biocatalysis*, Eds. A. J. J. Straathof, P. Adlercreutz, Harwood Academic Publishers GmbH, Chur, Switzerland, 293-316.
20. Gill L., Vulfson E., (1994), *Trends Biotechnol.*, 12, 118-122.
21. Russell A. J., Jang F. X., (1996), *Chemtech.*, 26, 24-27.
22. Malinowski J. J., Jarzębski A. B., (1996), *Biotechnologia*, 34, 87-96.
23. Antczak T., Graczyk J., (2002), *Biotechnologia*, 57, 130-145.
24. Klibanov A. M., (1986), *Chemtech*, 16, 354-359.
25. Dordick J. S., (1992), *Biotechnol. Prog.*, 8, 259-267.
26. Dordick J. S., (1989), *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 194-211.
27. Adlercreutz P., (1996), in: *Enzymatic reactions in organic media*, Eds. A. M. Klibanov, A. M. P. Koskinen, Chapman & Hall, Glasgow, 9-42.
28. Zaks A., Klibanov A. M., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 3194-3201.
29. Tramper J., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 52, 290-295.
30. Bell G., Halling P. J., Moore B. D., Partidge J., Rees D. G., (1995), *Trends Biotechnol.*, 13, 468-473.
31. Wescott C. R., Klibanov A. M., (1994), *Biochim. Biophys. Acta*, 1206, 1-9.
32. Jaenicke R., (2000), *J. Biotechnol.*, 79, 193-203.
33. Laane C., Boeren S., Hilhorst R., Veeger C., (1987), *Optimization of biocatalysts in organic media*, in: *Biocatalysis in organic media*, Eds. C. Laane, J. Tramper, M. D. Lilly, Elsevier, Amsterdam, 65-84.
34. Antczak T., (1991), *Biotechnologia*, 11, 62-70.
35. Halling P. J., (1990), *Biotechnol. Bioeng.*, 35, 691-701.
36. Khmelnicki Y. L., Mozhajev V. V., Belova A. B., Sergeeva M. K., Martinek K., (1991), *Eur. J. Biochem.*, 198, 31-41.
37. Brink L. E. S., Tramper J., (1985), *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 1258-1269.
38. Adres internetowy: esc.syrres.com/interkow/kowdemo.htm
39. Halling P. J., (1994), *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 178-206.
40. Antczak U., Góra J., Antczak T., Galas E., (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 589-593.
41. Antczak T., Krystynowicz A., Galas E., (1995), *Biotechnologia*, 29, 82-91.
42. Antczak T., Hiler D., Galas E., (1993), *Biotechnologia*, 20, 59-67.
43. Antczak T., (2001), *Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej*, 884, 1-175.
44. Bhandarkar S. V., Neau S. H., (2000), *Electronic J. Biotechnol.*, 3, 195-201.
45. Kuo S.-J., Parkin K. L., (1996), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 1427-1433.
46. Margolin A. L., Tai D. F., Klibanov A. M., (1987), *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 7885-7890.
47. Klibanov A. M., (1997), *Trends Biotechnol.*, 15, 97-101.
48. Castillo E., Dossat V., Marty A., Condoret J. S., Combes D., (1997), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 77-85.
49. Fregapane G., Sarney D. B., Greenberg S. G., Knight D. J., Vulfson E. N., (1992), *Prog. Biotechnol.*, 8, 563-568.
50. Antczak T., Morowiec-Białoń J., Bielecki S., Jarzębski A. B., Malinowski J. J., Lachowski A. I., Galas E., (1997), *Biotechnol. Techn.*, 11, 9-11.
51. Zaks A., Klibanov A. M., (1984), *Science*, 22, 1249-1251.
52. Volkin D. B., Staubli A., Langer R., Klibanov A. M., (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, 37, 843-853.
53. Adamczak M., Bednarski W., (1994), *Biotechnologia*, 27, 140-153.

54. Borzeix F., Monot F., Vandecasteele J. P., (1992), *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 791-797.
55. Flipsen J. A. C., Appel A. C. M., van der Hijden H. T. W. M., Verrips C. T., (1998), *Enzyme Microb. Technol.*, 23, 274-280.
56. John V. T., Abraham G., (1991), *Lipase catalysis and its applications*, in: *Biocatalysis for industry*, Ed. J. S. Dordick, Plenum Press, New York, 193-217.
57. Garcia H. S., Malcata F. X., Hill Ch. G. Jr., Amundson C. H., (1992), *Enzyme Microb. Technol.* 14, 535-545.
58. Antczak T., Hiler D., Krystynowicz A., Szczesna M., Bielecki S., Galas E., (2000), *Progress in Biotechnology*, vol. 17, *Food Biotechnology*, Eds. S. Bielecki, J. Polak, J. Tramper, Elsevier, Amsterdam, 221-227.
59. Rosu R., Uozaki Y., Iwasaki Y., Yamane T., (1997), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 445-450.
60. Isono Y., Nabetani H., Nakajima M., (1995), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 1632-1635.
61. Fomuso L. B., Akoh C. C., (1997), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 269-272.
62. Kwon D. Y., Song H. N., Yoon S. H., (1996), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 1521-1525.
63. Akoh C. C., Yee L. N., (1997), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 1409-1413.
64. Compton D. L., Laszlo J. A., Berhow M. A., (2000), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 513-519.
65. Haliniarz E., Lejczak B., (1996), *Wiadomości Chemiczne*, 50, 193-211.
66. Margolin A. L., (1993), *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 266-280.
67. Sánchez A., Valerio F., Lafuente J., Solà C., (2000), *Enzyme Microb. Technol.*, 27, 157-166.
68. Wu J.-Y., Liu S.-W., (2000), *Enzyme Microb. Technol.*, 25, 124-130.
69. González-Navarro H., Braco L., (1998), *Biotechnol. Bioeng.*, 59, 122-127.
70. Yee L. N., Akoh C. C., Philips R. S., (1997), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 255-260.
71. Lee K. K. B., Poppenborg L. H., Stuckey D. C., (1998), *Enzyme Microb. Technol.*, 23, 253-260.
72. Linko Y.-Y., Lämsä, Hehtala A., Rantanen O., (1995), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72, 1293-1299.
73. Park H. G., Chang H. N., (2000), *Biotechnol. Lett.*, 22, 39-42.
74. Watanabe Y., Shimada Y., Sugihara A., Noda H., Fukuda H., Tominaga Y., (2000), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 355-360.
75. Kumar A., Gross R. A., (2000), *Biomacromolecules*, 1, 133-138.
76. Kobayashi S., Uyama H., Takamoto T., (2000), *Biomacromolecules*, 1, 3-5.
77. Haughton L., Williams J. M. J., Zimmermann J. A., (2000), *Tetrahedron: Asymmetry*, 11, 1697-1701.
78. Shin H. S., Rigters P. L., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 52-62.
79. Felfer U., Kroutil W., Strauss U. T., Faber K., (1997), <http://ecsoc2.hcc.ru/al001/al001.htm>
80. Clapés P., Adlercreutz P., Mattiasson B., (1990), *J. Biotechnol.*, 15, 323-338.
81. Gill I., López-Fandiño R., Jorba X., Vulfson N., (1996), *Enzyme Microb. Technol.*, 18, 162-183.
82. Kaslhe V., Galunsky B., (1995), *Biotechnol. Bioeng.*, 45, 261-267.
83. Murakami Y., Yoshida T., Hayashi S., Hirata A., (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 69, 57-65.
84. Kawashiro K., Sugahara H., Sugiyama S., Hayashi H., (1997), *Biotechnol. Bioeng.*, 53, 26-31.
85. Chetham P. S. J., (1994), *Case studies in applied biocatalysis-from ideas to products. Applied Biocatalysis*, Eds. J. M. S. Cabral, D. Best, L. Boross, J. Tramper, Harwood Academic, Publishers GmbH, Chur, Switzerland, 47-109.
86. Adlercreutz P., (1996), *Biocatal. Biotrans.*, 14, 1-30.
87. Andersson M., Holmberg H., Adlercreutz P., (1998), *Biotechnol. Bioeng.*, 57, 79-86.
88. Orlich B., Berger H., Lande M., Schomäker R., (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 70, 638-646.
89. Dai L., Klibanov A. M., (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 70, 253-257.
90. Green chemistry network <http://www.chemsoc.org/networks/gcn/>
91. Bielecki S., Buchowiecka A., Gajewska M., (1999), *Biotechnologia*, 44, 67-83.
92. Boon M. A., van't Riet K., Janssen A. E. M., (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 70, 411-420.
93. Bielecki S., Somiari R. I., (1996), *Biocatal. Biotrans.*, 13, 217-231.
94. Meulenbeld G. H., Hartmans S., (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 70, 363-369.
95. Cantarella L., Nikolov Ž. L., Reilly P. J., (1994), *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 383-387.
96. Vulfson E. N., (1994), *Industrial applications of lipases, Lipases*, Eds. P. Woolley, S. B. Petersen, Cambridge University Press, 271-288.
97. Barzana E., Klibanov A., Karel M., (1987), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 15, 25-34.

98. Lamare S., Legoy M-D., (1995), *Biotechnol. Techn.*, 9, 127-132.
99. Maugard T., Lamare S., Legoy M-D., (2001) *Biotechnol. Bioeng.*, 73, 164-168.
100. Lamare S., Caillaud B., Roule K., Goubet I., Legoy M-D., (2001), *Biocatal. Biotransform.*, 19, 361-377.
101. Lamare S., Legoy M-D., (2001), *Methods in Biotechnol.*, vol 15, Section III *Enzymes in non-aqueous media*, Eds. E. N. Vulson, P. J. Halling, H. L. Holland, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
102. Lamare S., Legoy M-D., (1993), *Trends Biotechnol.*, 11, 413-418.
103. Barzana E., Klibanov A., Karel M., (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 1178-1185.
104. Balcão V. M., Paiva A. L., Malcata F. X., (1996), *Enzyme Microb. Technol.*, 18, 392-416.
105. Jarzębski A. B., Malinowski J. J., (1995), *Process Biochem.*, 30, 343-352.
106. Malinowski J. J., Jarzębski A. B., (1999), *Biotechnologia*, 44, 238-246.
107. Liu K-J., Cheng H-M., Chang R-Ch., Shaw J-F., (1997), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 1477-1482.
108. Jackson M. A., King J. W., List C. R., Neff W. E., (1997), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 635-639.
109. Wandel A., Gensler I., Porowski J., Jurczyk J., Barciszewski J., (1998), *Biotechnologia*, 40, 199-211.
110. Mozhaev V. V., Heremans K., Frank J., Masson P., Balny C., (1994), *Trends Biotechnol.*, 12, 493-501.
111. Kunugi S., (1992), *Effect of pressure on activity and specificity of some hydrolytic enzymes*, in: *High Pressure and Biotechnology*, Eds. C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans, P. Masson, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd., 224, 129-137.
112. Takahashi K., Ajima A., Yoshimoto T., Okada M., Matsushima A., Tamaura Y., Inada Y., (1985), *J. Org. Chem.*, 50, 3414-3415.
113. Jene Q., Pearson J. C., Lowe C. R., (1997), *Enzyme Microb. Technol.*, 20, 69-74.
114. Mogi K-I., Nakajima M., Mukataka S., (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 67, 513-519.
115. Inada Y., Takahashi K., Yoshimoto T., Aijma A., Matsushima A., Saito Y., (1986), *Trends Biotechnol.*, (July), 190-194.
116. Fukunaga K., Minamijima N., Sugimura Y., Zhang Z., Nakao K., (1996), *J. Biotechnol.*, 52, 81-88.
117. de la Casa R. M., Sanchez-Montero J. M., Sinisterra J. V., (1999), *Biotechnol. Lett.*, 21, 123-128.
118. Antczak T., Graczyk J., Szczęsna-Antczak M., Bielecki S., (2002), *J. Mol. Catal. B., Enzymatic*, 19-20, 287-294.