

Kierunki zastosowań technologii płynów nadkrytycznych w inżynierii bioprocessowej

Janusz J. Malinowski

Andrzej B. Jarzębski

Instytut Inżynierii Chemicznej

Polska Akademia Nauk

Gliwice

1. Wstęp

Rosnące zainteresowanie technologiami wykorzystującymi płyny w stanie nadkrytycznym wynika z atrakcyjnych możliwości jakie niesie ta technika, takich jak: użycie nietoksycznych, niepalnych i nieszkodliwych dla środowiska rozpuszczalników (zwykle sprężonego CO₂ w temperaturze ok. 40°C), a także łatwość zmiany potencjału rozpuszczalności, niemożliwa w klasycznych układach cieczowych. Płyny nadkrytyczne, tzn. ciecze o temperaturze i ciśnieniu powyżej punktu krytycznego (np. 31°C i 7,8 MPa dla CO₂) cechuje gęstość porównywalna z gęstością cieczy, wysoka ściśliwość oraz bardzo niska wartość współczynnika lepkości i wysoka wartość współczynnika dyfuzji. Pierwsze dwie cechy sprawiają, że parametry rozpuszczalności płynu nadkrytycznego są łatwe do kontroli poprzez zmianę ciśnienia i/lub temperatury, natomiast niska lepkość i wysoka dyfuzyjność zwiększając znacząco szybkość procesu transportu masy, wpływa korzystnie na kinetykę procesu.

Właściwości te zostały odkryte ponad 100 lat temu przez Hannaya i Hogartha (1), ale dopiero w 1940 r. Piłat i Godlewicz (2) zaproponowali ich wykorzystanie we współczesnym przemyśle. Szerokie zastosowanie przemysłowe znalazło, jak dotąd kilka rozwiązań, w których wykorzystuje się proces ekstrakcji sprężonym/nadkrytycznym CO₂ do produkcji kawy bezkofeinowej, ekstraktów chmielu i innych surowców naturalnych. Szczegółowe opisy tych procesów można znaleźć w podręcznikach i artykułach przeglądowych (3-8).

W artykule tym prezentujemy możliwości zastosowania technologii płynów nadkrytycznych w inżynierii bioprocessowej.

2. Biokataliza w płynach nadkrytycznych

2.1. Reakcje enzymatyczne

Enzymy zachowują aktywność katalityczną i stabilność w środowiskach niewodnych, a zatem mogą być stosowane jako katalizatory reakcji przebiegających w rozpuszczalnikach organicznych i innych mediach niekonwencjonalnych (9). Płyny nadkrytyczne, szczególnie CO₂, mogą być interesującą alternatywą dla rozpuszczalników organicznych jako media dla przeprowadzania reakcji enzymatycznych. Znacząca zmienność gęstości, w otoczeniu punktu krytycznego, ze zmianą ciśnienia i temperatury otwiera możliwości selektywnej separacji *downstream* produktów reakcji enzymatycznych.

Pierwsze badania, w których stwierdzono aktywność i stabilność enzymów w nadkrytycznym CO₂ wykonano w połowie lat osiemdziesiątych (10-12). Badaniem objęto konformację oksydazy cholesterolowej (13) i lipazy (15). Oksydaza cholesterolowa była stabilnie aktywna w CO₂ o ciśnieniu 10 MPa i temperaturze 35°C przez co najmniej 50 h (13). Pierwotnie uważano, że dekompresja CO₂ prowadzi do denaturacji protein, np. α -chymotrypsyny, trypsyny i amidazy penicylinowej (16). Jednak ostatnio opublikowane wyniki pracy Zagrobelnego i Brighta (17) dotyczące trypsyny świadczą, że to proces sprężania, a nie dekompresji CO₂ wpływa negatywnie na konformację protein. W przypadku lipazy *Mucor miehei* zaobserwowano po sześciu dniach obniżenie aktywności o 10% przy ciśnieniu z zakresu 13-18 MPa i temperaturze 40°C (18). Wzrost temperatury do 60°C przyczyniał się do spadku aktywności o dalsze 10%. Podobny efekt zaobserwowano dla lipazy *Candida cylindracea* (19).

Dotychczasowe badania przebiegu reakcji w nadkrytycznym dwutlenku węgla obejmowały m.in. utlenianie fenoli przez oksydazę polifenolową (11), konwersję *p*-nitrofenylofosforanu do *p*-nitrofenolu przez alkaliczną fosfatazę (10), utlenianie cholesterolu przez oksydazę cholesterolową (13,14). Jednak główny wysiłek koncentrował się na reakcjach estryfikacji, interestryfikacji i transestryfikacji katalizowanych przez lipazy (12,15,18-25).

Z uwagi na niezbędność wody dla utrzymania aktywnej konformacji protein, jej zawartość w układzie reakcyjnym jest ważnym czynnikiem wpływającym na przebieg reakcji. Stwierdzono, że optymalna zawartość wody w matrycy wynosi około 10% wag. (21), przy czym istotna jest nie tylko sama rozpuszczalność wody w rozpuszczalniku (organicznym czy nadkrytycznym CO₂, tj. np. 0,01% dla *n*-heksanu i 0,30-0,35% dla CO₂), ale współczynnik podziału dla wody między matrycą (zawierającą enzymy) a rozpuszczalnikiem. Wyniki szczegółowych badań tego zagadnienia przedstawiono w pracach (21,26).

Porównanie parametrów reakcji enzymatycznych w nadkrytycznym CO₂ i rozpuszczalnikach organicznych (np. *n*-heksanie i cykloheksanie) wskazuje, że uzyskane wydajności procesów są zbliżone w obu mediach (15,18,21). Istotną zaletą płynącą z zastosowania nadkrytycznego CO₂ jest jego nieszkodliwość dla środowiska naturalnego oraz możliwość zintegrowania procesu reakcji i separacji (22,23). Jednakże koszt aparatury wysokociśnienio-

wej oraz energii musi być bezwzględnie brany pod uwagę przy analizie ekonomicznej procesu wykorzystującego media nadkrytyczne. W przeprowadzonych analizach wskazuje się, że technologie, w których stosuje się nadkrytyczny dwutlenek węgla mają szansę na zastosowanie w odniesieniu do produktów drogich, których uzyskanie tradycyjnymi metodami jest bardzo utrudnione lub wręcz niemożliwe (7).

Jednym z interesujących wariantów zastosowania mediów nadkrytycznych do reakcji katalizowanych przez lipazy jest opracowany proces syntezy chiralnych związków biologicznie aktywnych, ibuprofenu i glicydu (27,28). Rantakylä i Aaltonen (27) przeprowadzili enancjoselektywną estryfikację ibuprofenu w nadkrytycznym dwutlenku węgla katalizowaną przez lipazę *Mucor miehei*. Ibuprofen, niesteroidowy środek o działaniu przeciwzapalnym, stosowany jest jako mieszanina racemiczna, przy czym jedynie enancjomer o konfiguracji S wykazuje aktywność biologiczną. Proces prowadzony w nadkrytycznym CO₂ pozwolił na uzyskanie 70% nadmiaru enancjomeru estru ibuprofenu w formie S przy 15 – 20% konwersji. W procesie estryfikacji glicydu katalizowanego przez lipazę z trzustki wieprzowej uzyskano ponad 83% nadmiar enancjomeru estru w formie S przy 25 – 30% konwersji (28).

2.2. Biotransformacje z udziałem żywych komórek

Ciecze nadkrytyczne mogą być zastosowane do ekstrakcji z brzeczki fermentacyjnej (rozcieńczonych roztworów wodnych) związków, takich jak etanol (29,30) i kwasy karboksylowe (31). Prowadzono badania fermentacji etanolowej, w układzie fermentacji ekstrakcyjnej, z nadkrytycznym CO₂ jako ekstrahentem (32,33). Stwierdzono inhibitujący wpływ wysokiego ciśnienia na syntezę etanolu przez komórki drożdży, ale mikroorganizmy były zdolne do podjęcia swoich funkcji życiowych po redukcji ciśnienia. L'Italian i wsp. (33) uważają za optymalne rozwiązanie fermentację z cyklicznym sprężaniem i rozprężaniem. Badania biotransformacji z udziałem żywych komórek zawoocowały pracami nad wpływem nadkrytycznego, głównie CO₂, na różne żywe mikroorganizmy (34-36). W świetle tych badań, jak się wydaje, jest mało prawdopodobne wykorzystanie w praktyce (poza skalą laboratoryjną) koncepcji biotransformacji z udziałem żywych komórek w środowisku nadkrytycznego dwutlenku węgla.

3. Mikronizacja cząstek

W ostatnich latach obserwuje się rosnące zainteresowanie mikronizacją cząstek związków biologicznie czynnych z uwagi na możliwość wprowadzania cząstek o średnicy poniżej 50 µm bezpośrednio do organizmu, doustnie lub domięśniowo (37). Tradycyjne metody rozdrabniania, takie jak: suszenie rozpyłowe, liofilizacja, strącanie z roztworów z wykorzystaniem antysolwentów organicznych, itd. są często mało efektywne w odniesieniu do związków o aktywności biologicznej (38).

Nowe możliwości otwierają rozwiązania wykorzystujące właściwości cieczy w stanie nadkrytycznym, takie jak: gwałtowne rozprężanie przez dyszę roztworów nadkrytycznych (ang. RESS) i krystalizacja w układzie gaz-antysolwent (ang. GAS). Mikronizację metodą gwałtownego rozprężania roztworów nadkrytycznych stosuje się tylko do substancji, które są efektywnie rozpuszczalne w płynie nadkrytycznym. Krukonis (39) jako pierwszy zastosował tę metodę do rozdrabniania materiałów, takich jak: katalizatory organiczne, polimery, barwniki i półprodukty do produkcji leków. Rozprężając nadkrytyczny CO₂ zawierający 3% metanolu Larson i King (40) otrzymali cząstki metabolitu grzybów *Aspergillus terreus* o nazwie mewinolin (lek obniżający poziom cholesterolu) o wielkości 10 – 50 µm. Tom i Debenedetti (37,41) wykazali, że biokompatybilne i biodegradowalne w organizmie ludzkim polihydroksykwasy, takie jak: kwas poli-L-mlekowy, poli-D,L-mlekowy i kwas poliglikolowy można rozdrabniać do cząstek o wielkości poniżej 50 µm metodą strącania z nadkrytycznego CO₂ lub mieszaniny CO₂ i acetonu. Warto nadmienić, że polimery te są przedmiotem szczególnie intensywnych badań ze względu na możliwość ich wykorzystania jako matryc leków o przedłużonym działaniu. Ta relatywnie prosta metoda uzyskania mikrocząstek tych polimerów została uznana przez autorów za pierwszy krok w kierunku formowania związków o działaniu terapeutycznym w otocze (matrycy) polimeru podlegającego stopniowej biodegradacji. Przykładem realizacji tej koncepcji są mikrocząsteczki kwasu poli-D,L-mlekowego zawierających preparat farmaceutyczny o nazwie lowastatin (Merck & Co.) otrzymane przez współstrącanie metodą RESS z nadkrytycznego CO₂ (42). Ostatnio zademonstrowano, że stosując metodę rozprężania z nadkrytycznego trójfluorometanu (43) możliwa jest mikronizacja gryzeofulwiny, antybiotyku metabolizowanego przez grzyby *Penicillium griseofulvum*, charakteryzującego się działaniem przeciugrzybicznym i przeciwzapalnym. Rozdrobnienie tego antybiotyku znacząco poprawiło jego przyswajalność przez organizm i pozwoliło na uzyskanie lepszego efektu terapeutycznego przy mniejszej dawce leku.

W przypadku związków nierozpuszczalnych w płynach nadkrytycznych, takich jak np. proteiny, polipeptydy, itd. alternatywnym rozwiązaniem mikronizacji jest krystalizacja typu gaz-antysolwent (44). Chang i wsp. (45) zastosowali tę metodę do separacji i oczyszczania β-karotenu z mieszaniny zawierającej produkty utleniania karotenu. Autorzy uważają, że ta koncepcja procesowa może znaleźć zastosowanie na skalę przemysłową. Innymi przykładami realizacji tej koncepcji mogą być mikronizacja insuliny wołowej i katalazy z wątroby wołowej (38), a także otrzymywanie cząstek insuliny poniżej 4 µm (42) metodą ekspansji typu GAS, odpowiednio 90% roztworu wodnego etanolu oraz roztworów dwumetylosulfotlenku i N,N-dwumetyloformamidu z nadkrytycznego CO₂.

4. Ekstrakcja gazami sprężonymi i przykłady innych zastosowań

Ekstrakcja nadkrytyczna jest znana i stosowana od połowy lat siedemdziesiątych metodą separacji związków zapachowych, smakowych i biologicznie czynnych z surowców naturalnych. Ze względu na niski koszt, oboję-

tność chemiczną i niską temperaturę krytyczną najczęściej stosowanym ekstrahentem jest dwutlenek węgla. Przedstawiamy przegląd nowszych osiągnięć w tej dziedzinie.

Steroidy, związki o szerokim zakresie zastosowań, są rozpuszczalne w nadkrytycznym CO₂, przy czym wyższa rozpuszczalność charakteryzuje sterole posiadające mniejszą liczbę grup hydroksylowych i karboksylowych. Przykładem mogą być ergosterol i stigmasterol posiadające po jednej grupie hydroksylowej. Rozpuszczalność w czystym CO₂ jest relatywnie niska, ale dodatek polarnych modyfikatorów pozwala na jej znaczącą poprawę (46). Rozpuszczalność progesteronu, testosteronu i cholesterolu w nadkrytycznym CO₂ wzrasta o jeden rząd wielkości przy zastosowaniu dodatku 10% objętości N₂O w zakresie ciśnień 8 – 25 MPa i temperatury 35 – 60°C (47). Badania rozpuszczalności mieszaniny różnych steroidów wskazują, że możliwa jest ich separacja przy użyciu nadkrytycznego CO₂ w temperaturze około 35°C.

Ostatnio obserwuje się rosnące zainteresowanie produktami spożywczymi o obniżonej zawartości cholesterolu, tłuszczem z mleka o obniżonej zawartości wysokocząsteczkowych kwasów tłuszczowych, łatwym w smarowaniu masłem, itp. Prowadzone są prace nad zastosowaniem ekstrakcji płynami około- i nadkrytycznymi do obniżenia zawartości cholesterolu w tłuszczach pochodzenia zwierzęcego oraz separacji lipidów (48-53). Badania koncentrują się na określeniu parametrów procesowych, takich jak rozpuszczalność, selektywność, itp., które są szczególnie istotne przy formułowaniu założeń projektowych procesu.

Stwierdzono, że znaczna część niskocząsteczkowych kwasów tłuszczowych oraz trójglicerydów o niskiej temperaturze topnienia może być oddzielona od tłuszczu mleka stosując nadkrytyczny CO₂ pod ciśnieniem 31 MPa i w temperaturze 40°C (51). Rozpuszczalność wysokocząsteczkowych trójglicerydów w nadkrytycznym CO₂ w temperaturze 40°C rośnie ze wzrostem ciśnienia i malejącą masą cząsteczkową. Stwierdzono ponadto, że nadkrytyczny CO₂, jako związek niepolarny, może być z powodzeniem zastosowany do rozdziału złożonych mieszanin lipidów polarnych (nierozpuszczalnych w CO₂) i rozpuszczalnych w CO₂, takich jak trójglicerydy. Przykładem może być rozfrakcjonowanie lipidów z glutenu na frakcję lipidów polarnych i niepolarnych (52). Ekstrakcja nadkrytyczna żółtek jaj kurzych, dwutlenkiem węgla z dodatkiem 3 – 5% etanolu pozwala na usunięcie ponad 70% lipidów i cholesterolu (53).

Separacja związków zapachowych i smakowych z surowców naturalnych metodą ekstrakcji nadkrytycznym CO₂ jest kolejnym z możliwych zastosowań tej techniki w przemyśle spożywczym i kosmetycznym (5,54,55). Analiza organoleptyczna ekstraktów z liści mięty pokazuje, że olejek wyekstrahowany nadkrytycznym CO₂ posiada zapach i smak zbliżony do naturalnego, występującego w liściach, w przeciwieństwie do ekstraktów uzyskanych metodą tradycyjną, tzn. ekstrakcją parą, co nie jest bez znaczenia dla jakości produktów końcowych, w których stosuje się te olejki (56). Sato i wsp. (57) przeprowadzili z powodzeniem ekstrakcję nadkrytycznym CO₂ olejku cytrynowego dla usunięcia terpenów, które ulegają rozkładowi na niepożądane związki pod wpływem światła i wysokiej temperatury. Klasyczna metoda usu-

wania terpenów metodą destylacji prowadzi nieodłącznie do rozkładu termicznego istotnych składników olejku.

Przykładem bardzo interesujących zastosowań ekstrakcji nadkrytycznym dwutlenkiem węgla jest separacja ω -3 kwasów tłuszczowych, wielołańcuchowych, nienasyconych kwasów tłuszczowych z wieloma podwójnymi wiązaniami, głównie kwasu eikozapentaenowego (EPA) i dekozaheksaenowego (DHA) z olejów rybich (58-61). Korzystne oddziaływanie fizjologiczne ω -3 kwasów tłuszczowych na organizm polega m. in. na obniżaniu ilości trójglicerydów i cholesterolu we krwi oraz agregacji krwinek płytkowych. Nilsson i wsp. (59) uzyskali EPA i DHA o czystości przekraczającej 90%, natomiast Eisenbach (58) przeprowadził z powodzeniem rozfrakcjonowanie estrów etylu kwasów tłuszczowych oleju z dorsza na instalacji ćwierćtechnicznej. Skuteczność tej metody separacji była również testowana w odniesieniu do ekstrakcji nienasyconych kwasów tłuszczowych z grzybów *Saprolegnia parasitica* (62). Grzyby te posiadają znaczną ilość EPA w polarnej frakcji lipidowej. Stosując nadkrytyczny CO_2 z dodatkiem etanolu odzyskano około 90% lipidów.

Ekstrakcja nadkrytyczna może być efektywną metodą separacji związków termicznie labilnych stosowanych w przemyśle farmaceutycznym, stawiającym ponadto ostre wymogi stosowania rozpuszczalników inertnych fizjologicznie. Schaeffer i wsp. (63) wyekstrahowali monokrotalinę, alkaloid z nasion *Crotalaria spectabilis*, będący prekursorem w syntezie związków stosowanych w chemioterapii nowotworowej. W procesie rozdziału na żywicach jonowymiennych sprzężonym z ekstrakcją nadkrytycznym CO_2 z dodatkiem etanolu uzyskano produkt o czystości przekraczającej 95%. Ta technika, jak się wydaje, jest szczególnie atrakcyjna dla pozyskiwania alkaloidów indolowych o działaniu cytostatycznym z liści *Catharanthus roseus* (64,65), ekstrakcji indolu (surowca do produkcji aminokwasów, m. in. tryptofanu) o wysokiej czystości ze smoły węglowej (66) oraz alkaloidów sporyszu (67). Badanie wpływu dodatku różnych polarnych modyfikatorów na rozpuszczalność naproksenu, niesteroidowego środka o działaniu przeciwzapalnym, w nadkrytycznym CO_2 było tematem pracy (68). Stwierdzono znaczący wzrost rozpuszczalności naproksenu w CO_2 po dodaniu modyfikatorów, a dane dotyczące rozpuszczalności w czystym CO_2 i zawierającym rozpuszczalniki polarne skorelowano na podstawie znanych równań stanu. Jennings i wsp. (69), przeprowadzili ekstrakcję taksolu, niedawno zidentyfikowanego związku o potencjalnym znaczeniu w leczeniu pewnych typów nowotworów. Kora cisa pacyficznego *Taxus brevifolia*, stosunkowo rzadkiego drzewa, jest jedynym znanym źródłem tego związku. Stwierdzono wyższą selektywność procesu ekstrakcji taksolu z kory nadkrytycznym CO_2 niż klasycznej ekstrakcji cieczą za pomocą etanolu.

Prace z zakresu transformacji przy użyciu CO_2 prowadzone w IIC PAN w odniesieniu do syntetycznych kopolimerów bezwodnika kwasu maleinowego i substancji biologicznie czynnych pozwoliły na korzystną modyfikację struktury masy cząsteczkowej oraz usunięcie z niego rozpuszczalnika i niepożądanych monomerów oraz oligomerów (70). Klasyczne metody oczyszczania okazały się w tym przypadku nieskuteczne. Współpraca IIC PAN z Instytutem Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej zaowocowała uzy-

skaniem efektywnych biokatalizatorów z wbudowanymi enzymami otrzymanymi metodą zol-żel i poddanych suszeniu w nadkrytycznym CO₂ (71).

Obiecujące wyniki uzyskano w badaniach nad wykorzystaniem ekstrakcji nadkrytycznej do odtłuszczenia tkanki kostnej, ludzkiej lub pochodzenia zwierzęcego mogącej znaleźć zastosowanie w implantach chirurgicznych (72). Skuteczne odtłuszczenie tkanki jest niezbędne dla ograniczenia możliwości negatywnej odpowiedzi immunologicznej po przeszczepie; limituje ono także asymilację tkanki w organizmie. Skuteczność metody stosującej nadkrytyczny CO₂ polega na znacznie lepszej penetracji mikroporowatej struktury kości przez nadkrytyczny CO₂ (determinowanej przez bardzo niską lepkość płynu) niż przez tradycyjnie stosowane rozpuszczalniki organiczne (nadtlenek wodoru, chloroform, dwuchlorometan). W konsekwencji możliwe jest prawie całkowite wyekstrahowanie frakcji lipidowej z tkanki szpiku kostnego. Dodatkowo technologia ta nie implikuje problemu toksycznych pozostałości po użytych rozpuszczalnikach, zaadsorbowanych w porach tkanki kostnej. Technologia ta znajduje się obecnie na etapie komercjalizacji.

5. Podsumowanie

Technologie, w których wykorzystuje się płyny w stanie nadkrytycznym stanowią interesującą, a niejednokrotnie nawet atrakcyjną alternatywę dla klasycznych procesów stosowanych w inżynierii bioprocessowej. Główne obszary zastosowań obejmują przemysł farmaceutyczny i spożywczy, często operującymi substancjami labilnymi termicznie i podatnymi na utlenianie. Wychodzą one także naprzeciw dominującym obecnie trendom ograniczania stosowania rozpuszczalników organicznych, charakteryzujących się często nadmierną toksycznością i zastąpienia ich efektywnymi zamiennikami nieszkodliwymi fizjologicznie i obojętnymi dla środowiska. Cechy takie posiadają niektóre gazy w stanie nadkrytycznym, szczególnie dwutlenek węgla.

Z przedstawionego przeglądu prac z zakresu zastosowań technologii płynów w stanie nadkrytycznym w technice bioprocessowej wynika, że istnieją szerokie możliwości wykorzystania cieczy nadkrytycznych w formowni mikrocząstek. Są to jednak metody stosowane, jak dotąd, w skali laboratoryjnej i ich wdrożenie do praktyki przemysłowej, jak się wydaje, jest jeszcze dość odległe. Zasadnicze ograniczenie leży po stronie ekonomii, a nie techniki; technologie te są bowiem dość drogie z uwagi na znaczny koszt aparatury wysokociśnieniowej. Badania z zakresu biokatalizy w środowisku nadkrytycznego CO₂ dostarczają interesujących wyników, ale wspomniane uwarunkowania skutecznie, jak dotąd, organiczają zastosowanie tej technologii w większej skali. Realna szansa przemysłowego zastosowania istnieje tylko w odniesieniu do produktów o szczególnych właściwościach, potrzebnych, których uzyskanie prostymi metodami jest praktycznie niemożliwe. Okazuje się, że technika ta może być niezwykle efektywnym narzędziem modyfikacji struktury materiałów, a także sposobem pozyskiwania materiałów o budowie niemożliwej do otrzymania za pomocą innych metod. Prace z tego zakresu są prowadzone między innymi w IIC PAN.

Literatura

1. Hannay J. B., Hogarth J., (1879), Proc. R. Soc. London, 29, 324-326.
2. Piłat S., Godlewicz M., (1940), U.S. Patent 2,188,013.
3. Stahl E., Quirin K. W., Gerard D., (1987), *Verdichtete Gase zur Extraktion und Raffination*, Springer Verlag, Berlin.
4. McHugh M. A., Krukoniš V. J., (1986), *Supercritical Fluid Extraction. Principles and Practice*, Butterworths Publishers, Boston.
5. Eds. Bruno T. J., Ely J. F., (1991), *Supercritical Fluid Technology: Review in Modern Theory and Applications*, CRC Press, Boca Raton.
6. Randall L. G., (1982), Sep. Sci. Technol., 17, 1-118.
7. Aaltonen O., Rantakylä M., (1991), CHEMTECH, 21, 240-248.
8. Grąjek W., Łukaszyński D., (1993), Przem. Spoż., 11, 307-310.
9. Zaks A., Klibanov A. M., (1985), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 82, 3192-3196.
10. Randolph T. W., Blanch H. W., Prausnitz J. M., Wilke C. R., (1985), Biotechnol. Lett., 7, 325-328.
11. Hammond D. A., Karel M., Klibanov A. M., Krukoniš V., (1985), Appl. Biochem. Biotechnol., 11, 393-400.
12. Nakamura K., Chi Y. M., Yamada Y., Yano T., (1986), Chem. Eng. Commun., 45, 207-212.
13. Randolph T. W., Clark D. S. Blanch H. W., Prausnitz J. M., (1988), Science, 239, 387-390.
14. Randolph T. W., Blanch H. W., Prausnitz J. M., (1988), AIChE J., 34, 1354-1360.
15. Miller D. A., Blanch H. W., Prausnitz J. M., (1991), Ind. Eng. Chem. Res., 30, 939-946.
16. Kasche V., Schlothauer R., Brunner G., (1988), Biotechnol. Lett., 10, 569-574.
17. Zagrobelyny J., Bright F. V., (1992), Biotechnol. Prog., 8, 421-423.
18. Marty A., Chulalaksananukul W., Condoret J. S., Willemot R. M., Durand G., (1990), Biotechnol. Lett., 12, 11-16.
19. Yu Z. R., Rizvi S. S. H., Zollweg J. A., (1992), Biotechnol. Prog., 8, 508-513.
20. Erikson J. C., Schyns P., Cooney C. L., (1990), AIChE J., 36, 299-301.
21. Marty A., Chulalaksananukul W., Willemot R. M., Condoret J. S., (1992), Biotechnol. Bioeng., 39, 273-280.
22. Nakamura K., Fujii H., Chi Y. M., Yano T., (1990), Annals N. Y. Acad. Sci., 613, 319-332.
23. Marty A., Combes D., Condoret J. S., (1994), Biotechnol. Bioeng., 43, 497-504.
24. Chulalaksananukul W., Condoret J. S., Combes D., (1993), Enzyme Microb. Technol., 15, 691-698.
25. Casstillo E., Marty A., Combes D., Condoret J. S., (1994), Biotechnol. Lett., 16, 169-174.
26. van Eijs A. M. M., de Jong J. P. L., Doddema H. J., Lindeboom D. R., (1988), Proc. Int. Symp. SC Fluids, Ed. M. Perrut, 933-942, Société Française de Chimie, Paris.
27. Rantakylä M., Aaltonen O., (1994), Biotechnol. Lett., 16, 825-830.
28. Martins J. F., Carvalho I. B., Sampaio T. C., Borreiros S., (1994), Enzyme Microb. Technol., 16, 785-790.
29. de Phillipi R. P., Moses J. M., (1982), Biotechnol. Bioeng. Symp., 12, 205-219.
30. Brunner G., Kreim K., (1986), Ger. Chem Eng., 9, 246-250.
31. Shimshick E. J., (1983), CHEMTECH, 13, 374-375.
32. Thibault J., LeDuy A., Côté F., (1987), Biotechnol. Bioeng., 30, 74-80.
33. L'Italien Y., Thibault J., LeDuy A., (1989), Biotechnol. Bioeng., 33, 471-476.
34. van Eijs A. M. M., Wokke J. M. P., ten Brink B., (1988), *Preconcentration and Drying of Food Materials*, Ed. S. Bruin, Elsevier, Amsterdam.
35. van Eijs A. M. M., Wokke J. M. P., ten Brink B., Dekker K. A., (1988), Proc. Int. Symp. SC Fluids, Ed. M. Perrut, 799-805, Société Française de Chimie, Paris.
36. Randolph T. W., Blanch H. W., Clark D. S., (1991), *Biocatalysts for Industry*, Ed. J. S. Dordick, 219-237, Plenum Press, New York.

37. Tom J. W., Debenedetti P. G., (1991), *Biotechnol. Prog.*, 7, 403-411.
38. Yeo S. D., Lim G. B., Debenedetti P. G., Bernstein H., (1993), *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 341-346.
39. Krukoniš V., (1984), Paper 140f, AIChE Meeting, San Francisco.
40. Larson K. A., King M. L., (1986), *Biotechnol. Prog.*, 2, 73-82.
41. Tom J. W., Debenedetti P. G., (1991), *J. Aerosol. Sci.*, 22, 555-584.
42. Tom J. W., Lim G. B., Debenedetti P. G., Prud'homme R. K., (1993), *Supercritical Fluid Engineering Science. Fundamentals and Applications*, Eds. E. Kiran, J. F. Brennecke, ACS Symp. Series 514, 238-257, American Chemical Society, Washington, DC.
43. Reverchon E., Della Porta G., Taddeo R., Pallado P., Stassi A., (1995), *Ind. Eng. Chem. Res.*, 34, 4087-4091.
44. Gallagher P. M., Coffey M. P., Krukoniš V. J., Klasutis N., (1989), *Supercritical Fluid Science and Technology*, Eds. K. P. Johnston, J. M. L. Penninger, ACS Symp. Series 406, Chapter 22, American Chemical Society, Washington, DC.
45. Chang C. J., Randolph A. D., Craft N. E., (1991), *Biotechnol. Prog.*, 7, 275-278.
46. Wong J. M., Johnston K. P., (1986), *Biotechnol. Prog.*, 2, 29-39.
47. Kosal E., Lee C. H., Holder G. D., (1992), *J. Supercrit. Fluids*, 5, 169-179.
48. Krukoniš V. J., (1988), *Proc. Int. Symp. SC Fluids*, Ed. M. Perrrut, 541-560, Società Française de Chimie, Paris.
49. Hammam H., S derberg I., Sivik B., (1991), *Fat Sci. Technol.*, 93, 374-378.
50. Hammam H., (1992), *J. Supercrit. Fluids*, 5, 101-106.
51. Yu Z.-R., Rizvi S. S. H., Zollweg J. A., (1992), *J. Supercrit. Fluids*, 5, 123-129.
52. Hammam H., Sivik B., (1991), *Fat Sci. Technol.*, 93, 104-108.
53. Bulley N. R., Labay L., Arntfield S. D., (1992), *J. Supercrit. Fluids*, 5, 13-18.
54. Stahl E., Quirin K. W., (1984), *Pharm. Res.*, 189-194.
55. Weatherley L. R., (1994), *Engineering Processes for Bioseparations*, ed. L. R. Weatherley, 233-257, Butterworth Heinemann, Oxford.
56. Barton P., Hughes R. E., Hussein M. M., (1992), *J. Supercrit. Fluids*, 5, 157-162.
57. Sato M., Goto M., Hirose T., (1995), *Ind. Eng. Chem. Res.*, 34, 3941-3946.
58. Eisenbach W., (1984), *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 88, 882-887.
59. Nilsson W. B., Gauglitz Jr. E. J., Hudson J. K., Stout V. F., Spinelli J., (1988), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65, 109-117.
60. Staby A., (1993), Ph. D. Thesis, Technical University of Denmark, Lyngby.
61. Staby A., Mollerup J., (1993), *Fluid Phase Equilibria*, 91, 349-386.
62. Cygnarowicz-Provost M., O'Brien D. J., Maxwell R. J., Hampson J. W., (1992), *J. Supercrit. Fluids*, 5, 24-30.
63. Schaeffer S. T., Zalkow L. H., Teja A. S., (1989), *Ind. Eng. Chem. Res.*, 28, 1017-1020.
64. Lee H., Hong W.-H., Yoon J.-H., Song K.-M., Kwak S.-S., Liu J.-R., (1992), *Biotechnol. Lett.*, 6, 127-130.
65. Song K.-M., Park S.-W., Hong W.-H., Lee H., Kwak S.-S., Liu J.-R., (1992), *Biotechnol. Prog.*, 8, 583-586.
66. Yanagiuchi M., Kato T., Ueda T., Matubara K., Arai K., Inomata H., Saito S., (1993), *J. Chem. Eng. Japan*, 26, 153-158.
67. Lachowski A. I., Rogut J., Sobik B., (1986), *Chem. Stos.*, 30, 499-507.
68. Ting S. S. T., Macnaughton S. J., Tomasko D. L., Foster N. R., (1993), *Ind. Eng. Chem. Res.*, 32, 1471-1481.
69. Jennings D. W., Deutsch H. M., Zalkow L. H., Teja A. S., (1992), *J. Supercrit. Fluids*, 5, 1-6.
70. Jarz bski A. B., Lachowski A. I., Mašlińska-Solich J., Wenzel H., (1990), *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, 11, 349-354.
71. Jarz bski A. B., Malinowski J. J., Lachowski A., Lorenc J., Bielecki S., Antczak T., Galas E., (1995), *Proc. 7th Europ. Congress on Biotechnol*, Paper MEP 172, Nice.
72. Fages J., Marty A., Delga C., Condoret J. S., Combes D., Frayssinet P., (1994), *Bio-materials*, 15, 650-656.

Application of supercritical fluid technology in bioprocess engineering

Summary

An overview of the prospects for application of supercritical fluid technology in bioprocess engineering is given. Recent investigations on the application of dense gases in biocatalysis, particles formation, separation and purification of biologically active compounds are critically reviewed.

key words:

supercritical fluids, bioprocessing, extraction, enzyme, comminution.

Adres do korespondencji:

Janusz J. Malinowski, Instytut Inżynierii Chemicznej PAN, ul. Bałtycka 5,
44-100 Gliwice.