



Separacja produktów biotechnologii w wodnych układach dwufazowych. Cz. II – Przykłady zastosowań

Magdalena Zielińska-Dawidziak, Tomasz Jankowski

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza, Poznań

The separation of biotechnology products in aqueous two-phase systems. Part II – Applications

Summary

This paper is focused on actual and potential applications of aqueous two-phase systems in the separation of biotechnology products. Applications of bioconversions, purification of enzymes and other biomolecules in these systems, proposed schemes of separation, and advantages and disadvantages are presented. The experimental and industrial results indicate high efficiency of the separations of biological materials in aqueous two-phase systems, which may result in the development of new technologies.

Key words:

aqueous two-phase systems, extractive bioconversion, protein and enzyme purification.

1. Wstęp

Ekstrakcja w wodnych układach dwufazowych (*aqueous two-phase systems* – ATPS) wykorzystuje zjawisko różnego powinowactwa separowanych cząsteczek do związków tworzących układy dwufazowe, tj. roztworów wodnych niektórych polimerów (np. glikolu polietylenowego z dekstranem, alkoholu poliwinylowego z metylocelulozą), glikolu polietylenowego w mieszaninie z pewnymi solami (np. fosforanami) lub termoseparującego roztworu niejonowego związku powierzchniowo czynnego.

Adres do korespondencji

Magdalena
Zielińska-Dawidziak,
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności,
Akademia Rolnicza,
ul. Wojska Polskiego 48,
61-627 Poznań.

biotechnologia

2 (57) 102–112 2002

Układy tego rodzaju zapewniają wysoką zawartość wody w obu fazach (70-95%), co gwarantuje utrzymanie biologicznej aktywności mikroorganizmów, organelli komórkowych i białek oraz bardzo korzystne warunki separacji, np. niskie napięcie międzyfazowe.

Komórki, organelle komórkowe i substancje wprowadzane do układu dwufazowego zachowują się zgodnie z prawem Nernsta, a zatem gromadzą się w określonej fazie w stężeniu zależnym od rodzaju układu i rozdzielanych substancji. Zjawisko to wyraża współczynnik podziału K , stały dla danej substancji w określonym układzie:

$$K = c_g/c_d,$$

gdzie: c_g – stężenie substancji w fazie górnej, c_d – stężenie substancji w fazie dolnej.

Procesy separacji mogą być prowadzone na materiale nie poddanym żadnej obróbce lub tylko wstępnie przygotowanym (np. bezpośrednio po homogenizacji komórek), co pozwala na szybki odzysk pożądanego produktu i minimalne straty. Warunki separacji są łagodne, a wydajność procesów jest bardzo wysoka.

Wymienione zalety ekstrakcji w wodnych układach dwufazowych powodują wzrost zainteresowania technologiami wykorzystującymi ATPS do izolacji różnych produktów z płynów pofermentacyjnych.

W pracy przedstawiono dotychczasowe osiągnięcia oraz perspektywy rozwoju separacji produktów biotechnologii w wodnych układach dwufazowych, z uwzględnieniem dwóch głównych kierunków zastosowań, tj. biosyntezy z jednoczesną ekstrakcją produktów i oczyszczania przez podział międzyfazowy.

2. Procesy biosyntezy z jednoczesną ekstrakcją (ekstrakcyjna biokonwersja) w ATPS

Jednym z głównych kierunków praktycznego zastosowania wodnych układów dwufazowych w biotechnologii jest zintegrowanie procesu biosyntezy z ekstrakcją produktów (*extractive bioconversion*). W procesie tym biokatalizator jest obecny w jednej z faz, a produkt jest gromadzony w drugiej.

Procesy biosyntezy w ATPS zostały opracowane dla systemów wykorzystujących enzymy, komórki oraz jedne i drugie równocześnie. Przykłady tych procesów przedstawiono w tabelach 1 i 2. Zazwyczaj biosynteza prowadzona jest w układzie, w którym biokatalizator znajduje się w fazie dolnej, a produkt gromadzi się w fazie górnej (1). Możliwa jest także migracja produktu do fazy dolnej (2), a zatrzymanie biokatalizatora w górnej (2-4).

Tabela 1

Przykłady reakcji enzymatycznych prowadzonych w wodnych układach dwufazowych

Enzym	Faza z enzymem	K_{enz}	Produkt	Faza z produktem	K_{prod}	Skład układu	Literatura
heksokinaza + kinaza octanowa	D	0,15	glukoza-6-P	G	–	PEG/dekstran	(34)
acylaza	G	–	l-metionina	D	1,54	PEG/fosforan potasu	(35)
α -amylaza + glikoamylaza	D	–	cukry redukujące	G	–	PEG/nieoczyszczony dekstran	(36)
acylaza penicylinowa	D	<0,01	6-APA	G	1,35	PEG/fosforan potasu	(37)
endo- β -glukanaza + β -glukozydaza	D	0,16	cukry redukujące	G	–	PEG/nieoczyszczony dekstran	(38)
β -galaktozydaza	D	<0,01	glukoza	G	1,01	PEG/pullulan	(39)

D – faza dolna, G – faza górna, K_{enz} – współczynnik podziału enzymu, K_{prod} – współczynnik podziału produktu.

Tabela 2

Przykłady procesów fermentacyjnych prowadzonych w wodnych układach dwufazowych

Mikroorganizm	Faza z komórkami	Produkt	Faza z produktem	K_{prod}	Skład układu	Proces	Literatura
<i>Clostridium tetani</i>	D(G)	toksyna	G	–	PEG/dekstran	ciągły	(40)
<i>S. cerevisiae</i>	D	etanol	G	–	PEG/dekstran	półciągły	(41)
<i>S. cerevisiae</i> + celulaza + β -glukozydaza	D	etanol	G	–	PEG/dekstran	okresowy	(42)
<i>Clostridium acetobutlicum</i>	D	aceton butanol	G G	1,9 2	PEG/deksirar.	okresowy	(43)
<i>S. cerevisiae</i> + α -amylaza	D	etanol	G	–	PEG/nieoczyszczony dekstran	ciągły	(44)
<i>T. reesei</i>	D	celulaza	G	–	PEG/dekstran	półciągły	(45)
<i>T. reesei</i>	D	celulaza	G	2,08	PEG/pullulan	półciągły	(46)
<i>B. subtilis</i>	D	α -amylaza	G	0,5	PEG/dekstran	półciągły	(47)
<i>B. subtilis</i>	D(G)	α -amylaza	G	0,74	PEG/dekstran	półciągły	(48)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	D(G)	α -amylaza	G	0,77	PEG/dekstran	okresowy	(49)

D – faza dolna, G – faza górna, K_{prod} – współczynnik podziału produktu.

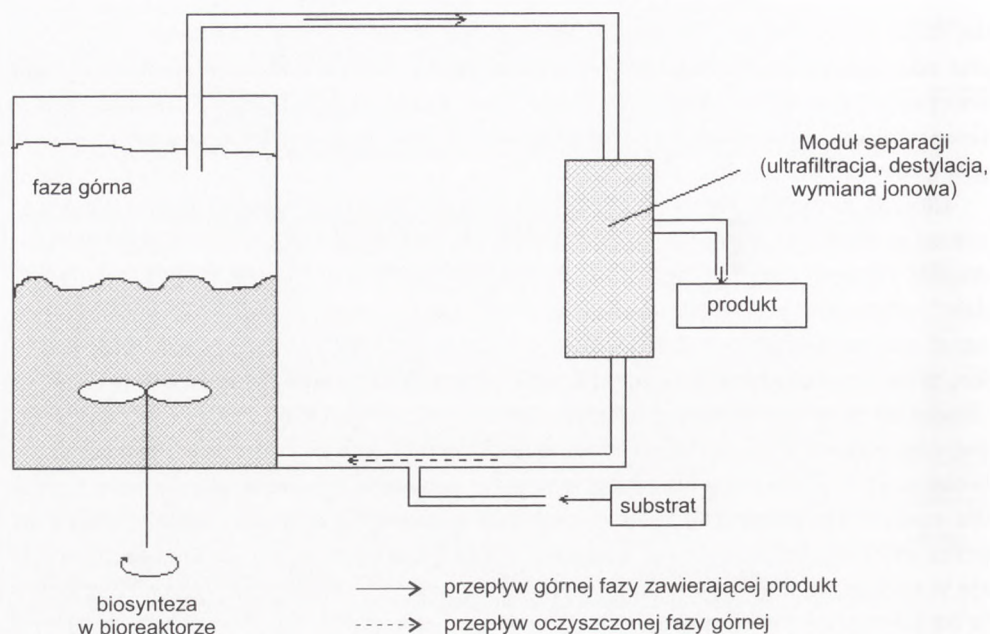
Łatwe w realizacji są procesy z wykorzystaniem całych komórek, ponieważ utrzymanie ich w konkretnej fazie nie nastęcza trudności. Natomiast zatrzymanie w jed-

nej fazie enzymów (jako biokatalizatorów) i oddzielenie ich od produktów reakcji jest zdecydowanie trudniejsze. Dlatego separację w ATPS stosuje się zwykle jako wstępny etap rozdziału i łączy się ją z procesem ultrafiltracji. Zdecydowanie podnosi się w ten sposób wydajność w porównaniu do sytuacji, gdyby każdy z tych procesów prowadzono oddzielnie (5).

Główną zasadą biosyntezy, z jednoczesną ekstrakcją, jest zawieszenie biokatalizatora w fazie, w której zachodzić będzie reakcja, i odzyskiwanie produktu z fazy drugiej. Ponieważ reakcja jest prowadzona w systemie emulsyjnym typu „woda-w-wodzie”, ułatwiona jest wymiana masy w porównaniu z systemem, w którym biokatalizator unieruchomiono w fazie stałej. Krople, w których zamknięty jest biokatalizator, mają wielkość kropeł emulsji, dzięki czemu dyfuzja substratów i produktów zachodzi na niewielkich odległościach. Bardzo ważne jest także to, że polimery zazwyczaj wykazują stabilizujące działanie dla substancji biologicznych oraz fakt, że biosynteza w ATPS pozwala na ograniczenie wszelkich rodzajów inhibicji typowych dla reakcji enzymatycznych oraz degradowania wytworzonych metabolitów, np. przez enzymy proteolityczne. Ponadto w przypadku enzymów katalizujących reakcję w rozpuszczalnikach organicznych, zamiana układu reakcyjnego na ATPS pozwala na korzystne przesunięcie reakcji w kierunku wytwarzania produktu, ponieważ szybkość reakcji nie jest ograniczana ani rozpuszczalnością substratu, ani dostępnością wody (6).

Układ dwufazowy do prowadzenia biosyntezy z jednoczesną ekstrakcją przygotowuje się w inny sposób dla produktów nisko- i wysokocząsteczkowych. Wówczas gdy produkt jest dużą cząsteczką, manipulując składem układu można znaleźć optymalne warunki, by produkt natychmiast po wytworzeniu był transportowany do fazy nie zawierającej biokatalizatora i substancji go degradujących (7). Z kolei dla produktów o niewielkiej masie cząsteczkowej współczynnik podziału jest zwykle bliski jedności. Ponieważ biokatalizator (komórka lub enzym) zazwyczaj wykazuje tendencję do zawieszania się w jednej fazie, skład układu dobiera się w ten sposób, by faza, która zawiera biokatalizator, miała wielokrotnie mniejszą objętość niż faza z produktem. Na przykład, jeżeli faza z której odbiera się produkt ma objętość dziesięciokrotnie większą niż faza, w której prowadzona jest reakcja, odbierając tę fazę otrzymuje się dziesięciokrotnie więcej produktu niż pozostaje w fazie reakcyjnej (8-10).

Interesującym rozwiązaniem technicznym do prowadzenia procesów fermentacyjnych z jednoczesną separacją produktów, pozwalającym na ograniczenie kosztów inwestycyjnych jest bioreaktor typu mieszalnik-odstojnik połączony bezpośrednio z modułem odzysku produktu, zaproponowany do produkcji sacharydów i etanolu (11-15). System ten umożliwia prowadzenie ciągłego procesu z częściową recyrkulacją składników tworzących ATPS (rys. 1). Dolna faza stacjonarna zawiera biokatalizator (komórki), natomiast górna-ruchoma służy do uzupełniania substratów i odbioru produktu, przy czym produkt odzyskiwano z tej fazy w module ultrafiltracyjnym.



Rys. 1. Schemat układu do prowadzenia procesów biokonwersji złożonego z bioreaktora typu „mieszalnik-odstojnik” i modułu separacyjnego.

3. Zastosowanie ATPS w procesach izolacji i oczyszczania

Ekstrakcja w wodnych układach dwufazowych znalazła również zastosowanie przemysłowe w procesach izolacji i oczyszczania różnych produktów biotechnologii, takich jak enzymy, rekombinowane białka, przeciwciała, itp. System dwufazowy tworzy się po wstępnej obróbce materiału, który ma być poddany ekstrakcji (np. po dezintegracji biomas komórkowych lub osadów ściekowych), albo przez dodanie polimerów tworzących fazy bezpośrednio do bioreaktora po zakończeniu procesu biosyntezy.

W tabeli 3 przedstawiono przykłady procesów separacji niektórych enzymów wewnątrzkomórkowych w układach ekstrakcyjnych ATPS. Metoda stosowana jest przede wszystkim do oddzielania danego enzymu od pozostałości komórkowych i innych białek oraz do zagęszczania. Ze względów praktycznych pozostałości rozdrobnionych komórek i inne zanieczyszczenia powinny być gromadzone w dolnej fazie układu, natomiast separowany enzym w górnej. Dla uzyskania dużej wydajności, dążyć należy do uzyskania współczynnika podziału enzymu większego niż 3 (2). Podane w tabeli 3 wielkości współczynnika oczyszczenia wskazują na stopień zagęszczenia enzymu w fazie ekstrakcyjnej w stosunku do materiału wyjściowego. Na

przykład, współczynnik oczyszczenia równy 2 oznacza, że 50% pozostałych białek znalazło się w dolnej fazie razem z pozostałościami komórek.

Tabela 3

Przykłady zastosowania wodnych układów dwufazowych do preparatywnego oczyszczania enzymów

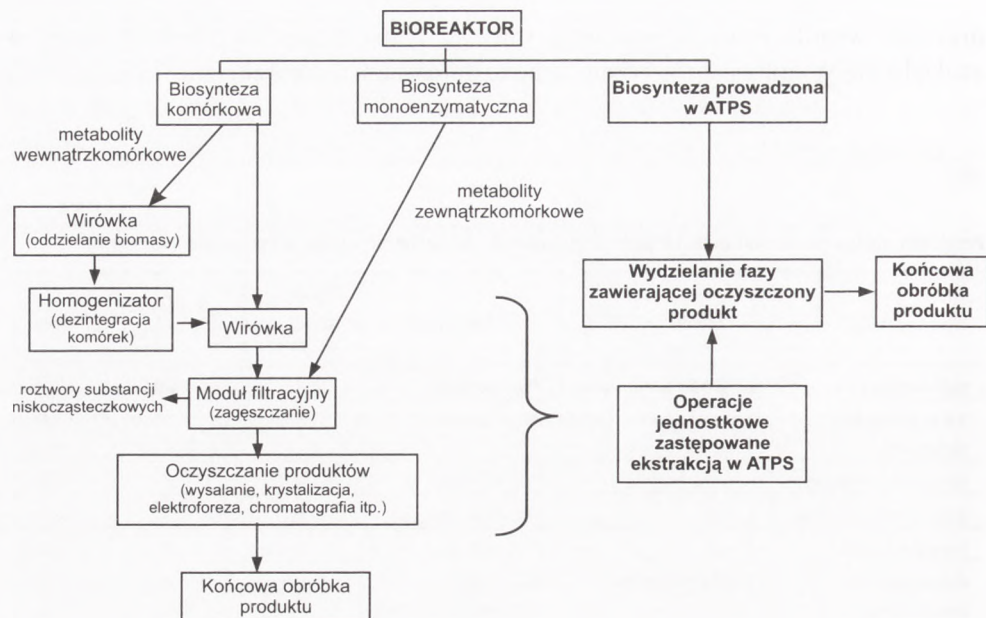
Enzym	Źródło enzymu	Skład układu	Współczynnik oczyszczenia, PF*	Wydajność, Y** (%)	Literatura
pullulanaza	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PEG/dekstran	2,0	88	(50)
1,4- α -fosforylaza glukanowa	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PEG/dekstran	1,2	85	(51)
dysmutaza nadtlenkowa	wątroba bydłęca	PEG/fosforan	4,0	83	(52)
acylaza penicylinowa	<i>E. coli</i>	PEG-TMA/ fosforan	25,7	–	(53)
β -galaktozydaza	<i>E. coli</i>	PEG/fosforan	–	90	(54)
dehydrogenaza mleczanowa	tkanka mięśniowa	PEG + żółć procjonowa/dekstran	10	68	(25)

$$* PF = \frac{\left(\frac{c_e}{c_b}\right)_G}{\left(\frac{c_e}{c_b}\right)_R} \quad ** Y = \frac{c_{e,G} \cdot V_G}{c_{e,R} \cdot V_R}$$

c – stężenie, V – objętość. Indeksy: e – enzym, b – białko ogólne, G – faza górna, R – roztwór wyjściowy.

Wodna ekstrakcja dwufazowa umożliwia również wydzielanie komórek zwierzęcych (16), mikroorganizmów (17), organelli komórkowych, pęcherzyków cytoplazmatycznych (18-20) i kwasów nukleinowych (21).

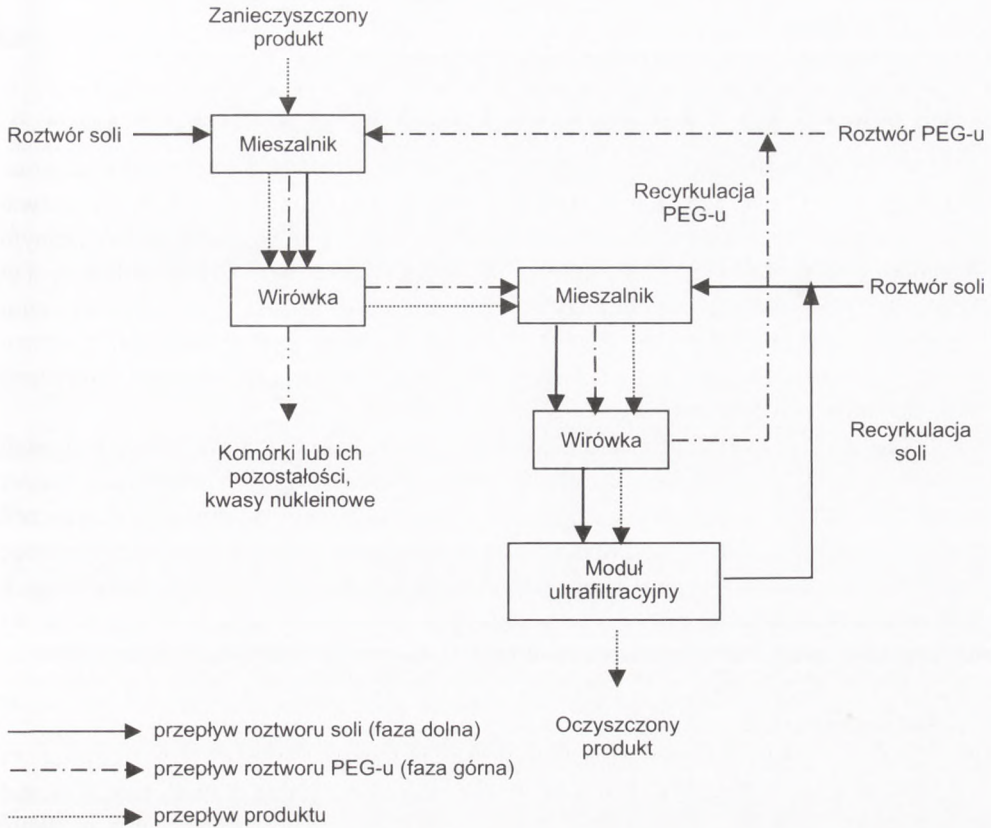
Tradycyjne metody oczyszczania i separacji produktów fermentacji wymagają stosowania wielu procesów jednostkowych, takich jak wielokrotna filtracja, wirowanie, wysalanie, schładzanie lub ogrzewanie płynów, co wiąże się z dużymi nakładami inwestycyjnymi i zwiększa ryzyko zakażeń w przypadku procesów prowadzonych z zawracaniem biomasy. Stosowanie ekstrakcji w ATPS pozwala na ograniczenie liczby operacji jednostkowych, ponieważ umożliwia jednoczesne prowadzenie izolacji, oczyszczania, koncentracji i klarowania w płynie pofermentacyjnym (rys. 2). Stosunkowo wysoki koszt odczynników ekstrakcyjnych jest zniwelowany redukcją nakładów pracy, niższym kosztem energii i zainstalowanej aparatury (22). Dodatkowo, jakość produktów ekstrahowanych z homogenatów komórkowych jest lepsza od sklarowanych ekstraktów uzyskanych przy użyciu separacji mechanicznej (23).



Rys. 2. Schemat prowadzenia procesów separacji i oczyszczania przy zastosowaniu technik tradycyjnych i ekstrakcji cieczowej.

Wydajność, jaką można uzyskać w ekstrakcji w ATPS jest dość wysoka. Coraz częściej proponowane są w procesach oczyszczania układy wykorzystujące powinowactwo separowanych substancji do wprowadzanych do układu ligandów. Zmodyfikowane w ten sposób układy ekstrakcyjne pozwalają na znaczne zwiększenie współczynnika oczyszczenia danej substancji (24-26).

Należy jednak podkreślić, że zazwyczaj separacja w ATPS nie jest procesem jednoetapowym. Pierwszy krok, to wytworzenie „pierwotnego” układu dwufazowego, który umożliwi wydzielenie produktu z płynu pofermentacyjnego (lub innego układu) do górnej fazy, najczęściej tworzonej przez PEG. Po rozdzieleniu faz, górną fazę miesza się z kolejnym roztworem (np. soli), w wyniku czego powstaje „wtórny” układ dwufazowy, w którym produkt będzie migrował do fazy dolnej, a z niej jest następnie wydzielany w procesie ultrafiltracji (rys. 3). Proces przedstawiony na schemacie jest przykładem separacji i oczyszczenia produktu z częściowym zawracaniem faz.



Rys. 3. Schemat przepływu płynów w ekstrakcji w ATPS z częściową recyrkulacją faz.

4. Zalety i wady ATPS

Procesy separacji prowadzone metodami wodnej ekstrakcji dwufazowej posiadają wiele zalet, wśród których najważniejszymi są (27-31):

- duża wydajność w krótkim czasie,
- łatwość powiększania skali,
- możliwość obróbki dużych objętości cieczy,
- możliwość prowadzenia ekstrakcji w sposób okresowy, półciągły i ciągły, także podczas fermentacji,
- łagodne warunki rozdziału przy minimalnej denaturacji białek,
- ograniczenie liczby operacji jednostkowych i zmniejszenie ryzyka zakażenia hodowli,
- nietoksyczność polimerów tworzących fazy,
- możliwość manipulowania rozdzielanymi substancjami,

- niski koszt inwestycyjny,
- niskie zapotrzebowanie na energię,
- niewielkie wymiary aparatury,
- możliwość odzysku odczynników stanowiących fazy.

Główną wadą procesów prowadzonych w ATPS jest wysoki koszt odczynników. Dlatego ciągle doskonalili się metody ich odzyskiwania. Opracowano metody pozwalające na zredukowanie zużycia PEG-u o 25%, a soli o połowę, przy jednoczesnym ograniczeniu zużycia wody (30). Zastępuje się też bardzo kosztowne polimery (jak PEG) tańszymi pochodnymi celulozy i skrobi lub łatwo odzyskiwanymi polimerami typu oksyetylen-oksypropylen (EO/PO). Ze względu na problemy związane z ochroną środowiska opracowuje się również techniki wykorzystujące mało toksyczne sole, zamiast soli fosforanowych.

Ostatnią z wymienianych wad ekstrakcji dwufazowej jest brak dobrych modeli przewidujących wielkość współczynnika podziału separowanych substancji. Nawet niewielkie zmiany parametrów rozdziału wywołują zmiany w migracji cząsteczek wewnątrz układu, co uniemożliwia płynną regulację procesu i narzuca konieczność wykonania żmudnych doświadczeń laboratoryjnych w celu ustalenia optymalnych warunków separacji dla konkretnego układu.

5. Podsumowanie

Separacja w wodnych systemach dwufazowych jest jedną z nielicznych metod pozwalających na prowadzenie procesów fermentacyjnych i oczyszczania na skalę przemysłową z bardzo wysoką wydajnością. Dodatkowo technika ta wychodzi na przeciw tendencjom ograniczania stosowania toksycznych rozpuszczalników organicznych i zastąpienia ich skutecznymi zamiennikami, nieszkodliwymi dla separowanych substancji i mniej uciążliwymi dla środowiska naturalnego. Dlatego ekstrakcja w ATPS jest coraz szerzej stosowana w biochemii i biotechnologii, przede wszystkim do separacji białek wewnątrzkomórkowych z homogenatów drobnoustrojów (32,33).

Technologie wykorzystujące ATPS do separacji biokatalizatorów lub produktów biosyntezy wymagają jednak wielu żmudnych doświadczeń modelowych, a następnie badań prowadzonych w skali półtechnicznej. Ponadto niewiele wykonanych dotąd badań dotyczyło fizjologii komórek w układach dwufazowych, oddziaływań polimer-komórki oraz transportu tlenu w procesach fermentacyjnych prowadzonych w układach dwufazowych.

Należy oczekiwać dalszego zwiększania zastosowań ATPS we współczesnej biotechnologii, ponieważ dobór prawidłowego układu separacyjnego pozwala na uzyskanie wyjątkowej selektywności i wydajności rozdziału.

Literatura

1. Andersson E., Hahn-Hagerdal B., (1990), *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 242-253.
2. Yang L. W., Husted H., Kula M.-R., (1988), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 10, 173-182.
3. Kuhlman W., Halwachs W., Schugerl K., (1980), *Chem. Ing. Tech.*, 52, 607, Synopse 821.
4. Flygare S., (1988), PhD Thesis, Dept. of Pure and Appl. Biochemistry, Lund University, Sweden.
5. Smeds A.-L., Veide A., Enfors S.-O. (1983), *Enzyme Microb. Technol.*, 5, 33-36.
6. Morita T., Karube I., (1995), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 55, 75-86.
7. Puziss M., Heden C.-G., (1965), *Biotechnol. Bioeng.*, 7, 355-366.
8. Mattiasson B., (1983), *Trends Biotechnol.*, 1, 16-20.
9. Hahn-Hagerdal B., Andersson E., Lopez-Leiva M., Mattiasson B., (1987), *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 11, 651-667.
10. Andersson E., Hahn-Hagerdal B., (1990), *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 242-254.
11. Wennersten R., Tjerneld F., Larsson M., Mattiasson B., (1983), *Proc. Int. Solvent Extraction Conf. ISEC*, Denver, 506.
12. Tjerneld F., Persson I., Albertsson P.-A., Hahn-Hagerdal B., (1985), *Biotechnol. Bioeng.*, Symp. No. 15, 1044-1050.
13. Tjerneld F., Persson I., Albertsson P.-A., Hahn-Hagerdal B., (1985), *Biotechnol. Bioeng.*, Symp. No. 15, 419-429.
14. Larsson M., Mattiasson B., (1984), *Enzyme Engineering*, 7, Eds. Laskin A. I., Tsao G. T., Wingard L. B. Jr., *Ann. NY Acad. Sci.*, 434, 144-147.
15. Hahn-Hagerdal B., Harder W., (1987), *Microbial Physiology for Biotechnology Innovation: Microorganisms in Aqueous Two-Phase Systems*, Royal Swedish Academy of Engineering Sciences, Stockholm, 145-148.
16. Walter H., Fisher D., (1985), *Partition in Aqueous Two-Phase Systems Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechnology*, Eds. Walter H., Brooks D. E., Fisher D., Academic Press, New York.
17. Magnusson K. E., Stendahl O., (1985), *Partition in Aqueous Two-Phase Systems Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechnology*, Eds. Walter H., Brooks D. E., Fisher D., Academic Press, New York.
18. Albertsson P.-A., Andersson B., Larsson C., Akerlund H.-E., (1981), *Meth. Biochem. Anal.*, 28, 115-150.
19. Flanagan S. D., (1985), *Partition in Aqueous Two-Phase Systems Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechnology*, Eds. Walter H., Brooks D. E., Fisher D., Academic Press, New York.
20. Larsson C., Andersson B., Akerlund H. E., (1985), *Partition in Aqueous Two-Phase Systems Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechnology*, Eds. Walter H., Brooks D. E., Fisher D., Academic Press, New York.
21. Muller W., (1985), *Partition in Aqueous Two-Phase Systems Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechnology*, Eds. Walter H., Brooks D. E., Fisher D., Academic Press, New York.
22. Kroner K.-H., Hustedt H., Kula M.-R., (1984), *Process Biochem.*, 19, 170-179.
23. Hustedt H., Kroner K.-H., Kula M.-R., (1985), *Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechnology*, Eds. Walter H., Brooks D. E., Fisher D., Academic Press, New York, 529-587.
24. Flanagan S. D., Barondes S., (1975), *J. Biol. Chem.*, 250, 1484-1489.
25. Tjerneld F., Johansson G., Joelsson M., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 809-816.
26. Kirchberger J., Cadelis F., Kopperschlager G., Vijayalakshmi M. A., (1989), *J. Chromatogr.*, 483, 289-299.
27. Ilieva M. P., Bakalova A., Mihneva M., Pavlov A., Dolapchiev L., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 51, 488-493.
28. Cascone O., Andrews B. A., Asenjo J. A., (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 629-635.
29. Sarmiento M. J., Pires M. J., Cabral J. M. S., Aires-Barros M. R., (1997), *Bioproc. Eng.*, 16, 295-297.
30. Hustedt H., (1986), *Biotechnol. Lett.*, 8, 791-796.
31. Persson I., Tjerneld F., Hahn-Hagerdal B., (1987), *Microbial Physiology for Biotechnology Innovation: Microorganisms in Aqueous Two-Phase Systems*, Royal Swedish Academy of Engineering Sciences, Stockholm, 11-32.

32. Kula M.-R., Kroner K.-H., Husted H., (1982), *Adv. Biochem. Eng.*, 24, 73-118.
33. Kroner K.-H., Schutte H., Stach W., Kula M.-R., (1982), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 32, 130-137.
34. Yamazaki Y., Suzuki H., (1979), *Rep. Ferment Res. Inst. Japan*, 52, 33-40.
35. Kuhlmann W., Halwachs W., Schugerl K., (1980), *Chem. Ing. Tech.*, 52, 607-611.
36. Wennersten R., Tjerneld F., Lersson M., Mattiasson B., (1983), *Proc. Int. Solvent Extraction Conf. ISEC*, Denver, 506.
37. Andersson E., Mattiasson B., Hahn-Hagerdal B., (1984), *Enzyme Microb. Technol.*, 6, 301-306.
38. Tjerneld F., Persson I., Albertsson P.-A., Hahn-Hagerdal B., (1985), *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 1036-1043.
39. Nguyen A.-L., Grothe S., Luong J. H. T., (1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 341-346.
40. Puziss M., Heden C.-G., (1965), *Biotechnol. Bioeng.*, 7, 355-366.
41. Kuhn I., (1980), *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 2393-2398.
42. Hahn-Hagerdal B., Mattiasson B., Albertsson P.-A., (1981), *Biotechnol. Lett.*, 3, 53-58.
43. Mattiasson B., Souminen M., Andersson E., Haggstrom L., Albertsson P.-A., Hahn-Hagerdal B., (1982), *Enzyme Engineering*, 6, Eds. Chibata I., Fukui S., Wingard L. B. Jr., Plenum Publ. Co., New York, 153-155.
44. Larsson M., Mattiasson B., (1984), *Enzyme Engineering*, 7, Eds. Laskin A. I., Tsao G. T., Wingard L. B. Jr., *Ann. NY Acad. Sci.*, 434, 144-147.
45. Persson I., Tjerneld F., Hahn-Hagerdal B., (1984), *Enzyme Microb. Technol.*, 6, 415-418.
46. Nguyen A.-L., Grothe S., Luong J. H. T., (1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 341-346.
47. Andersson E., Johansson A. C., Hahn-Hagerdal B., (1985), *Enzyme Microb. Technol.*, 7, 333-338.
48. Kantelinen A., Poutanen K., Linko M., Markkanen P., (1987), *Enzyme Engineering*, 8, Eds. Laskin A. I., Mosbach K., Thomas D., Wingard L. B. Jr., *Ann. NY Acad. Sci.*, 501, 229-232.
49. Andersson E., Hahn-Hagerdal B., (1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29, 329-336.
50. Kula M.-R., Buckman A., Hustedt H., Kroner K.-H., Morr M., (1977), *Enzyme Engineering*, 4, Eds. Bron G. B., Manecke G., Wingard L. B. Jr, Plenum Press, New York, 47-53.
51. Hustedt H., Kroner K. H., Stach W., Kula M.-R., (1978), *Biotechnol. Bioeng.*, 20, 1989-2005.
52. Boland J. G., Hesseling P. G. M., Papamichaek N., Hustedt H., (1991), *J. Biotechnol.*, 19, 19-34.
53. Guan Y., Wu X.-Y., Treffry T., Lilley T. H., (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 527-524.
54. Kohler K., Ljungquist C., Kondo A., Veide A., Nilsson B., (1991), *Bio/Technology*, 9, 642-646.