



Immobilizacja unieruchomionych *in situ* lipaz *Mucor* w mikroporowatych kapsułkach alginianowych

Tadeusz Antczak², J. Bugla¹, M. Mastalerz¹, A. Niemiec¹,
W. Szeja¹, M. Ślęk¹, E. Galas²

¹Katedra Technologii Chemicznej Węgla i Ropy Naftowej,
Politechnika Śląska, Gliwice

²Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, Łódź

Entrapment of immobilised *in situ* intracellular lipase of *Mucor* in microporous capsules

Summary

Lipases *Mucor circinelloides* and *Mucor racemosus* immobilised *in situ* were closed in microporous polysaccharides hydrophilic gel cross-linked using a solution of calcium salts. In order to increase the porosity of polysaccharides matrix during its cross-linking oligomer molecules of ethylene oxide (optimal Polikol 1000) were incorporated in the structure of the matrix. Then the oligomer was removed by acetone extraction. The obtained biocatalyst preparations were tested in hydrolysis of esters and esterification of oleic acid with butanol. The hydrolysis was carried out in water saturated organic solvents medium (n-hexane and diisopropylether). It was found that the efficiency of *M. racemosus* lipase immobilisation in hydrolysis of n-butyl oleate, n-butyl palmitate, n-butyl stearate, n-butyl laurate amounted to 60%. The efficiency of *M. circinelloides* lipase immobilisation in esterification of oleic acid with 1-butanol in hexane achieved 45%.

Key words:

lipase, immobilisation, entrapment, encapsulation, ester hydrolysis, esterification, alginate.

Adres do korespondencji

Wiesław Szeja,
Katedra Technologii
Chemicznej Węgla i Ropy
Naftowej,
Politechnika Śląska,
ul. Krzywoustego 8,
44-101 Gliwice.

1. Wstęp

Kataliza enzymatyczna w środowisku niekonwencjonalnym, nazywana także enzymologią niewodną, jest powszechnie uznanym sposobem transformacji związków organicznych.

W wyniku tych przemian otrzymuje się szereg substancji ważnych dla przemysłu farmaceutycznego (prekursory peptydów, feromony, antybiotyki), dla przemysłu spożywczego (emulgatory, tłuszcze o obniżonej wartości kalorycznej, pochodne witamin) czy przemysłu kosmetycznego (emulgatory, środki zapachowe, modyfikowane oleje) i inne (2-17).

Lipazy (EC 3.1.1.3), hydrolazy estrów gliceryny, należą do najczęściej stosowanych biokatalizatorów w syntezie chemicznej, tak w skali laboratoryjnej jak i przemysłowej (1,22). Enzymy te katalizują przemianę substratów nierozpuszczalnych w wodzie, co powoduje, że reakcja przebiega na powierzchni rozdziału faz z szybkością zależną od wielkości tej powierzchni. Reakcje hydrolizy estrów są odwracalne i przy małej zawartości wody w środowisku reakcji lipazy mogą katalizować także reakcje estryfikacji. Cechą wyróżniającą lipazy jest to, że w środowisku niewodnym syntezują nie tylko estry gliceryny i kwasów tłuszczowych, lecz także estry pochodne innych kwasów karboksylowych i alkoholi, poliestry, laktony, peptydy i amidy (18,24).

Większość produkowanych obecnie preparatów lipaz to enzymy pozakomórkowe, wytwarzane jako metabolity wtórne podczas hodowli drożdży, grzybów nitkowatych lub bakterii (19,20). Lipazy wewnątrzkomórkowe, poznane dotychczas w niewielkim stopniu, posiadają szereg właściwości, które umożliwiają ich stosowanie w procesach przemysłowych (21). Zaliczyć do nich można większą, w porównaniu z enzymami pozakomórkowymi hydrofobowość (co predystynuje je do katalizy w środowisku apolarnym) oraz odporność na czynniki denaturujące.

Lipazy stosowane są w katalizie w postaci rozpuszczalnej w wodzie, rozpuszczalnej w rozpuszczalniku organicznym bądź immobilizowanej. Enzymy te mogą być stosowane w układach mono-, dwu- i wielofazowych (24).

W pracach (25-31) opisano właściwości immobilizowanych *in situ* endolipaz *Mucor circinelloides* i *Mucor racemosus*. Preparaty te, w postaci odwodnionego mycelium, wykazują wysoką aktywność katalityczną zarówno w środowisku wodnym jak i organicznym. Ich wadą jest mała wytrzymałość mechaniczna. Wykazano również, że preparaty lipaz *Mucor circinelloides* i *Mucor racemosus* o ulepszonej wytrzymałości można uzyskać kapsułkując te enzymy w postaci odwodnionego mycelium (forma natywna) w żelu alginianu wapnia (31). Aktywność tak otrzymanych biokatalizatorów w środowisku hydrofobowym jest limitowana szybkością wymiany masy przez warstwę alginianu.

Obecnie, kontynuując doświadczenia immobilizacji lipaz *Mucor*, prowadzono badania zmierzające do opracowania warunków otrzymywania stabilnych i aktywnych mikroporowatych kapsułek alginianowych wykazujących właściwość dobrej wymiany masy w środowisku apolarnym.

2. Metodyka badań

2.1. Przygotowanie lipazy

Do badań wykorzystywano endolipazy *Mucor circinelloides* i *Mucor racemosus* immobilizowane *in situ* w postaci odwodnionego mycelium, otrzymywane zgodnie z metodą opisaną w pracach (28-29). Lipaza *M. circinelloides* wykazuje wyższą aktywność w reakcjach syntezy estrów, zaś lipaza *M. racemosus* w reakcjach hydrolizy estrów. Enzymy te w postaci drobin o średnicy 1-5 μm aktywowano za pomocą kwasu tłuszczowego lub estru.

2.1.1. Aktywacja lipazy *M. circinelloides*

Do 160 mg lipazy dodano 5 cm^3 0,25 M roztworu kwasu tłuszczowego w heksanie. Przygotowując preparat lipazy aktywowanej stosowano kwasy tłuszczowe, których estry zamierzano syntezować. Aktywację prowadzono w temperaturze 37°C przez 30 min, po czym enzym odsączono, przemywano 5 cm^3 heksanu i suszono przez 1,5 godziny w temperaturze 50°C.

2.1.2. Aktywacja lipazy *M. racemosus*

Do 160 mg lipazy dodano 5 cm^3 0,25 M roztworu estru w n-heksanie. Przygotowując preparat lipazy aktywowanej stosowano estry, które zamierzano hydrolizować. Dalej postępowano jak w punkcie 2.1.1.

2.2. Immobilizacja lipaz

2.2.1. Metoda A (31)

Do 5 cm^3 1% roztworu alginianu sodu dodano 50 mg aktywowanej lipazy, po czym intensywnie wytrząsano do uzyskania zawiesiny. Następnie zawiesinę wkraplano do 20 cm^3 2% wodnego roztworu CaCl_2 . Po 30 minutach kondycjonowania kapsułki odsączono i suszono przez 21 godzin w temperaturze 37°C.

2.2.2. Metoda B

60 mg aktywowanej lipazy wprowadzono do 5 cm³ 1% wodnego roztworu alginianu sodu zawierającego 1 g oligomeru tlenku etylenu (stosowano preparaty handlowe prod. „ROKITA”S.A.) i wytrząsano do uzyskania zawiesiny. Następnie zawiesinę wkraplano do 20 cm³ 2% wodnego roztworu CaCl₂. Po 30 minutach kapsułki przemywano wodą aż do całkowitego usunięcia oligomeru. Katalizator suszono 48 godzin w temperaturze 37°C.

2.2.3. Metoda C

60 mg aktywowanej lipazy zmieszano z 0,38 g celulozy mikrokrystalicznej, po czym dodano 0,20 g 4% roztworu wodnego soli sodowej karboksymetylocelulozy i 0,04 g Polikolu 1000 (prod. „ROKITA”S.A.). Po uzyskaniu jednolitej masy katalizator uformowano w postaci granulek. Granulki suszono przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Następnie każdą granulkę nasycono 1% alginianem sodu, wprowadzono do 20 ml 2% roztworu wodnego CaCl₂ i kondycjonowano przez 30 minut. Oligomer wmywano acetonem, po czym katalizator suszono 48 godzin w temperaturze 37°C.

2.3. Warunki prowadzenia reakcji estryfikacji i hydrolizy

Reakcje prowadzono w szczelnie zamkniętych naczyniach o pojemności 30 cm³, w temperaturze 37°C i mieszano z szybkością 225 min⁻¹. Reakcje hydrolizy prowadzono w środowisku rozpuszczalników organicznych nasyconych wodą. Postęp reakcji katalizowanych przez lipazy oceniano oznaczając alkalimetrycznie ilość kwasów tłuszczowych pozostałych (synteza) lub uwolnionych (hydroliza) (26).

2.3.1. Reakcje estryfikacji

W naczyniu umieszczano 2 mmol kwasu oleinowego, 2 mmol 1-butanolu, 5 cm³ n-heksanu, 1 g bezwodnego siarczanu sodu (pochłaniacz wody) oraz preparat lipazy (masy stosowanej lipazy w przeliczeniu na enzym związany z mycelium zamieszczono pod rysunkami).

2.3.2. Reakcje hydrolizy

2.3.2.1. Hydroliza oliwy z oliwek

W naczyniu umieszczono 0,9 g oliwy z oliwek, 5 cm³ heksanu i 60 mg preparatu lipazy w przeliczeniu na enzym związany z mycelium.

2.3.2.2. Hydroliza estrów

W naczyniu umieszczono 2 mmol estru (oleinianu, palmitynianu, laurynianu lub stearynianu 1-butylu), 5 cm³ rozpuszczalnika i 60 mg preparatu lipazy w przeliczeniu na enzym związany z mycelium. Rodzaj rozpuszczalnika zamieszczono pod rysunkami.

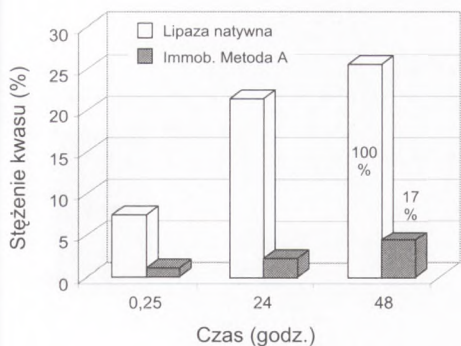
2.4. Oznaczanie stężenia wody

Stężenie wody w środowisku rozpuszczalników organicznych oznaczano metodą Karla Fishera.

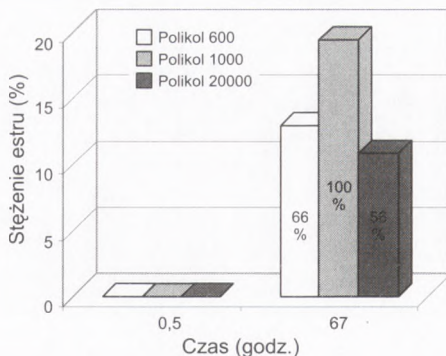
3. Omówienie wyników i dyskusja

W badaniach wykorzystywano immobilizowane *in situ* lipazy *Mucor circinelloides* i *Mucor racemosus*. Wstępne przygotowanie preparatu enzymatycznego polega na odwodnieniu biomasy *Mucor* acetonem, w wyniku czego usuwa się także większość składników komórkowych (białkowo-lipidowe struktury ściany komórkowej, wewnątrzkomórkowe inhibitory itp.) (28,29). Pozostałe, natywne lipazy związane z fragmentami szkieletu komórki posiadają szereg zalet w porównaniu z enzymem rozpuszczalnym. W środowisku wodnym są bardziej odporne na zmiany pH i temperatury. W środowisku rozpuszczalników organicznych wykazują ekstremalną termostabilność. Ogrzewane w temperaturze wrzenia przez 1 godzinę w środowisku heksanu zachowują 80% aktywności (25,30).

Aktywność immobilizowanej lipazy zależy w dużym stopniu od charakteru oddziaływań enzym-rozpuszczalnik i stężenia wody w środowisku. Wpływ rozpuszczalnika na aktywność lipazy jest dobrze poznany i powszechnie wiadomo, że najkorzystniejsze jest prowadzenie reakcji z ich udziałem w słabo polarnym środowisku (36). Badane reakcje hydrolizy i estryfikacji prowadzono zatem w heksanie i nieco bardziej polarnym eterze diizopropylowym. Oprócz polarności rozpuszczalniki te różnią się stopniem nasylenia wodą. Stężenie wody w stanie nasycenia w tempe-



Rys. 1. Hydroliza oliwy z oliwek katalizowana przez lipazę *M. racemosus* w środowisku heksanu.

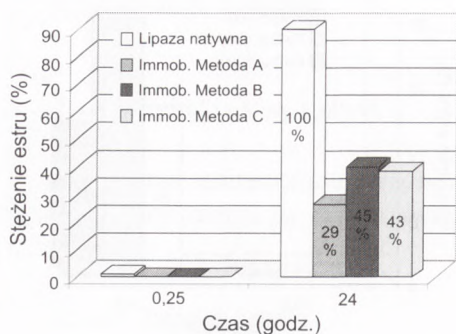


Rys. 2. Estryfikacja kwasu oleinowego alkoholem n-butylovym katalizowana przez lipazę *M. circinelloides* immobilizowaną metodą B w środowisku heksanu. Masa lipazy 45 mg (w przeliczeniu na enzym związany z mycelium).

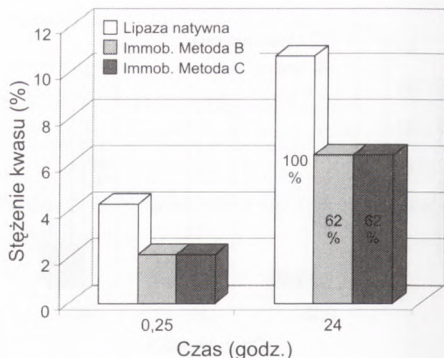
raturze 30°C jest następujące: heksan 0,10 mol/dm³, eter diizopropylowy 0,14 mol/dm³. Wadą lipaz immobilizowanych *in situ* jest mała odporność mechaniczna, z powodu której nie mogą być one wielokrotnie stosowane.

W poprzedniej pracy (31) stwierdzono, że odpowiednio preparowane nośniki hydrofilowe, takie jak alginian i karagenian, usieciowane jonami metali można zastosować do kapsułkowania immobilizowanych *in situ* lipaz *Mucor* (metoda A). Immobilizacja lipaz prowadzona zgodnie z tą metodą prowadzi do uzyskania biokatalizatora o dobrej odporności na czynniki mechaniczne, ale niewystarczającej aktywności. Postęp reakcji hydrolizy oliwy z oliwek prowadzonej z użyciem lipaz immobilizowanych (metoda A) w porównaniu z lipazą natywną wynosił jedynie 17% (rys. 1). Związane jest to z tym, że aktywność tak otrzymanych katalizatorów zależy silnie od szybkości dyfuzji substratów i produktów przez warstwę polarnego żelu tworzącego ścianę kapsułki. Jeżeli proces ten jest utrudniony szybkość reakcji enzymatycznych jest kontrolowana przez proces dyfuzji. Poprawy efektywności działania biokatalizatora można zatem oczekiwać zwiększając szybkość transportu masy przez błonę polisacharydową.

Szukając sposobu zwiększenia dyfuzji związków słabo polarnych takich jak estry i kwasy tłuszczowe oraz bardzo polarnej wody do wnętrza kapsułki utworzonej z alginianu usieciowanego jonami wapnia przyjęto założenie, że jedną z możliwości jest utworzenie systemu mikroporów w warstwie żelu, w której zawieszony jest enzym. Spodziewano się, że efekt zwiększenia porowatości polimerowej matrycy zostanie osiągnięty jeżeli podczas formowania się kapsułki w roztworze wodnym alginianu obecne będą liniowe związki wielkocząsteczkowe, które po preparacji katalizatora zostaną usunięte poprzez ekstrakcję w łagodnych warunkach. Oczywiście wprowadzone substancje nie mogą inaktywować lipazy ani wpływać znacząco na trwałość mechaniczną kapsułki.



Rys. 3. Estryfikacja kwasu oleinowego alkoholem 1-butylovym katalizowana przez lipazę *M. circinelloides*. Masa lipazy 60 mg (w przeliczeniu na enzym związany z mycelium).

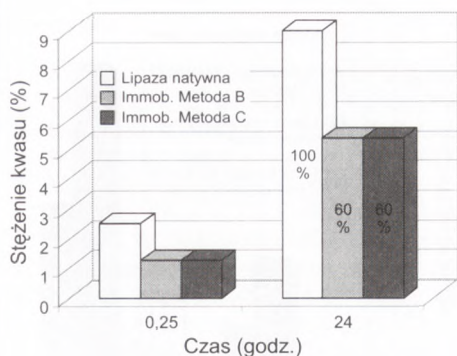


Rys. 4. Hydroliza oleinianu butylu katalizowana przez lipazę *M. racemosus* w środowisku heksanu.

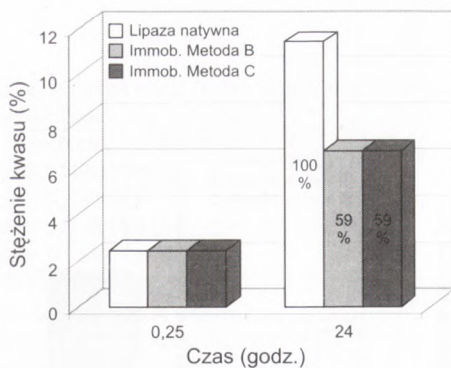
Zbadano szereg związków wielkocząsteczkowych i na podstawie wstępnych doświadczeń do dalszych prób wybrano oligomery tlenu etylenu. Są one stosunkowo dobrze rozpuszczalne w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych oraz nie zmieniają w szerokim zakresie stężeń właściwości mechanicznych kapsułki. Zastosowano trzy handlowe oligomery tlenu etylenu: Polikol 600, Polikol 1000, Polikol 20 000. Jako rozpuszczalnik do ekstrakcji polimeru z matrycy alginianowej wybrano aceton, ponieważ był on stosowany w trakcie preparacji enzymów z *Mucor* i nie zmieniał aktywności lipaz (28,29). Otrzymane biokatalizatory testowano w reakcji estryfikacji kwasu oleinowego alkoholem 1-butylovym. Najlepsze efekty uzyskano dla kapsułek preparowanych przy udziale Polikolu 1000 (rys. 2). Zgodnie z tym, w trakcie immobilizacji lipaz metodą B podczas sieciowania alginianu wbudowywano w jego strukturę cząsteczki Polikolu 1000, które następnie usuwano poprzez ekstrakcję acetonem. Otrzymane kapsułki cechuje bardzo dobra wytrzymałość mechaniczna co umożliwia wielogodzinne i wielokrotne prowadzenie procesu.

Aby dodatkowo zwiększyć szybkość przenoszenia substratów i produktów w obrębie kapsułki wprowadzono kolejną modyfikację warunków immobilizacji polegającą na wprowadzeniu dodatkowego wypełnienia w postaci celulozy mikrokrystalicznej. W procesie preparacji biokatalizatora zmieszano aktywowaną lipazę z celulozą mikrokrystaliczną, a jako środek wiążący zastosowano sól sodową karboksymetylocelulozy z dodatkiem Polikolu 1000. Uformowaną granulkę nasycano alginianem sodu i sieciowano jonami wapnia. Ostatni etap polegał na wymyciu oligotlenku etylenu. Tak otrzymane preparaty immobilizowanych lipaz wykazywały mniejszą odporność mechaniczną, ale z powodzeniem mogą być stosowane w procesach przepływowych.

Aktywność biokatalizatorów otrzymanych metodą B i C oceniono w reakcji estryfikacji kwasu oleinowego 1-butanolem (rys. 3).



Rys. 5. Hydrolyza palmitynianu butylu katalizowana przez lipazę *M. racemosus* w środowisku heksanu.

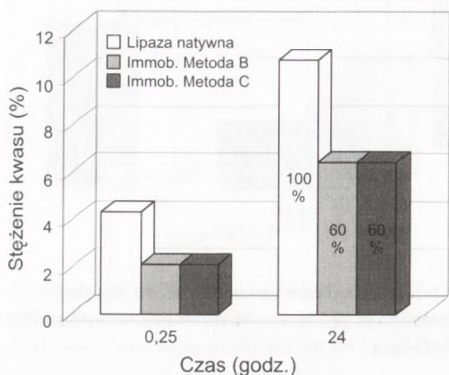


Rys. 6. Hydrolyza stearynianu butylu katalizowana przez lipazę *M. racemosus* w środowisku heksanu.

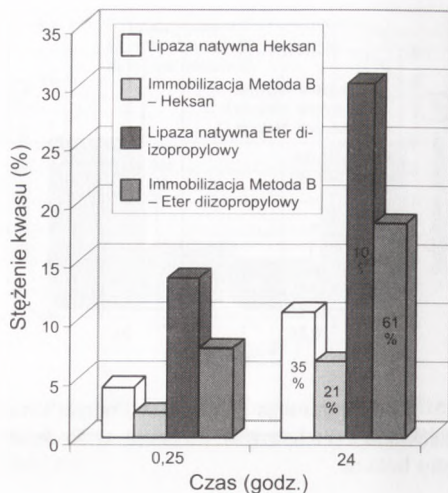
Stwierdzono, że dodatek zarówno Polikolu 1000 (metoda B) jak i celulozy mikrokryształicznej (metoda C) na etapie tworzenia kapsułki wywiera korzystny wpływ na szybkość reakcji syntezy estrów, co oznacza, że obie opracowane procedury pozwalają uzyskać biokatalizator o dobrej aktywności syntetycznej (około 45%). Brak produktów syntezy po półgodzinnym procesie może wynikać z dwóch powodów. Po pierwsze, z odmywania się, w początkowym etapie reakcji, z preparatu lipazy natywnej obecnych w nim inhibitorów lipazy rodzimej (35). Po drugie, czynnik wpływający na aktywność preparatu enzymatycznego to czas niezbędny do „udrożnienia” mikroporów kapsułki umożliwiających usuwanie z otoczenia enzymu wydzielanego w trakcie reakcji wody ze środowiska reakcji.

W pracy (26) wykazano, że w środowisku apolarnym reakcja estryfikacji katalizowana przez immobilizowane *in situ* lipazy *Mucor* do czterdziestej minuty ma przebieg pulsacyjny (synteza \leftrightarrow hydroliza). Wydzielająca się podczas syntezy woda, nie znajdując ujścia do fazy rozpuszczalnika, stwarza w otoczeniu katalizatora środowisko sprzyjające reakcji rewersji. Po tym czasie w strukturach komórkowych *Mucor* zostają uformowane mikropory, przez które woda może dyfundować do rozpuszczalnika i reakcja przebiega w kierunku tworzenia estru.

Otrzymane preparaty kapsułkowanych lipaz testowano również w reakcjach hydrolizy wybranych estrów: oleinianu n-butylu, palmitynianu n-butylu, stearynianu n-butylu i laurynianu n-butylu. Hydrolizę prowadzono w środowisku rozpuszczalników organicznych nasyconych wodą. Rezultaty zamieszczono na rysunkach 4-7. Stwierdzono, że postęp reakcji hydrolizy z udziałem kapsułkowanych lipaz *M. racemosus* jest podobny dla wszystkich badanych estrów. Wynika to prawdopodobnie ze zbliżonej zdolności rozpoznawania łańcucha kwasu tłuszczowego przez ten enzym (1,34). Preparaty kapsułkowanych lipaz przygotowane metodą B i C w reakcji hydrolizy estrów nie różnią się aktywnością. Porównanie przebiegu reakcji katalizowanej



Rys. 7. Hydroliza laurynianu butylu katalizowana przez lipazę *M. racemosus* w środowisku heksanu.



Rys. 8. Hydroliza laurynianu butylu w heksanie i eterze diizopropylowym.

przez lipazę natywną i immobilizowaną pozwala na stwierdzenie, że wydajność immobilizacji lipaz wynosiła ok. 60%, co należy uznać za wynik bardzo dobry.

Hydroliza katalizowana przez kapsułkowane lipazy *M. racemosus* przebiega wydajniej w rozpuszczalnikach bardziej polarnych, np. eterach niż w heksanie. Jest to związane z większą rozpuszczalnością wody w tych rozpuszczalnikach. W środowisku eteru diizopropylowego postęp hydrolizy laurynianu n-butylu jest 3-krotnie większy niż w środowisku heksanu (rys. 8).

4. Podsumowanie

Przedmiotem badań było opracowanie warunków otrzymywania aktywnego i stabilnego biokatalizatora. Wzrost aktywności spodziewano się uzyskać poprzez modyfikację warunków immobilizacji enzymu prowadzącą do utworzenia systemu mikroporów w polisacharydowej matrycy, które ułatwiałyby dyfuzję substratów i produktów w obrębie kapsułki. Na podstawie uzyskanych wyników dowodzi się, że zaproponowany sposób immobilizacji lipaz *Mucor* związanych ze strukturami komórkowymi w mikroporowatych kapsułkach alginianowych pozwala uzyskać biokatalizator o zwiększonej zdolności wymiany masy w środowisku apolarnym i nie wpływa negatywnie na aktywność katalityczną lipaz rodzimych. Różnice w wydajności immobilizacji dla reakcji hydrolizy (60%) i syntezy estrów (45%) wynikają prawdopodobnie z różnicy stężeń wody po obu stronach kapsułki.

Literatura

1. Faber K., (1997), *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 88-116.
2. de Zoete M. C., van Rantuijk F. i in., (1994), *Catalysis Today*, 22, 563-590.
3. Bucciarelli M., Forni A. i in., (1993), *Tetrahedron Asymmetry*, 4, 903-908.
4. Foelsche E., Hickel A. i in., (1990), *J. Org. Chem.*, 55, 1749-1752.
5. Margolin A. L., (1993), *Enzyme Microbiol. Technol.*, 15, 266-271.
6. Braun G., Braun P. i in., (1993), *Tetrahedron Letters*, 34, 3111-3114.
7. Holla E. W., Rebenstock H. P. i in., (1996), *Synthesis*, 7, 823-825.
8. Beviangkatatti H. S., Denerji A. A., (1991), *J. Org. Chem.*, 56, 5372-5375.
9. Gutman A. L., Brenner D. i in., (1993), *Tetrahedron Asymmetry*, 4, 839-842.
10. Haraldson G. G., Gumundson B. O. i in., (1993), *Tetrahedron Letters*, 34, 5791-5794.
11. Tsitsimpikou C., Daflos H., i in., (1997), *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*, 3, 189-192.
12. Backlund S., Eriksson F. i in., (1996), *Colloid and Polymer Science*, 274, 540-545.
13. Fuji K., Kawabata T. i in., (1990), *Tetrahedron Letters*, 31, 6663-6666.
14. Garcia M. J., Campo C. i in., (1993), *Tetrahedron*, 49, 8433-8435.
15. Ayers T. A., Schnettler R. A., Marciniak G., i in., (1997), *Tetrahedron Asymmetry*, 8, 45-48.
16. Csomos P., Kanerva L. T., Bernath G., Fulop F., (1996), *Tetrahedron Asymmetry*, 7, 1789-1794.
17. Weatherley L. R., Rooney D. W., Niekerg M. V., (1997), *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 68, 437-444.
18. Kazlauskas R. J., Bornscheur U. T., (1998), *Biotransformations with Lipases*, Biotechnology, vol. 8a, Ed. Kelly D. R., Wiley-VCH, New York, 37-191.
19. Jaeger K. E., Reetz M. T., (1998), *TIBITECH*, 16, 396-397.
20. Ganghi N. N., (1997), *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 621-628.
21. Long K., Ghazali H. M., Ariff A., Bucke C., (1997), *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 1121-1124.
22. Adamczak M., Bednarski W., (1994), *Biotechnologia*, 4(27), 140-153.
23. Klibanov A. M., (1997), *TIBITECH*, 15, 97-101.
24. Antczak T., (1991), *Biotechnologia*, 1 (11), 62-70.
25. Antczak T., Hiler D., Galas E., (1993), *Biotechnologia*, 1 (20), 59-67.
26. Antczak T., Krystynowicz A., Galas E., (1995), *Biotechnologia*, 2 (29), 82-97.
27. Antczak T., Galas E., (1995), *Biotechnologia*, 2 (29), 73-81.
28. Galas E., Antczak T., Krystynowicz A., (1989), Patent nr 150601.
29. Galas E., Antczak T., Krystynowicz A., (1989), Patent nr 150604.
30. Antczak T., Mrowiec-Białoń I. J., Bielecki S., Jarzębski A. B., Malinowski I. I., Lechowski A. J., Galas E., (1997), *Biotechnol. Techniq.*, 11, 9-11.
31. Antczak T., Bugla J., Szeja W., Galas E., (1999), *Biotechnologia*, 1 (44), 173-179.
32. Antczak T., Krystynowicz A., Galas E., Materiały z III Sympozjum Naukowo-Technicznego „Biotechnologia Środowiskowa”, 34-40.
33. Antczak T., Góra T., Antczak U., Galas E., (1991), *Enzyme Mikrob. Technol.*, 13, 589-593.
34. Kączkowski K., (1997), *Podstawy biotechnologii*, PWN, Warszawa, 78-113.
35. Antczak T., Hiler D., Krystynowicz A., Szczęśna M., Bielecki S., Galas E., *An activity of immobilised in situ intracellular lipases from *Mucor circinelloides* and *Mucor racemosus* in the synthesis of sucrose esters*, Progress in Biotechnology (w druku).
36. Laane C., Boeren S., Vos K., Veeger C., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 81-87.