



## Otrzymywanie i niektóre zastosowania unieruchomionych enzymów

Józef Synowiecki, Sylwia Wołosowska

Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności,  
Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk

### Production and selected applications of immobilized enzymes

#### Summary

The presented data explain why application of immobilized enzyme systems is advantageous in many modern industrial technologies. Also, this review article contains information concerning the main methods developed for enzyme immobilization, as well as characteristic, suitability and properties of different carriers used for these purposes. Furthermore, the influence of immobilization process on changes of enzyme activity, selectivity, stability, conditions of catalysed reaction and other properties important in practical applications are described. Emphasis is placed on the choice of immobilized enzyme system adequate for the designed technology.

#### Key words:

enzyme immobilization, enzyme supports, biocatalysis, biosensors, biofuel cells.

#### Adres do korespondencji

Józef Synowiecki,  
Katedra Chemii,  
Technologii  
i Biotechnologii Żywności,  
Wydział Chemiczny,  
Politechnika Gdańska,  
ul. Gabriela Narutowicza  
11/12,  
80-952 Gdańsk;  
e-mail:  
synowiec@chem.pg.gda.pl

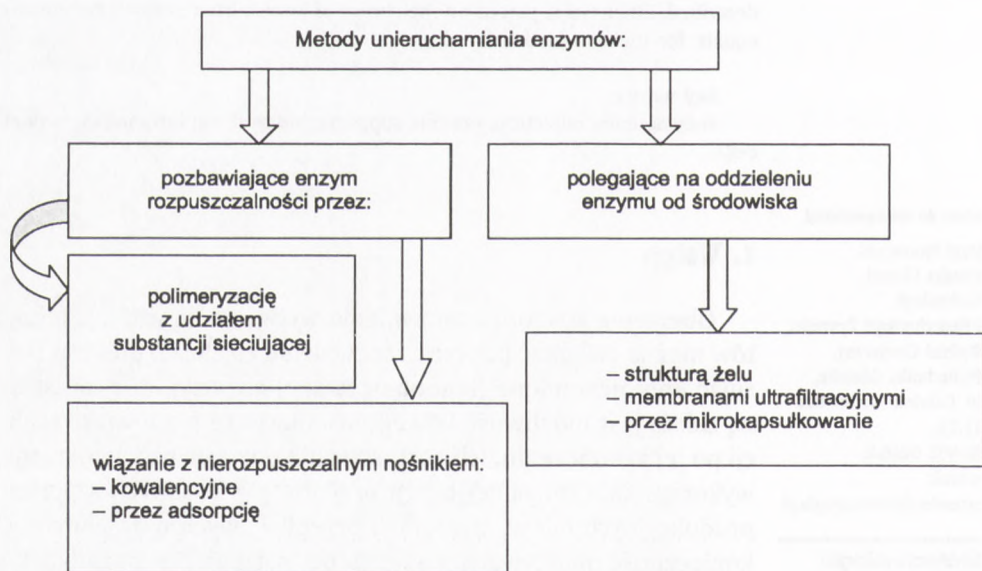
### 1. Wstęp

Obniżenie kosztu i usprawnienie wytwarzania wielu produktów można osiągnąć poprzez zapewnienie ciągłości, procesu stosując unieruchomione (immobilizowane) enzymy, których istotną zaletą jest możliwość łatwego usunięcia ze środowiska reakcji po jej zakończeniu. Ich zastosowanie pozwala na wielokrotne wykorzystanie tej samej porcji preparatu w kolejnych szarżach produkcyjnych lub w reaktorach przepływowych oraz eliminuje konieczność inaktywacji enzymu po osiągnięciu pożądanego stopnia konwersji substratu. Stosowanie unieruchomionych

enzymów jest także korzystne ze względu na lepszą kontrolę warunków reakcji oraz brak zanieczyszczenia produktu enzymem i innymi substancjami pochodzącymi z nisko oczyszczonego preparatu biokatalizatora. W przypadku enzymów proteolitycznych immobilizacja zapobiega ich autodestrukcji, często występującej w roztworach natywnego preparatu (1).

## 2. Sposoby immobilizacji

Immobilizowanymi enzymami są preparaty wytworzone przez połączenie biokatalizatora z nośnikiem nierozpuszczalnym w środowisku reakcji, a także nierozpuszczalne agregaty cząsteczek lub kryształów białka oraz enzymy zamknięte w strukturze żelu lub oddzielone od środowiska reakcji półprzepuszczalnymi membranami (rys. 1). Najwcześniej stosowane sposoby immobilizacji polegały na przyłączeniu enzymu do powierzchni nośnika. Odbывается to przez fizyczną adsorpcję biokatalizatora, wiązanie z udziałem oddziaływań jonowych lub przez wytworzenie wiązań kowalencyjnych (2-4). Jeśli bezpośrednia reakcja pomiędzy białkiem a nośnikiem nie jest możliwa stosuje się substancje posiadające co najmniej dwie grupy chemiczne zdolne do reakcji zarówno z nośnikiem jak i enzymem (5). Zwiększając one odległość pomiędzy cząsteczkami unieruchomionego enzymu a powierzchnią nośnika, co ułatwia dostęp substratu do centrum katalitycznego.



Rys. 1. Główne sposoby immobilizacji enzymów.

W przypadku gdy nie ma potrzeby zbyt trwałego wiązania enzymu jako nośniki można wykorzystać rozmaite sorbenty, których zaletą jest nieskomplikowana procedura immobilizacji oraz możliwość łatwej regeneracji poprzez wymycie nieaktywnego już białka (6). Nie następują też zazwyczaj zmiany struktury cząsteczek enzymu, które mogą spowodować zmniejszenie jego aktywności. Niewielka energia uczestniczących w wiązaniu białka oddziaływań jest jednak przyczyną dość szybkiej desorpcji enzymu podczas działania reaktora.

Silniejsze wiązanie zapewniają oddziaływania jonowe powstające w zakresie pH przy którym zarówno enzym jak i nośnik uzyskują ładunek elektryczny. Jeśli grupy funkcyjne enzymu i nośnika mają ładunek jednakowego znaku do zaistnienia wiązania niezbędne są dwuwartościowe kationy, sprzęgające białko za pośrednictwem mostków solnych. W przypadku stosowania silnych kationitów lub anionitów poszerza to zakres wartości pH przy których następuje jonowe wiązanie enzymu (7). Przykładem tego są nośniki z grupami sulfonowymi, które angażują kationy  $\text{Me}^{2+}$  w wiązanie  $-\text{OSO}_3^- + \text{Me}^+ - \text{OOC}-$  zastępujące bezpośrednie oddziaływanie grup  $-\text{OSO}_3^-$  i  $+ \text{H}_3\text{N}-$  wyeliminowane wskutek zaniku protonowania grup aminowych enzymu.

W celu ograniczenia desorpcji enzymów w środowisku o podwyższonej sile jonnej stosuje się nośniki o dużej gęstości i dostępności ładunku. Wytwarza się je przez pokrycie sorbentu warstwą polietylenoiminy, chitozanu lub innego polimeru (6,8). Unieruchomiona w ten sposób  $\beta$ -galaktozydaza traciła tylko 5% pierwotnej aktywności po inkubacji w 0,4 M roztworze NaCl, podczas gdy enzym zaadsorbowany na DEAE agarozie był w tych warunkach wmywany aż w 70% (6). Zwiększenie energii wiązania i poprawa stabilności preparatu jest skutkiem wielopunktowego oddziaływania enzymu z nośnikiem uzależnionego od gęstości ładunku oraz od wielkości i struktury cząsteczek białka (8). Immobilizację bez udziału wiązań kowalencyjnych z powodzeniem stosowano do unieruchamiania lipaz i innych enzymów katalizujących reakcje w środowisku zawierającym rozpuszczalniki organiczne (1,9,10).

Zmniejszenia aktywności operacyjnej preparatu spowodowanego desorpcją enzymu można uniknąć wykorzystując procedury immobilizacji polegające na wytwarzaniu wiązań kowalencyjnych w warunkach nie powodujących denaturacji białka. Niepożądanemu sprzęganiu enzymu za pośrednictwem reszt aminokwasowych centrum katalitycznego można przeciwdziałać blokując je przed immobilizacją cząsteczkami substratu lub kompetytywnych inhibitorów. Kowalencyjne wiązanie enzymu odbywa się z udziałem białkowych reszt lizyny, argininy, cysteiny, tyrozyny, kwasów glutaminowego i asparaginowego oraz aminokwasów znajdujących się w pozycji N- lub C-terminalnej (5). Zależnie od budowy chemicznej nośnika przeprowadzane są reakcje alkilowania, arylowania diazowania amidowania oraz tworzenia wiązań amidowych lub zasad Schiffa. Niekiedy stosuje się skojarzone metody immobilizacji polegające na tworzeniu odrębnych wiązań kowalencyjnych z grupami funkcyjnymi różnego rodzaju. Taki sposób wykorzystywano np. w celu zwiększenia

ilości lipazy osadzonej na chitozanie. W pierwszym etapie procesu następuje przyłączenie cząsteczki enzymu do grupy hydroksylowej chitozanu aktywowanej 3-dimetyloaminopropylu karbodiimidem (EDC), a w kolejnym sprzęgnięciu następnej cząsteczki lipazy aldehydem glutarowym (11).

Jako nośniki przydatne są m.in. polimery zawierające wolne grupy aminowe, umożliwiające sprzęganie białka enzymatycznego w łagodnych warunkach za pośrednictwem aldehydu glutarowego (12). Jego wadą jest tendencja do tworzenia oligomerów o zróżnicowanej długości cząsteczek, będąca przyczyną niejednakowego oddalenia poszczególnych cząsteczek biokatalizatora od powierzchni nośnika (13). Następuje wskutek tego zróżnicowanie aktywności preparatów wytwarzanych w odrębnych szarach produkcyjnych zależne od pochodzenia, czystości i okresu przechowywania aldehydu.

Nośniki pozbawione grup chemicznych tworzących wiązania kowalencyjne z białkiem lub substancją sprzęgającą, jak np. szkło porowate, żel krzemionkowy, tlenki metali lub rozmaite substancje ceramiczne aktywuje się  $\gamma$ -aminopropylotrietoksyilanem (14,15). Uzyskane pochodne zawierają grupy aminowe umożliwiające przyłączenie enzymu za pośrednictwem aldehydu glutarowego, tiofosgeny, chlorku p-nitrobenzoilu lub bezwodnika bursztynowego (16). Aktywację wymienionych nośników można także osiągnąć stosując  $\text{BCl}_3$  lub  $\text{SiCl}_4$ , a w dalszym etapie alifatyczną diaminę (16). Negatywnym skutkiem kowalencyjnego wiązania enzymu jest zmniejszenie aktywności preparatu spowodowane zmianami struktury cząsteczek białka oraz ograniczeniem dostępu substratu do centrum katalitycznego (17).

Inne sposoby otrzymywania nierozpuszczalnych preparatów enzymów polegają na międzycząsteczkowym usieciowaniu biokatalizatora za pośrednictwem wiązań wytworzonych z substancjami dwufunkcyjnymi, takimi jak aldehyd glutarowy i inne polialdehydy lub kwas bis-diazobenzodysulfonowy. W zależności od sposobu przygotowania białka i warunków sieciowania uzyskiwane są preparaty różniące się aktywnością, termostabilnością, odpornością na działanie substancji denaturujących białka, stopniem uwodnienia, wielkością ziaren i wytrzymałością mechaniczną (1,18).

Sieciowanie białek znajdujących się w roztworze prowadzi do znacznego uwodnienia precipitatu oraz niewielkiej wytrzymałości mechanicznej i zróżnicowanej wielkości ziaren. Immobilizowany w ten sposób enzym charakteryzuje się wprawdzie polepszoną termostabilnością, ale trudno jest wytworzyć preparaty o powtarzalnych właściwościach ze względu na duży wpływ niewielkich nawet zmian stężenia substancji sieciującej oraz pH, temperatury i siły jonowej środowiska reakcji (18). Niekorzystnym skutkiem sieciowania rozpuszczonych białek jest powolna precipitacja wytworzonych agregatów cząsteczek oraz znaczne, niekiedy nawet ponad 50% zmniejszenie aktywności enzymu (18). Lepsze preparaty uzyskiwano natomiast podczas sieciowania kryształów białka lub też agregatów jego cząsteczek strąconych wskutek zmniejszenia solwatacji enzymu lub zmiany stałej dielektrycznej roztworu (19-22).

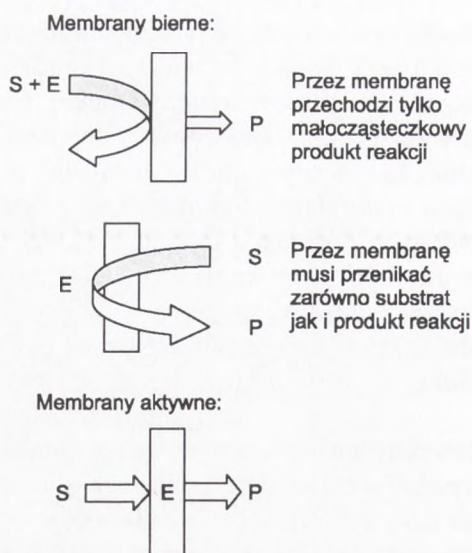
Właściwości katalityczne kryształów białka enzymatycznego agregowanych przeważnie za pomocą aldehydu glutarowego były badane w wielu ośrodkach (19-25). Uzyskane preparaty (CLEC, ang. *Cross-Linked Enzyme Crystals*) składają się z prawie homogennego białka i dzięki temu wykazują dużą aktywność i odporność na działanie czynników denaturujących. Wynika to z licznych oddziaływań elektrostatycznych i hydrofobowych występujących w kryształach. Krystaliczna struktura preparatu utrudnia jego inaktywację spowodowaną degradacją enzymu pod wpływem proteaz znajdujących się w niektórych przetwarzanych surowcach (26). Imobilizowane tym sposobem lipazy z *Candida rugosa* i *Burkholderia cepacia* wykazywały wysoką stereoselektywność w reakcjach hydrolizy oraz zwiększoną aktywność podczas estryfikacji i transestryfikacji prowadzonej w środowisku zawierającym rozpuszczalniki organiczne (27).

Dalsze rozpowszechnienie wymienionej metody immobilizacji nastąpi po polepszeniu sposobów wydajnego uzyskiwania kryształów białek o optymalnym kształcie i wielkości oraz dostępności przenikających ich strukturę kanałów, ułatwiających penetrację roztworu substratu (26). Wadą preparatów tego rodzaju są niewielkie rozmiary cząstek usieciowanych kryształów będące przyczyną zwiększenia oporów przepływu substratu w reaktorach kolumnowych.

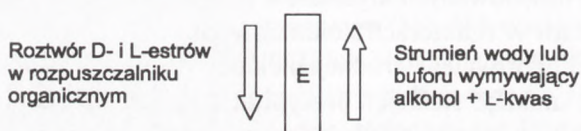
Kosztownej, długotrwałej i trudnej niekiedy do przeprowadzenia krystalizacji enzymów można uniknąć sieciując precypitat strącony uprzednio w niedenaturujących warunkach roztworami soli, rozpuszczalnikami organicznymi, bądź polimerami niejonowymi. Korzystną cechą tak wytworzonych preparatów (CLEA, ang. *Cross-Linked Enzyme Aggregates*) jest możliwość regulacji ich specyficzności poprzez wybór odpowiedniej substancji strącającej i warunków procesu. Wynika to z charakterystycznego i zróżnicowanego wpływu każdego sposobu strącania na strukturę białek w precypitacie, utwaloną następnie wskutek sieciowania preparatu (28,29). Istnieje zatem możliwość uzyskania z tego samego enzymu preparatów o różnym powinowactwie do substratów i odporności na działanie inhibitorów.

Do immobilizacji enzymów można też wykorzystać błony o selektywnej przepuszczalności, spełniające wyłącznie funkcję separacyjną, bądź też zarówno funkcję separacyjną jak i katalityczną (30,31). Aktywność unieruchomionych w ten sposób enzymów zależy głównie od szybkości dyfuzji substratu i produktu reakcji przez stosowane membrany. Nie zawierające enzymu membrany biernie służą do zamknięcia roztworu biokatalizatora w mikrokapsułce lub w module reaktora. Do mikrokapsułkowania konieczne jest stosowanie błon przepuszczających zarówno cząsteczki substratów jak i produktów reakcji. Membrany zatrzymujące tylko cząsteczki substratu są natomiast przydatne do oddzielenia produktów reakcji od zawierającej rozpuszczony enzym mieszaniny reakcyjnej (rys. 2).

Membrany aktywne katalitycznie, które zawierają enzym umiejscowiony w ich strukturze lub osadzone na powierzchni polimeru są często używane do katalizowania reakcji wytwarzających produkty różniące się od substratów rozpuszczalnością w fazie rozpuszczalnika organicznego i wody. Przykładem ich zastosowania jest wy-



Rys. 2. Funkcje membran w reaktorach enzymatycznych (enzym – E, substrat – S, produkt – P).



Rys. 3. Rozdzielanie mieszaniny D- i L-estrów umieszczoną na granicy faz membraną z immobilizowanym, działającym stereoselektywnie enzymem.

odrębnianie jednego ze składników racematu, polegające na katalizowaniu degradacji zbędnego enancjomeru działającym stereoselektywnie enzymem (rys. 3) (32).

Kolejną metodą unieruchamiania enzymów jest pułapkowanie (inkluzyja) w strukturze żelu wytwarzanego po zmieszaniu roztworów enzymu i substancji żelującej. Mała energia oddziaływań wiążących enzym z tworzącym żel polimerem jest przyczyną łatwego wymywania biokatalizatora i dość szybkiego spadku aktywności preparatu. Przechodzenie biokatalizatora do mieszaniny reakcyjnej, może być ponadto przyczyną zmian właściwości produktów spowodowanych niecałkowitym zahamowaniem przebiegu reakcji. W celu ograniczenia wymywania glukoamylazy,  $\beta$ -fruktofuranozydazy i  $\beta$ -amylazy z żelu poliakrylamidowego przeprowadzano polimeryzację inicjowaną promieniowaniem  $\gamma$ . Aktywności wytworzonych w ten sposób preparatów były tylko o 10-20% mniejsze od aktywności wolnych enzymów (33). Często stosowanym czynnikiem sieciującym jest aldehyd glutarowy, który próbowano wykorzystać np. do unieruchamiania  $\beta$ -galaktozydazy z *Aspergillus niger* w żelach alginianowych i żelatynowych. Następowo jednak dość znaczne zmniejszenie aktywności preparatu wynoszące około 44% początkowej wartości (33). Pułapkowanie w żelu nie nadaje się do immobilizacji hydrolaz powodujących degradację jego

składników i nie powinno być stosowane w przypadku gdy substraty lub produkty reakcji z trudnością migrują w strukturze polimeru, np. z powodu zbyt dużej masy cząsteczkowej.

### 3. Zalety i wady unieruchomionych enzymów

Stosowanie immobilizowanych enzymów ogranicza się tylko do substratów występujących w stanie ciekłym lub w formie roztworów. Przyczyną tego jest brak możliwości łatwego oddzielenia biokatalizatora po zakończeniu procesu oraz prawie zupełne zahamowanie reakcji przebiegającej na granicy dwóch faz stałych.

Unieruchomienie enzymu zachodzi zwykle wskutek wytworzenia specyficznych oddziaływań cząsteczek enzymu z matrycą odpowiednio dobranego nośnika. Ubocznym efektem tego procesu jest stabilizacja struktury biokatalizatora przeciwdziałająca niekorzystnemu oddziaływaniu środowiska (5,34). Przejawia się to wzrostem termostabilności preparatu białkowego, jego odporności na warunki hydrofobowe i substancje denaturujące. Innym pozytywnym efektem immobilizacji enzymów jest obniżenie inhibicji produktami oraz zmiana specyficzności względem inhibitorów, spowodowana prawdopodobnie przekształceniami struktury trzeciorzędowej centrum katalitycznego (34).

Negatywną konsekwencją procesu sprzęgania enzymu z nośnikiem jest utrudnienie zmian oscylacyjnych podczas katalizowania reakcji oraz przestrzenne ograniczenie dostępu substratu. Obniżenie aktywności biokatalizatora po unieruchomieniu zależy od rodzaju nośnika, jego porowatości oraz od odległości cząsteczek enzymu od powierzchni nośnika. W przypadku nośników porowatych na aktywność katalityczną preparatu wpływa szybkość dyfuzji substratu do wnętrza sorbentu oraz szybkość dyfuzji produktu do środowiska reakcji (17). Nasilenie oporów dyfuzyjnych spowodowanych dużą lepkością upłynnionej skrobi jest przyczyną ograniczonego użycia immobilizowanych  $\alpha$ -amylaz w produkcji syropów maltodekstrynowych. Negatywne efekty immobilizacji przejawiają się zwykle obniżeniem powinowactwa enzymu do substratu (zwiększenie stałej Michaelisa oraz zmniejszenie  $V_{max}$ ) (17).

Podczas długotrwałego stosowania preparatu immobilizowanego enzymu następuje stopniowe zmniejszanie jego aktywności katalitycznej spowodowane prawdopodobnie częściową desorpcją biokatalizatora lub jego inaktywacją pod wpływem zbyt wysokiej temperatury reakcji lub nieodpowiedniej kwasowości i siły jonowej środowiska. Innymi przyczynami tego procesu mogą być: blokowanie enzymu cząsteczkami produktu, adsorpcja zanieczyszczeń działających jako inhibitory lub też rozwój drobnoustrojów.

Stosowanie kationitów lub anionitów powoduje pozorną zmianę optymalnego pH działania enzymu (35,36). Ładunek powierzchniowy matrycy jest przyczyną gradientu protonów w warstwie granicznej enzym/nośnik. Wskutek tego wartości wy-

znaczone podczas pomiaru optymalnego pH reakcji nie odzwierciedlają rzeczywistego stężenia  $H^+$  w okolicy cząsteczek enzymu (36). Oddziaływania elektrostatyczne z powierzchnią nośnika są też jedną z przyczyn zmniejszenia powinowactwa enzymu do posiadających ładunek elektryczny cząsteczek substratu.

Podstawą dokonania wyboru nośnika i sposobu jego sprzężenia z enzymem powinny być warunki projektowanego procesu i przeznaczenie produktu. Unieruchomione enzymy stosowane do wytwarzania składników żywności nie powinny zanieczyszczać środowiska reakcji nawet śladową ilością substancji o niekorzystnym oddziaływaniu fizjologicznym.

#### 4. Rodzaje nośników i ich przydatność

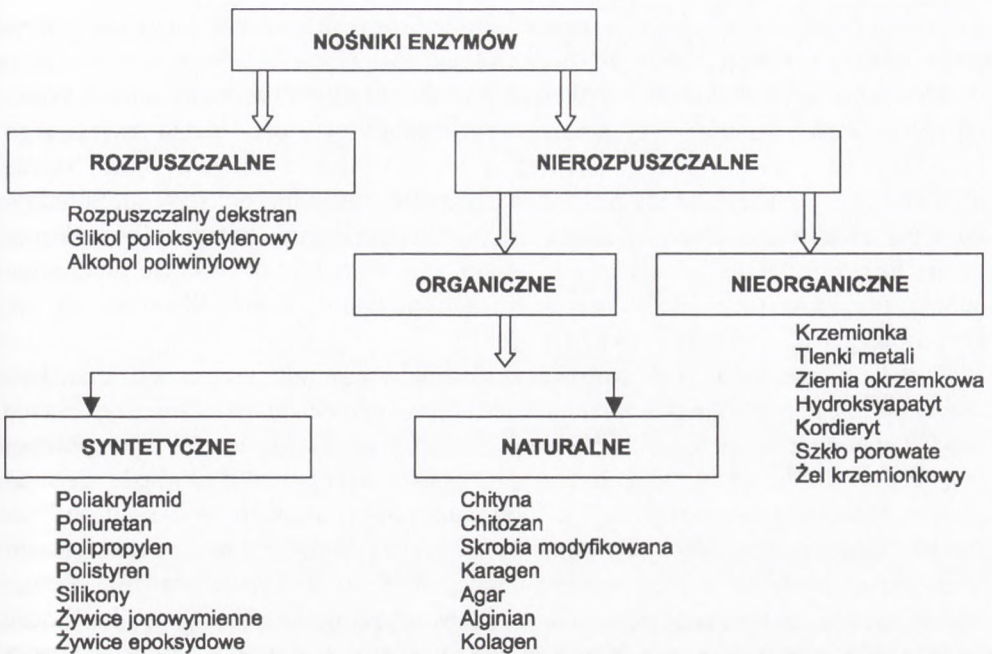
Aktywność, stabilność operacyjna i koszt preparatu immobilizowanego enzymu zależy w dużym stopniu od właściwości nośnika, które powinny być dostosowane do temperatury, kwasowości, lepkości i polarności środowiska reakcji oraz do konstrukcji używanego reaktora. Oceniając przydatność substancji jako nośnika należy uwzględnić jej powierzchnię właściwą, rozmiary ziaren i ich porowatość, wytrzymałość mechaniczną, ilość, dostępność i rodzaj grup funkcyjnych wiążących enzym oraz zawartość grup hydrofilowych i hydrofobowych.

Niekiedy konieczna jest modyfikacja powierzchni nośnika mająca na celu wprowadzenie grup funkcyjnych reagujących z białkiem lub zmianę jej polarności. Można ją przeprowadzić pokrywając nośnik warstwą reagującego z białkiem polimeru lub też wbudowując pożądane grupy chemiczne podczas syntezy nośnika (37). Do immobilizacji enzymów stosowanych w środowisku wodnym przydatne są polimery o właściwościach hydrofilowych. Przykładem zastosowania nośników z ugrupowaniami hydrofobowymi jest natomiast katalizowana lipazami produkcja rozmaitych emulgatorów, środków pianotwórczych, żelujących i surfaktantów (38). Hydrofilowe właściwości lipaz utrudniały przebieg reakcji w środowisku zawierającym apolarnie rozpuszczalniki. Problem ten rozwiązano łącząc lipazę z monomerem winylowym, a następnie sprzęgając uzyskany produkt z hydrofobowym nośnikiem (39).

Aktywność preparatów immobilizowanego enzymu zależy także od struktury nośnika. Zaletą substancji porowatych jest duża powierzchnia kontaktu ze środowiskiem reakcji, umożliwiającą zwiększenie ilości przyłączonych cząsteczek enzymu. Niepożądanym skutkiem wzrostu porowatości jest nasilenie oporów dyfuzyjnych, utrudniających transport substratów i produktów katalizowanego procesu przez warstwę graniczną enzym/środowisko reakcji (17).

Substancje używane do immobilizacji enzymów powinny się charakteryzować stabilnością w warunkach katalizowanej reakcji, odpornością na degradację pod wpływem drobnoustrojów oraz gęstością właściwą i wytrzymałością mechaniczną dostosowaną do rodzaju reaktora. Kształt, gęstość i wielkość ziaren nośnika oraz ich odporność na ścieranie determinują skuteczność i czas oddzielania immobilizo-





Rys. 4. Niektóre nośniki stosowane do unieruchamiania enzymów.

wanego enzymu od cieczy poreakcyjnej w reaktorach ze złożem fluidalnym. Nośniki przeznaczone do wykorzystania w reaktorach kolumnowych powinny natomiast wykazywać wytrzymałość mechaniczną nie dopuszczającą do ich rozkruszenia pod wpływem ciśnienia wywieranego przez strumień substratu.

Nośnikami enzymów mogą być polimery syntetyczne lub naturalnego pochodzenia oraz wiele nieorganicznych adsorbentów, takich jak: szkło porowate (40,41), żel krzemionkowy (42,43), tlenki metali (44,45), glinokrzemiany oraz rozmaite substancje ceramiczne poddawane często modyfikacji mającej na celu wprowadzenie grup funkcyjnych wiążących białko (rys. 4). Produkowane aktualnie nośniki są zazwyczaj nierozpuszczalne. Stosuje się jednak także polimery, których rozpuszczalność zależy od warunków środowiska. Wiązanie białka enzymatycznego z takimi substancjami daje możliwość katalizowania reakcji w fazie ciekłej, a następnie strącenia immobilizowanego biokatalizatora po zakończeniu procesu pod wpływem zmian temperatury, pH lub siły jonowej mieszaniny reakcyjnej. Przykładem tworzywa ulegającego natychmiastowemu strąceniu po przekroczeniu progowej wartości temperatury jest poli-N-izopropylakrylamid (46).

Szybkie przerwanie katalizowanego procesu zapewniają też preparaty enzymów immobilizowanych na ferromagnetycznych nośnikach, usuwanych z cieczy poreakcyjnej pod wpływem pola magnetycznego. Stosuje się w tym celu polimery zawierające pułapkowane cząstki metali lub ich ferromagnetycznych tlenków albo granu-

le tlenków tych metali aktywowanych  $\gamma$ -aminopropylotrietoksylanem lub pokrytych warstwą substancji wiążącej białka (45).

Liczną grupą produkowanych obecnie nośników są syntetyczne polimery i kopolimery o właściwościach i pojemności enzymatycznej (ilości białka związanego przez jednostkę masy nośnika) dostosowanych do projektowanego procesu. Należą do nich m.in. poliakryloamidy poliamidy, rozmaite pochodne polistyrenu, poliakrylonitrylu lub alkoholu poliwinylowego oraz zawierające grupy bezwodnikowe kopolimery bezwodnika maleinowego z etylenem albo styrenem (47-50). Do unieruchamiania enzymów przez kopolimeryzację z odpowiednimi prepolimerami są np. przydatne żywice poliuretanowe.

Podjęto także wiele prób stosowania nośników naturalnego pochodzenia, których zaletą jest niski koszt i wyeliminowanie niebezpieczeństwa zanieczyszczenia produktu pozostałościami substancji służących do wytwarzania syntetycznych polimerów. Wykorzystuje się w tym celu rozmaite polisacharydy, białka i związki nieorganiczne, takie jak szkło porowate i żel krzemionkowy oferowany w handlu pod nazwami: Spherosil, Promaxon lub Aerosil (5,16,51). Dostępny jest także żel krzemionkowy aktywowany przez producenta  $\gamma$ -aminopropylotri-etoksylanem (16). Wymienione nośniki wytwarzane sposobami zapewniającymi kontrolowaną liczebność i rozmiary porów, nie ulegają degradacji w szerokim zakresie pH i temperatury oraz są odporne na mikrobiologiczną degradację.

Dobrze zbadanym i łatwo dostępnym nośnikiem jest chitozan zawierający grupy aminowe, wiążące enzym za pośrednictwem wiązań jonowych lub wiązań kowalencyjnych wytwarzanych z udziałem aldehydu glutarowego. Skuteczność immobilizacji zależy od zawartości wolnych grup aminowych, którą można regulować zmianami stężenia, temperatury i czasu oddziaływania roztworu NaOH powodującego deacetylację chityny (51,52). Wadą chitozanu jako nośnika jest rozpuszczalność w kwaśnym środowisku. Ułatwia to jednak formowanie ziaren lub błon chitozanych, polegające na strącaniu wymienionego biopolimeru z roztworu przeniesionego do alkalicznego środowiska. Rozpuszczalność tak uformowanego nośnika można następnie ograniczyć przez sieciowanie aldehydem glutarowym lub innymi substancjami.

## 5. Przykłady zastosowań w przemyśle

Jednym z wcześniejszych zastosowań immobilizowanego enzymu było wydzielenie L-aminokwasów polegające na hydrolizie tylko jednej N-acetylowej pochodnej znajdującej się w racemicznej mieszaninie N-acetylowanych aminokwasów. Reakcję katalizowano działającą stereoselektywnie aminoacylazą unieruchomioną na złożu DEAE-Sephadex, a uwolniony L-aminokwas oddzielano od cieczy poreakcyjnej przez krystalizację (53). Preparaty immobilizowanych enzymów charakteryzujących się stereospecyficznością mają duże znaczenie w przemyśle farmaceutycznym. Wynika

to z bardzo zróżnicowanego niekiedy oddziaływania fizjologicznego poszczególnych enancjomerów stosowanej jako lek substancji, powodującego konieczność usunięcia niepożądanego składnika.

Innym przykładem zastosowań w przemyśle farmaceutycznym jest produkcja kwasu 6-aminopenicylinowego wytwarzanego z penicyliny w procesie katalizowanym immobilizowaną amidazą penicylinową z *Escherichia coli* lub *Bacillus megaterium*. Zainstalowane w firmie Rohm Co. reaktory przetwarzają w każdej szarzy produkcyjnej około 2 ton substratu. Stosowane do katalizowania procesu 300-gramowe porcje preparatu enzymatycznego zawierające około 20 g unieruchomionego białka charakteryzują się dużą stabilnością operacyjną, umożliwiającą 1000-krotne ich użycie (54,55).

Immobilizowaną izomerazę ksylozową stosuje się od dość dawna w przepływowych reaktorach służących do wytwarzania fruktozy. Produkowane obecnie preparaty umożliwiają konwersję około 45% glukozy znajdującej się w roztworze substratu (4,56,57). Wydajności procesu nie można zwiększyć ze względu na inaktywację enzymu w temperaturze przekraczającej 55-60°C oraz z powodu wzrastającego zanieczyszczenia wytwarzanego syropu produktami reakcji Maillarda (57). Oddzielenie pozostałości glukozy odbywa się w kolumnie z kationitem adsorbującym fruktozę z której jest ona następnie wmywana wodą. Preparaty immobilizowanej izomerazy glukozy są zazwyczaj eksploatowane przez 200-400 dni (58). Okres ten ulega skróceniu w przypadku gdy nie usunięto pozostałości białek z przetwarzanego syropu glukozy lub z powodu mikrobiologicznego zanieczyszczenia reaktora. Zmniejszenie aktywności preparatu następuje także pod wpływem jonów  $Ca^{2+}$  działających jako inhibitor enzymu (58). Chromatograficznego wzbogacania produktu można uniknąć w przypadku znalezienia izomerazy o lepszej termostabilności, umożliwiającej zwiększenie stopnia konwersji przez podniesienie temperatury (59,60). Enzym ten powinien być ponadto aktywny w lekko kwaśnym środowisku ograniczającym niepożądane reakcje uboczne.

Wiele uwagi poświęcono badaniom przydatności immobilizowanych  $\beta$ -galaktozydaz do wytwarzania produktów mlecznych przeznaczonych dla ludzi cierpiących na nietolerancję laktozy lub syropów glukozy-galaktozowych z permeatu serwatki. Stosowano w tym celu  $\beta$ -galaktozydazy z różnych źródeł unieruchomione na chitynie, chitozanie, rozmaitych sorbentach lub syntetycznych polimerach (6,62-65). Znaczenie tych badań wynika z konieczności zagospodarowania około 5 mln ton laktozy rocznie, pochodzącej z serowarstwa i produkcji kazeiny (64). Innym korzystnym skutkiem hydrolizy laktozy jest wyeliminowanie jej oddziaływania na jakość produktów, wynikającego z krystalizacji w obniżonej temperaturze, higroskopijności i zdolności do adsorbowania niepożądanych substancji zapachowych. Zastąpienie preparatów unieruchomionej  $\beta$ -galaktozydazy, stosowanych obecnie w ograniczonym zakresie do wytwarzania pozbawionego laktozy mleka i serwatki, ich odpowiednikami zawierającymi enzym pochodzący z psychrofilii ograniczy ryzyko mikrobiologicznego zanieczyszczenia reaktora i cieplnej destrukcji termolabilnych skład-

ników produktu. Preparaty tego rodzaju nie są jeszcze produkowane na skalę przemysłową. Opracowano jednak skuteczny sposób immobilizacji  $\beta$ -galaktozydazy z antarktycznej bakterii *Pseudoalteromonas* sp. 226 na chitozanie. Uzyskany biokatalizator charakteryzuje się dobrą stabilnością operacyjną i umożliwia konwersję ponad 90% znajdującej się w mleku laktozy po 24 godz. hydrolizy w temperaturze 4°C (64).

Prowadzone są obecnie badania preparatów immobilizowanej syntazy trehalozy (66). Enzym ten przekształcając występujące w maltozie wiązania  $\alpha$ -1,4-glikozydowe umożliwia produkcję trehalozy ( $\alpha$ -D-glukopiranozylo-1,1- $\alpha$ -glukopiranozydu) z łatwo dostępnych syropów maltozowych (66-68). Uzyskany disacharyd jest cennym produktem przydatnym w lecznictwie, przetwórstwie żywności oraz kosmetyce i farmacji (69). Nie udało się jeszcze uzyskać satysfakcjonującej wydajności procesu, bo zbadane dotychczas preparaty syntazy trehalozy z *Thermus caldophilus*, immobilizowanej na nośniku Eupergit C250L katalizowały w optymalnych warunkach konwersję około 42% maltozy znajdującej się w środowisku reakcji (66).

Duże znaczenie praktyczne ma zastosowanie unieruchomionych hydrolaz glikozydowych i enzymów modyfikujących lub tworzących wiązania glikozydowe do syntezy oligosacharydów o korzystnych właściwościach funkcjonalnych, leczniczych i prebiotycznych (70,71). Immobilizowane fruktozylotransferazy są m.in. stosowane w instalacjach przemysłowych służących do produkcji fruktoooligosacharydów z sacharozy (72-74). Skład mieszaniny oligosacharydów wytwarzanej z udziałem unieruchomionych biokatalizatorów zależy od rodzaju enzymu i nośnika, czasu kontaktu substratu ze złożem oraz temperatury reakcji. Immobilizacja stabilizuje strukturę enzymu i zapobiega spadkowi aktywności w środowisku rozpuszczalników, dodawanych czasami w celu obniżenia aktywności wody, a w konsekwencji przyspieszenia transglikozylacji lub odwrotnej hydrolizy. Innym korzystnym skutkiem immobilizacji niektórych hydrolaz glikozydów jest intensyfikacja reakcji odwrotnej hydrolizy i zwiększenie wydajności syntezy oligosacharydów (70). Do katalizowania tego procesu szczególnie przydatne są enzymy termostabilne, działające w podwyższonej temperaturze powodującej zmniejszenie lepkości stężonych roztworów cukrów (40).

Duże perspektywy ma zastosowanie immobilizowanych lipaz katalizujących reakcje hydrolizy, estryfikacji, transestryfikacji i regioselektywnej acylacji (39). Ich zaletą jest znaczna aktywność katalityczna w środowisku rozpuszczalników organicznych i na granicy faz różniących się polarnością. Opracowano wiele sposobów immobilizacji lipaz od których wyboru zależy aktywność, specyficzność i stabilność operacyjna biokatalizatora (10,75-77). Niektóre z tych preparatów są już stosowane w przemyśle do produkcji strukturyzowanych lipidów, leków, substancji smakowo-zapachowych i emulgatorów (39). Przykładem strukturyzacji lipidów jest wytwarzanie substytutu masła kakaowego. Opatentowany przez firmy Unilever i Fui Oil proces polega na enzymatycznej transestryfikacji olejów: palmowego, słonecznikowego lub oliwkowego z udziałem tristearynoiloglicerolu jako donora grup acylo-

wych (78,79). Immobilizowaną lipazę z *Rhizomucor miehei* zastosowano w koncernie Unichem International do wytwarzania estrów kwasów tłuszczowych (emolientów) służących w kosmetyce do pielęgnacji skóry (80,81). Preparat zaadsorbowanej na celicie lipazy z *Rhizopus arrhizus* okazał się natomiast przydatny do produkcji monoacylogliceroli wykorzystywanych jako emulgatory oraz środki pianotwórcze i żelujące (82). Spośród wielu możliwych zastosowań immobilizowanych lipaz należy wyróżnić prowadzoną w apolarnym środowisku syntezę estrów sacharydów używanych jako biodegradowalne surfaktanty oraz wytwarzanie nadkwasów RCOOH z kwasów karboksylowych utlenianych nadkwasem wodoru (39,83). Duże znaczenie praktyczne może też mieć przejawiana przez unieruchomione lipazy zdolność katalizowania reakcji przebiegających w środowisku płynów nadkrytycznych (SCF). Przeprowadzone w tym zakresie badania dotyczyły m.in. wytwarzania czystego enancjomerycznie ibuprofenu stosowanego jako lek przeciwzapalny i przeciwbólowy (84).

Unieruchomioną papainę, pepsynę lub neutrazę stosuje się w celu zapobiegania zmętnieniu piwa podczas przechowywania chłodniczego. Wymienione proteazy hydrolizują znajdujące się w piwie białka wytwarzając oligopeptydy i wolne aminokwasy mniej podatne na tworzenie kompleksów z polifenolami strącających się w obniżonej temperaturze (4).

Zdolność proteaz do katalizowania w pewnych warunkach syntezy wiązania amidowego wykorzystano w procesie przemysłowego wytwarzania aspartamu. Główni producenci tej niekalorycznej substancji słodzącej stosują preparaty unieruchomionej termolizyny z *Bacillus thermoproteolyticus* (85). Syntetyzowany enzymatycznie dipeptyd zbudowany jest wyłącznie z kwasu L-asparaginowego i metylowego estru L-fenyloalaniny i nie zawiera reszt aminokwasowych o innej konfiguracji, powodujących ograniczenie słodkości aspartamu wytwarzanego metodami chemicznymi (54).

Procesy enzymatyczne okazały się też przydatne do produkcji akrylamidu  $\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$  z akrylonitrylu  $\text{CH}_2\text{CHCN}$  i wody (54). Związek ten stosowany jako prekursor rozmaitych polimerów i flokulantów wytwarzano metodami chemicznymi, których wadą są niepożądane reakcje uboczne. Znacznie większą czystość produktu zapewnia proces katalizowany hydratazą nitrylową z *Rhodococcus rhodochrous* wykorzystywany obecnie do produkcji akrylamidu w skali ponad 15 000 ton rocznie (54).

Odmiennym sposobem wykorzystania enzymów unieruchomionych w mikrokapsułkach jest ich użycie jako komponenta proszków do prania. Otoczka mikrokapsułki służy w tym przypadku jako bariera zabezpieczająca enzym przed inaktywującym oddziaływaniem innych składników detergentu podczas jego przechowywania i powinna ulegać destrukcji po wprowadzeniu środka piorącego do wody.

## 6. Przydatność immobilizowanych enzymów w analityce

Enzymy wchodzą w skład układu detekcyjno-pomiarowego kilku typów biosensorów charakteryzujących się dużą czułością, szybkością pomiaru i łatwością użycia. Są one przydatne do oznaczania cukrów, aminokwasów, kwasów karboksylowych, mocznika, polifenoli, pestycydów i wielu innych małowcząsteczkowych analitów w mieszaninie różnych, często podobnych pod względem budowy chemicznej substancji. Ze względu na rodzaj generowanego sygnału biosensory enzymatyczne można podzielić na: elektrochemiczne, optyczne i termiczne (86).

Biosensory elektrochemiczne zawierają enzym osadzony na powierzchni czujnika przetwarzającego zmiany zawartości substratu lub produktu katalizowanej reakcji na proporcjonalne zmiany potencjału elektrody, natężenia prądu pomiędzy elektrodami referencyjną i pomiarową lub przewodności elektrycznej środowiska (87). Jeśli powstający produkt nie pobudza detektora stosuje się kilka immobilizowanych enzymów katalizujących następujące kolejno reakcje, aż do powstania substancji wywołującej sygnał. Biosensor przeznaczony do oznaczania sacharozy zawiera na przykład  $\beta$ -fruktofuranozydazę katalizującą hydrolizę disacharydu oraz oksydazę glukozową utleniającą wytworzoną w poprzedniej reakcji glukozę pod wpływem tlenu. Zawartość sacharozy wyznacza się pośrednio mierząc stężenie nadtlenu wodoru lub jonów wodorowych uwolnionych podczas dysocjacji kwasu glukonowego albo przez pomiar ubytku tlenu zużywanego do utlenienia glukozy (88,89).

Do odrębnej grupy klasyfikuje się biosensory z osadzonymi na powierzchni czujnika komórkami drobnoustrojów lub fragmentami tkanek roślinnych lub zwierzęcych. Są one *sensu stricte* biosensorymi katalitycznymi ze względu na zaangażowanie aparatu enzymatycznego immobilizowanych komórek do generowania sygnału czujnika. Procesy metaboliczne zachodzące w komórkach są przyczyną spadku stężenia tlenu w ich otoczeniu lub wydzielania substancji o właściwościach elektrolitu (jak np. kwas mlekowy), powodujących wzrost mierzonego konduktometrycznie przewodnictwa próbki. Mikrobiologiczne biosensory są mniej wrażliwe na zmiany temperatury i pH próbek od elektrod z immobilizowanymi enzymami i charakteryzują się dłuższym okresem eksploatacji. Ich wadą jest jednak mniejsza selektywność oraz dość duże opóźnienie reakcji czujnika (90).

Biosensory elektrochemiczne zawierają zazwyczaj enzymy wytwarzające substancje, które w środowisku wodnym występują w postaci jonów. Tak działają np. elektrody służące do oznaczania mocznika, których potencjał zmieniają kationy  $\text{NH}_4^+$  powstające pod wpływem ureazy (91). Drugą grupą często używanych biokatalizatorów są oksydoreduktazy stosowane w elektrodach służących do amperometrycznego pomiaru stężenia analitu. W przypadku immobilizacji oksydoreduktaz ważne jest zapewnienie transportu elektronów pomiędzy cząsteczkami enzymu a elektrodą. Przeprowadza się w tym celu modyfikację powierzchni czujnika substancjami pośredniczącymi w przekazywaniu elektronów lub pułapkuje się enzym

w polimerach redoksowych tworzących warstwę oddzielającą wewnątrz elektrody od analizowanej próbki (92).

Selektywność i powtarzalność pomiarów zależy głównie od specyficzności immobilizowanego enzymu, ale można ją dodatkowo zwiększyć oddzielając enzym od roztworu próbki membranami o selektywnej przepuszczalności ograniczającymi dostęp substancji przeszkadzających lub pokrywając enzymem elektrody jonoselektywne. Nowsze generacje czujników elektrochemicznych zawierają enzym immobilizowany na membranie mającej kontakt z bazą tranzystora polowego. Zmiana potencjału bazy wywołana jonami generowanymi podczas katalizowanej reakcji wywołuje zależne od stężenia analitu zmiany natężenia prądu przepływającego przez tranzystor (86,93).

Biosensory z przetwornikami amperometrycznymi lub potencjometrycznymi służą m.in. do oznaczania różnych składników i zanieczyszczeń żywności. Elektrody z unieruchomionymi oksydoreduktazami stosuje się np. do pomiaru zawartości etanolu i kontroli przebiegu fermentacji piwa i wina (94). Skonstruowano też analizatory przydatne do określania świeżości ryb, wykorzystując w tym celu immobilizowaną 5'nukleotydazę, fosforylaze nukleotydów i oksydazę ksantynową lub oksydazy umożliwiające oznaczenie zawartości histaminy, putrescyny i kadaweryny (94). Zmiany przewodnictwa elektrycznego pod wpływem wytwarzanych przez drobno-ustroje metabolitów wykorzystano w zestawach używanych do pomiaru zanieczyszczenia mikrobiologicznego żywności przekraczającego  $10^6$  komórek/ml (86,95).

W biosensorach katalitycznych można wykorzystać enzymy generujące substancje nie nadające się do oznaczenia metodami elektrochemicznymi. Źródłem sygnału odzwierciedlającego stężenie analitu są w tym przypadku przetworniki optyczne lub kalorymetryczne. Do pomiarów kalorymetrycznych stosuje się termistory z unieruchomionym na ich powierzchni enzymem, które mierzą zmiany temperatury spowodowane wydzielaniem ciepła katalizowanej reakcji. Niedogodnością tych urządzeń jest duży wpływ ewentualnych strat ciepła na dokładność pomiarów bardzo małych zmian temperatury, rzędu  $0,005-0,03^{\circ}\text{C}$  (96).

Immobilizowane biokatalizatory znajdują się też w biosensorach optycznych służących do pomiaru stężenia analitu na podstawie wywołanych reakcją enzymatyczną zmian luminescencji, fluorescencji lub absorpcji promieniowania UV-VIS (97). Zaletą takich biosensorów jest możliwość badania próbek o bardzo małej objętości. Umożliwia to miniaturyzacja sondy, którą stanowi końcówka światłowodu z unieruchomionym enzymem. Na drugim końcu światłowodu znajduje się natomiast system detekcji analizowanego promieniowania oraz źródło promieniowania wzbudzającego fluorescencję lub światła niezbędnego do spektrofotometrycznego pomiaru zmian stężenia chromoforów, zanikających lub wytwarzanych podczas reakcji enzymatycznej. Sonda niektórych biosensorów optycznych zawiera oprócz immobilizowanego enzymu luminofory emitujące promieniowanie pod wpływem produktów reakcji lub mikroorganizmy przejawiające zdolność do bioluminescencji (86,98). Biosensory optyczne są m.in. przydatne do oznaczeń związków biologicznie czyn-

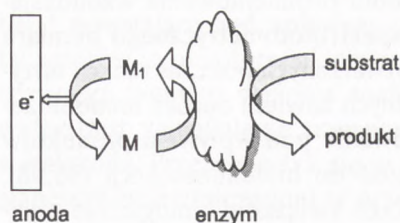
nych i aktywności enzymów oraz do śledzenia przebiegu procesów biochemicznych związanych np. z przemianami ATP i NADH (86).

## 7. Bioogniwa

Drobnoustroje lub immobilizowane oksydoreduktazy są wykorzystywane w ogniwach paliwowych wytwarzających energię elektryczną z alkoholi, kwasu mlekowego, glukozy lub innych substratów (99-101). Zasilane etanolem ogniwo paliwowe zawiera np. dehydrogenazę alkoholową unieruchomioną na złotej folii pełniącej funkcję anody. Izolacyjne właściwości białka praktycznie uniemożliwiają bezpośrednią wymianę elektronów pomiędzy elektrodą, a centrum katalitycznym enzymu. Konieczne jest zatem stosowanie substancji pośredniczących (mediatorów) ulegających pod wpływem enzymu utlenianiu albo redukcji (rys. 5). Stosuje się w tym celu fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, błękit metylenowy lub inne substancje, których wybór zależy od rodzaju używanej oksydoreduktazy (102). Skutkiem utlenienia alkoholu jest redukcja mediatora, regenerującego się po przekazaniu pobranego elektronu na anodę. Kationy  $H^+$  uwalniane podczas reakcji przenikają przez przepuszczalną dla protonów membranę do przestrzeni katodowej, gdzie łączą się z tlenem atmosferycznym, który przejmując elektrony dopływające przez obwód zewnętrzny redukuje się do jonu tlenkowego, a ten łączy się z protonami tworząc wodę (102). Katalizatorem tej reakcji jest np. wykonana z platyny katoda. Zasilane etanolem ogniwo paliwowe wytwarza siłę elektromotoryczną 0,34 V przy gęstości prądu  $0,53 \mu A/cm^2$  elektrody (103).

Opracowano już wiele typów elektrod różniących się rodzajem immobilizowanej oksydoreduktazy i mediatora (104). Są one przydatne w miniaturowych ogniwach paliwowych dostarczających energii dla telefonów komórkowych i przenośnych komputerów. Ogniwa zasilane znajdującą się we krwi glukozą mogą być wykorzystane w medycynie, np. do zasilania rozruszników serca lub monitorowania stanu fizjologicznego organizmu. Anoda tych ogniw zawiera oksydazę glukozową immobilizowaną na warstwie polimeru o właściwościach oksydacyjnoredukcyjnych (104).

Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe składają się też z odrębnych przedziałów anodowego i katodowego oddzielonych przepuszczalną dla jonów membraną. W przedziale anodowym odbywa się przeprowadzana w warunkach beztlenowych hodowla względnego tlenowca. Wskutek braku tlenu elektrony wytwarzane w pro-



Rys. 5. Schemat przekazywania elektronu z substratu na elektrodę enzymatycznego ogniwa paliwowego (M - zregenerowana forma mediatora).



cesie glikolizy substratu, są podczas fosforylacji przenoszone na wprowadzony do podłoża hodowlanego zewnętrzny akceptor elektronów (mediator), którym może być: żelazicyjanek potasu, fiolet metylowy, czerwień obojętna, kwasy huminowe lub 2-hydrokso-1,4-naftochinon (105,106). Podobnie jak w ogniwach enzymatycznych, transfer elektronów na anodę wywołuje regenerację mediatora, co umożliwi ponowne jego wykorzystanie. Stosowanie mediatora jest zbędne w przypadku *Shewanella putrefaciens*, *Aeromonas hydrophila* i innych bakterii korzystających z energii uzyskiwanej podczas redukcji związków Fe(III) (107,108). Cytochromy tych mikroorganizmów są wbudowane w błonę komórkową i mogą przekazywać elektrony bezpośrednio na anodę ogniwa (109). Jednym z wielu możliwych zastosowań mikrobiologicznych ogniw paliwowych jest ich wykorzystanie do otrzymywania energii elektrycznej z rozmaitych substancji odpadowych i ścieków.

## 8. Podsumowanie

Dalszy postęp w zakresie stosowania immobilizowanych enzymów będzie prawdopodobnie polegał na szerszym niż dotychczas wykorzystaniu mało dotychczas poznanych enzymów z ekstremofili, działających w warunkach umożliwiających opracowanie nowych lub udoskonalenie dotychczas istniejących technologii. Rozpowszechni się też stosowanie enzymów o strukturze udoskonalonej metodami inżynierii genetycznej w celu poprawienia ich aktywności, specyficzności, termostabilności i odporności na działanie czynników denaturujących białka oraz enzymów z sekwencjami aminokwasów wprowadzonymi w celu ułatwienia immobilizacji. Duże znaczenie będzie miało sprzęganie białka z polimerami, których właściwości można regulować pod wpływem odpowiednich bodźców wywieranych na środowisko reakcji.

## Literatura

1. Tischer W., Kasche V., (1999), TIBTECH, 17, 326-335.
2. Goldstein L., (1970), Methods Enzymol., 19, 935-995.
3. Melrose G., (1971), Rev. Pure Appl. Chem., 21, 83-98.
4. Kilara A., Shahani K. M., (1979), Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 12(2), 161-197.
5. Tischer W., Wedekind F., (1999), Topics Cur. Chem., 200, 97-126.
6. Pessela B. C., Fernandez-Lafuente R., Fuentes M., Vian A., Garcia J. L., Carrascosa A. V., Mateo C., Guisan J. M., (2003), Enzyme Microb. Technol., 32, 369-374.
7. Batista-Viera F., Manta C., Carlson J., (1994), Appl. Biochem. Biotechnol., 44, 1-14.
8. Pessela B. C., Torres R., Fuentes M., Mateo C., Filho M., Carrascosa A. V., Vian A., Garcia J. L., Guisan J. M., Fernandez-Lafuente R., (2004), Biotech. Prog., 20, 1507-1511.
9. Balcao V. M., Paiva A. L., Malcata F. X., (1996), Enzyme Microb. Technol., 18, 392-397.
10. Malcata F. X., Reyes H. R., Garcia H. S., Hill C. G., Amundson C. H., (1992), Enzyme Microb. Technol., 14, 426-446.
11. Hung T. C., Giridhar R., Chiou S. H., Wu W. T., (2003), J. Molec. Catalysis, 26, 69-78.

12. Richards M., Knowles J. R., (1968), *J. Mol. Biol.*, 37, 232-247.
13. Muzzarelli R. A. A., (1977), *Chitin*, Pergamon Press, New York, Toronto, 131-137.
14. Haller W., (1983), *Solid phase biochemistry*, in: *Analytical and Synthetic Aspects*, Ed. Scouten W. H., Wiley, New York, 535-599.
15. Weetal H. H., Filbert A. M., (1974), *Methods Enzymol.*, 34, 59-78.
16. Łobazewski J., Ginalska G., (1994), *Biotechnologia*, 1(24), 44-63.
17. Aiba S., Humprey A. E., Mills N. F., (1973), *Immobilized enzymes*, in: *Biochemical Engineering*, University of Tokyo Press, 421-444.
18. Cao L., van Langen L., Sheldon R. A., (2003), *Cur. Opin. Biotechnol.*, 14, 387-394.
19. Haring D., Schreier P., (1999), *Cur. Opin. Chem. Biol.*, 3, 35-38.
20. Margolin A. L., (1996), *Trends Biotechnol.*, 14, 223-240.
21. Cao L., van Langen L. M., van Rantwijk F., Sheldon R. A., (2001), *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 11, 665-670.
22. Lopes-Serrano P., Cao L. M., van Rantwijk F., Sheldon R. A., (2002), *Biotechnol. Lett.*, 24, 1379-1383.
23. St Clair N. L., Navia M. A., (1992), *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 7314-7316.
24. Noritomi H., Koyama K., Kato S., Nagahama K., (1998), *Biotech. Technol.*, 12, 467-469.
25. Visuri K., Oastrinen O., Wu X. Y., Maekinen K., Leisola M., (1999), *Biotechnol. Bioeng.*, 64, 377-380.
26. Turkiewicz M., Makowski K., (2004), *Biotechnologia*, 3(66), 129-139.
27. Khalaf N., Govardhan C. P., Lalonde J. J., Persihetti R. A., Wang Y. F., Margolin A. L., (1996), *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 5494-5495.
28. Cao L., van Langen L. M., van Rantwijk F., Sheldon R. A., (2001), *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 11, 665-670.
29. Tomimatsu Y., Jansen E. F., Gaffield W., Olson A. C., (1971), *J. Colloid Interface Sci.*, 36, 51-64.
30. Ceynowa J., (1994), *Biotechnologia*, 24, 64-77.
31. Chang H. N., Furusaki S., (1991), *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 44, 27-64.
32. Tosa T., Mori T., Fuse N., Chibata I., (1967), *Biotechnol. Bioeng.*, 9, 603-615.
33. Tanriseven A., Dogan S., (2002), *Process Biochem.*, 38, 27-30.
34. Pessela B. C., Mateo C., Fuentes M., Vian A., Garcia J. L., Carrascosa A. V., Guisan J. M., Fernandez-Lafuente R., (2003), *Enzyme Microb. Technol.*, 33, 199-205.
35. Schmidtke J. L., Wescott C. R., Klibanov A. M., (1996), *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 3360-3365.
36. Goldstein L., (1976), *Methods Enzym.*, 44, 397-414.
37. Mateo C., Abian O., Fernandez-Lafuente R., Guisan J. M., (2000), *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 509-515.
38. Bednarski W., Adamczak M., (2005), *Właściwości lipaz i ich zastosowanie, w: Enzymatyczna modyfikacja składników żywności*, Kołakowski E., Bednarski W., Bielecki S., (red), Warszawa, Szczecin.
39. Pilarek M., Szewczyk K. W., Wrona M., (2002), *Biotechnologia*, 2(57), 146-164.
40. Ettalibi M., Baratti J. C., (2001), *Enzyme Microb. Technol.*, 28, 596-601.
41. Robinson P. J., Dunnill P., Lilly M. D., (1971), *Biochim. Biophys Acta*, 242, 659-661.
42. Burteau N., Burton S., Crichton R. R., (1989), *FEBS Lett.*, 258, 185-189.
43. Synowiecki J., Wołosowska S., (2006), *Enzyme Microb. Technol.*, 39, 1417-1422.
44. Bouin J. C., Atallah M. T., Hultin H. O., (1976), *Biotechnol. Bioeng.*, 18, 179-187.
45. Varlan A. R., Sansen W., van Loey A., Hendrick M., (1996), *Biosensors Bioelectronics*, 11(4), 443-447.
46. Park T. G., Hoffman A. S., (1990), *Biotechnol. Bioeng.*, 35, 152-159.
47. Ginalska G., Belcarz A., Łobazewski J., Wolski T., (1999), *Biotechnologia*, 44, 226-237.
48. Manecke G., (1972), *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 3, 185-187.
49. Bryjak J., Kolarz B. N., (1998), *Biochemistry*, 33, 409-417.
50. Katchalski-Katzir E., Kraemer D. M., (2000), *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 10, 157-176.
51. Synowiecki J., Sikorski Z. E., Naczek M., (1982), *Food Chem.*, 8, 239-246.
52. Maciuńska J., Scibisz M., Synowiecki J., (2000), *J. Food Biochem.*, 24, 299-310.
53. Chibata I., Tosa T., (1977), *Adv. Appl. Microbiol.*, 22, 1-12.
54. Katchalski-Katzir E., (1993), *Trends Biotechnol.*, 11, 471-478.
55. Self D. A., Kay G., Lilly M. D., Dunnill P., (1969), *Biotechnol. Bioeng.*, 11, 337-345.
56. Crabb D. W., Mitchinson C., (1997), *TIBTECH*, 15, 349-353.

57. Synowiecki J., (2007), The use of starch processing enzymes in the food industry, in: *Industrial Enzymes*, Eds. Polaina J., Mac Cabe A., Springer, Dordrecht, the Netherlands, 19-34.
58. Novozymes application sheet, Starch/2002-01443-04, Use of Sweetzyme IT in the production of high fructose syrup.
59. Gomes J., Steiner W., (2004), *Food Technol. Biotechnol.*, 42, 223-235.
60. Vieille Z., Zeikus G. J., (2001), *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 65, 1-43.
61. Katchalski E., Silman I. H., Goldman R., (1971), *Adv. Enzymol. Mol Biol.*, 34, 445-458.
62. Whetal H. H., Havewala N. B., Pitcher H. W., Detor C. C., Vonn W. P., Yavergaum S., (1974), *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 95-108.
63. Pessela B. C., Mateo C., Fuentes M., Vian A., Garcia J. L., Carrascosa A. V., Guisan J. M., Fernandez-Lafuente R., (2003), *Enzyme Microb. Technol.*, 33, 199-205.
64. Turkiewicz M., Białkowska A., Tkaczuk K., Kałużewska M., Makowski K., Cieśliński H., Wanarska M., Kur J., Bujnicki J. M., (2005), *Antarktyczna  $\beta$ -galaktozydaza – właściwości i wykorzystanie w hydrolizie laktozy*, w: *Enzymatyczna modyfikacja składników żywności*, Kołakowski E., Bednarski W., Bielecki S. (red.), Warszawa, Szczecin, 397-414.
65. Greenberg N. A., Mahoney R. R., (1981), *Proc. Biochem.*, 2-8.
66. Co Y. J., Park O. J., Shin H. J., (2006), *Enzyme Microb. Technol.*, 39, 108-113.
67. Gainnesi G. C., Polizeli M., Terenzi H. F., Jorge J. A., (2006), *Proc. Biochem.*, 41, 1729-1735.
68. Zdziebło A., Synowiecki J., (2006), *Food Chem.*, 96, 8-13.
69. Richards A. B., Krakowska S., Dexter L. B., Schmid H., Wolterbbeck A. P. M., Waalkens-Berendsen D. H., Arai S., Kurimoto M., (2002), *Food Chem. Toxicol.*, 40, 871-898.
70. Olesienkiewicz A., Grajek W., (2005), *Enzymatyczna synteza oligosacharydów*, w: *Enzymatyczna modyfikacja składników żywności*, Kołakowski E., Bednarski W., Bielecki S., (red.), Warszawa, Szczecin, 431-449.
71. Krastanov A., Blazheva D., Yanakieva I., Kratchanova M., (2006), *Enzyme Microb. Technol.*, 39, 1306-1312.
72. Yun J. W., (1996), *Enzyme Microb. Technol.*, 19, 107-117.
73. Yun J. W., Jung K. H., Jeon Y. J., Lee J. H., (1992), *J. Microb. Biotechnol.*, 2, 98-101.
74. Yun J. W., Jung K. H., Oh J. W., Lee J. H., (1990), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 24/25, 299-308.
75. Balcao V. M., Paiva A. L., Malcata F. X., (1996), *Enzyme Microb. Technol.*, 18, 392-416.
76. Lalonde J., (1997), *CHEMTECH*, 38-45.
77. Cao L., Bornscheuer U. T., Schmid R. D., (1999), *J. Mol. Catal. B, Enzym.*, 6, 279-285.
78. Matsuo T., Sawamura N., Hashimoto Y., Hoshida W., (1981), US Patent 4268527.
79. Macrae A. R., (1983), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60, 291-294.
80. Vulfson E. N., (1994), *Industrial application of lipases*, in: *Lipases, Structure, Biochemistry and Applications*, Eds. Wooley P., Petersen S. P., Cambridge University Press, 271-278.
81. Salka B. A., (1997), *Cosmetics Toiletries*, 112, 101-105.
82. Millqvist A., (1994), *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 1042-1047.
83. Adelhorst K., (1990), *Synthesis*, 2, 112-115.
84. Rantakyla M., Aaltonen O., (1994), *Biotechnol. Lett.*, 16, 825-830.
85. Ajinomoto Coop. Inc., (1985), Japan Patent 60-62998.
86. Mello L. D., Kubota L. T., (2002), *Food Chem.*, 77, 237-256.
87. Thevenot D. R., Toth K., Durst R. A., Wilson G. S., (2001), *Biosensor Bioelectronics*, 16, 121-131.
88. Davis J., Vaughan D. H., Cardosi M. F., (1995), *Enzyme Microb. Technol.*, 17, 1030-1035.
89. Updike S. J., Hicks G. P., (19967), *Nature*, 214(5092), 986.
90. Phadke R. S., (1992), *Biosystems*, 27, 203-206.
91. Guilbault G. G., Montalvo J. G., (1970), *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 2533-2536.
92. Leman J., (1998), *Materiały kongresowe Food Nutrition and Health*, Warszawa, 274-279.
93. Desphande S. S., Rocco R. M., (1994), *Food Technol.*, 48, 146-150.
94. Jędrychowski L., Leman J., (2001), *Biotechnologiczne metody analizy żywności*, w: *Biotechnologia żywności*, Bednarski W., Rejs A., (red.), WNT, Warszawa.
95. Ivnitski D., Hamid I. A., Atanasov P., Wilkins E., (1999), *Biosensors Bioelectronics*, 14, 599-624.

96. Wagner G., Schmid R. D., (1990), *Food Biotechnol.*, 4, 215-240.
97. Seitz W. R., (1988), *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, 19, 135-173.
98. Mehrvar M., Bis C., Scharer J. M., Mao-Young M., Luong J. H. T., (2000), *Anal. Sci.*, 26, 677-692.
99. Bardea A., Katz E., Buckmann A. F., Willner I., (1997), *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 9114-9122.
100. Katz E., Shipway A. N., Willner I., (2003), *Biochemical fuel cells*, in: *Handbook of Fuel Cells-Fundamentals, Technology and Applications*, Eds. Vielstich W., Gasteiger H. A., Lamm A., Wiley and Sons, Ltd., New York.
101. Garza L. G., Jeong P. A., Liddell T., Sotomura T. A., Moore A. L., Gust D., (2003), *J. Phys. Chem.*, 107, 10252-10273.
102. Bullen R. A., Arnot T. C., Lakeman J. B., Walsh F. C., (2005), *Biosensors Bioelectronics*, 21, 2015-2045.
103. Chen T., Barton S. C., Binyamin G., Gao Z., Zhang Y., Kim H. H., Heller A., (2001), *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 8630-8631.
104. Materiały konferencyjne, *Biofuel Cells*, (2005), Division of Fuel Chemistry, Washington D.C.
105. Bennetto H. P., Stirling J. L., Tanaka K., Vega C. A., (1983), *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 559-568.
106. Allen R. M., Bennetto H. P., (1993), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 39/40, 27-40.
107. Kim H. J., Park H. S., Hyun M. S., Chang I. S., Kim M., Kim B. H., (2002), *Enzyme Microb. Technol.*, 30, 145-152.
108. Pham C. A., Jung S. J., Phung N. T., Lee J., Chang I. S., Kim B. H., Chun J., (2003), *FEMS Microb. Lett.*, 223, 129-134.
109. Myers C. R., Myers J. M., (1992), *J. Bacteriol.*, 174, 3429-3438.