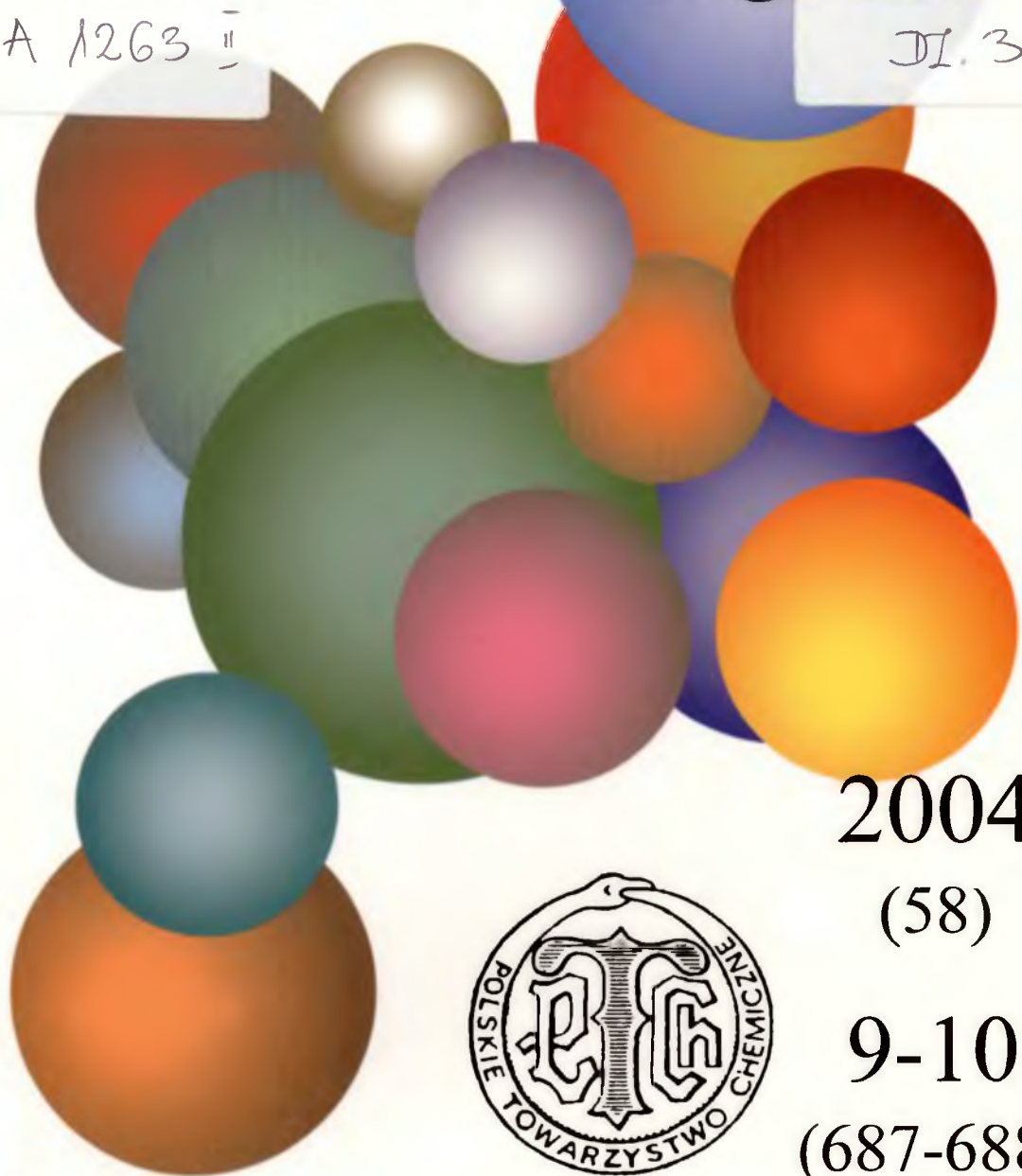


WIADOMOŚCI *chemiczne*

A 1263 II

II.3



2004

(58)

9-10

(687-688)



CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana przez KBN

RADA REDAKCYJNA

RYSZARD ADAMIAK, JERZY BŁAŻEJOWSKI, JÓZEF CEYNOWA,
JACEK GAWROŃSKI, JACEK KIJEŃSKI, TADEUSZ M. KRYGOWSKI,
JACEK MŁOCHOWSKI, PIOTR PANETH, LEONARD M. PRONIEWICZ,
WŁADYSŁAW RUDZIŃSKI, STANISŁAW SŁOMKOWSKI, JAN ZAWADIAK

Z REDAKCJĄ STALE WSPÓŁPRACUJĄ

HENRYK GALINA (Rzeszów), MAREK K. KALINOWSKI (Warszawa),
BENIAMIN LENARCIK (Bydgoszcz), ZOFIA LIBUŚ (Gdańsk), JAN MAŁYSZKO (Kielce),
BOGDAN MARCINIEC (Poznań), ZOFIA MICHAŁSKA (Łódź),
ROMAN MIERZECKI (Warszawa), WŁADYSŁAW RUDZIŃSKI (Lublin),
ZOFIA STASICKA (Kraków), JAN SZYMANOWSKI (Poznań), JÓZEF ŚLIWIOK (Katowice)

KOMITET REDAKCYJNY

BOGDAN BURCZYK, JERZY P. HAWRANEK, ADAM JEZIEŃSKI, ADOLF KISZA,
LUDWIK KOMOROWSKI, ZDZISŁAW LATAJKA, PRZEMYSŁAW MASTALERZ,
IGNACY Z. SIEMION, MIROSLAW SOROKA, MARIA SUSZYŃSKA

REDAKTOR NACZELNY

JÓZEF J. ZIÓLKOWSKI

SEKRETARZ REDAKCJI

KRYSTYNA MARKSOWA

Korespondencję należy kierować pod adresem:

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
tel. 375 73 89, tel./fax 322 14 06

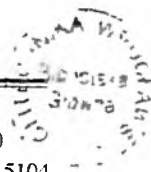
INTERNET (English abstracts) <http://www.chem.uni.wroc.pl/wiadchem.htm>

© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, Wrocław 2004

ISSN 0043-5104

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy we wrześniu 2004

Przygotowanie do druku i druk: Firma Wydawnicza K-2, ul. Konopnickiej 6, 00-491 Warszawa, tel./fax: (22) 628-97-66



IMMOBILIZACJA ENZYMÓW. CZĘŚĆ 1: METODY KONWENCJONALNE

ENZYMES IMMOBILISATION. PART 1: CONVENTIONAL METHODS

Jolanta Bryjak

*Inżynierii Chemicznej, Politechnika Wroclawska,
ul. Norwida 4/6, 50-373 Wrocław*

Abstract

Wstęp

1. Immobilizacja enzymów
2. Podział metod immobilizacji enzymów
 - 2.1. Preparaty rozpuszczalne w wodzie lub rozpuszczalnikach organicznych
 - 2.2. Preparaty nierozpuszczalne w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych
 - 2.2.1. Zamykanie enzymów w fazie nierozpuszczalnej. 2.2.1.1. Zamknięcie w sieci polimeru, 2.2.1.2. Otoczkowanie (okładowanie), 2.2.1.3. Zamykanie w mikro(makro)kapsułkach, 2.2.1.4. Zamykanie w mikro(makro)emulsjach stabilizowanych surfaktantami
 - 2.2.2. Związanie enzymu z powierzchnią nośnika. 2.2.2.1. Adsorpcja, 2.2.2.2. Wiązanie z udziałem metali przejściowych, 2.2.2.3. Wiązanie wykorzystujące specyficzne powinowactwo, 2.2.2.4. Wiązanie kowalencyjne, 2.2.3. Sieciowanie enzymu, 2.2.3.1. Sieciowanie białka w formie rozpuszczalnej, 2.2.3.2. Sieciowanie agregatów, 2.2.3.3. Sieciowanie kryształów
3. Mieszane metody immobilizacji enzymów
4. Właściwości preparatów immobilizowanych
5. Dobór metody immobilizacji
6. Zastosowania immobilizowanych enzymów
 - 6.1. Przemysł
 - 6.2. Biosensory
 - 6.3. Zastosowania biomedyczne

Podsumowanie

Dr Jolanta Bryjak jest absolwentką Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. W latach 1983–1985 pracowała na stanowisku młodszego asystenta w Laboratorium Centralnym Państwowego Szpitala Klinicznego nr 1 we Wrocławiu, a następnie, jako samodzielny biolog, w Zakładzie Inżynierii Bioprocessowej w Instytucie Inżynierii Chemicznej i Urządzeń Ciepłych Politechniki Wrocławskiej. W roku 1990 uzyskała tytuł doktora nauk technicznych i od 1991 roku pracuje jako adiunkt w Zakładzie Inżynierii Bioprocessowej na Wydziale Chemii Politechniki Wrocławskiej. W latach 1994–2003 odbyła staże zagraniczne w University of Calabria; University of Bath; Stuttgart University; Slovak Technical University.

Zajmuje się stabilizacją i immobilizacją enzymów, procesami membranowymi w oczyszczaniu białek i w prowadzeniu procesów enzymatycznych, badaniami kinetyki procesów enzymatycznych i inaktywacji z udziałem enzymów natywnych i immobilizowanych oraz matematycznym modelowaniem procesów, wykorzystującym metody klasyczne i sztuczne sieci neuronowe. Jest współautorką lub autorką 43 publikacji, głównie w języku angielskim, oraz 23 artykułów zamieszczonych w materiałach konferencyjnych.

ABSTRACT

Attractive features of biological systems include versatility, substrate selectivity, regio-, chemo-, and enantioselectivity as well as catalysis at ambient temperatures and pressure. However, the challenge facing bioprocesses is cost competitiveness with existing chemical process assets. The current expansion of industrial biocatalysis can be attributed to recent progress in molecular biology, advanced instrumentation, and engineering. Novel catalyst formulation based on technology such as directed evolution and enzyme immobilisation, has resulted in improved types of highly active and stable biocatalysts.

In industrial biotransformations the immobilisation of enzymes on/in support is often chosen to enhance the stability and to simplify the biocatalyst recovery. The main purpose of this paper is to present a general picture of the immobilization techniques that is organised according to the two categories of methods, i.e., conventional methods (Part 1) and immobilisation in membrane reactors (Part 2).

The intention of the first part is outline the common procedures that span from binding on carrier materials to incorporation into *in situ* prepared matrix in which binding forces vary between weak adsorption and covalent binding. Although the development of suitable immobilisation protocol often follows empirical guidelines, some general rules to facilitate proper applications are also presented. Immobilisation of enzymes means a deliberate restriction of the mobility of the enzyme, which can also affect mobility of the solutes. Thus it is mandatory to have basic knowledge of the essential contribution of the chemical forces and the physicochemical interactions during heterogeneous catalysis that is also discussed. Finally, the technological developments in the field of immobilised biocatalysts are presented that show possibility of a wide and more economical exploitation of enzymes in industry, medicine, and in the monitoring devices like the biosensors.

WSTĘP

Enzymy, w porównaniu z katalizatorami chemicznymi, charakteryzują się wysoką aktywnością w relatywnie niskich temperaturach (30–110°C) oraz unikalną specyficznością substratową, co wskazuje na potencjalne możliwości ich wykorzystania jako katalizatorów, regulatorów czy biosensorów. Jednak, mimo że w bazach komputerowych jak BioCatalysis (www.accelrys.com) w 2003 roku przedstawiono około 36000 reakcji prowadzonych przez enzymy, analogi enzymów, przeciwciała katalityczne i komórki, tylko niewielka ich część znalazła zastosowanie w skali przemysłowej. Wynika to w znacznym stopniu z wymogów, jakie stawia się preparatom enzymatycznym: wysoka aktywność, odpowiednia specyficzność i wysoka stabilność w warunkach procesowych, czyli niska podatność na: inaktywację w obecności mieszania lub dużych przepływów, wahania wartości pH, obecność enzymów proteolitycznych czy podwyższoną temperaturę. Nie bez znaczenia są też problemy z otrzymaniem preparatu handlowego, stabilnego w warunkach przechowywania i transportu. To spowodowało, że od wczesnych lat 80. notuje się wzrost zainteresowania mechanizmami inaktywacji enzymów i metodami ich stabilizacji.

Systematyczne i celowe próby zwiększenia stabilności enzymów w znacznej mierze wynikają z wniosków wyciągniętych z obserwacji naturalnego środowiska enzymów i pozwalają wyróżnić cztery grupy technik stabilizujących aktywność enzymów [1, 2]:

- stabilizacja w obecności związków wysokocząsteczkowych (białka, lipidy, polisacharydy) lub niskocząsteczkowych, jak np. poliaminy;
- wielopunktowe interakcje lub związanie z membranami biologicznymi, zmniejszające ruchliwość konformacyjną białka;
- posttranslacyjna modyfikacja białek u *Eucaryota*, najczęściej poprzez glikozylację seryny, treoniny, asparaginy lub przez przyłączenie lipidu;
- wprowadzenie zmian w sekwencji aminokwasów lub/oraz usztywnienie konformacji przestrzennej białka, oparte na analizie porównawczej enzymów podobnych funkcjonalnie ale pochodzących z mikroorganizmów mezofilowych, termofilowych i ekstremotermofilowych.

Badania nad stabilizacją enzymów objęły zarówno zwiększenie ich trwałości podczas przechowywania jak i w warunkach procesowych, ze szczególnym uwzględnieniem podwyższonych temperatur. Atrakcyjność procesów w temperaturach powyżej 55°C wynika przede wszystkim ze wzrostu szybkości reakcji zgodnie z prawem van't Hoffa, przesunięcia równowagi termodynamicznej w kierunku produktów w reakcjach endotermicznych, wzrostu rozpuszczalności substratu, spadku lepkości mieszaniny reakcyjnej, redukcji rozwoju mikroorganizmów i łatwości zatrzymania reakcji przez obniżenie temperatury [3]. Wiele metod stabilizacji aktywności enzymów jest konsekwencją licznych zalet reakcji prowadzonych w rozpuszczalnikach organicznych, co jednak wymusza konieczność zwiększenia ich trwałości i rozpuszczalności w emulsjach i rozpuszczalnikach organicznych. W chwili obecnej sposoby

pozyskiwania enzymów o wydłużonym czasie połowicznego zaniku aktywności można podzielić na pięć grup [4–14]:

1. Poszukiwanie producentów stabilnych enzymów, głównie mikroorganizmów żyjących w ekstremalnych warunkach jak źródła geotermalne, zbiorniki paliw, błota solankowe [6, 15, 16];

2. Dodatek związków stabilizujących enzymy specyficznie lub niespecyficznie. Są to substraty, inhibitory, kofaktory [7, 15, 17, 18]; rozpuszczalniki organiczne w wysokich (> 99%) lub niskich (< 30%) stężeniach w medium reakcyjnym [15, 18, 19]; dodatek soli nieorganicznych lub wymrażanie z solami [10, 19–21], dodatek związków jonowych jak dialkiloimidazol czy aminy czwartorzędowe [22–24]; dodanie polimerów naturalnych [3, 6, 7, 25–27], syntetycznych [6, 7, 9, 25, 26, 29–31] czy surfaktantów [3]; dodanie niskocząsteczkowych związków organicznych, głównie polialkoholi [3, 25, 26, 29, 32, 33];

3. Modyfikacje chemiczne: monofunkcyjne podstawienie białek, np.: aminokwasem lub jego polimerem [15, 17, 34]; modyfikowanie białek np.: przez tworzenie pochodnych alkilowych, wiązanie oktanolu, alkoholu dodecyłowego, glicerolu, kwasów organicznych, w tym tłuszczowych [15, 34–36]; łączenie (sieciowanie) istniejących grup funkcyjnych białka, zlokalizowanych wewnątrz cząsteczki lub na jego powierzchni, dwufunkcyjnymi reagentami [3, 36–38]; glikozylacja mono- i oligosacharydami oraz podstawienie polisacharydami jak dekstran, lewan, chitozan, pochodne celulozy [29, 39, 40]; modyfikacje chemiczne polimerami syntetycznymi jak poli(kwas akrylowy), poli(glikol etylenowy) i ich pochodne [40–46]; tworzenie wiązań kowalencyjnych pomiędzy podjednostkami enzymu, najczęściej poprzez generowanie wiązań peptydowych z wykorzystaniem karbodiimidu [16, 34, 35, 47];

4. Produkcja i modyfikacja enzymów metodami inżynierii genetycznej poprzez: klonowanie enzymów termostabilnych [3]; usuwanie fragmentów białka bogatych w glicynę [48]; mutacje punktowe i wielopunktowe [11, 13, 49], powodujące zmianę ładunku powierzchni [14], wprowadzające dodatkowe mostki disiarczkowe i solne [11, 13, 50], optymalizujące upakowanie, stabilizację α -helis i redukcję powierzchniowych pętli peptydowych [51]; zmiany specyficzności istniejących stabilnych enzymów [12, 52, 53];

5. Immobilizacja enzymów, najczęściej rozumiana jako przeprowadzenie rozpuszczalnego w wodzie białka enzymatycznego w formę nierozpuszczalną, o zmniejszonej ruchliwości konformacyjnej i często zwiększonej stabilności. Zwykle immobilizacja, jako technika stabilizacji aktywności, podwyższa odporność na temperaturę, zmiany wartości pH, na czynniki denaturujące (ze szczególnym uwzględnieniem rozpuszczalników organicznych) i obniża podatność na działalność enzymów proteolitycznych.

Dobór odpowiedniej metody efektywnej stabilizacji danego enzymu odbywa się najczęściej metodą prób i błędów. Jednak obecnie, wraz ze wzrostem danych o sekwencji aminokwasowej enzymów, wspartym grafiką komputerową, można często przewidzieć skutki wprowadzanych zmian w białku i jego środowisku. Z tych badań

wynika kilka interesujących wniosków [8, 11, 12, 13, 17, 51, 52, 54–56]. Po pierwsze, bardziej opłaca się stabilizować/modyfikować dobrze poznane enzymy, a po drugie jest niezmiernie trudno otrzymać enzymy znacząco stabilniejsze niż w temperaturze, w której zostały wyprodukowane przez mikroorganizm. Wzrost stabilności jest zwykle jednoznaczny ze spadkiem szybkości reakcji w podwyższonych temperaturach (zmniejszona ruchliwość konformacyjna) i po czwarte, łączenie kilku metod stabilizacji często powoduje sumowanie się efektów.

Znaczący postęp w technikach stabilizacji aktywności enzymów spowodował, że część z nich jest wystarczająco tania i stabilna, aby wykorzystywać je w formie natywnej. Najlepszymi przykładami są procesy upłynniania i scukrzania skrobi (α - β - i glukoamylazy), produkcja L-aminokwasów (aminoacylaza), synteza kwasu *N*-acetyloneuraminowego (epimeraza), produkcja aspartamu (subtylizyna, termolizyna), produkcja insuliny ludzkiej ze zwierzęcej (trypsyna, karboksypeptydaza B), produkcja inhibitorów proteaz (subtylizyna), usuwanie nadtlenu wodoru (katalaza) czy produkcja feromonów, amfetaminy, leków na nadciśnienie, przeciwpadaczkowych, obniżających stężenie cholesterolu, inhibitorów proteaz (dehydrogenazy: mleczanowa, leucynowa, alkoholowa, łączone z dehydrogenazą mrówczanową lub glukozową celem regeneracji kofaktora NAD^+ [57]). Jednakże, dla znacznej części procesów enzymatycznych, wysoki koszt otrzymania i oczyszczania biokatalizatora, trudności w odzyskaniu enzymu z mieszaniny reakcyjnej lub/oraz wysoki koszt oczyszczania produktu z przymieszek białkowych, a także wrażliwość enzymów na podwyższoną temperaturę i obecność rozpuszczalników organicznych powoduje, że proces enzymatyczny staje się nieopłacalny ekonomicznie. Część z tych problemów można rozwiązać, stosując immobilizację enzymów.

1. IMMOBILIZACJA ENZYMÓW

Zgodnie z podstawową definicją immobilizacji, którą zaproponował w 1971 roku E. Katchalski-Katzir [2], enzym można uważać za immobilizowany, jeżeli zlokalizowany w ściśle określonej przestrzeni obszaru reakcyjnego, jest zdolny przejawiać swoją aktywność i może być wykorzystany ponownie lub w sposób ciągły. Definicja ta, wskazująca na możliwość obniżenia kosztów procesu poprzez wielokrotne użycie preparatu enzymatycznego lub możliwość jego zastosowania w procesie ciągłym, a także zmniejszenia kosztów oczyszczania produktów finalnych od białka enzymatycznego, nie ujmuje zagadnień związanych ze stabilizacją aktywności enzymu. Obecna tendencja, zmierzająca do otrzymywania preparatów immobilizowanych i o zwiększonej stabilności powoduje, że granice między immobilizacją i stabilizacją ulgają zatarciu i zasadniczo przeważa pogląd, że głównym celem immobilizacji jest otrzymanie preparatu o zwiększonej termostabilności i stabilności operacyjnej, a zastosowane rozwiązania aparaturowe zapewniają jego odzysk lub proces w trybie ciągłym [58].

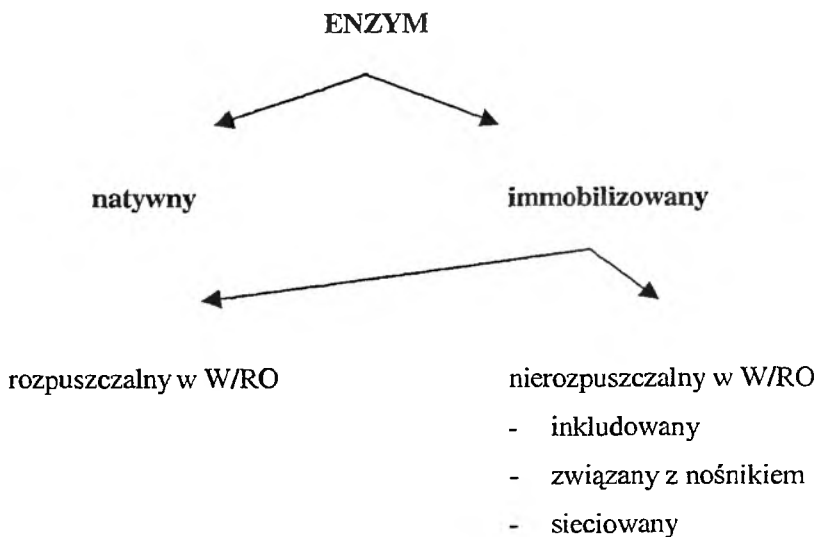
Jakkolwiek zwiększenie stabilności enzymu nie jest inherentnym elementem immobilizacji, to w większości badanych przypadków preparaty immobilizowane warunkiem ten spełniają, głównie za sprawą szeroko rozumianego terminu „stabilizacja”. I tak, jeżeli na skutek procedur immobilizacji enzym posiada zmniejszoną podatność na agregację lub/ oraz autolizę, atak enzymów drobnoustrojowych, inhibicję czy inaktywację w obecności czynników denaturujących, to jest uznawany za preparat stabilizowany.

2. PODZIAŁ METOD IMMOBILIZACJI ENZYMÓW

W praktyce stosowane są dwie podstawowe formy enzymów. I tak biokatalizator może występować w stanie natywnym, ewentualnie w obecności stabilizatorów, takich jak sole czy polimery, a samo białko jest zwykle zmodyfikowane metodami inżynierii genetycznej lub/ oraz chemicznymi. Druga forma to preparat immobilizowany, który również może być uprzednio poddany stabilizacji i stosowany z dodatkiem stabilizatorów, a dodatkowo spełnia warunki podstawowej definicji immobilizacji, czyli może być wielokrotnie użyty lub jego forma umożliwia prowadzenie procesu ciągłego, lub występuje w ściśle zdefiniowanym miejscu w reaktorze, lub można go łatwo wydzielić z mieszaniny reakcyjnej.

Podział metod immobilizacji nie jest ustalony, głównie za sprawą wprowadzania nowych procedur i technik mieszanych, a także stosowania rozpuszczalników organicznych i technik separacji membranowej. Nie ma również zgodności w zaliczaniu danej procedury jako sposobu immobilizacji lub stabilizacji. W niniejszym opracowaniu starano się przedstawić wszystkie główne sposoby immobilizacji, zaznaczając, na ile i kiedy dany sposób zwiększa stabilność enzymu, a także, które z elementów podstawowej definicji są przez rozpatrywane metody spełniane. Jednocześnie, ze względu na rozwiązania aparaturowe i tendencję przedstawiania metod immobilizacji z wykorzystaniem technik membranowych w formie odrębnych opracowań [59–65]), enzymatycznym reaktorom membranowym poświęcono drugą część opracowania.

Przed wszystkim, enzymy immobilizowane można podzielić na dwie zasadnicze grupy (Rys. 1): rozpuszczalne i nierozpuszczalne w wodzie lub rozpuszczalniku organicznym. Otrzymywanie preparatów nierozpuszczalnych w wodzie (i w ograniczonym stopniu w rozpuszczalnikach organicznych) można zaliczyć do klasycznych metod immobilizacji enzymów. Natomiast preparaty rozpuszczalne częściej można zaklasyfikować jako uznana od lat metoda stabilizacji enzymów. Dokładniejsze informacje na temat poszczególnych metod przedstawiono poniżej.



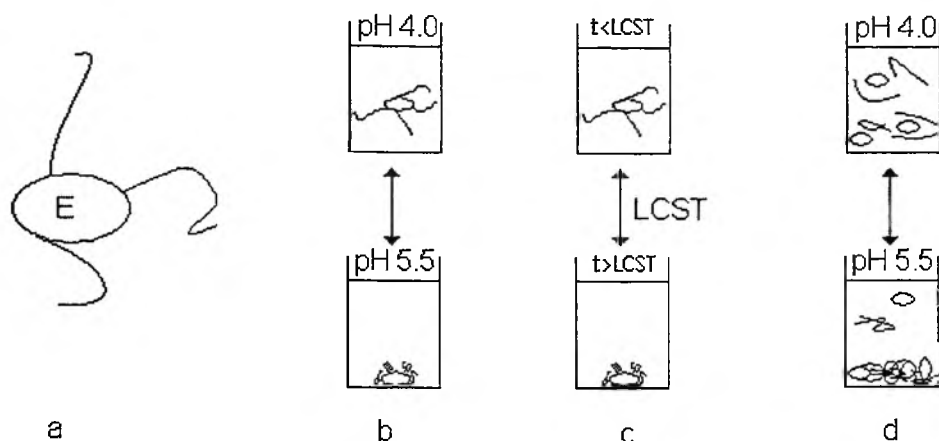
Rysunek 1. Podział głównych metod immobilizacji enzymów.
W – woda, RO – rozpuszczalnik organiczny

2.1. PREPARATY ROZPUSZCZALNE W WODZIE LUB ROZPUSZCZALNIKACH ORGANICZNYCH

Najczęstszym sposobem otrzymywania stabilniejszego enzymu, rozpuszczalnego w wodzie, jest kowalencyjne przyłączenie do powierzchniowo usytuowanej reszty lizyny polimerów syntetycznych, jak poli(*N*-winylopirolidon), poli(glikol ctylenowy) lub ich pochodne [28, 41, 43, 46, 66, 67], lub polimerów naturalnych, jak pochodne celulozy, dekstran, spolimeryzowana sacharoza, lewan, chitozan [39, 66–69] (Rys. 2 a). Ta technika immobilizacji, częściej zaliczana do technik stabilizacji, pozwala otrzymać preparaty o podwyższonej stabilności, odporne na podwyższoną temperaturę i obecność surfaktantów [41]. Przykładami tak immobilizowanych enzymów może być trypsyna i chymotrypsyna [43, 66, 67, 69], β -amylaza i pullulanaza [68], ligninaza [46], lizozym [66], L-asparaginaza [39] czy lipaza [5, 28, 41, 66]. Daje się zauważyć, że w przypadku preparatów rozpuszczalnych w wodzie najczęściej znajdują one zastosowanie w produkcji detergentów i w hydrolizie substratów wielkocząsteczkowych. Natomiast odzysk enzymu z mieszaniny poreakcyjnej jest trudny, jakkolwiek zwiększenie masy cząsteczkowej enzymu lub zmniejszenie jego rozpuszczalności w wodzie może ułatwić separację preparatu z mieszaniny poreakcyjnej. O zmianie stabilności i rozpuszczalności enzymu decyduje rodzaj użytego polimeru i stopień podstawienia białka.

Powyższa metoda, zastosowana w modyfikacji lipaz, esteraz oraz niektórych proteaz i dehydrogenaz, ma przede wszystkim za zadanie zwiększenie stabilności i rozpuszczalności enzymów w rozpuszczalnikach organicznych [70, 71]. Ponieważ

podobne efekty zwiększenia stabilności i dyspersji enzymu w rozpuszczalniku osiąga się, stosując preparaty enzymatyczne liofilizowane w obecności soli organicznych i nieorganicznych w ściśle określonym pH [12, 14, 22–24, 70, 71], a enzym można stosunkowo łatwo odzyskać dzięki tendencji do tworzenia agregatów białkowych, dlatego często stosuje się w tych przypadkach termin „immobilizacja”.



Rysunek 2. Przykłady rozpuszczalnych immobilizowanych enzymów: wiązanie kowalencyjne z polimerem rozpuszczalnym w wodzie/rozpuszczalniku organicznym (a), polimerem pH-wrażliwym (b), polimerem termowrażliwym (c) lub odzysk enzymu poprzez flokulację polimerem pH-wrażliwym (d). LCST – wyjaśnienie w tekście

Również tradycyjne preparaty liofilizowane, użyte w rozpuszczalnikach organicznych, zalicza się do układów z immobilizowanym biokatalizatorem. Ponieważ większość białek jest nierozpuszczalna w rozpuszczalnikach organicznych i bez dodatkowej modyfikacji lub intensywnego mieszania czy dyspersji ultradźwiękami białka ulegają zazwyczaj agregacji gromadząc się na powierzchni cieczy, uważa się, że agregaty mogą być łatwo oddzielone od mieszaniny reakcyjnej i ponownie użyte [70]. Jednak ze względu na dużą podatność enzymów niestabilizowanych na inaktywację w obecności rozpuszczalników, ta metoda jest obecnie rzadziej stosowana.

Natomiast obserwuje się systematyczny rozwój metod kowalencyjnego łączenia enzymów z polimerami odwracalnie rozpuszczalnymi-nierozpuszczalnymi w wodzie. Polimery te posiadają unikalną właściwość zmiany rozpuszczalności wywołanej niewielką zmianą warunków fizycznych jak wartości pH, temperatury, siły jonowej, pola elektrycznego czy pola magnetycznego albo kilku wymienionych czynników jednocześnie [72–74]. Spośród licznej grupy polimerów, największym zainteresowaniem w immobilizacji enzymów cieszą się polimery termo- i pH-wrażliwe.

Najczęściej stosowane polimery, wrażliwe na zmiany wartości pH środowiska, to poli(kwas (met)akrylowy), poli(etyleñoimina), poli(L-lizyna), pochodne octanu metylolcelulozy czy poli(tlenek etylenu – ko-tlenek propylenu) (znany pod nazwą handlową Eudragit™) (Rys. 2 b). Przykładowa procedura immobilizacji to połączenie kowa-

lencyjne grupy aminowej białka z grupą karboksylową Eudragit S z udziałem karbodiimidu. Proces enzymatyczny prowadzi się w pH poniżej 4,5, w którym preparat jest całkowicie rozpuszczalny w wodzie. Podwyższenie wartości pH do około 5–5,5 powoduje wytrącenie preparatu, który oddziela się od mieszaniny reakcyjnej przez wirowanie. Preparat enzymatyczny można wykorzystać kilkakrotnie i po kilku kolejnych procesach odzysk aktywnego enzymu może wynosić od 50 do 95% [73, 75–78]. Z polimerami odwracalnie rozpuszczalnymi-nerozpuszczalnymi w wodzie w zależności od pH środowiska wiązano: inhibitory trypsyny i α -amylazy [74], α -amylazę [76], β -glukozydazę [73], trypsynę [76, 77], chitynazę i lizozym [75], lipazę [78], liażę pektynową [79] czy ksylanazy [80].

W przypadku polimerów termowrażliwych uważa się, że dowolny polimer rozpuszczalny w wodzie, po wprowadzeniu odpowiedniej ilości ugrupowań hydrofobowych, staje się odwracalnie rozpuszczalny-nerozpuszczalny, w zależności od temperatury (Rys. 2 c). Punkt przejścia fazowego tych polimerów określa wartość LCST (ang. *Lower Critical Solution Temperature*), która, w zależności od polimeru, zawiera się w zakresie od 5 do 75°C. Przykładami polimerów termowrażliwych są: poli(*N*-podstawiony metyloakryamid) i jego pochodne sieciowane diwinylobenzencem, poli(*N*-winylo-*N,N*-dwupodstawione amidy), pochodne poli(tlenku etylenu), karboksymetylocelulozy, poli(akroilo-piperidyno)cysteiny [81–86], a także, rzadziej, białka jak elastyna i fibryna jedwabiu (LCST 37°C [73]) lub polipeptydy elastynopodobne (ELPs) z powtarzalną sekwencją Val-Pro-Gly-(nie prolina)-Gly [87]. Wśród enzymów, wiązanych kowalencyjnie z polimerami termowrażliwymi, dominują hydrolazy polimerów naturalnych jak chityna, skrobia, celuloza, białka, pektyna [73–77, 79, 82, 87, 88], a także hydrolaza organofosforanowa [87], lipaza [79], β -galaktozydaza czy kwaśna fosfataza [88].

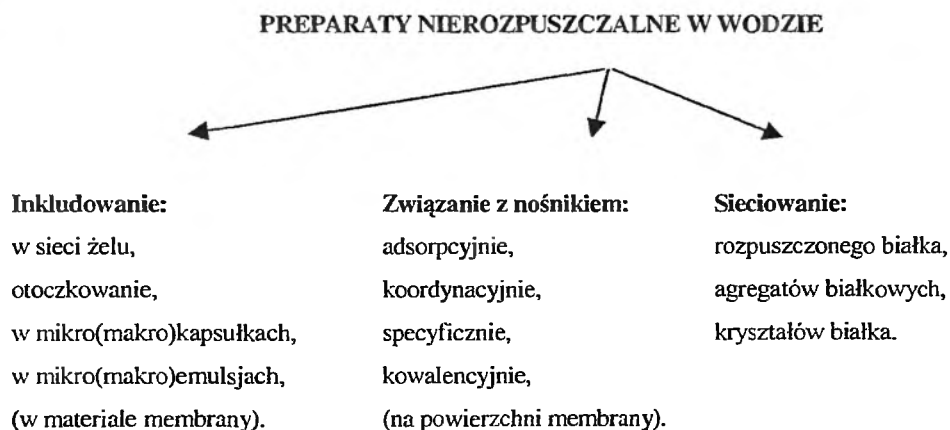
Uważa się, że enzymy wiązane z polimerami wrażliwymi na zmiany wartości pH lub temperatury posiadają dwa główne obszary zastosowań: w procesach z substratami wielkocząsteczkowymi i w precypitacji powinowactwa. Celem uniknięcia konieczności kowalencyjnego wiązania enzymu z polimerami wrażliwymi na zmiany wartości pH lub temperatury, można polimery stosować jako dodatki do mieszaniny reakcyjnej. Ich zadaniem jest koprecypitacja enzymu po zakończeniu procesu [76, 79] (Rys. 2 d). Jest to metoda rzadziej stosowana ze względu na około 80% odzysk aktywności enzymatycznej w kolejnych procesach.

Wymienione powyżej metody otrzymywania preparatów immobilizowanych, rozpuszczalnych w wodzie lub rozpuszczalnikach organicznych, poza enzymami liofilizowanymi użytymi w rozpuszczalnikach, łączą warunki katalizy homogenicznej, łatwość przenoszenia skali i konieczność doboru warunków immobilizacji do enzymu. W przypadku katalizy w rozpuszczalnikach organicznych, podkreśla się brak konieczności utrzymywania sterylności w mieszaninie reakcyjnej. Z kolei jedynie enzymy liofilizowane, stosowane w rozpuszczalnikach organicznych, i enzymy związane kowalencyjnie z polimerami pH- lub termowrażliwymi, mogą być wielokrotnie użyte w procesach okresowych. Natomiast wzrostu termostabilności i stabilności

operacyjnej preparatu należy przede wszystkim oczekiwać w przypadkach kowalencyjnej modyfikacji enzymu.

2.2. PREPARATY NIEROZPUSZCZALNE W WODZIE LUB ROZPUSZCZALNIKACH ORGANICZNYCH

Otrzymywanie preparatów nierozpuszczalnych w wodzie lub rozpuszczalnikach organicznych to najstarsze i najczęściej omawiane sposoby immobilizacji enzymów [16, 34, 57, 89, 90]. Podział technik na trzy podstawowe grupy (Rys. 3) zasadniczo od lat nie ulega zmianom, poszerzając się o udoskonalone lub nowe procedury. W celach informacyjnych, na rysunku 3, obok technik tradycyjnych, podano w nawiasach możliwość poszerzenia schematu o immobilizację na/w półprzepuszczalnych membranach (tzw. membrany katalityczne). Równie popularny jest inny podział, różniący procedury bazujące na wiązaniu kowalencyjnym i niekowalencyjnym [34]. Wówczas metody oparte na adsorpcji i inkluzji są włączane w jedną grupę, natomiast w drugiej znajduje się kowalencyjne wiązanie enzymów z nośnikiem oraz sieciowanie.



Rysunek 3. Podział metod immobilizacji enzymów prowadzących do otrzymywania preparatów nierozpuszczalnych w wodzie

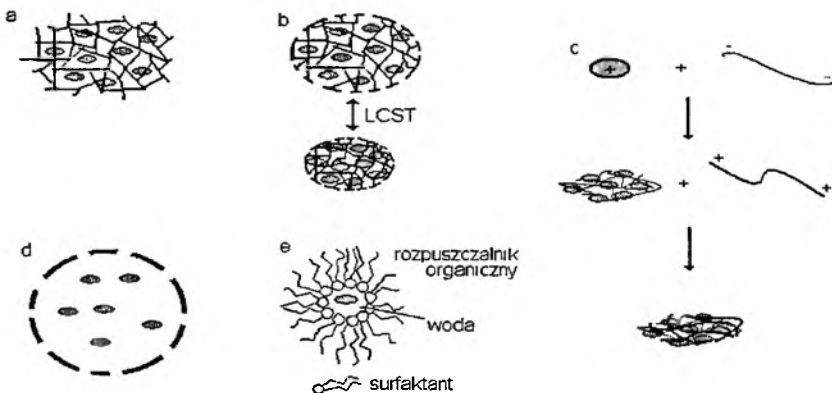
Od strony procesowej powyższe trzy grupy łączy możliwość stosowania preparatów w procesach ciągłych z reaktorem ze złożem upakowanym i z występującymi oporami dyfuzyjnymi w złożu. Natomiast różni je stopień ingerencji w cząsteczkę enzymu i możliwość otrzymania preparatu o podwyższonej stabilności. Generalnie, enzymy immobilizowane każdą z powyższych procedur, posiadają zwiększoną odporność na działalność enzymów produkowanych przez mikroorganizmy i często są mniej podatne na inhibicję. Nie występuje również agregacja cząsteczek enzymu,

co jest jedną z przyczyn utraty aktywności enzymów natywnych w warunkach procesowych.

Jeżeli rozpatrywać podział na trzy zasadnicze grupy, to preparaty otrzymywane przez inkluzję w zasadzie zawierają enzym w formie niezmięnionej. Związanie białka z nośnikiem może prowadzić do znacznej modyfikacji enzymu, natomiast wszystkie techniki sieciowania powodują istotną modyfikację chemiczną enzymu.

2.2.1. Zamykanie enzymów w fazie nierozpuszczalnej

Najczęściej metoda polega na zamknięciu enzymu natywnego w fazie wodnej, w ściśle i łatwo definiowalnym obszarze, a ciągłość fazy ciekłej wewnątrz i na zewnątrz preparatu zapewniają nieciągłości w fazie zamykającej. Wymianę substratów, produktów, aktywatorów czy inhibitorów z roztworem zewnętrznym zapewnia porowata struktura fazy zamykającej, a szybkość tej wymiany jest zawsze, w mniejszym lub większym stopniu, determinowana dyfuzją reagentów. Ta forma immobilizacji jest ograniczona do układów reakcyjnych z niskocząsteczkowymi reagentami, ze względu na niewielki rozmiar porów, który zapewnia zatrzymanie enzymu w preparacie.



Rysunek 4. Przykłady zamykania enzymu w sieci polimeru (a), w sieci polimeru termowrażliwego (b), okludowania polimerami rozpuszczalnymi w wodzie (c) zamykania w makrokapsułkach (d) oraz w mikroemulsjach (e)

Ponieważ enzym jest *de facto* w stanie natywnym, a jego oddziaływania z fazą zamykającą są z reguły niewielkie, rzadko obserwuje się różnice w aktywnościach pomiędzy enzymem natywnym a immobilizowanym, chyba że wynikają one z oporów dyfuzyjnych w układzie. Stąd też wzrost stabilności enzymu jest obserwowany jedynie w przypadkach, gdy rozpatruje się odporność na obecność rozpuszczalników organicznych czy enzymów degradujących dany enzym. Największą niedogod-

nością tej metody jest „ucieczka” enzymu do roztworu zewnętrznego, co powoduje, że jest ona zalecana do immobilizacji komórek lub do układów wieloenzymatycznych [91–94] czy enzymów zbudowanych z oligomerów [95]. Celem ograniczenia ucieczki enzymu stosowane są często dodatkowe procedury jak sieciowanie lub dodatkowa immobilizacja [96, 97].

Wyróżnia się kilka procedur zamykania enzymów: zamknięcie w sieci polimeru, kapsułkach i w mikroemulsjach oraz otoczkowanie (Rys. 4).

2.2.1.1. Zamknięcie w sieci polimeru

W wersji klasycznej jest to jedna z prostszych i bardziej zachowawczych dla enzymu metod immobilizacji. Polega na zmieszaniu monomeru(ów) lub polimeru z roztworem enzymu oraz dodaniu czynników sieciujących i ewentualnych inicjatorów, celem wywołania polimeryzacji bez udziału cząsteczek enzymu (Rys. 4 a). Taka procedura może być stosowana do wszystkich enzymów, jednak warunki polimeryzacji mogą powodować denaturację białka. Zdecydowanie najmniej szkodliwa dla enzymów i najchętniej stosowana jest immobilizacja w sieci spolimeryzowanych związków pochodzenia naturalnego, jak agar, agaroz, żelatyna (polimeryzacja termoodwracalna) czy alginian i karaginan (żelowanie jonozależne) [98–100]. Szczególnie popularna jest immobilizacja w żelach alginianowych, stabilizowanych jonami Ca^{2+} [34, 96, 101, 102]. Równie chętnie stosowane są żele żelatynowe [34, 103], z chitozanu i ksantanu [104, 105], mieszaniny alginianu i siarczanu celulozy [101] czy octanu celulozy [34]. Przykładami tak immobilizowanych enzymów mogą być: acylaza penicylanowa [102], ureaza [101], izomeraza arabinozy [96], lakkaza i tyrozynaza [106], czy lipaza [99, 103, 104].

Wśród polimerów syntetycznych, stosowanych w zamykaniu enzymów w sieci żelu, dominują te, które ulegają polimeryzacji pod wpływem światła, a także poliuretany lub akrylany (np. popularny poli(akrylamid)) [34, 98, 107–109] oraz żele z poli(glikolu etylenowego) [97] czy poli(alkoholu winylowego) [109]. W porównaniu z żelami z materiałów pochodzenia naturalnego, warunki polimeryzacji monomerów syntetycznych mogą powodować inaktywację enzymów, a monomery i polimery mogą być toksyczne (jak poliakrylamid [98]). Przykładami efektywnej immobilizacji może być zamknięcie w żelu acylazy penicylanowej [102], hydrolazy organofosforanowej [97], lakkazy i tyrozynazy [106], peroksydazy i fosfatazy alkalicznej [107, 108], lipazy [109], inwertazy [110] czy α -amylazy [111].

Ostatnio szczególnym zainteresowaniem cieszą się termo- lub pH-wrażliwe hydrożele [72–74, 83, 112–114] (Rys. 4 b). Są to usieciowane polimery pH- lub termowrażliwe, służące najczęściej do kontrolowanego uwalniania enzymów terapeutycznych [72, 83] lub proteaz stosowanych w procesie dojrzewania serów [113], a także w konstrukcji mikrosensorów [112]. Podkreśla się również możliwość ich stosowania w procesach enzymatycznych (ureaza i β -galaktozydaza [114], inwertaza [74]), w których zaletą jest zmiana objętości żelu w zależności od temperatury, co daje efekt

„pompy hydraulicznej”, zwiększającej szybkość transportu substratu i produktu w objętości żelu.

Jeszcze większy wzrost zainteresowania obserwuje się w przypadku tzw. preparatów zol-żel, otrzymywanych głównie z alkoholanów metali o wzorze sumarycznym $M(OR)_n$, gdzie M to najczęściej Al, Si, Ti, a R to grupa organiczna [115–120]. Związki te są poddawane wstępnej hydrolizie a następnie polikondensacji. Metoda ta pozwala otrzymać różnorodne materiały od monolitów, poprzez nano- mikro- i makroziarniste złoża, po filmy, włókna i materiały otoczkowane. W zależności od sposobu postępowania przyjętego po etapie polikondensacji, otrzymuje się hydrożele (50–80% wody) i hydrożele sezonowane (5–30% wody) lub kserożele (po suszeniu) czy aerożele (po suszeniu w nadkrytycznym CO_2) o zróżnicowanej powierzchni właściwej (od 400 do 2000 m^2/g) i rozmiarach porów (od 0,5 do 200 nm) [119]. Zaletami tych żeli jest duża łatwość wprowadzania grup funkcyjnych na etapie ich syntezy oraz możliwość tworzenia żeli hybrydowych, kompozytowych i szablonowanych z wykorzystaniem naturalnych lub syntetycznych polimerów [115, 117, 119, 121, 122]. W efekcie otrzymuje się hydrożele od plastycznych po sztywne, a celem zwiększenia odporności mechanicznej można stosować dodatki grafitu lub celulozy. Do wad należy zaliczyć kompresję złoża i zamykanie porów, słabą stabilność mechaniczną, a przede wszystkim uwalnianie się alkoholu w czasie polimeryzacji. Obecność etanolu w stężeniach denaturujących białka powoduje, że często immobilizuje się enzymy uprzednio stabilizowane (w tym immobilizowane innymi metodami) oraz stosuje się materiały kompozytowe, hybrydowe i szablonowane [122–127]. Przykładami enzymów immobilizowanych w złożach zol-żel są proteazy [115, 125–127], lipazy, esterazy i fosfolipazy [116, 117, 119, 121, 123, 128], enzymy hydrolizujące polisacharydy [119, 124], oksydoreduktazy [115, 118, 119, 121, 126], fosfatazy [119, 121] oraz ureaza [115] i acylaza penicylanowa [102].

2.2.1.2. Otoczkowanie (okludowanie)

Jest to metoda często przedstawiana jako zamykanie enzymu w mikro(makro)kapsułkach, co wydaje się mylące. W tym przypadku cząsteczki enzymu nie występują w wyraźnie wyodrębnionej fazie wodnej, a są otoczone przez inny związek wielko-cząsteczkowy, którym może być polielektrolit, lipid czy surfaktant. Zamknięcie enzymu z wykorzystaniem polielektrolitów polega na traktowaniu enzymu lub jego agregatów kolejno polianionem lub polikationem (kolejność zależy od ładunku białka) (Rys. 4 c). Pierwszy z polimerów, adsorbując się na cząsteczkach enzymu, powoduje jego wytrącanie (flokulację), a utworzone kompleksy polimer-białko są następnie stabilizowane i powiększane przez dodanie polimeru o ładunku przeciwnym. Zaletą metody jest szybka i efektywna preparatyka, bez modyfikacji chemicznej, bez rozpuszczalników organicznych i bez konieczności stosowania stężonych roztworów enzymów. Jednak jest to metoda rzadko stosowana, ze względu na znaczne ograniczenia transportu masy, szczególnie gdy otrzymanie stabilnych i nierozpuszczalnych

preparatów wymaga utworzenia większej ilości warstw polielektrolitów [129]. Najczęściej stosowane polielektrolity to: metoksyoli(glikol etylenowy), siarczan celulozy, poli(etylenoimina), poli(chlorek dimetylodialloamonowy), poli(kwas styrenosulfonowy), poli(aminometylostyren) (Wofatit®), hydrochlorek poli(alliloaminy), estry kwasu poliakrylowego, poli(kwas mlekowy), a efektywną immobilizację osiągnięto otoczkując polielektrolitami dehydrogenazę mleczanową, chymotrypsynę, inwertazę, ureazę i lipazę [129–136]. Natomiast, jeżeli preparat immobilizowany ma być wykorzystany w rozpuszczalniku organicznym, to zaleca się okładowanie kwasami tłuszczowymi, lipidami lub surfaktantami [3, 28, 137–142].

2.2.1.3. Zamykanie w mikro(makro)kapsułkach

Jest to metoda stosunkowo rzadko stosowana w immobilizacji enzymów [98, 101, 140, 143, 144]. Polega ona na zamykaniu fazy wodnej, zawierającej enzym, w półprzepuszczalnej membranie polimerowej, otrzymywanej metodą polikondensacji na granicy faz lub międzyfazowej koacerwacji i podwójnego emulgowania (Rys. 4 d). Wielkość kapsułek waha się od 1 μm do kilku milimetrów, przy grubości ścianki od 0,01 do 1 μm [101]. Wadą tej metody są większe ograniczenia w odniesieniu do wielkości substratu i produktu, niż w przypadku inkluzji w żelu oraz możliwa denaturacja enzymu w warunkach tworzenia kapsułek. Membrany mikro(makro)kapsułek najczęściej są wytwarzane na bazie azotanu lub octanu celulozy, poliuretanów, poliamidu, nylonu, polichloroku winylu, polietylenoiminy, poliakryloamidu, κ -karaginanu lub z błony komórkowej erytrocytów. Enzymy można też zamykać w obrębie membran ciekłych, złożonych z poliamin czy izoparafin o wysokich masach cząsteczkowych. Dobre efekty osiągnięto immobilizując tą metodą systemy wieloenzymatyczne lub/ oraz z regeneracją kofaktorów, a jako zalety podaje się zwiększoną odporność na enzymy proteolityczne i niewielkie przechodzenie enzymu do roztworu zewnętrznego [65, 143].

Równie rzadko stosowaną metodą jest zamykanie enzymów w liposomach [28, 34, 139, 144, 145]. Są to koncentryczne kulki zbudowane z dwuwarstwy fosfolipidowej lub z innych lipidów, które tworzą membrany nierozpuszczalne w wodzie i nie wymagające dodatkowego nośnika. Mono- lub wielowarstwowe liposomy tworzą struktury o rozmiarach około 0,15 μm i, jeżeli są wykonane z naturalnej lub syntetycznej lecytyny, to mogą być wykorzystywane do kontrolowanego uwalniania enzymów terapeutycznych lub proteaz w procesach dojrzewania serów [141].

2.2.1.4. Zamykanie w mikro(makro)emulsjach stabilizowanych surfaktantami

Jest to układ, w którym wodne mikroobszary są otoczone cząsteczkami polarnego surfaktanta, którego liniowe lub rozgałęzione łańcuchy hydrofobowe kontaktują

się z otaczającym niepolarnym rozpuszczalnikiem organicznym [34, 146–148]. Często metoda ta nosi nazwę immobilizacji w odwróconych micelach, co mylnie wskazuje na układ jednofazowy.

Enzymy zamykane w mikro(makro)emulsjach zwykle znajdują się w fazie wodnej (Rys. 4 e) i wyróżnia się trzy możliwe procedury wprowadzania białka: wodny roztwór enzymu dodaje się do roztworu odwróconych miceli (1), białko w formie liofilizatu dodaje się do emulsji (2) i roztwór białka dodaje się do emulsji (3) [147]. W efekcie otrzymuje się dynamiczny układ, stabilizowany oddziaływaniami hydrofobowymi, van der Waalsa, elektrostatycznymi i wodorowymi. O stabilności i reaktywności układu decyduje rodzaj i stężenie enzymu, surfaktanta (kosurfaktanta), elektrolitów, substratu(ów) i produktu(ów) oraz stosunek molowy wody do surfaktanta. Stosować można wszystkie typy surfaktantów (anionowe, kationowe, obojnacze i niejonowe), a ich dobór zwykle zależy od tolerancji enzymu. Zaletami tego układu są: duża powierzchnia kontaktu faz ($10\text{--}100\text{ m}^2/\text{cm}^3$) z pomijalnymi ograniczeniami transportu masy, mała objętość reakcyjna, brak zanieczyszczeń mikroorganizmami, brak agregacji białka, przejrzystość optyczna umożliwiająca bezpośrednie pomiary spektrofotometryczne, łatwość zmiany mikroemulsji w makroemulsje i łatwość przenoszenia skali. Immobilizacji w emulsjach często towarzyszy wzrost termostabilności, stabilności operacyjnej i reaktywności, ale główną zaletą jest możliwość stosowania substratów i produktów trudno rozpuszczalnych w wodzie. Należy podkreślić, że procesy w środowiskach o kontrolowanej zawartości wody, w których faworyzowane są procesy syntezy z udziałem hydrolaz, cieszą się obecnie szczególnym zainteresowaniem.

Największe ograniczenia metody to częsta denaturacja enzymów w obecności surfaktantów i rozpuszczalników organicznych oraz utrudniony odzysk produktu i enzymu. Celem umożliwienia wielokrotnego użycia enzymu, do rozdzielania faz często stosuje się techniki membranowe [147, 149], które jednak powodują utratę surfaktantów. Natomiast denaturację biokatalizatora można ograniczyć, wykorzystując inne metody immobilizacji/stabilizacji lub/ oraz użycie biosurfaktantów [28, 103, 107, 139]. Kolejny problem wiąże się z toksycznością (przemysł farmaceutyczny) i niską biodegradowalnością (ochrona środowiska) tanich, ale syntetycznych surfaktantów. Poszukiwania biosurfaktantów (lipopeptydów) pochodzenia mikrobiologicznego lub ich synteza enzymatyczna [150–152] pozwalają liczyć na szybkie zwiększenie ich dostępności.

Powyższe układy reakcyjne są stosowane w przemyśle chemicznym (asymetryczna transestryfikacja lipidów, synteza makrocyclicznych laktonów), spożywczym (hydroliza tłuszczów, produkcja emulgatorów, synteza triglicerydów) i farmaceutycznym (biotransformacje steroidów, synteza enancjoselektywna, synteza prostaglandyn i prostanoidów) [147]. Stąd też mikro(makro)emulsje są najczęściej tworzone z lipazą [28, 103, 139, 147, 149, 153, 154], ale również z lakkazą i tyrozynazą [106], katalazą i oksydazą alkoholową [155], chymotrypsyną [156] i oksydazą glukozową [157].

2.2.2. Związanie enzymu z powierzchnią nośnika

Jest to najpopularniejsza metoda immobilizacji, w której dobór nośnika i procedury wiązania enzymu posiada zasadnicze znaczenie dla jakości produktu finalnego. Szeroka gama nośników od naturalnych po syntetyczne i liczba procedur wiązania z jednej strony, a struktura enzymu i jego właściwości z drugiej, powodują, że nie istnieją żadne generalne wskazania, skutkiem czego dominuje metoda prób i błędów [34, 71, 89, 98, 140, 144, 158, 159]. Ponieważ rola nośników jest znacząca, zebrano podstawowe informacje o ich typach i właściwościach. Przede wszystkim „idealny” nośnik powinien:

- być stabilny chemicznie, fizycznie i mechanicznie, co decyduje o jego trwałości i możliwości zastosowania w reaktorach mieszalnikowych i ze złożem upakowanym;
- posiadać odpowiedni dla danego enzymu i układu reakcyjnego charakter hydrofilowo/hydrofobowy oraz niską sorpcję niespecyficzną względem innych białek;
- być łatwo dostępny, tani, regenerowalny i posiadać odpowiednią formę (ziarnisty regularny i nieregularny, włóknisty, w formie powierzchni płaskich, itp.);
- być odporny na biodegradację w trakcie procesu ale jednocześnie, po wykorzystaniu, być biodegradowalnym;
- posiadać wysoką pojemność sorpcyjną względem białka i, zależnie od możliwości wystąpienia ograniczeń dyfuzyjnych w porach, być lub nie być porowatym;
- nie oddziaływać chemicznie z substratami i produktami reakcji.

Część wymogów jest wzajemnie sprzecznych, ale i tak nie istnieje materiał, który spełniałby większość oczekiwań potencjalnych użytkowników. Dlatego często o wyborze rodzaju nośnika decydują wymogi procesowe a nie ich kompatybilność z enzymem.

Nośniki stosowane do immobilizacji enzymów można podzielić wielorako. Uwzględniając ich kształt, najczęściej wykorzystuje się różne formy granulatów (kulki, elipsoidy obrotowe, proszki, nieregularne ziarna) oraz, rzadziej, filmy, powierzchnie płaskie, włókna. Nośniki można także podzielić na nieporowate i porowate (o kontrolowanych rozmiarach porów, o zróżnicowanych porach, o strukturze żelowej) lub ze względu na materiał, z którego nośnik został wykonany. Ostatni typ podziału jest najbardziej popularny [34, 65, 98, 140, 158–161] i zgodnie z nim wyróżnia się:

- nośniki nieorganiczne, a w tym otrzymane z minerałów surowych (np.: bentonit, krzemionka, grafit, hydroksyapatyt, hornblenda, pumeks, glina) lub przetworzonych (metale i tlenki metali, szkło nieporowate lub o kontrolowanych porach, ceramika, stal nierdzewna), a z mniej typowych zeolity [120, 162–164] i półpruszczalne nanokryształy [165];
- nośniki organiczne, a w tym pochodzenia naturalnego (np.: celuloza i jej pochodne, skrobia, dekstran, fibroina jedwabiu, agarozę i alginiany, karaginaniny, chityna i chitozan, kolagen, żelatyna, albumina, aktywowany węgiel) lub z polimerów syntetycznych (np.: polistyreny, poliakrylany, poliakryloaminy, polihydroksyalkilometakryla-

ny, polimetakrylany, polimery z bezwodnikiem maleinowym, polimery winylowe i alkilowe, poliamidy oraz ich pochodne);

- nośniki hybrydowe nieorganiczno-organiczne (np.: kompozyty z alkoholanami metali [121, 122, 126] lub będące mieszaniną polimerów naturalnych i syntetycznych [119, 122]).

Zestaw podstawowych cech wymienionych powyżej trzech grup nośników podano w Tabeli 1. Teoretycznie, nośniki nieorganiczne posiadają najwięcej potencjalnych zalet w zastosowaniach przemysłowych: odporne fizycznie, chemicznie i biologicznie, duży wybór preparatów handlowych, większość może być regenerowana przez pirolizę. Jest to szeroka gama nośników od tanich (piasek, pumeks, bentonit, porowata ceramika) po drogie (szkło i tlenki metali o kontrolowanych porach, metale szlachetne). Spośród nich najczęściej stosuje się złoża krzemionkowe, stosowane w chromatografii (Nucleosil, Kromasil, LiChrospher, Spherisorb, Hypersil W) czy Toyonite z kaolinu. Przykładem handlowego preparatu z organokrzemianu jest Deloxan. W porównaniu z nośnikami syntetycznymi, nośniki nieorganiczne rzadko negatywnie wpływają na strukturę białka, za to wiążą go w niewielkich ilościach ze względu na niewielką liczbę grup aktywnych chemicznie.

Tabela 1. Zestawienie podstawowych cech nośników stosowanych do immobilizacji enzymów

| Cecha | Nośniki nieorganiczne | Nośniki organiczne | | Nośniki hybrydowe |
|--|-----------------------|----------------------------|-------------|-------------------|
| | | naturalne | syntetyczne | |
| Stabilność chemiczna, fizyczna, mechaniczna | wysoka | raczej niska | wysoka | raczej wysoka |
| Odporność biologiczna | duża | brak | duża | duża |
| Regulacja charakteru hydrofobowo/hydrofilowego | ograniczona | duża | duża | średnia |
| Forma | raczej ziarniste | raczej ziarniste i tkaniny | dowolna | raczej ziarniste |
| Pojemność wiązania białka | zwykle niska | duża | średnia | średnia |
| Koszt/dostępność | zróżnicowany/średnia | średni/duża | niski/duża | wysoki/niska |
| Możliwość regeneracji | dobra | brak | raczej brak | raczej brak |
| Uciążliwość dla środowiska | niska | brak | duża | niska |
| Porowate/nicporowate | tak/tak | tak/nie | tak/tak | tak, tak |
| Destrukcyjny wpływ materiału nośnika na białka | brak | brak | częsty | najczęściej brak |

Wśród nośników organicznych, pochodzenia naturalnego, dominują matryce bazujące na polisacharydach. Powierzchnia właściwa tych nośników (około 100 m²/g) oraz duża ilość grup aktywnych chemicznie i łatwość ich modyfikacji, zapewnia znaczącą pojemność sorpcyjną, przy zadawalających właściwościach mechanicznych.

Poza tym są hydrofilowe i biodegradowalne. Do wad należy zaliczyć brak odporności na krańcowe wartości pH, zmiany chłonności wody w różnych wartościach pH, stopniowe uwalnianie merów i brak odporności na działalność mikroorganizmów (produkowanych enzymów). Ich popularność zwiększa duża oferta handlowa, szczególnie w formie usieciowanych złóż chromatograficznych o charakterze żelowym. Przykładami są przede wszystkim jonowymienne pochodne celulozy (np.: DEAE-, CM-, AE-Cellulose, Granocel, Cellufine), sieciowane dekstrany (np. Sephadex) i agarozę (np.: Superose, Biogel, Sepharose), chitozan (Chitopearl) czy hydrożel z chitozanu i ksantanu (Chitoxan). Wśród nośników dominuje forma ziarnista o rozmiarach od 5 μm (preferowana chromatografia) po 500 μm (preferowane procesy). Chętnie również stosuje się tkaniny lniane i bawełniane [166, 167] oraz krystaliczną lub spolimeryzowaną sacharozę [168].

Nośniki produkowane w oparciu o białka nierozpuszczalne w wodzie (kolagen, żelatyna, wełna owcza, jedwab, mączka kostna, keratyna [27, 34, 169]) są zaliczane do biodegradowalnych matryc hydrofilowych, o zróżnicowanych jakościowo grupach funkcyjnych, które nie nadają się do regeneracji i są niestabilne termicznie. Tego typu nośniki, jako biokompatybilne, preferowane są w zastosowaniach biomedycznych. Nośnikami naturalnymi mogą być również komórki, a szczególnie komórki drożdży, posiadające certyfikat GRAS (ang. *Generally Regarded As Safe*) [170], co ma duże znaczenie w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym.

Zdecydowanie najliczniejszą grupą nośników są nośniki z polimerów syntetycznych. Duża ilość grup polimerów, a szczególnie różnorodność ich modyfikatów, doprowadziła do zdominowania rynku nośników do immobilizacji, szczególnie w zastosowaniach procesowych. Ich zaletami jest możliwość regulacji porowatości, średnicy porów i pęcznienia warunkami syntezy. Charakteryzują się szeroką gamą możliwości wprowadzania grup funkcyjnych na etapie syntezy lub/ oraz modyfikacji istniejących grup. Odporność na warunki fizykochemiczne oraz działalność mikroorganizmów i enzymów stawia je pomiędzy nośnikami nieorganicznymi i z materiałów naturalnych. Nośniki z syntetycznych polimerów mogą być porowate i nieporowate, o dowolnych kształtach, a struktura może być od elastycznej po sztywną. Ich charakter hydrofobowy, działający niekorzystnie na strukturę III-rzędową większości enzymów [171, 172], może być łatwo zmieniony modyfikacją chemiczną gotowych nośników lub doбором odpowiednich komonomerów, oferując nośniki o zróżnicowanym charakterze hydrofilowo-hydrofobowym. Do cech ujemnych zalicza się obciążające środowisko warunki syntezy i modyfikacji, niepożądaną sorpcję hydrofobową, praktycznie brak biodegradowalności i ograniczoną możliwość regeneracji.

O popularności nośników syntetycznych zdecydowała w dużej mierze ich dostępność na rynku, niski koszt i walory procesowe. Zwykle występują w formie drobn- i gruboziarnistych wymiennaczy jonowych. Przykładami nośników najczęściej stosowanych w immobilizacji są złoża akrylowe (Chirazym, Separon, Dynospheres, Sepabeads, Amberlite XAD7, Trisakryl, Enzacryl), winylowe (Toyoppearl, Fractogel), poliakrylamidowe (Bio-Gel, Affi-gel), z metakrylanem glicydyłu (Euper-

git, Celite), a także z polistyrenu (Amberlite XAD2, Duolite), poliamidu (Nylon6, Nylon 6.6), czy polipropylenu (Accurel).

Nośniki hybrydowe mają na celu łączenie zalet poszczególnych grup nośników i minimalizację cech ujemnych. Na przykład, sieciując poliakrylamid dekstranem lub agarozą, otrzymano popularne złoża Sephacryl i Ultrogel. Zauważa się rosnącą popularność nośników hybrydowych, w skład których wchodzi alginian, karaginin, żelatyna, poliuretan lub poliakrylan oraz alkoholany metali [119, 121, 122, 126]. Do nośników kompozytowych można także zaliczyć nośniki nieorganiczne lub organiczne, otoczkowane polimerami syntetycznymi, naturalnymi lub organokrzemianami, celem wprowadzenia grup funkcyjnych i hydrofobowych lub celem zmniejszenia oddziaływań hydrofobowych [98, 173–181]. Innym przykładem są nośniki szczepione polimerami wrażliwymi na zmiany pH lub temperatury [73, 74] albo otrzymane na bazie wzajemnie zdyspergowanego powietrza, rozpuszczalnika organicznego i wody (CGAs – ang. *Colloidal Gas Aphrons*) [182, 183].

Wśród metod wiązania enzymów z powierzchnią nośnika można wyróżnić kilka grup, różniących się siłą oddziaływań pomiędzy matrycą a białkiem. W kolejności wzrostu oddziaływań są to: adsorpcja fizyczna i jonowa, z wykorzystaniem metali przejściowych, wiązanie biospecyficzne i wiązanie kowalencyjne.

2.2.2.1. Adsorpcja

Obecnie rzadko wyróżnia się adsorpcję fizyczną i jonową, ze względu na jednolitość stosowanych procedur jak i mieszany charakter typowych nośników, posiadających właściwości jonowymieniaczy o obszarach zdolnych do słabych oddziaływań z białkiem (oddziaływania van der Waalsa, hydrofobowe, wiązania wodorowe). Adsorpcja jest metodą, w której wiązanie enzymu z nośnikiem jest słabe, a zatem wywołuje niewielkie, jakkolwiek zauważalne zmiany w konformacji białka [172, 173]. Metoda ta jest prosta, efektywna i tania, a nośnik można łatwo regenerować. Ponieważ proces adsorpcji zwykle nie przekracza 2 godzin [34, 96, 173], jest to także metoda szybka. Efektywność wiązania (również desorpcji) zależy od zastosowanego nośnika (głównie jego powierzchni właściwej, średnicy porów, rodzaju dominujących oddziaływań), stężenia białka, wartości pH i siły jonowej oraz od temperatury. Ze względu na łatwość desorpcji, tego typu preparaty raczej nie są stosowane w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym, ze względu na utrudnioną kontrolę procesu i konieczność oczyszczania produktu z przymieszek enzymatycznych. Z kolei adsorpcja jest preferowanym sposobem immobilizacji w procesach prowadzonych w środowiskach niewodnych i o niskiej zawartości wody. Ponieważ białka charakteryzuje niskie powinowactwo do rozpuszczalników organicznych, w ich obecności nie obserwuje się desorpcji [28, 34, 162, 177]. I jest to główny powód gwałtownego wzrostu zainteresowania immobilizacją przez adsorpcję na nośnikach nierozpuszczalnych w wodzie.

Wyróżnia się kilka procedur wiązania białka przez adsorpcję [28, 34] (Rys. 5):

1. Prosta adsorpcja – nośnik jest zawieszony w roztworze enzymu i po zakończonej adsorpcji odmywa się niezwiązane białko [167, 170, 176–178, 181–197]. Jeżeli preparat zostanie wysuszony w łagodnych warunkach, może być stosowany w rozpuszczalnikach organicznych;

2. Agregacja – do roztworu białka, zawierającego nośnik, dodaje się rozpuszczalnik organiczny lub zwiększa siłę jonową solami nieorganicznymi, celem wywołania agregacji białka i jego sorpcji na nośniku. Po wysuszeniu można stosować preparat w środowiskach niewodnych [198–200]. Jest to metoda znacznie zwiększająca ilość związanego białka;

3. Depozycja – roztwór enzymu z nośnikiem poddaje się łagodnemu mieszaniu i suszeniu. Tu również otrzymany preparat posiada zwiększoną ilość związanego białka i nadaje się do stosowania w środowiskach niewodnych [163, 189, 201–203].



Rysunek 5. Wiązanie enzymu z powierzchnią nośnika przez prostą adsorpcję (a) lub depozycję/agregację (b)

Ze względu na słabe oddziaływania enzymu z nośnikiem, zwykle nie obserwuje się znaczących różnic w wartościach pH_{opt} , optymalnej temperatury, stabilności i podstawowych parametrach kinetycznych enzymu natywnego i związanego [178, 195, 204], poza zastosowaniami w środowiskach niewodnych. Podkreślana wielokrotnie desorpcja w wodzie (30–50% [130, 195]) i raczej rzadko spotykany wzrost termostabilności obniża możliwość zastosowań praktycznych tych preparatów. Próba ominięcia tej niedogodności jest sieciowanie uprzednio zaadsorbowanego białka dwufunkcyjnym reagentem [166, 186, 205–207]. Ten sposób można zaliczyć do metod sieciujących enzym z nośnikiem, jednak wydaje się raczej naturalnym uzupełnieniem metody adsorpcyjnej. Można również, celem zwiększenia oddziaływań pomiędzy białkiem a enzymem, wstępnie otoczyć złożę poli(etylenoiminą) [98, 175–177, 180, 207], która posiada certyfikat FFDCa (ang. *Federal Food, Drug and Cosmetic Act*), dopuszczający do kontaktu z żywnością, lekami i kosmetykami [98, 175].

Jeżeli chodzi o przykłady immobilizacji, to trudno wymienić nośnik i enzym, które nie były poddane próbie immobilizacji przez adsorpcję. Wśród nowszych doniesień znajdują się nośniki mineralne [164, 180, 185, 187, 192, 195, 205, 206, 208–212], z naturalnych polimerów [107, 161, 164, 166, 168, 176, 177, 180, 189, 198, 213], z syntetycznych polimerów [159, 161, 178–180, 186, 188, 190–193, 197, 202, 204, 207, 208, 214–220] oraz kompozytowe [121, 182, 183, 186, 221]. Wśród enzymów dominują te, które są często stosowane:

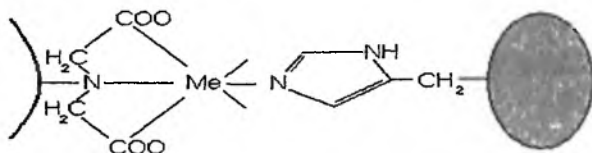
– w obecności rozpuszczalników organicznych: lipazy [28, 143, 168, 176, 177, 179–182, 190, 191, 197–199, 207, 216–219, 221], proteazy [159, 162, 163, 192, 201, 202, 205, 214, 215] jak również lipoksygenaza [185], dehydrataza węglanowa [221], lakkaza [210], acylaza penicylanowa [214, 215], peroksydaza [192] czy dekstranosacharaza [213];

– w biosensorach: oksydaza glukozowa [173, 196, 198], katalaza [165, 173, 178], tyrozynaza [106, 164], ureaza [166, 173], inwertaza [165, 173], β -galaktozydaza [208], lakkaza [106, 212], diastaza [211], dekarboksylaza L-glutaminianowa [184] czy peroksydaza chlorkowa [118];

– w procesach enzymatycznych: acylaza penicylanowa [102, 195, 209, 214], glukoamylaza [175, 203], izomeraza glukozowa [203], α -amylaza [205], β -galaktozydaza [178], lakkaza [189], liaza pektynowa [79], fruktozotransferaza [161, 187], lewanosacharaza [222], lizozym [193], dekstranosacharaza [213], katalaza [206] czy glukanotransferaza cyklomaltodekstrynowa (CGTaza) [186, 223].

2.2.2.2. Wiązanie z udziałem metali przejściowych

Metoda ta, często włączana do metod adsorpcyjnych, wykorzystuje metale przejściowe, pozwalające utworzyć chelaty z nośnikiem i z białkiem (Rys. 6). Jednakże siła oddziaływań w chelacie może nawet odpowiadać oddziaływaniom enzym–kofaktor/inhibitor lub antygen–przeciwciało [224], stąd tendencja do wyłączenia tej metody w oddzielną grupę [34, 144].



Rysunek 6. Immobilizacja enzymów poprzez tworzenie chelatów z metalami przejściowymi

W ogólnym schemacie metoda bazuje na właściwościach chelatujących chlorków i siarczanów np.: tytanu, wanadu, cyrkonu, cynku, żelaza, niklu i miedzi. W związkach tych, przykładowo w obecności kwasu imidoacetylooctowego, część ligandów chelatowych można podstawić różnymi ugrupowaniami [34, 224, 225]. Immobilizację białka poprzedza formowanie chelatu z grupami hydroksylowymi nośnika, a następnie, po odmyciu nadmiaru jonów metalu i dodaniu białka, kolejny ligand zostaje podstawiony ugrupowaniem $-\text{COOH}$ aminokwasów kwaśnych, lub grupą $-\text{OH}$ seryny, tyrozyny czy treoniny, $-\text{NH}_2$ lizyny, lub grupą $-\text{SH}$ cysteiny. Największą efektywność immobilizacji obserwuje się w przypadkach tworzenia chelatu z grupą sulfhydrylową cysteiny, jednak częstość występowania tego aminokwasu w białkach globularnych, a w szczególności na ich powierzchni, jest niewielka. Stąd

metoda ta była sporadycznie stosowana. Dodatkowo, uwalniające się jony metali, wykluczały potencjalne zastosowania preparatów w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym. „Toksyczność” złóż można minimalizować, stosując jako nośniki tlenki tytanu lub cyrkonu [144], natomiast niską dostępność histydyny zwiększa się dwoma metodami: (1) modyfikacją chemiczną, polegającą na wprowadzeniu histydyny lub poli(histydyny) na powierzchnię białka [224] oraz (2) metodami inżynierii genetycznej, podstawiając wybrane aminokwasy powierzchniowe histydyną lub wykorzystując fuzję genów, celem wbudowania członu wzbogaconego histydyną [200, 224, 226]. Najlepsze efekty osiąga się, stosując drugą z wymienionych metod, gdyż, obok możliwości utworzenia preparatu z regenerowalnym nośnikiem, można wbudować elementy wzbogacone histydyną w miejscu oddalonym od centrum aktywnego enzymu. Wówczas, po immobilizacji, centrum katalityczne będzie skierowane do roztworu, minimalizując przeszkody przestrzenne w dotarciu substratu do centrum. Zalety takiej immobilizacji, łączącej korzystne zorientowanie cząsteczki enzymu z powinowactwem histydyny do metali przejściowych, pozwala na otrzymanie preparatu o bardzo wysokiej aktywności, wywołanej zjawiskiem preferencyjnej sorpcji enzymu z mieszaniny białek. Dlatego, w ostatnich latach, obserwuje się wyraźny wzrost zainteresowania tą metodą immobilizacji, mimo że stabilność preparatów bywa często niska, co wiąże się z inhibicją enzymów uwalniającymi się jonami metalu [144].

Metodę wiązania enzymów z nośnikiem, z udziałem metali przejściowych, wykorzystano do immobilizacji endoksylnazy [226], kutynazy [227], lipazy [228], acylazy glutarylowej [200], a także β -galaktozydazy, β -glukuronidazy, peroksydazy chrzastkowej, dehydrogenazy mleczanowej, galaktozowej i jabłczanowej czy fosfatazy alkalicznej [224].

2.2.2.3. Wiązanie wykorzystujące specyficzne powinowactwo

Ogromny postęp, notowany w inżynierii genetycznej i inżynierii białek, otworzył nowe możliwości otrzymywania immobilizowanych enzymów o wyjątkowo wysokiej aktywności. Jest to szczególnie dobrze widoczne w procedurach opartych o specyficzne powinowactwo biocząsteczek. Zaletami tej grupy technik są [224, 229]: wiązanie enzymu z ligandem wykazującym powinowactwo w sposób trwały, ale odwracalny w specyficznych warunkach; wiązanie przebiega w łagodnych warunkach pH, temperatury i bez rozpuszczalników organicznych; możliwość utworzenia korzystnej orientacji enzymu względem powierzchni nośnika; możliwość użycia enzymu w formie częściowo oczyszczonej lub nawet homogenatu komórkowego; wielopunktowe wiązanie enzymu z ligandem zapewnia zwiększoną stabilność preparatu w obecności czynników denaturujących, przy niezmiennych parametrach kinetycznych. W metodzie tej z nośnikiem wiąże się (zwykle kowalencyjnie) odpowiedni dla enzymu ligand, który oddziałuje z enzymem specyficznie i, korzystnie, w miejscu oddalo-

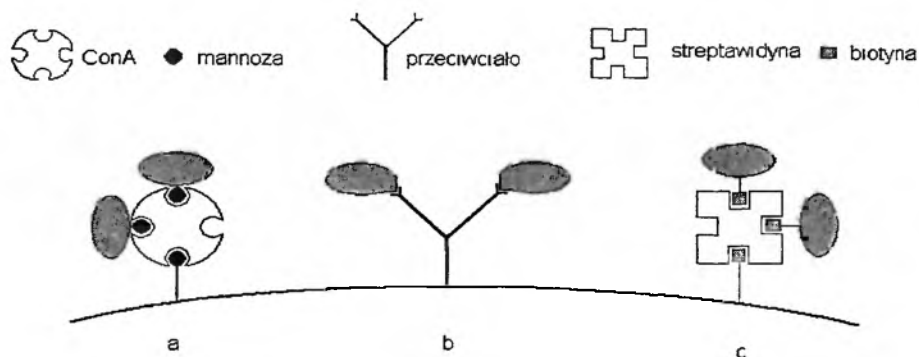
nym od centrum aktywnego. Stosowane ligandy różnią się wartościami stałych wiązania i stopniem specyficzności [224]. Najczęściej stosowane układy to:

1. Glikoproteidy – lektyny (Rys. 7 a). Lektyny mogą pochodzić z roślin, zwierząt lub mikroorganizmów i posiadają możliwość specyficznego łączenia się z glikozylowanym fragmentem białka (stała wiązania 10^6 – 10^7 [224]). Najchętniej stosowaną w immobilizacji lektyną jest konkanawalina A (Con A), posiadająca 4 podmiejsca do wiązania α -D-mannozy [230]. Za jej pośrednictwem wiązano naturalne glikoproteidy jak: inwertaza [224, 230, 231], peroksydaza i oksydaza glukozowa [224, 230, 232, 233] oraz karboksypeptydaza i fosfataza kwaśna [229] lub enzymy modyfikowane mannozą: oksydaza glukozowa i mleczanowa [229], peroksydaza [230], lakkaza i tyrozynaza [106]. Natomiast Con A zwykle jest wiązana kowalencyjnie z nośnikiem poprzez grupy aminowe [224, 232] lub przez depozycję na nośniku [230, 233];

2. Enzym – przeciwciało monoklonalne lub poliklonalne (Rys. 7 b). Metoda wiązania opiera się na powinowactwie immunologicznym wiazanego białka i jego przeciwciała (stałe wiązania 10^5 – 10^{11}) monoklonalnego (drogic ale maksymalna specyficzność) lub poliklonalnego (tańsze ale szerokie spektrum powinowactwa) [224]. Przeciwciała zwykle wiąże się kowalencyjnie z nośnikiem poprzez oligosacharyd przeciwciała, co najczęściej powoduje jego korzystną orientację przestrzenną względem nośnika i wiazanego enzymu. Popularność wykorzystywania oddziaływań białko-przeciwciało w chromatografii powinowactwa powoduje, że często znane są warunki wiązania przeciwciał z nośnikami i warunki oddysocjowania enzymu, co ułatwia praktyczne wykorzystanie tej metody immobilizacji [234]. I tak, z przeciwciałami monoklonalnymi wiązano karboksypeptydazę, peroksydazę, reduktazę azotanową, esterazę acetylocholinową, oksydazę cholinową i glukozową, dehydrogenazę mleczanową, a z poliklonalnymi wiązano β -galaktozydazę, α -amylazę i glukooamylazę, trypsynę, chymotrypsynę i subtilizynę, a także ureazę, inwertazę czy L-hydantoinazę [98, 224, 229];

3. (Strept)awidyna – biotyna (Rys. 7 c). Awidyna (z białka jaja kurzego, tańsza i o mniejszej specyficzności) i streptawidyna (pochodzenia bakteryjnego, droższa i o większej specyficzności) charakteryzują się posiadaniem 4 miejsc wiążących biotynę z unikalnie dużą siłą oddziaływań (stałe wiązania około 10^{15} [224]), co zalicza je do najsilniejszych wiązań niekowalencyjnych. Związanie enzymu z nośnikiem poprzez (strept)awidynę można zrealizować na kilka sposobów: (1) do biotynylowanego nośnika dodaje się ligand a następnie biotynylowany enzym [47]; (2) ligand wiąże się z nośnikiem kowalencyjnie i wiąże się biotynylowane białko [98, 229]; (3) do biotynylowanej matrycy dodaje się białko chimeryczne, otrzymane przez fuzję genu danego enzymu i genu kodującego streptawidynę lub fragment kodujący obszar odpowiedzialny za rozpoznanie biotyny [104, 229, 235–237]. Natomiast biotynylowane enzymy otrzymuje się poprzez modyfikację chemiczną [98, 229] lub metodami inżynierii genetycznej, włączając biotynę lub peptyd z biotyną [236]. Przykładami immobilizacji enzymów z wykorzystaniem właściwości (strept)awidyny są: trypsy-

na, β -glukozydaza, β -galaktozydaza i fosfataza alkaliczna [235], lipaza [106], keratynaza [237].



Rysunek 7. Przykłady odwracalnego wiązania enzymu z powierzchnią nośnika na bazie specyficznych oddziaływań pomiędzy lektyną a mannozą związaną z białkiem (a), enzymem a przeciwciałem (b) oraz streptawidyną a biotyną związaną z białkiem (c)

Powyższe metody łączy szczególnie wysoki koszt otrzymywania preparatów enzymatycznych, głównie spowodowany ceną ligandów i modyfikowanych enzymów. Dlatego główny obszar praktycznych zastosowań to produkcja biosensorów, szczególnie bioczypów, w których niewielkie rozmiary powierzchni do wiązania enzymów wymuszają stosowanie czystych biokatalizatorów i o korzystnie zorientowanym centrum aktywnym [229, 238].

2.2.2.4. Wiązanie kowalencyjne

Technika ta polega na utworzeniu wiązania kowalencyjnego pomiędzy grupami funkcyjnymi białka i nośnika. Liczne opracowania książkowe i publikacje przeglądowe wyczerpująco omawiają zagadnienia związane z chemią modyfikacją nośników i reakcjami wiązania enzymów [2, 16, 34, 62, 70, 98, 140, 144, 158, 160; 239 i 240 w języku polskim], dlatego ograniczono się do przedstawienia najczęściej stosowanych sposobów immobilizacji.

Przede wszystkim jest to metoda wymagająca wiedzy o podatności i dostępności grup funkcyjnych białka w wybranym sposobie immobilizacji, a także możliwości wystąpienia inaktywacji enzymu w warunkach tworzenia wiązania. Ponieważ zarówno skład aminokwasowy wielu enzymów, a w szczególności prawdopodobieństwo wystąpienia danego aminokwasu na powierzchni białka, jak i ich stabilność w danych warunkach wiązania (pH, temperatura, obecność rozpuszczalników organicznych), często nie są znane, wybór metody ma zwykle charakter przypadkowy. Teoretyczne wskazania są takie, żeby w wiązaniu kowalencyjnym wykorzystywać takie grupy funkcyjne, które są podatne na modyfikację chemiczną i nie są zaangażo-

wane w proces katalizy oraz nie biorą bezpośredniego udziału w stabilizacji struktury III- i IV-rzędowej białka. Rozpatrując około 20 aminokwasów białkowych, 11 można aktywować chemicznie lub wykorzystać w wiązaniu z aktywnym nośnikiem. Są to grupy: hydroksylowe seryny i treoniny; tioeterowa metioniny; indolowa tryptofanu; imidazolowa histydyny; guanidynowa argininy; fenolowa tyrozyny; karboksylowe kwasu asparaginowego i glutaminowego lub aminokwasu C-końcowego; sulfhydrylowa cysteiny; aminowe lizyny lub N-końcowego aminokwasu. Jednak, uwzględniając niską reaktywność seryny i treoniny w roztworach wodnych oraz niską częstotliwość występowania kilku następnych aminokwasów, najczęściej w reakcjach wiązania kowalencyjnego bierze udział ugrupowanie tiolowe cysteiny, fenolowe tyrozyny, imidazolowe histydyny i aminowe lizyny [34, 158].

Rozpatrując grupy funkcyjne nośników, do wytworzenia wiązania kowalencyjnego z białkiem wykorzystać można: aminy aromatyczne i I-rzędowe, grupy hydroksylowe i karboksylowe, pochodne bezwodników kwasowych i cyklicznych węglanów, winylosulfonowe i winyloketonowe, oksiranowe i aldehydowe, halogenkowe i tiolowe oraz imidoestrowe. Jednak kapitalna większość procedur wiązania dotyczy immobilizacji z wykorzystaniem ugrupowań hydroksylowych, karboksylowych, aminowych i oksiranowych. Obecność grup funkcyjnych na/w nośniku wynika albo z jego składu (np.: nośniki organiczne z polimerów naturalnych), albo jest wprowadzana na etapie jego syntezy. W pozostałych przypadkach nośnik musi być poddany funkcjonalizacji metodami chemicznymi lub fizycznymi. O efekcie końcowym immobilizacji decyduje ilość, jakość i dystrybucja grup funkcyjnych na/w nośniku.

Tabela 2. Główne rodzaje chemicznej aktywacji grup funkcyjnych nośnika oraz białka. Plussem oznaczono odporność białka i nośnika na warunki aktywacji

| Typ aktywacji | Białko | Nośnik |
|-----------------------------------|--------|--------|
| Diazowanie | - | + |
| Tworzenie wiązań amidowych | +/- | + |
| Alkilacja i aryłacja | + | + |
| Tworzenie zasad Schiffa* | + | + |
| Reakcja Ugi** | - | + |
| Amidynowanie | - | + |
| Tworzenie wiązań disiarczkowych | - | + |
| Indukcja promieniowaniem γ | + | + |

* wiązanie pomiędzy grupą karbonylową zaktywowanego nośnika i grupą aminową białka lub przyłączenie grupy aminowej enzymu do podwójnego wiązania w α,β -nienasyconych oligomerach aldehydu glutarowego

** utworzenie *N*-podstawionego amidu w sekwencyjnej reakcji czterech ugrupowań funkcyjnych (-NH₂, -CHO, -CO₂H, -NC)

Tabela 3. Sposoby i warunki wiązania kowalencyjnego enzymów z różnymi typami grup funkcyjnych nośników

| Grupa funkcyjna nośnika | Grupa funkcyjna białka | Czynnik wiążący/aktywujący | Wartość pH korzystna dla reakcji wiązania białka |
|----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--|
| -COOH | -NH ₂ | karbodiimid | 3,5-4,5 |
| | -COOH | izocyjanki | 4,0-8,0 |
| | -NH ₂ , -SH, -OH | metoda azydkowa | 8,0-9,0 |
| -NH ₂ | -NH ₂ | aldehyd glutarowy | 6,0-8,0 |
| | -NH ₂ | kwask askorbinowy | 6,0-7,0 |
| | -COOH | karbodiimid | 3,5-4,5 |
| | -COOH | izocyjanki | 4,0-8,0 |
| | -NH ₂ | karbodiimid | 8,0-9,5 |
| | -NH ₂ | triazol | 7,5-9,5 |
| aminy aromatyczne | -NH ₂ , imidazol | sole diazoniowe | 6,0-8,0 |
| | -OH | | 8,0-9,0 |
| grupy oksiranowe lub glicydylowe | -SH | | 7,0-9,0 |
| | -NH ₂ | | 9,0-11,0 |
| | -OH | | 11,0-13,0 |
| -SH | -SH | | 5,0 |
| -OH | -NH ₂ | diwinylosulfon | 6,0-10,0 |
| | -SH | | 9,0-11,0 |
| | -OH | | 11,0-13,0 |
| | -NH ₂ | nadjodan sodu i aminacja redukcyjna | 7,0-11,0 |
| | -NH ₂ | bromocyjan | 8,0-10,0 |
| | -NH ₂ | hydrazyna | 7,0-9,0 |
| | -NH ₂ | benzochinon | 7,0-9,0 |
| | -NH ₂ | nadjodan sodu | 7,5-8,5 |
| | -NH ₂ -OH | trichloro-s-triazyna | 7,05-9,0 |
| | -NH ₂ | karbodiimid | 8,0-9,5 |
| | -NH ₂ | chlerek tresylu | 7,5-10,5 |
| | -OH | sole diazoniowe | 6,0-8,0 |
| -NH ₂ | mrówczan <i>p</i> -nitrofenylu | 8,5-9,5 | |

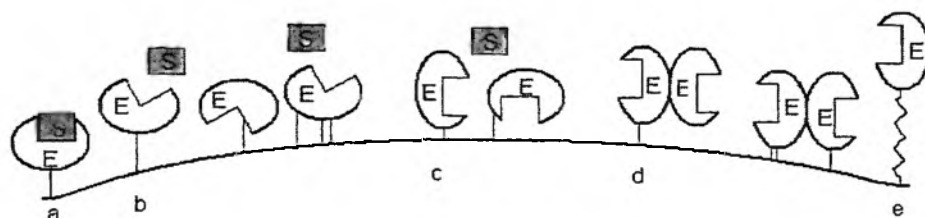
Celem wytworzenia wiązania kowalencyjnego pomiędzy enzymem a nośnikiem, zazwyczaj jeden z tych elementów musi być poddany aktywacji. Ponieważ część procedur wywołuje denaturację enzymu (Tabela 2), a usunięcie nadmiaru aktywatora z roztworu białka stanowi dodatkowe utrudnienie, najczęściej aktywacji poddawane

są grupy funkcyjne nośnika. Natomiast sam czynnik aktywujący może pełnić rolę aktywatora reakcji tworzenia wiązania kowalencyjnego (jak bromocyjan czy karbodiimid) lub wbudowywać się pomiędzy grupy funkcyjne nośnika i białka (jak aldehyd glutarowy lub diwinylosulfon). Wykaz najczęściej aktywowanych grup funkcyjnych nośników, stosowanych aktywatorów i ugrupowań funkcyjnych białka zestawiono w tabeli 3 [144, 241–244].

Obok nośników wymagających wstępnej funkcjonalizacji/aktywacji, dostępne są również takie, które posiadają ugrupowania reaktywne. Przykładami są nośniki aktywowane bromocyjanem (Agarose CNBr, CNBr silica, CNBr-Sepharose 4B), diwinylosulfonem (MINI LEAK, Separon HEMA, Immobilon), diazofluoroboranem (Bakerbond), karbodiimidem (Reacti-Gel), aldehydem glutarowym (Bakerbond, Agarose ActiBind ALD, ACTIGEL A, Polybead, Act-Ultrigel) lub z ugrupowaniem tresylowym (SelectiSpher, tresyl-Sepharose 4B, Selecti-Sphere-10) czy epoksydowym (Affi-Prep, Affi-Gel, Bakerbond, Eupergit, Ultraaffinity-EP, VA-Epoxy Biosynth, Indion, Durasphere AS, Separon HEMA). Producenci wymienionych nośników to: Beckman, Bio-Rad, Crescent, ICN, J.T. Baker, Kem-En-Tec, Millipore, Pharmacia, Phoenix, Pierce, Polysciences, Rainin, Riedel-de Haen, Röhm Pharma, Serva, Sterogene, Tessek.

Typowa procedura immobilizacji poprzez wytworzenie wiązań kowalencyjnych rozpoczyna się od wybrania warunków i czasu aktywacji oraz doboru warunków i czasu niezbędnego do wytworzenia wiązania kowalencyjnego białko–nośnik. Przeciętnie czas tworzenia tego wiązania jest znacznie dłuższy niż 2 h i decyduje o prawdopodobieństwie utworzenia wiązań pojedynczych lub wielokrotnych. O efekcie końcowym immobilizacji głównie decydują: powierzchnia nośnika dostępna dla białka; ilość zaktywowanych grup funkcyjnych nośnika; rodzaj czynnika wiążącego czynnikiem z nośnikiem; dostępność grup funkcyjnych białka w danym pH; odległość związanego enzymu od powierzchni nośnika i orientacja przestrzenna centrum aktywnego; mono- lub wielopunktowe związanie enzymu z nośnikiem i powinowactwo chemiczne enzymu do materiału nośnika.

Celem nadrzędnym immobilizacji kowalencyjnej jest trwałe związanie enzymu z nośnikiem, jednak obok dodatkowych korzyści, jak zwiększenie odporności biokatalizatora na czynniki denaturujące przez usztywnienie konformacji białka, mogą pojawić się zjawiska niekorzystne, obniżające aktywność otrzymanego preparatu. Przede wszystkim część białka ulega nieodwracalnej denaturacji na skutek modyfikacji chemicznej lub utworzenia wiązania z aminokwasem z centrum aktywnego (Rys. 8 b). Wiązanie chemiczne może również indukować rozfałdowanie struktury III-rzędowej białka, a centrum aktywne może być niekorzystnie zorientowane względem powierzchni nośnika (Rys. 8 c). Z kolei wiązanie wielopunktowe, zwiększając stabilność enzymu, zwiększa też prawdopodobieństwo wystąpienia niekorzystnych zmian konformacyjnych (Rys. 8 b). Natomiast nadmiar związanego białka często wywołuje przestrzenne przeszkody w dotarciu substratu do enzymu (Rys. 8 c).



Rysunek 8. Kowalencyjne związanie enzymu (E) z nośnikiem. Enzym aktywny (a) i nieaktywny na skutek zmian konformacyjnych (b) lub przeszkód przestrzennych (c); nieprawidłowe i prawidłowe związanie oligomerycznych białek enzymatycznych (d); związanie enzymu z wbudowaniem ramienia przestrzennego (e)

Ilość możliwych kombinacji w doborze nośnika i procedury wiązania oraz niejasne, zazwyczaj, przyczyny wysokiej lub niskiej aktywności preparatu po immobilizacji, najczęściej uniemożliwiają racjonalny dobór metody wiązania, odpowiedniej dla danego enzymu. Istnieje zaledwie kilka wskazań, których nie można traktować jak reguły. I tak, celem ochrony centrum aktywnego, można wiązać enzym w obecności inhibitora kompetycyjnego lub substratu, co blokuje ugrupowania istotnie katalitycznie lub też można immobilizować prekursorzy enzymu [2, 175]. Zwiększenie prawdopodobieństwa korzystnej orientacji centrum aktywnego osiąga się, wprowadzając dodatkowe ugrupowania funkcyjne modyfikacją chemiczną lub metodami inżynierii genetycznej tak, aby były usytuowane po przeciwnej, do centrum aktywnego, stronie białka [2, 34]. W przypadku niektórych enzymów, jak glukoamylaza czy lewanosacharaza, immobilizacja poprzez aldehyd glutarowy jest niekorzystna [161, 175], natomiast acylaza penicylanowa nie powinna być wiązana przez grupy $-\text{COOH}$ tego białka [245]. Z kolei glikoproteidy, jak oksydaza glukozy, peroksydaza czy inwertaza, korzystnie jest wiązać poprzez ich elementy węglowodanowe [43, 98, 246]. W przypadku wiązania enzymów będących białkami oligomerycznymi, tylko wiązanie wielopunktowe może ograniczyć oddysocjowanie podjednostek [34, 247, 248] (Rys. 8 d). W przypadku reakcji z substratami będącymi polimerami, problemy związane z przeszkodami w dotarciu substratu do centrum aktywnego można obniżyć poprzez niskie obsadzenie powierzchni nośnika białkiem lub/ oraz wbudowanie ramienia przestrzennego (ang. *spacer arm*) pomiędzy nośnik a białko [239, 240, 249, 250] (Rys. 8 e). Natomiast stabilność wiązania poprzez zasady Schiffa można zwiększyć, redukując wiązania podwójne borowodorkiem sodu, cyjanoborowodorkiem sodu lub kwasem askorbinowym [243, 251].

Ponieważ metoda wiązania kowalencyjnego jest równie popularna jak immobilizacja adsorpcyjna, również w tym przypadku trudno wymienić nośniki i enzymy w niej nie wykorzystane. Aktywacji poddawano nośniki nieorganiczne [165, 245, 252–261], organiczne pochodzenia naturalnego [169, 170, 179, 223, 248, 262–267] i syntetyczne [109, 173, 249, 268–276] oraz hybrydowe [127, 277]. Bardzo często wykorzystuje się nośniki handlowe, posiadające ugrupowania reaktywne (np.: Sephadex [278, 279], epoxysilica [141], CNBr Sepharose [246], a szczególnie chętnie

Eupergit C, z ugrupowaniem epoksydowym [214, 215, 220, 263, 280–288], któremu poświęcono oddzielną pracę przeglądową [89]. Enzymy wiązane kowalencyjnie z nośnikami nierozpuszczalnymi w wodzie relatywnie rzadko stosuje się w reakcjach z niską zawartością wody [220, 269, 279, 289]). Główne zastosowania to:

- produkcja biosensorów z takimi np. enzymami jak: oksydaza glukozowa [253, 257, 258, 277, 278], peroksydaza chrzanowa [268, 289], dehydrogenaza formaldehydowa [165], trehalaza [262], katalaza [52], trypsyna [257], lipaza [289], NAD⁺-dehydrogenazy, tyrozynazy, lakkazy [106, 248];

- procesy enzymatyczne jak: hydroliza białek [127, 170, 244, 291], tłuszczów [109, 179, 262, 272, 292], oligo- i polocukrów [246, 249, 254, 255, 260, 265–267, 274, 275, 285, 286, 293], pektyn [294] i penicyliny G lub V [245, 263, 269, 270, 280–282, 284], a także reakcje izomeryzacji [96, 295] oraz z hydantoinazą [268, 280], lakkazą [288], oksydazą glukozową [251] i naringinazą [27].

2.2.3. Sieciowanie enzymu

W odróżnieniu od innych, nierozpuszczalnych w wodzie katalizatorów enzymatycznych, preparaty otrzymywane metodami sieciowania nie zawierają istotnego udziału masowego nieaktywnego nośnika. Obecność nośnika, stanowiącego od 90,0 do 99,9% masy całkowitej preparatu [297], powoduje „rozcieńczenie” aktywności w reaktorach, obniżając produktywność układu. Natomiast immobilizacja oparta na bezpośrednim sieciowaniu białek w różnych formach oferuje preparaty o najwyższej, z możliwych, aktywności w przeliczeniu na jednostkę masy finalnego produktu.

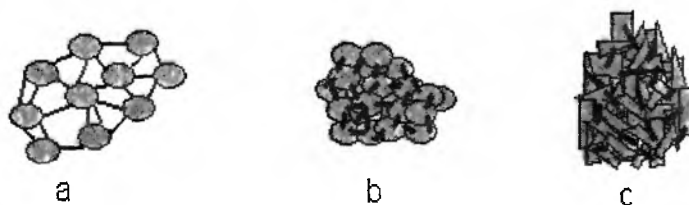
Ogólny schemat otrzymywania usieciowanych preparatów polega na utworzeniu wielokrotnych, i w trzech wymiarach, wiązań kowalencyjnych pomiędzy cząsteczkami enzymu z wykorzystaniem odpowiednich reagentów. Tymi reagentami mogą być jedno, dwu- i wielofunkcyjne czynniki sieciujące, przy czym najczęściej stosowane są reagenty dwufunkcyjne. Czynniki wiążące cząsteczki białka można podzielić na [3, 144]:

- indukujące utworzenie wiązania kowalencyjnego bezpośrednio pomiędzy dwoma ugrupowaniami chemicznymi enzymów, bez wbudowania dodatkowego elementu. Są to karbodiimidy, pochodne izoksazodynowe i chloromrówczy;

- wbudowujące się pomiędzy grupami funkcyjnymi białek. Mogą one być: (1) homodifunkcyjnymi związkami acylującymi, z przewagą specyficzności względem grup aminowych (diimidoestry, bis-succinimidyl, diizocyjaniiny, diizocyjanaty, halogenki disulfonowe, estry dinitrofenylowe, dialdehydy, diacyloazydki) lub homodifunkcyjnymi związkami alkilującymi, specyficznymi względem grup sulfhydrylowych (bis-maliimidy, pochodne bis-haloacetylowe, dialkilohalogenki, bis-oksirany), oraz (2) związkami heterodifunkcyjnymi, będącymi kombinacją grup reaktywnych czynników alkilujących i acylujących.

Mimo dużej różnorodności czynników sieciujących białka, zdecydowanie najczęściej wykorzystuje się aldehyd glutarowy. Swoją popularność zawdzięcza głów-

nie stabilności, niskiej cenie, wydajności, łagodnym warunkom sieciowania i certyfikatowi GRAS [98, 140]. Istnieją jednak próby jego zastąpienia równie reaktywnymi i mniej toksycznymi, ale niestabilnymi dialdehydami, bazującymi na glukozie, laktozie i galaktozie [298, 29].



Rysunek 9. Metody immobilizacji poprzez sieciowanie rozpuszczonego (a), w formie agregatów (b) i kryształów (c) białka

Sieciovaniu można poddać różne formy enzymu. Popularną procedurą jest sieciowanie białka uprzednio związanego z nośnikiem lub zamkniętego w sieci żelu, co jednak należy traktować jako uzupełnienie innych technik immobilizacji. Natomiast procedury tworzenia preparatów bez dodatkowej masy nośnika ograniczają się do sieciowania enzymu w roztworze wodnym lub agregatów białkowych, lub kryształów (Rys. 9). Metody te łączy tworzenie trójwymiarowej struktury, w której cząsteczki enzymu są połączone wielokrotnymi wiązaniami kowalencyjnymi i oddziaływaniami niekowalencyjnymi, co daje unikalnie wysoką stabilność enzymu w preparacie, ale jednocześnie istotną utratę aktywności.

2.2.3.1. Sieciovanie białka w formie rozpuszczalnej

Sieciovanie rozpuszczonego w wodzie enzymu jest najwcześniejszą metodą otrzymywania nierozpuszczalnych i nie zawierających nośnika preparatów enzymatycznych. Najczęściej wymienianą zaletą tej metody jest znaczący wzrost termostabilności oraz, rzadziej, stabilności operacyjnej. Spośród głównych wad należy wymienić dużą utratę aktywności, wywołaną wielopunktową modyfikacją chemiczną, niską powtarzalność metody oraz problemy z otrzymaniem jednolitych rozmiarowo agregatów i preparatów handlowych [140, 154, 297, 300]. Natomiast sama procedura, polegająca na dodaniu czynnika sieciującego do roztworu enzymu w ilości zapewniającej wypadanie z roztworu usieciovanych agregatów, należy do wyjątkowo prostych. Efekt końcowy zależy głównie od stężenia białka i czynnika sieciującego, wartości pH mieszaniny, temperatury i siły jonowej [297].

Wymienione powyżej wady sieciowania enzymu w formie rozpuszczalnej w wodzie spowodowały, że ta metoda została prawie zarzucona już w późnych latach 60. ubiegłego wieku [297]. Pojawienie się licznych modyfikacji metody nie wniosło znaczącej poprawy jakości preparatów. Modyfikacje te zmierzały przede wszystkim do

zmniejszenia przeszkód przestrzennych w dostępności centrum aktywnego enzymu dla substratu i zmniejszenie utraty aktywności, spowodowanej wielopunktową modyfikacją chemiczną enzymu poprzez kosieczowanie białek inertnych jak żelatyna, kazeina, albumina, kolagen lub polimerów rozpuszczalnych w wodzie [98, 144, 154, 301].

2.2.3.2. Sieciowanie agregatów

Sieczowane agregaty enzymatyczne (CLEAs – ang. *Cross-Linked Enzyme Aggregates*) są najnowszą metodą immobilizacji przez sieciowanie [297, 302–305]. W metodzie tej do roztworu enzymu dodaje się czynnika wywołującego niedenaturującą agregację, a otrzymane agregaty białka są następnie sieciowane dwufunkcyjnym reagentem. Właściwości katalityczne finalnego produktu w znacznym stopniu mogą zależeć od typu precypitacji (np.: wysalanie, wytrącanie rozpuszczalnikiem organicznym), zawartości białek balastowych, stężenia czynnika sieciującego i czasu sieciowania [297, 303, 304]. Duże problemy nastęrcza niewielka możliwość kontroli wielkości agregatów, dobór warunków agregacji i sieciowania oraz trudna kontrola sterowania porowatością preparatów. Do zalet zalicza się brak konieczności stosowania czystych białek enzymatycznych, niski koszt produkcji, łączenie immobilizacji z oczyszczaniem enzymu oraz, przede wszystkim, wysoką aktywność w przeliczeniu na masę preparatu (do 40%) i zwiększoną stabilność. Do chwili obecnej CLEAs były tworzone na bazie acylazy penicylanowej [297, 302, 303, 305] i lipazy [297, 304].

2.2.3.3. Sieciowanie kryształów

Mimo że pierwsze usieczowane kryształy enzymu (CLECs – ang. *Cross-Linked Enzyme Crystals*) otrzymano w latach 60. ubiegłego wieku [297], ich wartość, jako preparatów immobilizowanych, doceniono dopiero na początku lat 80., w związku z rozwojem katalizy enzymatycznej w środowiskach z ograniczoną zawartością wody [306]. Zainteresowanie wzbudziła wysoka pH- i termostabilność, odporność mechaniczna, stabilność w rozpuszczalnikach organicznych i bardzo wysoka aktywność w przeliczeniu na jednostkę masy preparatu, związana z gęstym upakowaniem cząsteczek enzymu w kryształach. Przeciętą procedurą polega na otrzymaniu mikrokryształów lub zarodków krystalizacyjnych o rozmiarach 1–20 μm , które sicciuje się zwykle aldehydem glutarowym [307, 308] lub diaminami, jeżeli enzym jest glikozylowany [309]. Jest to tak zwane sieciowanie wewnątrz kryształu, po którym następuje dalsze sieciowanie pomiędzy kryształami, prowadzące do zwiększenia rozmiaru CLECs i wzrostu utraty rozpuszczalności w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych. Regulacja czasu sieciowania pozwala otrzymać preparaty o rozmiarach od 5 do 100 μm , a dodatkowe dalsze sieciowanie zwiększa stabilność operacyjną preparatu, jednak kosztem utraty części aktywności [307, 309–311].

Jest to jedna z droższych i bardziej skomplikowanych metod immobilizacji. Wysoka cena wynika z kosztów otrzymywania czystego enzymu, niezbędnego do produkcji kryształów [300, 306, 309], natomiast skomplikowanie jest skutkiem problemów z doбором warunków krystalizacji (pH, temperatura, precypitant, przeciwojny, stężenie białka) oraz warunków sieciowania (stężenie czynnika sieciującego i dobór rozpuszczalnika) [306, 307, 309]. Jednak wysoki koszt może zostać skompensowany wyjątkowo wysoką stabilnością operacyjną i możliwością długoterminowego przechowywania [312]. Dodatkową zaletą sieciowanych kryształów jest obecność w preparacie otwartych kanałów o rozmiarach 20–55 Å, co ułatwia dyfuzję substratów i produktów [309, 312]. W efekcie, opory dyfuzyjne w preparacie są porównywalne z występującymi w innych heterogenicznych biokatalizatorach [300, 302], przy wyraźnie większej stabilności w rozpuszczalnikach organicznych i mieszaninach wodno-organicznych [89, 297, 300, 307, 308].

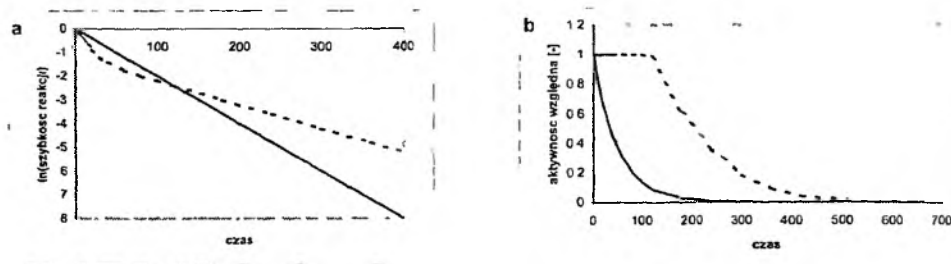
CLECs są chętnie stosowane do immobilizacji enzymów multimerycznych oraz stosowanych w rozpuszczalnikach organicznych [89, 300, 306–310, 313]. Najczęściej prezentowane reakcje z udziałem CLECs, to rozdział chiralny związków, transestryfikacja, transformacje chemo-, regio- i stereoselektywne oraz synteza oligopeptydów z udziałem lipaz, chymotrypsyny i dehydrogenazy alkoholowej [306, 309], acylazy penicylanowej [306], subtylizyny [308, 314], termolizyny [313] i liazy hydroksynitrylowej [307] oraz hydroliza penicylin z udziałem acylazy penicylanowej [102] i produkcja syropów fruktozowych z izomerazą glukozową [310, 311, 315, 316].

3. MIESZANE METODY IMMOBILIZACJI ENZYMÓW

Łączenie różnych metod immobilizacji/stabilizacji enzymów jest obecnie praktyką częstą, a jej popularność wynika z niskiej stabilności operacyjnej preparatów otrzymywanych z wykorzystaniem jednej z procedur. Przykładami może być stabilizacja enzymu (zwykle metodą chemiczną), a następnie adsorpcja [42] lub mikro(makro)enkapsulacja [139], lub sieciowanie [97], lub zamknięcie w sieci żelu [269, 317]. Często sieciuje się enzym uprzednio związany z nośnikiem adsorpcyjnie [166, 175, 186, 205, 207] lub kowalencyjnie [262]. Można również zamykać enzym w sieci żelu, a następnie preparat poddać otoczkowaniu [276, 294, 318, 319] lub sieciowaniu [96, 320]. Z kolei w sieci żelu zamyka się enzymy zaadsorbowane na nośniku [96, 213], mikro(makro)kapsułkowane [103, 321] lub związane kowalencyjnie z nośnikiem [213, 264]. Są również przykłady sieciowania enzymów otoczkowanych [319] oraz poddanych mikro(makro)enkapsulacji po uprzedniej adsorpcji na nośniku [322].

4. WŁAŚCIWOŚCI PREPARATÓW IMMOBILIZOWANYCH

Pełna charakterystyka enzymu po immobilizacji obejmuje informacje o ilości związanego białka, aktywności i stabilności w zależności od wartości pH i temperatury, odporności na rozpuszczalniki organiczne i zanieczyszczenia substratu, wartościach parametrów kinetycznych, braku/obecności oporów transportu masy oraz stabilności operacyjnej i w warunkach przechowywania.

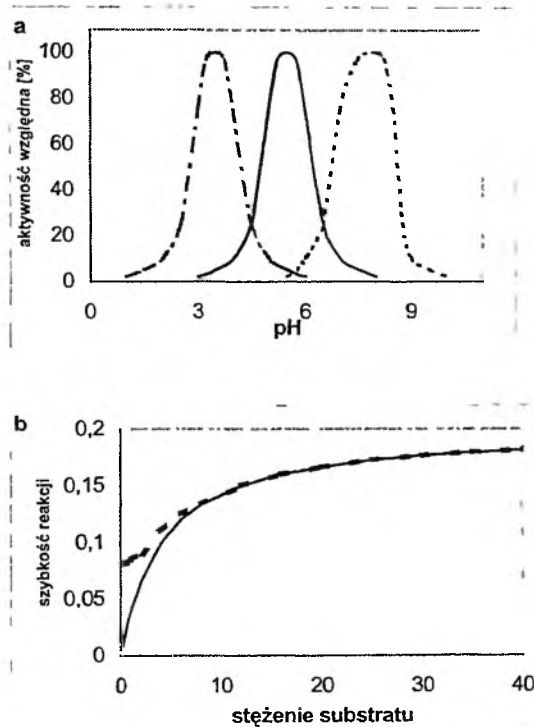


Rysunek 10. Zmiany stabilności enzymu po immobilizacji (-----), wywołane otrzymaniem frakcji enzymu o zróżnicowanej stabilności (a) lub związaniem wielu warstw enzymu (b)
Enzym natywny – linia ciągła

Stabilność operacyjna i w warunkach przechowywania jest zwykle efektem stabilizacji na poziomie molekularnym i ilości związanego białka. Często wyraża się zmianą kinetyki inaktywacji, wskazującą na istnienie dwóch lub więcej populacji enzymu o różnej stabilności [34, 265] (Rys. 10 a). Wysokie stężenie białka w preparacie powoduje, że początkowo jedynie zewnętrzna warstwa przejawia aktywność, a po jej denaturacji „ujawniają” się kolejne warstwy (tzw. efekt Zulu [140]) (Rys. 10 b). Stabilność w warunkach ciągłej ekspozycji na warunki procesowe należy odróżnić od zwykle prezentowanych w literaturze badań nad kinetyką inaktywacji w nieobecności reagentów, które mogą stabilizować/destabilizować enzym.

Aby enzym po immobilizacji był aktywny, musi posiadać odpowiednią konformację i umożliwiającą ruchliwość konformacyjną. Większość procedur immobilizacji wywołuje zmiany konformacji i ogranicza ruchliwość, czyniąc część cząsteczek nieaktywnymi. Powoduje to niską aktywność enzymu w przeliczeniu na ilość związanego białka [34]. Natomiast jest wysoce mało prawdopodobne, aby zmiany właściwości enzymu były skutkiem immobilizacji. Częściej przyczyną zmian jest mikrośrodowisko, w jakim funkcjonuje enzym [65, 140, 300, 323]. Rola mikrośrodowiska jest szczególnie dobrze widoczna w przypadku porowatych, jonowymiennych i nierozpuszczalnych preparatów i uwidacznia się zmianą wartości pH_{opt} , t_{opt} i parametrów równania kinetycznego Michaelisa-Menten. Wyróżnia się tu dwa główne czynniki, które w rzeczywistych procesach zwykle występują jednocześnie. Jest to zróżnicowana dystrybucja reagentów pomiędzy roztworem zewnętrznym i w porach preparatu oraz wystąpienie obszarów z dominującą dyfuzją reagentów.

Stosownie do posiadanych właściwości fizykochemicznych preparatu enzymatycznego, zwykle mają miejsce niekatalityczne oddziaływania substratu, produktu, inhibitora, składników buforu z materiałem nośnika [71, 140, 270, 300]. Dla przykładu, jeżeli wypadkowy ładunek preparatu jest ujemny a substrat jest kationem, to dochodzi do koncentracji substratu w obrębie preparatu (w pobliżu enzymu). Zjawisko to, w odniesieniu do jonów (np. składniki buforu) również ma miejsce, obniżając wartość pH w preparacie. W efekcie różnych stężeń reagentów i jonów w obrębie preparatu i w roztworze zewnętrznym, obserwuje się zmiany w wartościach pH_{opt} (Rys. 11 a) czy nietypowe zależności szybkości reakcji od stężenia substratu (Rys. 11 b).

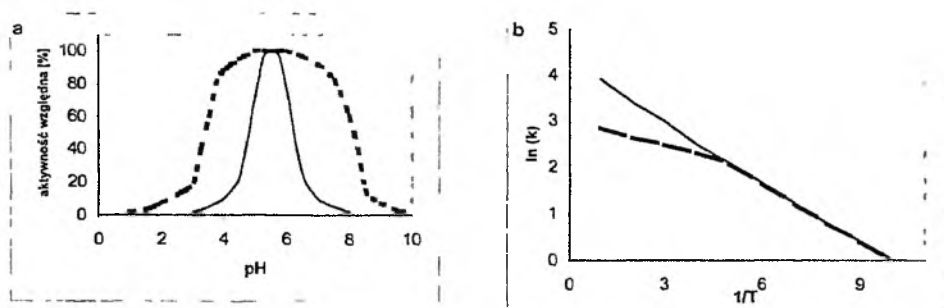


Rysunek 11. Zmiany w wartościach pH_{opt} (a) i zależności szybkości reakcji od początkowego stężenia substratu (b), wywołane podziałem jonów lub substratu w preparacie immobilizowanym i w roztworze zewnętrznym. Linia ciągła – enzym natywny; przerywana – enzym immobilizowany

Opory dyfuzyjne to w dużym przybliżeniu skutek fizycznych rozmiarów reagentów i porowatości preparatu immobilizowanego [140]. Opory dyfuzyjne są odpowiedzialne za tworzenie gradientów stężeńowych substratu i produktu, spowodowanych niską szybkością ich dyfuzji w żelu i porach nośnika. Zjawiska te nie dotyczą związków towarzyszących reakcji (np. buforu). Efekty dyfuzyjne występują w dwóch

obszarach. W obszarze zewnętrznym, bezpośrednio otaczającym preparat (tzw. warstwa Nernsta) ma miejsce bierna dyfuzja molekularna. Grubość tej warstwy można zredukować mieszaniem i w odpowiednich warunkach zjawisko to jest do pominięcia [34, 65, 196, 295, 302, 324]. Ograniczenia dyfuzyjne wewnątrz preparatu nie mogą być minimalizowane mieszaniem, gdyż transport masy zależy tylko od dyfuzji molekularnej. Limitowanie szybkości reakcji dyfuzją w obszarze wewnętrznym preparatu jest szczególnie dobrze widoczne w preparatach żelowych i o rozwiniętej powierzchni ziarna nośnika. Tego typu ograniczenia mogą być pomijalne tylko w przypadku procesu limitowanego szybkością reakcji (bardzo wolna reakcja, np. w rozpuszczalnikach organicznych [28, 179, 325]).

Kombinacja efektów zróżnicowanej dystrybucji reagentów, wywołanej powinowactwem preparat–substrat/produkt i oporów dyfuzyjnych może dać efekt synergiczny lub antagonistyczny. Często pierwszym sygnałem takiej kombinacji jest poszerzenie zakresu wartości pH_{opt} [65, 140] (Rys. 12 a). Rozróżnienie obu zjawisk nie jest proste, ale uważa się, że przy dominującym powinowactwie reagentów do preparatu oraz w stałej sile jonowej enzym zachowuje się zgodnie z kinetyką Michaelisa-Menten. Jeżeli dominują efekty dyfuzyjne, na wykresie Lineveawera-Burka otrzymuje się sigmoidalną krzywą [140, 302].



Rysunek 12. Wpływ zróżnicowanych stężeń reagentów w nośniku i roztworze zewnętrznym na zależność aktywności od wartości pH (a) i od odwrotności temperatury (b). Linia ciągła – enzym natywny; linia przerywana – enzym immobilizowany

Parametry kinetyczne, np.: wartości V_{max} ($k_3 \times C_E$) i K_m , w przypadku preparatów immobilizowanych muszą być zdefiniowane [140, 323]. W układzie realnym wartość stałej szybkości reakcji (k_3) jest kombinacją rzeczywistej szybkości reakcji w warunkach wysycenia substratem oraz oporów dyfuzyjnych. Natomiast stała Michaelisa jest miarą rzeczywistego powinowactwa enzym–substrat, zmodyfikowanego efektami zróżnicowanej dystrybucji reagentów w obrębie nośnika wywołanych dyfuzją i współczynnikami podziału. Stąd w pracach, w których nie wyznacza się obu parametrów w warunkach pozwalających powyższe efekty zaniedbać, stosuje się określenia pozornych (k_{app}) lub obserwowanych (k_{obs}), lub efektywnych (k_{eff}) wartości parametrów kinetycznych. Należy zwrócić uwagę, że ograniczenia dyfu-

zyjne są lepiej widoczne w niskich stężeniach substratu, a efekt różnych współczynników podziału w niskiej sile jonowej. Oba czynniki mogą powodować wzrost stałej Michaelisa nawet o jeden rząd [34, 70, 323]. Trzeba również pamiętać, że w katalizie heterogenicznej szybkość reakcji enzymu immobilizowanego zależy w niższych temperaturach głównie od właściwości kinetycznych preparatu, ale ze wzrostem temperatury dyfuzja substratu staje się czynnikiem limitującym szybkość (Rys. 12 b), gdyż temperatura wpływa silniej na zmianę szybkości reakcji niż na szybkość dyfuzji [65, 140, 302].

Immobilizacja prowadząca do otrzymania preparatów nierozpuszczalnych w wodzie zawsze oznacza ograniczenie ruchliwości enzymu, zróżnicowaną dystrybucję enzymu w preparacie a także, w większości przypadków, wpływa na ruchliwość i dystrybucję pozostałych reagentów [302]. Rzadkie przypadki braku zmian w stabilności enzymu po immobilizacji [58, 186, 326], braku zmian optimum pH i temperatury [58, 75, 111, 186, 208, 246, 275, 320, 326] czy wartości stałej Michaelisa [58, 77, 79, 276, 281] dotyczą głównie preparatów rozpuszczalnych w wodzie lub związanych z nośnikami nieporowatymi. W dotychczas cytowanej literaturze dominują doniesienia o wzroście pH- i termostabilności, zmianie pH_{opt} , t_{opt} oraz wzroście wartości stałej Michaelisa. Pełna charakterystyka enzymu po immobilizacji jest rzadko prezentowana [58, 88, 111, 178, 208, 216, 246, 275, 294, 326, 327] a rolę oporów dyfuzyjnych i dystrybucji reagentów z enzymem włącznie uwzględnia się sporadycznie [65, 157, 217, 254, 281, 295, 324, 328, 329]. Należy zwrócić uwagę, że procesy z udziałem enzymów immobilizowanych, szczególnie w reaktorach przepływowych, muszą być optymalizowane celem wyselekcjonowania korzystnych warunków operacyjnych. Obok znajomości właściwości preparatu enzymatycznego, należy znać powierzchnię i średnicę cząsteczek biokatalizatora, dystrybucję enzymu w preparacie, charakterystykę przepływów, lepkość oraz współczynniki dyfuzji (liczba Peckleta, Reynoldsa, Schmidta, Sherwooda, moduł Thiele'go) a globalne równanie kinetyczne wymaga przeciętnie wyznaczenia 9–13 wartości stałych [157, 267, 295, 324, 329, 330].

5. DOBÓR METODY IMMOBILIZACJI

Ogólnych zasad doboru rodzaju immobilizacji do enzymu/procesu, mogących ułatwić i zawęzić zakres planowanych eksperymentów, jest niewiele. Poniżej zebrano kilka podstawowych wskazań:

– enzymy oligomeryczne. W zdecydowanej większości przypadków dysocjacja enzymu do podjednostek jest jednoznaczna z częściową lub całkowitą utratą aktywności, stąd efektywne są metody sieciowania enzymów oraz zamykanie w sieci żelu, wielopunktowe związanie z powierzchnią nośnika lub sieciowanie już związane-go enzymu [33, 38, 95, 247, 331];

– systemy wieloenzymatyczne. W tych przypadkach preferuje się zamykanie enzymów w hydrożelach i mikro(makro)kapsułkach oraz otoczkowanie [34, 98, 143]. Raczej stosuje się koimmobilizację niż immobilizację na różnych nośnikach;

– substrat lub produkt polimeryczny albo lepki. Taki układ reakcyjny wyklucza możliwość stosowania preparatów żelowych [34, 98, 332]. W przypadku reakcji z substratem polimerycznym zaleca się w wiązaniu kowalencyjnym stosowanie „ramion przestrzennych” oraz wiązanie nie więcej niż jednej monowarstwy białka (około 1 g/m^2 [71]) lub wiązanie z polimerem odwracalnie rozpuszczalnym/nierozpuszczalnym w wodzie [34, 71, 300];

– substrat i produkt słabo rozpuszczalne. W tych przypadkach preparaty (nośniki) nie mogą być porowate, gdyż może dojść do krystalizacji reagentów w porach [332];

– analityka medyczna. Mała powierzchnia wiązania białka w biosensorach oraz konieczność stabilizacji powodują, że preferowane są metody wiązania kowalencyjnego i biospecyficznego [230, 238, 333–336]. Immobilizując enzym z myślą o analizach wykonywanych przez pacjentów, preferuje się zamykanie enzymów w polimerach żelowych, nanoszonych na bibułę filtracyjną [34];

– przemysł farmaceutyczny faworyzuje preparaty umożliwiające trwałe związanie białka: związane kowalencyjne, sieciowane kryształy oraz zamknięte w sicci żelu z następczym sieciowaniem [102, 332];

– lipazy. Dobrze tolerują kontakt z matrycami hydrofobowymi, a w środowisku wodnym często wykazują hiperaktywację, spowodowaną tworzeniem przez nośnik granicy faz, aktywującej enzym [168, 179];

– niska szybkość reakcji. Należy stosować w immobilizacji enzymy oczyszczone lub sieciowane, a reaktor ze złożem upakowanym jest zalecanym rozwiązaniem aparaturowym [300, 311, 315, 316];

– wartość stałej K_m po immobilizacji jest o rząd większa od wartości dla enzymu natywnego. Wykazanie znaczącej roli ograniczeń dyfuzyjnych wymusza konieczność ich minimalizacji przez zastosowanie preparatów nieporowatych [86, 260, 337] lub o uporządkowanej strukturze wewnętrznej z przenikającą się siecią połączeń [325], lub nośników szerokoporowatych o średnicy porów $> 30 \text{ nm}$ przy średnicy ziaren nieprzekraczającej $100 \mu\text{m}$ [71, 300, 302];

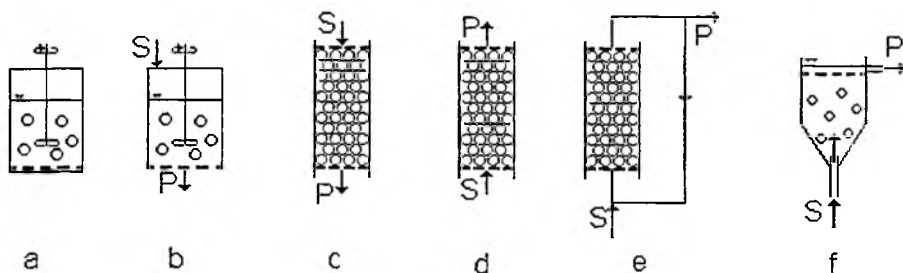
– reakcje w środowisku niewodnym. W rozpuszczalnikach organicznych ($< 1\%$ wody) szybkość reakcji jest o 2–6 rzędów mniejsza, niż w wodzie [28, 179, 307, 325], dlatego preparat enzymatyczny musi posiadać wysoką aktywność, co osiąga się stosując kryształy, sieciowane kryształy i depozycję na nośniku. Nośnik powinien być amfifilowy, niepęczniący w rozpuszczalniku i o niskiej pojemności wodnej, aby nie odvodnił enzymu [71, 109]. Enzymy stabilne modyfikuje się lub okluduje celem zwiększenia rozpuszczalności biokatalizatora;

– reakcje w obecności kosolwentu mieszczonego z wodą. Do 20% zawartości rozpuszczalnika w wodzie stosuje się preparaty tak jak w środowisku wodnym. Wzrost stężenia kosolwentu przyspiesza inaktywację i niezbędna jest stabilizacja otocz-

kowaniem, wiązaniem z polimerami rozpuszczalnymi w wodzie, kowalencyjnym wiązaniem z nośnikami czy stosowanie sieciowanych kryształów [34, 109, 179, 269, 338, 339];

– reakcje w obecności kosolwentu niemieszającego się z wodą. Jeżeli enzymem jest lipaza, to może być bezpośrednio stosowana w układach emulsyjnych lub poddana poprzedniej immobilizacji/solubilizacji [28, 103, 107, 139, 147]. Inne enzymy powinny być poddane poprzedniej stabilizacji/immobilizacji [106, 155, 157];

– dopasowanie preparatu do istniejącego rozwiązania aparaturowego. W przemyśle dominują trzy główne typy reaktorów (mieszalnikowy, kolumnowy, fluidyzacyjny (Rys. 13)) i o wdrożeniu nowej lub zmianie istniejącej technologii może decydować możliwość wykorzystania posiadanego parku maszynowego.



Rysunek 13. Typy reaktorów dla immobilizowanych enzymów: mieszalnikowy reaktor okresowy (a) i przepływowy (b); reaktor kolumnowy ze złożem upakowanym zasilany od góry (c), od dołu (d) i z recyrkulacją (e); reaktor fluidyzacyjny (f); S – substrat; P – produkt

O wyborze typu reaktora w większym stopniu decydują właściwości mechaniczne preparatu enzymatycznego oraz rodzaj substratu i produktu niż aktywność preparatu. W przypadku stosowania preparatów nierozpuszczalnych w wodzie/rozpuszczalnikach organicznych najczęstszym rozwiązaniem aparaturowym jest reaktor kolumnowy ze złożem upakowanym (Rys. 13 c–e), posiadający najwyższą aktywność w przeliczeniu na objętość reaktora oraz charakteryzujący się niskim kosztem inwestycyjnym, łatwością konstrukcyjną, operacyjną i przenoszenia skali oraz niskim kosztem robocizny [34, 245, 267, 332, 335]. To rozwiązanie jest zalecane dla procesów z niestabilnym substratem i/lub produktem (penicyliny, chloroaketyny, chloroalkohole), w których niezbędna jest precyzyjna regulacja czasu przebywania reagentów w reaktorze. Jest to również układ korzystny dla reakcji hamowanych przez produkt. Natomiast nie nadaje się do reakcji z lepkim substratem lub słabo rozpuszczalnym substratem/produktem oraz w sytuacjach, gdy reakcji towarzyszy zmiana wartości pH. Jeżeli w procesie niezbędny jest duży przepływ reagentów przez złożo (opory dyfuzyjne), można zastosować układ z recyrkulacją. Reaktor kolumnowy ze złożem upakowanym może być zasilany od góry, ale wówczas nośnik musi być

odporny na kompresję złoża i zgniatanie oraz nie może być stosowany w reakcjach z uwalnianiem gazu. Z kolei reaktory zasilane od dołu powinny zawierać złoże o gęstości znacznie większej niż gęstość mieszaniny reakcyjnej, celem ograniczenia wypłukiwania złoża. Zalecany rozmiar nośników zawiera się od 150 do 300 μm .

Reaktor mieszalnikowy okresowy lub przepływowy (Rys. 13 a, b) wymaga stosowania nośników elastycznych, o niskiej podatności na kruszenie i ścieranie [16, 34, 71, 245, 302]. Jest zalecany do reakcji z lepkiem substratem i/lub koniecznością utrzymania stałej wartości pH oraz przy dużych ziarnach nośnika ($> 200 \mu\text{m}$). Objętość preparatu nie powinna przekraczać 10% objętości reaktora.

Reaktor fluidyzacyjny (Rys. 13 f), charakteryzujący się mieszaniami roztworu cieczą, nie wymaga stosowania nośników odpornych mechanicznie [34, 245]. Gęstość preparatu powinna być zbliżona do gęstości roztworu reakcyjnego, a ten typ reaktora jest zalecany do reakcji z lepkiem lub trudno rozpuszczalnym substratem albo, gdy substrat lub produkt jest gazem. Objętość preparatu immobilizowanego nie powinna przekraczać 6% objętości reaktora.

6. ZASTOSOWANIA IMMOBILIZOWANYCH ENZYMÓW

W sytuacjach, w których wydzielanie enzymu z produktów stanowi znaczący element i koszt ciągu technologicznego i jeżeli immobilizowany enzym posiada wysoką stabilność operacyjną, to korzyści wynikające z takiej formy enzymu są ewidentne. Uważa się, że koszt zużycia preparatu enzymatycznego musi być poniżej 10% globalnego kosztu otrzymania produktu w wersji handlowej, aby jego wykorzystanie było opłacalne [4]. Obserwuje się systematyczne wypicranie enzymów natywnych immobilizowanymi w zastosowaniach z substratami i produktami rozpuszczalnymi w wodzie i, ostatnio, rozpuszczalnymi w rozpuszczalnikach organicznych, podczas gdy procesy hydrolizy substratów wielkocząsteczkowych nadal są, i prawdopodobnie będą, prowadzone przez enzymy natywne [89]. Natomiast wykorzystanie enzymów w biosensorach jest zawsze jednoznaczne z immobilizacją. Wzrasta również ilość zastosowań stabilizowanych lub immobilizowanych enzymów w medycynie. Poniżej przedstawiono przegląd trzech podstawowych obszarów zastosowań immobilizowanych enzymów: w przemyśle, analityce i medycynie.

6.1. PRZEMYSŁ

Dostępność aktualnych danych na temat istniejących technologii z enzymami immobilizowanymi jest niewielka. Zarówno producenci preparatów enzymatycznych jak i zakłady przemysłowe je stosujące są wyjątkowo oszczędni w udzielaniu takich informacji. Przegląd danych zawartych w książce *Industrial Enzymology* [16] wskazuje, że na 137 głównych producentów enzymów przemysłowych, zaledwie 9 produkuje enzymy immobilizowane, co wydaje się liczbą zaniżoną. Są to: Genencor In-

ternational, Gist-Brocades NV, Nagase Biochemicals, Novo Nordisk AS, Solvay Enzymes GmbH, U.O.P., Meito Sankyo Co., Toyobo Co., Recordati Industria Chimica. Jakościowo pełniejsze informacje zostały przedstawione w opracowaniu *Industrial Biotransformations* [57], które jest rzadkim zbiorem danych otrzymanych bezpośrednio od biotechnologicznych jednostek przemysłowych. Mimo że aktualność danych (zebranych w Tabeli 4) można uznać za dyskusyjną, to można przypuszczać, że są to „sztandarowe” technologie wielkotonażowe, nie objęte tajemnicą technologiczną. Co ciekawe, lista ta nie objęła, dawniej często cytowanych, zastosowań unieruchomionych enzymów do usuwania nadtlenu wodoru i niepożądanych zapachów w pasteryzowanym mleku, klarowania piwa czy produkcji lizyny, tryptofanu i tyrozyny [34]. Jest to prawdopodobnie skutek zmiany technologii na wykorzystujące enzymy stabilizowane metodami inżynierii genetycznej.

Tabela 4. Zestawienie ważniejszych procesów przemysłowych, prowadzonych z udziałem immobilizowanych enzymów [57]

| Enzym | Firma | Produkcja: |
|----------------------------------|---|---|
| lipaza | Bristol-Myers Squibb Bristol-Myers Squibb Chiroscience Ltd DSM Sepracor Schering Plough Unichema Chemie BV Hoffmann-La Roche | leków antyrakowych, leków obniżających ciśnienie krwi, komponentów peptydów, β -blokerów, ibuprofenu, związków przeciwgrzybiczych, składników mydeł, smarów i maści, strukturyzowanych glicerydów |
| liaza N-acetylo-D-neuraminianowa | Glaxo Marukin Shoyu Research Center Julich | kwasów siałowych |
| izomeraza glukozowa | Novo Nordisk Gist-Brocades Miles Kali-Chemie Nagase Finnsugar | fruktozy |
| amoniakoliza asparaginianowa | BioCatalytics Kyowa Hakko Kogyo Co. Mitsubishi Petrochemical Co. | aspartamu |
| amidaza glutarylowa | Hoechst Marion Roussel Toyo Joza Asahi Chemical Industry | kwasu 7-aminocefalosporynowego |
| acylaza penicylanowa | Dr. Vig Medicaments Unifar Eli Lilly Chemferm | kwasu 6-aminopenicylanowego, penicylin półsyntetycznych, kwasu 7-aminocefalosporynowego |
| aminoacylaza | Chiroscience Degussa-Huls AG | L-aminokwasów, inhibitorów reniny, leków na nadciśnienie |
| oksydaza nukleozydowa | Glaxo | leków przeciwzapalnych |
| penicylinaza | Chiroscience | cyklicznych nukleozydów |
| ureaza | Asahi Chemical Industry Toyo Joza | usuwanie mocznika z sake |
| β -galaktozydaza | Sumimoto Chemical Industries Snow Brand Milk Products Central del Latte | hydroliza laktozy |

Enzymatyczne technologie wielkotonażowe (> 1000 ton/rok) są procesami wdrożonymi wiele lat temu. Produkty to przede wszystkim dodatki do żywności i leki, gdyż jedynie przemysł farmaceutyczny i spożywczy są w stanie sfinansować badania nad poszukiwaniem producentów enzymów, wydajną nadprodukcją biokatalizatora, oczyszczaniem, immobilizacją i wdrożeniem w skali technicznej [332].

Największy potencjał we wdrażaniu biotransformacji enzymatycznych tkwi w przemyśle chemicznym i farmaceutycznym. Cechą wspólną jest stosunkowo krótka „żywność” nowego związku na rynku. Przeciętnie, co 10 lat następuje drastyczna zmiana technologii, stwarzająca szanse zaistnienia nowych rozwiązań. Dla technologii chemicznych typowa skala zawiera się od 1 tony do kilku tysięcy ton rocznie [340, 341], i są to najczęściej technologie hybrydowe, chemiczno-enzymatyczne. Przykładem jest produkcja D-*p*-hydroksyglicyny, syntonu semisyntetycznych penicylin i cefalosporyn, w której chemicznie zsyntezowana hydantoina jest stereospecyficznie przekształcana przez D-hydantoinazę i D-karbamoilazę. Domeną przemysłu chemicznego są biotransformacje prowadzone w wodzie, układach dwufazowych i rozpuszczalnikach organicznych, a przykłady reakcji zebrano w Tabeli 5, opracowanej na podstawie informacji zawartych w pracach przeglądowych [34, 70, 71, 89, 122, 147, 154, 332, 340–343].

Tabela 5. Przykłady reakcji enzymatycznych w przemyśle chemicznym

| Enzymy | Najczęstsze reakcje |
|--|--|
| lipazy | synteza (regioselektywna) peptydów, triglicerydów, surfaktantów, monocyklicznych laktonów, oksyetylowanych glikozydów, fosfolipidów, kwasów organicznych; enancjoselektywna hydroliza olejów; hydroliza tłuszczów w mleku; asymetryczna transestryfikacja lipidów; acylacja amin |
| esterazy | transestryfikacja; synteza peptydów; enancjoselektywna hydroliza estrów i kondensacja aldolowa |
| fosfolipazy | synteza i modyfikacje fosfolipidów |
| fosfataza kwaśna fosfataza alkaliczna | rozdzielanie D,L-treoniny i pochodnych |
| fosfotricsteraza fosfodiesteraza | produkcja insektycydów lub ich syntonów; degradacja gazów bojowych; wybiórcza hydroliza RNA w obecności DNA |
| transaminazy | synteza herbicydów i ich syntonów |
| α -galaktozydaza | synteza α -galaktozydów |
| β -glikozydaza | regioselektywna synteza oksyetylowanych glikozydów, surfaktantów i β -glikozydów |
| dehydrogenazy | odwodornienie alkoholi, androsteronu, kortyzonu, hydroksysteroidów i pochodnych |
| proteazy: trypsyna, proteinaza K, karboksipeptydaza Y, α -chymotrypsyna, subtylizyna | kondensacja oligopeptydów; hydroliza amidów aminokwasów; synteza estów aminokwasów; reakcje transestryfikacji |

Technologie o skali typowej dla przemysłu chemicznego stawiają wysokie wymagania cenowe biokatalizatorom, gdyż konkurują z technologiami chemicznymi już

istniejącymi. Przy względnie niskim zapotrzebowaniu na produkt i krótkim czasie jego istnienia na rynku, nie jest to przemysł wprowadzający na rynek nowe enzymy, bo to wiąże się z finansowaniem badań nad doбором enzymu, modyfikacji, produkcji i stabilizacji. Jest to przemysł oczekujący na enzymy o wyższej jakości i stabilności oraz niższej cenie, które zostały już wdrożone w technologiach wielkotonażowych. Zatem nie ma tu miejsca na poszukiwanie odpowiednich enzymów, a raczej poszukiwanie reakcji do istniejących biokatalizatorów [320]. Dlatego w przemyśle chemicznym dominują stabilne lipazy, amylazy i proteazy, produkowane jako komponenty proszków do prania oraz immobilizowane lipazy, acylazy, amidazy i proteazy.

Przemysł farmaceutyczny charakteryzuje się raczej stosunkowo niską skalą (od 1 tony do 1 kg rocznie) i wysokimi wymaganiami odnośnie czystości produktów. Przemysł farmaceutyczny należy do grupy często wprowadzającej nowe technologie i nowe biokatalizatory, a wysoka cena biokatalizatora nie wyklucza jego stosowania, gdyż liczy się przede wszystkim czystość optyczna produktu i silna konkurencja [4, 34, 147, 340–344]. Obecnie obowiązuje reguła, że jeżeli lek jest chiralny, to izomery muszą być rozdzielone i poddane rygorystycznym testom, gdyż obecność niepożądanych enancjomerów, które w najlepszym wypadku są nieaktywne, w najgorszym mogą dać efekty uboczne, jak słynny Thalidomid. Dodatkowo, selektywna kataliza enzymatyczna to procesy z mniejszą ilością ścieków i niewielką ilością produktów ubocznych. Przykładami wykorzystania enzymów w farmacji jest produkcja: leków (lub syntonów leków) metabolicznych, przeciwzapalnych, antyrakowych, antywirusowych, anti-HIV, przeciwinfekcyjnych, antydepresyjnych, obniżających poziom cholesterolu lub ciśnienie krwi, na arytmie serca, blokerów kanałów wapniowych, insuliny ludzkiej ze zwierzęcej czy inhibitorów acetylocholinoesterazy. Spośród licznych enzymów należy wymienić lipazy, glukonolaktonazę, tyrozinazę, trypsynę, karboksypeptydazy, aminotransferazy i dehydrogenazy.

6.2. BIOSENSORY

Biosensor to zintegrowany układ, który jest w stanie zapewnić ilościową informację analityczną wykorzystując, jako element rozpoznawczy, receptor biochemiczny, który znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie elementu przekaźnikowego [345]. Dodatkowo nie wymaga on stosowania specjalnych odczynników i może być użyty wielokrotnie lub w sposób ciągły. W biosensorych enzymatycznych enzym jest immobilizowany zwykle w bezpośrednim sąsiedztwie elektrody (element przekaźnikowy), która jest w stanie przejmować elektrony wytworzone podczas reakcji lub je przekazywać do reakcji. Enzymy najczęściej są immobilizowane na powierzchni elektrody węglowej, grafitowej lub ze złota, srebra czy platyny [165, 212, 252, 253, 257, 278, 346–348]. Ponieważ szybkość przekazywania elektronu na elektrodę jest często etapem limitującym szybkość otrzymania sygnału, podczas immobilizacji enzymu dodaje się związki pośredniczące, jak ferrocen, benzochinon, ubichinon, błękit metylenowy lub polimery, jak polipirol, politiofen, poliwinyl-*n*-metylopirydyna czy poli-

winyloferrocen [110, 238, 334, 346, 349]. Spośród typów immobilizacji dominuje wiązanie kowalencyjne z powierzchnią elektrody, poddaną uprzedniej modyfikacji [112, 212, 238, 253, 257]. Stosuje się także adsorpcję z następczym sieciowaniem [238, 333, 335], immobilizację usieciowanych kryształów [98], zamykanie w sieci żelę lub paście węglowej [110, 112, 122, 278, 348, 350], za pośrednictwem streptawidyny lub lektyny [98, 230, 232], a także w mikroemulsjach [98, 351].

Głównymi problemami, wymagającymi rozwiązania, jest dobór techniki immobilizacji, zapewniającej swobodną dyfuzję substratu i produktu (ultracienka warstwa z enzymem lub monowarstwa), wysoka stabilność i powtarzalność oraz stabilność podczas przechowywania. Ponieważ zakres detekcji zależy od aktywności związanego enzymu, a powierzchnia dostępna do immobilizacji jest niewielka, stąd zalecane są techniki pozwalające otrzymać korzystną orientację przestrzenną enzymu, a sam enzym powinien być homogeny.

Biosensory oparte o elektrody, jako elementy przekąźnikowe i nośniki do immobilizacji, znalazły zastosowanie przede wszystkim w laboratoriach badawczych i w analizie medycznej [238]. Dominują elektrody do pomiaru stężenia glukozy, mleczanów, mocznika, cholesterolu i licznych substratów dehydrogenaz. Przeciętnie taką elektrodę można wykorzystywać przez 5–21 dni, a liczni producenci, jak Beckman, Eppendorf, i-Stat, Koto Daiichi Kagaku, Mediscense, Nova Biomedical, Universal Sensors, Yellow Springs Instrument zapewniają pełną dostępność na rynku.

W sytuacjach, gdy ciągły pomiar stężenia danego związku jest niezbędny (np. monitorowanie procesu) obok elektrod ze związanym enzymem stosuje się układ zawierający mikroreaktor ze złożem upakowanym [98, 238, 352]. Jest to rozwiązanie szczególnie korzystne, gdy wartości stałej K_m dla danego substratu są wysokie [238]. Firmy specjalizujące się w produkcji zestawów analitycznych dla przemysłu spożywczego i farmaceutycznego (np.: ATI Orion, Toyo Jozo, Universal Sensors, Yellow Springs Instrument) oferują układy do oznaczania jednego lub wielu związków, a przede wszystkim: glukozy, glutaminianów, galaktozy, laktozy, sacharozy, glicerolu, kwasu mlekowego i glutaminowego, lizyny, tyraminy, etanolu, metanolu, aminokwasów, askorbinianów, szczawianów, salicylanów, kwasu moczowego, aspartamu, skrobi i nadtlenu wodoru.

W ochronie środowiska najczęściej wykorzystuje się elektrody i mikroreaktory [333, 334]. Ze względu na toksyczność badanych związków, metody analityczne najczęściej opierają się na pomiarze stopnia zahamowania reakcji enzymatycznej. Przykładami może być inhibicja acetylocholinesterazy insektycydami fosforoorganicznymi i karbaminianowymi; siarkotransferazy tiosiarczanowej i oksydazy siarczynowej przez cyjanki; syntazy acetomleczanowej przez imidazole i sulfonilomoczniki; lakказы i tyrozynazy przez herbicydy triazynowe i pochodne fenolu; dehydrogenazy aldehydowej przez fungicydy ditiokarbaminianowe.

W produkcji i kontroli żywności oraz w rolnictwie stosuje się biosensory takie same, jak w ochronie środowiska oraz pozwalające oznaczyć stężenie jonów metali ciężkich, biosensory dostosowane do pomiarów w rozpuszczalnikach organicznych,

olejczkach i olejach oraz biosensory do oznaczania penicylin, kreatyniny, witamin, sacharydów i alkoholi [335, 346].

Duże zapotrzebowanie na szybką, tanią i dokładną analizę w laboratoriach i w terenie stymuluje rozwój miniaturyzacji sprzętu analitycznego, a drogą do osiągnięcia celu jest wytwarzanie analitycznych układów mikroczipowych, tzw. μ TASs (ang. *Micro Total Analytical Systems*). W dużym uproszczeniu jest to układ, w którym reakcja enzymatyczna przebiega w mikropojemnikach i kanałach mikrocieczowych o objętościach nanolitów, co pozwala zwiększyć szybkość, automatyzację i miniaturyzację, przy zwiększonej rozdzielczości i redukcji objętości próbek [92, 108, 253, 289]. Przykładami enzymów immobilizowanych w mikroczipach są: oksydaza glukozowa, trypsyna, fosfataza alkaliczna i β -galaktozydaza.

6.3. ZASTOSOWANIA BIOMEDYCZNE

Zasadniczo można wyróżnić cztery grupy zastosowań terapeutycznych immobilizowanych/stabilizowanych enzymów:

- do obniżania stężenia związków szkodliwych w surowicy wykorzystuje się enzymy wiązane kowalencyjnie z nośnikami lub zamknięte w żelach w zestawach z pozaustrojowym krążeniem krwi. Przykładami enzymów mogą być: fosfolipaza A₂, obniżająca stężenie cholesterolu i lipoprotein [353], L-asparaginaza i dehydrogenaza glutaminianowa stosowana w leukemii i limfosarkomie [39, 264, 354, 355] oraz tyrozynaza w chorobach wątroby [34];

- preparaty o spowolnionym uwalnianiu enzymów są najczęściej immobilizowane w alginianach i służą do doustnego podawania pacjentom z upośledzonym wytwarzaniem enzymów i koniecznością stosowania restrykcyjnej diety [318, 356]. Jest to przede wszystkim inwertaza (Sacraid) i amoniakoliza fenylalaninowa (Phenylase™). Popularnie stosowana mieszanina enzymów z trzustki (amylazy, lipazy, proteazy) jest obecnie zastępowana sieciowanymi kryształami (TheraCLEC Total™);

- w terapiach tkanek okrywowych preferuje się immobilizację enzymów w polimerach hydrofilowych w formie hydrożeli zawierających enzymy proteolityczne do usuwania uszkodzonych białek w poparzonej skórze (np. Vibrilase™) [173, 356]. Preparaty wspomagające regenerację uszkodzonych nerwów (liaza hialuronianowa i chondroitynaza) są obecnie w fazie badań klinicznych [356];

- do stosowania w krążeniu ustrojowym, celem uzupełnienia niedoboru enzymów, wykorzystuje się immobilizację w erytrocytach lub stabilizuje enzymy przez wiązanie kowalencyjne z poli(glikolem etylenowym) [356]. Obecnie preferuje się drugie rozwiązanie, a przykładami enzymów są: PEG-deaminaza adeninowa (Adagen®) w leczeniu niedoboru enzymu, PEG-asparaginaza (Oncaspar®) w leczeniu leukemii limfoblastycznej, PEG-oksydaza moczanowa w leczeniu dny moczanowej lub PEG-dysmutaza ponadtlenkowa w chorobach krążenia, płuc, nerek i wątroby. Można również stosować enzymy poddane mikroenkapsulacji w liposomach (np. katalaza i asparaginaza [34]). Interesujące są badania nad stosowaniem zamykanych w sieci pH-wra-

liwego żelu łącznie insuliny i oksydazy glukozowej. W obecności glukozy oksydaza glukozowa, przekształcając glukozę w kwas glukonowy, wywołuje spadek wartości pH, prowadzący do rozkurczenia żelu i uwolnienia insuliny. Natomiast spadek stężenia glukozy powoduje, w ciągu 10 min, kurczenie żelu i zamykanie hormonu [73]. Jest to tzw. „chemiczny kurek” do kontrolowanego uwalniania leku.

PODSUMOWANIE

W ciągu ostatnich 10 lat biokataliza stała się technologią pozwalającą otrzymywać liczne związki na potrzeby przemysłu spożywczego, chemicznego i farmaceutycznego. Te procesy to efekt rozwoju wielu dziedzin, poczynając od wprowadzenia nowych procedur modelowania molekularnego i selekcji zmutowanych enzymów o nowych właściwościach i często radykalnie poszerzonej specyficzności, zwiększonej stereoselektywności i podwyższonej stabilności [52, 54, 342]. Osiągnięcia w tworzeniu rekombinowanych producentów enzymów i w inżynierii metabolicznej pozwalają otrzymywać stabilne biokatalizatory o wysokiej aktywności i selektywności [4]. Dodając klasyczne i nowe techniki stabilizacji/immobilizacji enzymów, często wsparte modelowaniem komputerowym celem przewidzenia skutków modyfikacji fizycznych i chemicznych, otrzymuje się preparaty dostosowane do wymagań procesowych [312].

Jakkolwiek znakomita większość publikacji, dotyczących procesów z immobilizowanymi enzymami, przedstawia badania nad hydrolazami, to w przemysłowych biotransformacjach ta dominacja nie jest tak silna. Systematycznie rośnie udział procesów z wykorzystaniem liaz i transferaz, a przewiduje się istotny wzrost udziału oksydoreduktaz z towarzyszącą regeneracją koenzymów [357]. Rozwój badań nad przeciwciałami katalitycznymi pozwala przypuszczać, że będzie można otrzymywać biokatalizatory o szerokim zakresie specyficzności substratowej, z poszerzeniem o substraty nierozpoznawalne przez naturalne enzymy [358, 359]. Dodając możliwości prowadzenia reakcji w tak zróżnicowanych środowiskach jak wodne, mieszaniny wody i rozpuszczalników organicznych oraz w rozpuszczalnikach organicznych a także rozszerzenie specyficzności substratowej i stereoselektywności poprzez dobór rozpuszczalników, otrzymuje się pełny obraz już istniejących i potencjalnych możliwości katalizy enzymatycznej. Ogromny potencjał tkwi również w integracji procesów chemicznych i biologicznych wraz ze stosownym opracowaniem inżynieryjnym procesów, co pozwala na obniżenie kosztów zużycia energii, wzrost efektywności i stabilności operacyjnej enzymów oraz produkcji lepszych jakościowo związków, przy zmniejszonej ilości produktów ubocznych i uciążliwych ścięków.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] T.E. Creighton (Ed.), *Proteins. Structures and Molecular Properties*, 2nd Edition, W.H. Freeman and Company, New York, 1993.
- [2] E. Katchalski-Katzir, *TIBTECH*, 1993, **11**, 471.
- [3] S.S. Wong, L.-J.C. Wong, *Enzyme Microb. Technol.*, 1992, **14**, 866.
- [4] A.J.J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Curr. Opinion Biotechnol.*, 2002, **13**, 548.
- [5] J.M.S. Rocha, M.H. Gil, F.A.P. Garcia, *J. Biotechnol.*, 1998, **66**, 61.
- [6] S.A. Costa, T. Tzanov, A.F. Caneiro, A. Paar, G.M. Gubitza, A. Cavaco-Paulo, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **30**, 387.
- [7] S.R. Weijers, K. van't Riet, *Biotech. Adv.*, 1992, **10**, 237.
- [8] A. Shaw, R. Bott, *Curr. Opinion Struct. Biol.*, 1996, **6**, 546.
- [9] C. Kuhlmeier, J. Klein, *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, **32**, 99.
- [10] B. Lee, G. Vasmatzis, *Curr. Opinion Biotechnol.*, 1997, **8**, 423.
- [11] N. Lehmann, M. Wyss, *Curr. Opinion Biotechnol.*, 2001, **12**, 371.
- [12] H. Zhao, K. Chockalingam, Z. Chen, *Curr. Opinion Biotechnol.*, 2002, **13**, 104.
- [13] C. Vicille, J.G. Zeikus, *TIBTECH*, 1996, **14**, 183.
- [14] A.O. Triantafyllou, E. Wehtje, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, *Biotechnol. Bioeng.*, 1997, **54**, 67.
- [15] R.D. Schmid, *Adv. Biochem. Eng.*, 1979, **12**, 41.
- [16] T. Godfrey, S. West (Eds), *Industrial Enzymology*, 2nd Edition, Macmillan Press Ltd, London 1996.
- [17] A. Illanes, C. Altamirano, A. Aillapan, G. Tomasello, M.E. Zuniga, *Enzyme Microb. Technol.*, 1998, **23**, 3.
- [18] A.V. Kabanov, A.V. Levashov, K. Martinek, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1987, **501**, 63.
- [19] R.W. Lencki, R.J. Neufeld, *Enzyme Microb. Technol.*, 1996, **19**, 232.
- [20] M.T. Ru, S.Y. Hirokane, A.S. Lo, J.S. Dordick, J.A. Reimer, D.S. Clark, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **22**, 1565.
- [21] J.P. Henley, A. Sadana, *Biotechnol. Bioeng.*, 1984, **26**, 959.
- [22] P. Lozano, T. de Diego, J.-P. Guegan, M. Vaultier, J.L. Iborra, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **75**, 563.
- [23] M. Erbedinger, A.J. Mesian, A.J. Russel, *Biotechnol. Progr.*, 2000, **16**, 1129.
- [24] R. Madeira Lau, F. van Rontwijk, K.R. Seddon, R.A. Sheldon, *Org. Lett.*, 2002, **2**, 4189.
- [25] M.D. Busto, D.S. Owusu Apenten, D.S. Robinson, Z. Wu, R. Casey, R.K. Hughes, *Food Chem.*, 1999, **65**, 323.
- [26] M. Fernandez, M.L. Villalonga, J. Caballero, A. Fragoso, R. Cao, R. Villalonga, *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, **83**, 743.
- [27] G. Ellenrieder, M. Daz, *Biocatal. Biotrans.*, 1996, **14**, 113.
- [28] M. Persson, I. Mladenoska, E. Wehtje, P. Adlercreutz, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **31**, 833.
- [29] F.J. Plou, A. Ballesteros, *TIBTECH*, 1999, **17**, 304.
- [30] M.A. Anderson, R. Hatti-Kaul, *J. Biotechnol.*, 1999, **72**, 21.
- [31] M. Teramoto, H. Nishibue, H. Ogawa, H. Kozono, K. Morita, H. Matsuyama, *Coll. Surf. B: Biointerf.*, 1996, **7**, 165.
- [32] R.P. Baptista, J.M.S. Cabral, K. Melo, *Biotechnol. Bioeng.*, 2000, **70**, 699.
- [33] K. Visuri, O. Pastinen, X. Wu, K. Makinen, M. Leisola, *Biotechnol. Bioeng.* 1999, **64**, 377.
- [34] R.F. Taylor (Ed), *Protein Immobilization. Fundamentals and Applications*, Marcel Decker, Inc., New York 1991.
- [35] G. Means, R.E. Feeney, *J. Food Biochem.*, 1998, **22**, 399.
- [36] K. Khajeh, H. Naderi-Manesh, B. Ranjbar, A.A. Moosavi-Movahedi, M. Namat-Gorgani, *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, **28**, 543.

- [37] A.M. O'Brien, C. O'Fagain, P.F. Nielsen, K.G. Welinder, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **76**, 277.
- [38] Y.-H. Cheon, G.-J. Kim, H.-S. Kim, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2000, **11**, 29.
- [39] I. Vino, Karsakevich, M. Bekers, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2001, **11**, 551.
- [40] V.Y. Levitsky, A.A. Panova, V.V. Mozhaev, *Eur. J. Biochem.*, 1994, **219**, 231.
- [41] M.V. Calvo, F.J. Plou, A. Ballesteros, *Biotechnol. Biotrans.*, 1996, **13**, 271.
- [42] E.T. Baran, N. Ozer, V. Hasirci, *J. Chromat.*, 2003, **794**, 311.
- [43] Z. Zhang, Z. He, M. He, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2001, **14**, 85.
- [44] A. Murphy, C.D. Fagain, *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, **58**, 365.
- [45] S.G. Cao, H. Yang, H. Dong, N.-X. Zhang, S.-P. Han, S.-D. Liu, Z.-B. Liu, T.-S. Yang, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1996, **799**, 201.
- [46] P. Wang, C.A. Woodward, E.N. Kaufman, *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, **64**, 290.
- [47] T. Sano, S. Vajda, G.O. Reznik, C.L. Smith, C.R. Cantor, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1996, **799**, 383.
- [48] Y.F. Ma, J.K. Eglinton, D.E. Evans, S.J. Logue, P. Langridge, *Biochemistry*, 2000, **39**, 13350.
- [49] J.C. Williams, J.P. Zeelen, G. Neubauer, G. Vriend, J. Bachmann, P.A. Michels, A.M. Lambcirk, R.K. Wierenga, *Protein Eng.*, 1999, **12**, 243.
- [50] O. Turunen, K. Etuaho, F. Fenel, J. Vehmaanpera, X. Wu, J. Rouvinenc, M. Leisola, *J. Biotechnol.* 2001, **88**, 37.
- [51] R. Jaenicke, *J. Biotechnol.*, 2000, **79**, 193.
- [52] A.D. Griffiths, D.S. Tawfik, *Curr. Opinion Biotechnol.*, 2000, **11**, 338.
- [53] L. Beier, A. Svedsen, C. Andersen, T.P. Frandsen, T.V. Borchet, J.R. Cherry, *Protein Eng.*, 2000, **13**, 509
- [54] P. Soumillion, J. Fasteur, *Curr. Opinion Biotechnol.*, 2001, **12**, 387.
- [55] R.M. Daniel, *Enzyme Microb. Technol.*, 1996, **19**, 74.
- [56] G. Carrea, G. Colombo, *TIBTECH*, 2000, **18**, 401.
- [57] A. Liesch, K. Seelbach, C. Wandrey, (Eds), *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
- [58] S.A. Cetinus, H.N. Oztop, *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, **26**, 497.
- [59] I.F.J. Vankelecom, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 3779.
- [60] L. Giorno, E. Drioli, *TIBTECH*, 2000, **18**, 339.
- [61] E. Klein, *J. Membr. Sci.*, 2000, **179**, 1.
- [62] E. Drioli, L. Giorno (Eds), *Biocatalytic Membrane Reactors. Applications in Biotechnology and Pharmaceutical Industry*, Taylor and Francis Ltd., London 1999.
- [63] V. Gekas, *Enzyme Microb. Technol.*, 1986, **8**, 450.
- [64] D.M.F. Prazeres, J.M.S. Cabral, *Enzyme Microb. Technol.*, 1994, **16**, 738.
- [65] G. Stephanopoulos (Ed.), *Biotechnology*, Vol. 3: *Bioprocessing*, VCH, Weinheim 1993.
- [66] M.A. Longa, D. Combes, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 1999, **74**, 25.
- [67] R. Villalonga, M.L. Villalonga, L. Gomez, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2000, **10**, 483.
- [68] J.-P. Lenders, R.R. Crichton, *Biotechnol. Bioeng.* 1984, **26**, 1343.
- [69] J.J. Marshall, M.L. Rabinowitz, *J. Biol. Chem.*, 1976, **251**, 1081.
- [70] K. Drautz, H. Waldmann (Eds), *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. A Comprehensive Handbook*, VCH, Weinheim 1995.
- [71] P. Adlercreutz, R. Barros, E. Wehtje, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1996, **799**, 197.
- [72] I.Y. Galacv, B. Mattiasson, *Enzyme Microb. Technol.*, 1993, **15**, 354.
- [73] B. Jeong, A. Gutowska, *TIBTECH*, 2002, **20**, 305.
- [74] I.Y. Galacv, B. Mattiasson, *TIBTECH*, 1999, **17**, 335.
- [75] S.-H. Chen, Y.-H. Yen, C.-L. Wang, S.-L. Wang, *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, **33**, 643.
- [76] V. Arasaratnam, I.Y. Galacv, B. Mattiasson, *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, **27**, 254.
- [77] A. Kumar, M.N. Gupta, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 1998, **5**, 289.

- [78] R. Rodrigues, J.M.S. Cabral, M.A. Taipa, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **31**, 133.
- [79] C. Dinnella, G. Lanzerini, P. Ercolelli, *Process Biochem.*, 1995, **30**, 151.
- [80] I. Roy, A. Gupta, S.K. Khare, V.S. Bisaria, M.N. Gupta, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, **61**, 309.
- [81] A. Charusheela, L. Arvind, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **30**, 19.
- [82] Z. Ding, G. Chen, A.S. Hoffmann, *Bioconj. Chem.*, 1996, **7**, 121.
- [83] L.-C. Pan, C.-C. Chien, *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 2002, **55**, 87.
- [84] H. Uludag, B. Norrie, N. Kousiniotis, T. Gao, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **75**, 510.
- [85] K. Hoshino, M. Taniguchi, T. Kitao, S. Morohashi, T. Sasakura, *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, **60**, 568.
- [86] A. Kondo, H. Fukude, *Coll. Surf. A: Physiochem. Eng. Aspects*, 1999, **153**, 435.
- [87] M. Shimazu, A. Mulchandani, W. Chen, *Biotechnol. Bioeng.*, 2002, **81**, 74.
- [88] M. Sardar, I. Roy, M.N. Gupta, *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, **27**, 672.
- [89] E. Katchalski-Katzir, D.M. Kraemer, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2000, **10**, 157.
- [90] B. Katzbauer, M. Narodoslavsky, A. Moser, *Bioproc. Engn.*, 1995, **12**, 173.
- [91] W. Harmcier, *TIBTECH*, 1985, **3**, 149.
- [92] L. Xiong, F.E. Regnier, *J. Chromatogr. A.*, 2001, **924**, 165.
- [93] I. Gill, A. Ballesteros, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 8587.
- [94] R. Obert, B.C. Dave, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 12192.
- [95] W. Marcon, F. Faída, A. Piozzi, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2001, **15**, 93.
- [96] D.-K. Oh, H.-J. Kim, S.-A. Ryu, H.-J. Rho, P. Kim, *Biotechnol. Lett.*, 2001, **23**, 1859.
- [97] F.M. Andreopoulos, M.J. Roberts, M.D. Bentley, J.M. Harris, E.J. Bechman, A.J. Russell, *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, **65**, 579.
- [98] S.F. D'Souza, *Curr. Sci.*, 1999, **77**, 69.
- [99] T. Antczak, J. Bugla, W. Szcja, E. Galas, *Biotechnologia*, 1999, **44**, 172.
- [100] S. Glados, M. Maciejewski, *Wiad. Chem.*, 1998, **52**, 101.
- [101] E. Hearn, R.J. Neufeld, *Process Biochem.*, 2000, **35**, 1253.
- [102] M. Arroyo, I. de la Mata, C. Acebal, M. Pilar Castillon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, **60**, 507.
- [103] K. Soni, D. Madamwar, *Process Biochem.*, 2001, **36**, 607.
- [104] D. Maguin, S.Y.P. Dumitriu, E. Chomet, *Biotechnol. Progr.*, 2001, **17**, 734.
- [105] A.S. Cetinus, N.H. Oztop, *Microb. Technol.*, 2003, **32**, 889.
- [106] N. Dura, M.A. Rosa, A. D'Annibale, L. Gianfreda, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **31**, 907.
- [107] A. Welwardowa, P. Gemeiner, E. Michalkova, L. Welward, A. Jakubova, *Biotechnol. Technique*, 1993, **7**, 809.
- [108] A. Srinivasan, X. Wu, M.M. Lee, J.S. Dordick, *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, **81**, 563.
- [109] F.M. Plieva, K.A. Kochetkov, I. Singh, V.S. Parmar, Y.N. Belokon, V.I. Lozinsky, *Biotechnol. Lett.*, 2000, **22**, 511.
- [110] A. Cirpan, S. Alkan, L. Toppare, Y. Hepuzer, Y. Yahci, *Bioelectrochem.*, 2003, **59**, 29.
- [111] A.K. Bajpai, S. Bhanu, *Cell. Polym. Sci.*, Springer, 2003-10-13, 13 pages.
- [112] A. Guiseppe-Elie, N.F. Sheppard, Jr., S. Brachim, D. Narinesingh, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **75**, 475.
- [113] C. Perols, B. Piffant, J. Scher, J.P. Ranvet, D. Poncelet, *Enzyme Microb. Technol.*, 1997, **20**, 57.
- [114] J.-P. Chen, S.-H. Chiu, *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, **26**, 359.
- [115] B. Dunn, J.M. Miller, B.C. Dave, J.S. Valentine, J.I. Zink, *Acta Mater.*, 1998, **46**, 737.
- [116] J.-P. Chen, Y.-N. Hwang, *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, **33**, 513.
- [117] A. Pierre, P. Buisson, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2001, **11**, 639.
- [118] Y.-J. Han, J.T. Watson, G.D. Stucky, A. Butler, *Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2002, **17**, 1.

- [119] I. Gill, *Chem. Mater.*, 2001, **13**, 3404.
- [120] K. Maruszewski, *Fizykochemia molekul zamkniętych w zeolitach i zol-żelach*, Biblioteka Wiadomości Chemicznych, Wrocław 2000.
- [121] Y. Wei, J. Xu, Q. Feng, H. Dong, M. Lin, *Mat. Lett.*, 2000, **44**, 6.
- [122] I. Gill, A. Ballesteros, *TIBTECH*, 2000, **18**, 282.
- [123] S. Furukava, T. Ono, H. Ijima, K. Kawakani, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2001, **15**, 65.
- [124] H. O'Neil, C.V. Angley, I. Hemery, B.R. Evans, S. Dai, J. Woodward, *Biotechnol. Lett.*, 2002, **24**, 783.
- [125] D.-J. van Unen, J.F.J. Engbersen, D.N. Reinhondt, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **75**, 154.
- [126] B. Li, H. Takahashi, *Biotechnol. Lett.*, 2000, **22**, 1953.
- [127] H.H.P. Yiu, P.A. Wright, N.P. Botting, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2001, **15**, 81.
- [128] J.-P. Chen, W.-S. Lin, *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, **12**, 801.
- [129] J. Mansfeld, M. Forster, A. Schellenberger, H. Dautzberg, *Enzyme Microb. Technol.*, 1991, **13**, 240.
- [130] J. Mansfeld, M. Forster, T. Hoffmann, A. Schellenberger, *Enzyme Microb. Technol.*, 1995, **17**, 11.
- [131] M.E. Bobreshova, G.B. Sukhorukov, E.A. Soburova, L.I. Elfimova, B.I. Sukhorukov, L.I. Sharabchina, *Biophysics*, 1999, **44**, 813.
- [132] N.G. Balabushevitch, G.B. Sukhorukov, N.A. Moroz, D.V. Volodkin, N.I. Larionova, E. Donath, H. Mohwald, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **76**, 207.
- [133] T.G. Park, S. Cohen, R. Langer, *Pharm. Res.*, 1992, **9**, 37.
- [134] F. Secundo, G. Carrea, G. Vecchio, F. Zambianchi, *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, **64**, 624.
- [135] V. Stefuca, P. Gemeiner, L. Kurillova, H. Dautzberg, M. Polakovic, V. Balcs, *Appl. Biochem. Biotech.*, 1991, **30**, 313.
- [136] B.V. Kudryashova, A.K. Gladilin, A.V. Vakurov, F. Heitz, A.V. Levashov, V.V. Mozhaev, *Biotechnol. Bioeng.*, 1997, **55**, 267.
- [137] J. Tramper, H.C. van der Plas, P. Linko, (Eds), *Biocatalysts in Organic Synthesis*, Elsevier, Amsterdam, 1995.
- [138] T. Mori, S. Kishimoto, K. Ijiro, A. Kobayashi, Y. Okahata, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **76**, 157.
- [139] Y. Okahata, T. Mori, *TIBTECH*, 1997, **15**, 50.
- [140] M.D. Trevan (Ed.), *Immobilized Enzymes. An Introduction and Applications in Biotechnology*, J. Wiley & Sons, Chichester 1980.
- [141] A. Gole, M. Sastry, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **74**, 172.
- [142] A. Fishman, V. Cogan, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2003, **22**, 193.
- [143] A. Blondino, M. Macias, D. Cantero, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **31**, 556.
- [144] K. Mosbach (Ed.), *Immobilized Enzymes and Cells, Methods in Enzymology*, vol. 137, Academic Press, San Diego 1988.
- [145] M. Yoshimoto, S. Wang, K. Fukunaga, R. Kuboi, K. Nakao, *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, **81**, 695.
- [146] I.J. Castellanos, R. Crespo, K. Griebenow, *J. Control Release*, 2003, **88**, 135.
- [147] C.M.L. Carvalho, J.M.S. Cabral, *Biochimia*, 2000, **82**, 1063.
- [148] J. Rodakiewicz-Nowak, *Biotechnologia*, 2003, **63**, 47.
- [149] C.M.L. Carvalho, M.R. Aires-Barros, J.M.S. Cabral, *Langmuir*, 2000, **16**, 3082.
- [150] M. Kahlwet, G. Busse, B. Faulhaber, *Langmuir*, 1997, **13**, 5249.
- [151] S.C. Lin, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 1996, **66**, 109.
- [152] K. Paraszkiwicz, J. Długoński, *Biotechnologia*, 2003, **63**, 82.
- [153] D.M. Prazeres, F. Lemos, F.A.P. Garcia, J.M.S. Cabral, *Biotechnol. Bioeng.*, 1993, **42**, 759.
- [154] H.M. van Sonsbeck, Beeftink, H.H., Tramper, J., *Enzyme Microb. Technol.*, 1993, **15**, 722.

- [155] M. Karra-Chaabouni, S. Pulvin, A. Meziani, D. Thomas, D. Tourand, W. Kunz, *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, **81**, 27.
- [156] B. Deshrevel, J.-C. Vincent, C. Ripell, M. Thellier, *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, **81**, 167.
- [157] P. Pal, S. Datta, P. Bhattacharyan, *Biochem. Eng. J.*, 2000, **5**, 89.
- [158] W. Tischer, F. Wedekind, *Topics Cur. Chem.*, 1999, **200**, 95.
- [159] F.J. Plou, M.A. Cruces, M. Ferrer, G. Fuentes, E. Pastor, M. Barnabe, M. Christensen, F. Comelles, J.L. Parra, A. Ballesteros, *J. Biotechnol.*, 2002, **96**, 55.
- [160] R.A. Messing, *Adv. Biochem. Eng.*, 1978, **10**, 51.
- [161] S. Lim, K.-Y. Lee, Y.-B. Lee, K.-B. Song, *Biotechnol. Lett.*, 2001, **23**, 1335.
- [162] F.N. Serralha, J.M. Lopes, M.R. Aires-Barros, D.M.F. Prazeres, J.M.S. Cabral, F. Lemos, F. Ramoa-Ribeira, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **31**, 29.
- [163] F.N. Serralha, J.M. Lopes, F. Lemos, D.M.F. Prazeres, M.R. Aires-Barros, J.M.S. Cabral, F. Ribeiro, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2001, **11**, 713.
- [164] G. Setharam, B.A. Saville, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **31**, 747.
- [165] M.L. Curri, A. Agostino, G. Leo, A. Mallardi, P. Corma, M. Della Monica, *Mater. Sci. Eng. C.*, 2002, **22**, 449.
- [166] N., Das, A.M. Kayastha, *J. Microb. Biotechnol.*, 1998, **14**, 927.
- [167] Q.Z. Zhou, X.D. Chen, X. Li, *Biotechnol. Bioeng.*, 2002, **81**, 127.
- [168] A. Bastida, P. Sabuquillo, P. Armisen, R. Fernandez-Lafuente, J. Huguet, J.M. Guisan, *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, **58**, 486.
- [169] C. Carpio, P. Gonzales, J. Ruales, F. Batista-Viera, *Food Chem.*, 2000, **68**, 403.
- [170] M.P. Schrender, A.T.A. Mooren, H.Y. Toschka, C.T. Verrips, F.M. Klis, *TIBTECH*, 1996, **14**, 115.
- [171] L. Ding, B. Qu, *React. Polym.*, 2001, **49**, 67.
- [172] W. Norde, C.E. Giacomelli, *J. Biotechnol.*, 2000, **79**, 259.
- [173] H. Malmsten, A. Larsson, *Coll. Surf. B: Biointerfaces*, 2000, **18**, 259.
- [174] C. Mai, A. Majcherczyk, A. Huttermann, *Microb. Technol.*, 2000, **27**, 167.
- [175] S.F. D'Souza, B.S. Kubal, *J. Biochem. Biophys, Methods*, 2002, **51**, 151.
- [176] J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, C. Mateo, C. Ortiz, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **31**, 775.
- [177] J.M. Palomo, G. Munoz, G. Fernandez-Lorente, C. Mateo, C. Ortiz, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2002, **19-20**, 279.
- [178] S. Akgol, Y. Kacar, S. Ozkara, H. Yavuz, A. Denizli, M.Y. Arica, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2001, **15**, 197.
- [179] G. Fernandez-Lorente, M. Terreni, C. Mateo, A. Bastida, R. Fernandez-Lafuente, P. Dalmases, J. Huguet, J.M. Guisan, *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, **28**, 389.
- [180] C. Mateo, O. Abian, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, *Biotechnol. Bioeng.*, 2000, **68**, 98.
- [181] M. Kamori, T. Hori, Y. Yamashita, Y. Noashima, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2000, **9**, 269.
- [182] P.J. O'Connell, J. Vasley, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **74**, 264.
- [183] S.B. Lamb., D.C. Stuckey, *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, **26**, 574.
- [184] D. Ling, G. Wu, C. Wang, F. Wang, G. Song, *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, **27**, 516.
- [185] E. Santano, del Carmen M. Pinto, P. Macias, *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, **30**, 639.
- [186] H. Kawamoto, T. Oguma, H. Sekine, M. Kobayashi, *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, **28**, 515.
- [187] D. Steiner, R. Rozen, M. Bromshteym, B. Zaks, I. Gedalia, G. Bachrach, *Carbohydr. Res.*, 2002, **331**, 701.
- [188] X. Zhou, B. Xue, S. Bai, Y. Sun, *Biochem. Eng. J.*, 2002, **11**, 13.
- [189] C. Mai, O. Millstein, A. Huttermann, *J. Biotechnol.*, 2000, **79**, 173.
- [190] P. Mensah, G. Carta, *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, **66**, 137.

- [191] S. Harikrishna, S. Divakar, S.G. Prapulla, N.G. Karanth, *J. Biotechnol.*, 2001, **87**, 193.
- [192] H. Kakahashi, B. Li, T. Sasaki, C. Miyazaki, T. Kajino, S. Inagaki, *Microporous and Macroporous Materials*, 2001, **44-45**, 755.
- [193] Y. Kacar, M.Y. Arica, *Food Chem.*, 2001, **75**, 325.
- [194] J. He, X. Li, D.G. Evans, X. Duan, C. Li, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2000, **11**, 45.
- [195] L. Ren, J. He, D.G. Evans, X. Duan, R. Ma, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2001, **16**, 65.
- [196] P. Irwin, J. Bromllette, M. Germann, K. Hicks, M. Kurantz, W. Damert, *Enzyme Microb. Technol.*, 1999, **24**, 675.
- [197] A. Akova, G. Ustun, *Biotechnol. Lett.*, 2000, **22**, 355.
- [198] L.-Q. Wu, T. Chen, K.K. Wallace, R. Vazquez-Duhalt, G.F. Payne, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **76**, 325.
- [199] W. Pu, Y. Li-rong, W. Jian-ping, *Biotechnol. Lett.*, 2001, **23**, 1429.
- [200] P. Mateo, G. Fernandez-Lorente, E. Cortes, J.L. Garcia, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **76**, 269.
- [201] R.J. Barros, E. Wehtje, P. Adlercreutz, *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, **59**, 364.
- [202] R. Afrin, T. Haruyama, Y. Yanagida, E. Kobatake, M. Aizawa, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2000, **9**, 259.
- [203] Ge.Y. Wang, H. Zhou, U. Tong, W. Li, *J. Biotechnol.*, 1999, **67**, 33.
- [204] H. Yavuz, G. Bayromoglu, Y. Kacar, A. Denizli, M.Y. Arica, *Biochem. Eng. J.*, 2002, **10**, 1.
- [205] A. Kondo, T. Urabe, K. Higashitani, *J. Ferment. Bioeng.*, 1994, **77**, 700.
- [206] S.A. Costa, T. Tzanov, F. Carneiro, G.M. Gubitza, A. Cavaco-Paulo, *Biotechnol. Lett.*, 2002, **24**, 173.
- [207] J.M. Guisan, P. Sabuquillo, R. Fernandez-Lafuente, G. Fernandez-Lorente, C. Matco, P.J. Halling, D. Kennedy, E. Miyata, D. Re, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2001, **11**, 817.
- [208] Q.Z.K. Zhou, X.D. Chen, *Biochem. Eng. J.*, 2001, **9**, 33.
- [209] J. He, X. Li, D.G. Evans, X. Duan, C. Li, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2000, **11**, 45.
- [210] A.T. Ruiz, A.J. Malave, C. Felby, K. Griebenow, *Biotechnol. Lett.*, 2000, **22**, 229.
- [211] A.K. Bajpai, R. Sachdeva, *Colloid Polym. Sci.*, 2002, **280**, 892.
- [212] M.R. Tarasevich, V.A. Bogdanovskaya, A.V. Kapustin, *Electrochem. Comm.*, 2003, **5**, 491.
- [213] A. Reischwitz, K.-D. Reh, K. Buchholz, *Enzyme Microb. Technol.*, 1995, **17**, 457.
- [214] A. Basso, L. De Martin, C. Ebert, L. Cardossi, P. Linda, V. Zlatov, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2001, **11**, 851.
- [215] A. Basso, L. De Martin, C. Ebert, L. Cardossi, P. Linda, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2000, **8**, 245.
- [216] A. Kilinc, S. Onal, A. Telefoncu, *Process Biochem.*, 2002, **38**, 641.
- [217] Y.P. Yong, B. Al-Duri, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 1996, **65**, 239.
- [218] Y. Watanabe, Y. Miyawaki, S. Adachi, K. Nakanishi, R. Matsuno, *Biochem. Eng. J.*, 2001, **8**, 213.
- [219] C.-H. Lee, K.L. Parkin, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **75**, 219.
- [220] I.V. Gorokhova, A.E. Ivanov, V.P. Zubov, *Russian J. Bioorg. Chem.*, 2002, **28**, 38.
- [221] S. Hosseinkhani, M. Nemat-Gorgoni, *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, **33**, 179.
- [222] K.-H. Jang, K.-B. Song, B.-S. Park, C.H. Kim, B.H. Chung, R.W. Chouc, K.S. Lee, C. Lee, U.-H. Chun, S.-K. Rhee, *Process Biochem.*, 2001, **37**, 339.
- [223] C.A.K. Sobral, M.O.R. Rodrigues, D.R. De Oliveira, F.F. De Moraes, M.G. Zanin, *J. Ind. Phn. Mol. Rec. Chem.*, 2002, **44**, 383.
- [224] M. Saalemuddin, *Adv. Biochem. Eng.*, 1999, **64**, 203.
- [225] M.L. Carbajal, E.E. Smolko, M. Grosselli, *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B.*, 2003, **208**, 416.
- [226] L. Masta, A. Heyraud, J.-P. Joseleau, P.R. Coulet, *J. Biotechnol.*, 2003, **101**, 253.
- [227] F.N. Serralha, J.M. Lopes, F. Lemos, D. Prazeres, M. Aires-Barros, J. Rocha, J. Cabral, R. Fernando, *React. Kin. Catal. Lett.*, 2000, **69**, 217.

- [228] F. Bellezza, A. Cipiciani, V. Costantino, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2003, **26**, 47.
- [229] J. Turkova, *J. Chromatogr. B*, 1999, **722**, 11.
- [230] J. Anzai, Y. Kobayashi, N. Nakamura, T. Hoshi, *Sensors and Actuators B*, 2000, **65**, 94.
- [231] P. Gemeiner, P. Docolomansky, J. Nahalka, V. Stefuca, B. Danielsson, *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, **49**, 26.
- [232] H. Helmholz, S. Cartellieri, L. He, P. Thiesen, B. Niemeyer, *J. Chromatogr.*, 2003, **1006**, 127.
- [233] Y. Kobayashi, J. Anzai, *J. Electroanal. Chem.*, 2001, **507**, 250.
- [234] P. Peluso, D.S. Wilson, D. Do, H. Tran, M. Venkatasubbaiah, D. Quincy, B. Heidecker, K. Poindexter, N. Tolani, M. Phelan, K. Witte, L.S. Jung, P. Wagner, S. Nock, *Anal. Biochem.*, 2003, **312**, 113.
- [235] P. Lee, H.E. Swaisgood, *Enzyme Microb. Technol.*, 1998, **22**, 246.
- [236] W.H. Shao, X.E. Zhang, H. Liu, Z.P. Zhang, A.E. Cass, *Bioconj. Chem.*, 2000, **11**, 822.
- [237] J.J. Wang, H.E. Swaisgood, J.C.H. Shih, *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, **81**, 421.
- [238] W.H. Scouten, J.H.T. Luong, R.S. Brown, *TIBTECH*, 1995, **13**, 178.
- [239] A. Szewczuk, A. Rapak, *Wiad. Chem.*, 1985, **39**, 31.
- [240] G. Józefaciuk, I. Miedziak, *Wiad. Chem.*, 1984, **38**, 163.
- [241] N. Nakajima, Y. Ikade, *Bioconj. Chem.*, 1995, **6**, 123.
- [242] J. Tiller, P. Berlin, D. Klemm, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1999, **30**, 155.
- [243] A. Kenney, S. Fowell (Eds), *Practical Protein Chromatography*, Humana Press, Totowa 1992.
- [244] E. Ruckenstein, W. Guo, *J. Membr. Sci.*, 2001, **193**, 131.
- [245] G. Massolini, E. Calleri, E. De Lorenzi, M. Pregnotato, M. Terreni, G. Felix, C. Gandini, *J. Chromatogr. A*, 2001, **921**, 147.
- [246] H.-J. Hsieh, P.-C. Liu, W.-J. Liao, *Biotechnol. Lett.*, 2000, **22**, 1459.
- [247] E.M. Lamas, R.M. Barros, V.M. Balcao, F.X. Malcata, *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, **28**, 642.
- [248] A. Hidalgo, L. Betancor, F. Lopez-Gallego, R. Moreno, J. Berenguer, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, **33**, 278.
- [249] M.Y. Arica, H. Yavuz, S. Patir, A. Denizli, *Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2000, **11**, 127.
- [250] A. De Maio, M.M. El-Masry, P. De Luca, V. Grano, S. Rossi, N. Pagliuoka, F.S. Gaeta, M. Pataccio, D.G. Mita, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2003, **21**, 253.
- [251] F.H. Isgrove, R.J.H. Williams, G.W. Niven, A.T. Andrews, *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, **28**, 225.
- [252] A. Avramescu, S. Andreescu, T. Noguier, C. Bala, D. Andreesen, J.-L. Marty, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, **374**, 25.
- [253] S. Yabuku, F. Mizutani, S. Yukari, Y. Hirata, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2003, **91**, 187.
- [254] M. Ladero, M.T. Perez, A. Santos, F. Garcia-Ochoa, *Biotechnol. Bioeng.*, 2002, **81**, 241.
- [255] M.E. Halibi, J.C. Baratti, *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, **28**, 296.
- [256] E. Calleri, G. Massolini, F. Loiodice, G. Fracchilla, C. Temporini, G. Felix, P. Tortorella, G. Caccialanzo, *J. Chromatogr. A*, 2002, **958**, 131.
- [257] V. Chegel, Y. Shirshov, S. Avilov, M. Demchenko, M. Mustafaev, *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 2002, **50**, 201.
- [258] T. Tzanov, S.A. Costa, G.M. Gubitz, A. Cavaco-Paulo, *J. Biotechnol.*, 2002, **93**, 87.
- [259] N. Bachinski, A.S. Martins, V.M.F. Paschoalin, A.D. Panek, C.L.A. Paiva, *Biotechnol. Bioeng.*, 1997, **54**, 33.
- [260] L.H. Lim, D.G. Macdonald, G.H. Hill, *Biochem. Eng. J.*, 2003, **13**, 53.
- [261] G. Ginalska, A. Belcarz, T. Wolski, *Biotechnologia*, 1999, **44**, 226.
- [262] T.-C. Hung, R. Giridhar, S.-H. Shao, W.-T. Wu, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2003, **26**, 69.
- [263] S. Rocchietti, A.S.V. Urrutia, M. Pregnotato, A. Tagliani, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, M. Terreni, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **31**, 88.

- [264] V.M. Balcao, C. Mateo, R. Fernandez-Lafuente, F.X. Malcata, J.M. Guisan, *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, **28**, 696.
- [265] A. Illanes, L. Wilson, G. Tomasello, *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, **27**, 270.
- [266] A. Illanes, L. Wilson, G. Tomasello, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2001, **11**, 531.
- [267] C.R. Carrara, E.J. Mammarella, A.C. Rubiolo, *Chem. Eng. J.*, 2003, **92**, 123.
- [268] K.F. Fernandes, C.S. Lima, H. Pinho, C.H. Collins, *Process Biochem.*, 2003, **38**, 1379.
- [269] C. Aguirre, M. Toledo, V. Medina, A. Illanes, *Process Biochem.*, 2002, **38**, 351.
- [270] L. Jianguo, C. Wei, W. Shuai, O. Fan, *React. Func. Polym.*, 2001, **48**, 75.
- [271] P. Padmini, K.K.S. Iyegar, A. Baradarajan, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 1995, **64**, 31.
- [272] A. Zaidi, J.L. Gainer, G. Carta, A. Mrani, T. Kadiri, Y. Belarbi, A. Mir, *J. Biotechnol.*, 2002, **93**, 209.
- [273] A. Parmar, H. Kumar, S.S. Marwaha, J.F. Kennedy, *Biotechnol. Adv.*, 2000, **18**, 289.
- [274] J.-W. Park, K. Park, H. Song, H. Shin, *J. Biotechnol.*, 2002, **93**, 203.
- [275] R. Prodanovic, S. Jovanovic, Z. Kujcic, *Biotechnol. Lett.*, 2001, **23**, 1171.
- [276] C.-H. Fan, C.-K. Lee, *Biochem. Eng. J.*, 2001, **8**, 157.
- [277] S. Wang, M. Yoshimoto, K. Fukunaga, K. Nakao, *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, **83**, 444.
- [278] S.G. Wang, Q. Zhang, R. Wang, S.F. Yoon, J. Ahn, D.J. Yang, J.Z. Tian, J.Q. Li, Q. Zhou, *Electrochem. Comm.* 2003, **5**, 800.
- [279] J.M. Palomo, G. Munoz, G. Fernandez-Lorente, C. Matco, M. Fuentes, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2003, **21**, 201.
- [280] Guan, Y.H., Lilley, T.H., Brook, A.H., *Enzyme Microb. Technol.*, 28 (2001) 218-224.
- [281] Spiess, A., Schlothamer, R.-C., Hinrichs, J., Scheidet, B., Kasche, V., *Biotechnol. Bioeng.*, 62 (1999) 267-277.
- [282] J. Torres-Bacete, M. Arroyo, R. Torres-Guzman, I. Mata, M.P. Castillon, C. Accebal, *Biotechnol. Lett.*, 2000, **22**, 1011.
- [283] M.J. Hernaiz, D.H.G. Crout, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2000, **10**, 403.
- [284] M.J. Hernaiz, D.H.G. Crout, *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, **27**, 26.
- [285] M.E. Bruins, E.W. Van Hellemond, A.E.M. Janssen, R.M. Boom, *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, **81**, 546.
- [286] M.E. Bruins, A.J.H. Thewessen, A.E.M. Janssen, R.M. Boom, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2003, **21**, 31.
- [287] S.W. Park, Y.I. Kim, K.H. Chung, S.W. Kim, *Process Biochem.*, 2001, **37**, 153.
- [288] K. Ragnitz, C. Syldatk, M. Pietzsch, *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, **28**, 713.
- [289] M.Y. Lee, A. Srinivasan, B. Ku, J.S. Dordick, *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, **83**, 20.
- [290] F.M. Bautista, J.M. Campelo, A. Garcia, A. Jurado, D. Luna, J.M. Marinas, A.A. Romero, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2001, **11**, 567.
- [291] G. Penzol, P. Armisen, R. Fernandez-Lafuente, L. Rodas, J.M. Guisan, *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, **60**, 518.
- [292] P.S. Sehanputri, C.G. Hill Jr., *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, **83**, 608.
- [293] B.C.C. Pessela, C. Mateo, M. Fuentes, A. Vian, J.L. Garcia, A.V. Carrascosa, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, **33**, 199.
- [294] F. Vaillant, A. Millan, P. Millan, M. Dornier, M. Decloux, M. Reynes, *Process Biochem.*, 2000, **35**, 989.
- [295] E. Palazzi, A. Converti, *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, **28**, 246.
- [296] G. Hublik, F. Schinner, *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, **27**, 330.
- [297] L. Cao, L. van Langen, R.A. Sheldon, *Opinion Biotechnol.*, 2003, **14**, 387.
- [298] R. Schoevaart, T. Kieboom, *Carbohydr. Res.*, 2002, **337**, 899.
- [299] R. Schoevaart, T. Kieboom, *Carbohydr. Res.*, 2001, **334**, 1.

- [300] W. Tischer, V. Kasche, *TIBTECH*, 1999, **17**, 326.
- [301] E.M. D'Urso, G. Fortier, *Enzyme Microb. Technol.*, 1996, **18**, 482.
- [302] L. Cao, L. van Langen, R.A. van Rantwijk, R.A. Sheldon, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2001, **11**, 665.
- [303] L. Cao, R.A. van Rantwijk, R.A. Sheldon, *Org. Lett.*, 2000, **2**, 1361.
- [304] P. Lopez-Serrano, L. Cao, R.A. van Rantwijk, R.A. Sheldon, *Biotechnol. Lett.*, 2002, **24**, 1379.
- [305] L. Cao, L. van Langen, M.H.A. Janssen, R.A. Sheldon, *Eur. Pat. Appl*, 1999, EP1088887A1.
- [306] A.L. Margolin, *TIBTECH*, 1996, **14**, 223.
- [307] D. Cortes, E. Wehtje, P. Adlercreutz, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2002, **11**, 607.
- [308] Y.-F. Wang, K. Yakovlevsky, N. Khalaf, B. Zhang, A.L. Margolin, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1996, **799**, 777.
- [309] J.D. Vaghjiani, T.S. Lee, G.J. Lye, M.K. Turner, *Biocatal. Biotrans.*, 2000, **18**, 151.
- [310] M. Leisola, J. Jokela, J. Finell, O. Pastinen, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **72**, 501.
- [311] J. Jokela, O. Pastinen, M. Leisola, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **31**, 67.
- [312] C. O'Fagain, *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, **33**, 137.
- [313] N.L. Clair, M.A. Novia, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 7314.
- [314] H. Noritomi, K. Koyama, S. Kato, K. Nagahama, *Biotechnol. Technol.*, 1998, **12**, 467.
- [315] O. Pastinen, K. Visuri, M. Leisola, *Biotechnol. Technol.*, 1998, **12**, 557.
- [316] O. Pastinen, J. Jokela, T. Eerikainen, T. Schwabe, M. Leisola, *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, **26**, 550.
- [317] M. Dois-Lafargue, R.-M. Willemot, P.F. Monsan, M. Remaud-Simeon, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **75**, 276.
- [318] A.R. DeGroot, R.J. Neufeld, *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, **29**, 321.
- [319] D.K. Boadi, R.J. Neufeld, *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, **28**, 590.
- [320] A. Tanriseven, S. Dogan, *Process Biochem.*, 2001, **36**, 1081.
- [321] M. Schulcit, P.L. Luisi, *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, **72**, 249.
- [322] S. Kermasha, R. Gaffar, B. Bisakowski, *Process Biochem.*, 2000, **35**, 1103.
- [323] J. van Roon, R. Beeftink, K. Schroen, H. Tramper, *Curr. Opinion Biotechnol.*, 2002, **13**, 398.
- [324] M. Ladero, A. Santos, F. Garcia-Ochoa, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **72**, 458.
- [325] P. Wang, S. Dai, S.D. Waezsada, A.Y. Tsao, B.H. Davidson, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **74**, 249.
- [326] N. Munjal, S.K. Sawhney, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **30**, 613.
- [327] M. Ladero, A. Santos, F. Garcia-Ochoa, *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, **27**, 583.
- [328] V. Stefuca, A. Welwardova, P. Gemeiner, A. Jakubova, *Biotechnol. Technol.*, 1994, **8**, 497.
- [329] G.-H. Xiu, L. Jiang, P. Li, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **74**, 29.
- [330] J.F. Celayeta, A.H. Silva, V.M. Balcao, F.X. Malcata, *Bioproc. Biosys. Engn.*, 2001, **24**, 143.
- [331] R. Fernandez-Lafuente, V. Rodrigues, C. Mateo, G. Penzol, D. Hernandez-Justiz, G. Irazoqui, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 1999, **7**, 181.
- [332] S.M. Thomas, R. DiCossimo, V. Nagarajan, *TIBTECH*, 2002, **20**, 238.
- [333] I. Karube, Y. Nomura, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2000, **10**, 177.
- [334] C. Nistor, J. Erneus, *Waste Management*, 1999, **19**, 147.
- [335] P.D. Patel, *Trends Anal. Chem.*, 2002, **21**, 96.
- [336] K. Ramanathan, M. Rank, J. Svitel, A. Dzegeev, B. Daniellson, *TIBTECH*, 1999, **17**, 499.
- [337] H. Jing, X.F. Li, D.G. Evans, X. Duan, C.Y. Li, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2000, **11**, 45.
- [338] H. Kise, A. Hayakawa, *Enzyme Microb. Technol.*, 1991, **13**, 584.
- [339] A.M. Azevedo, D.M.F. Prazeres, J.M.S. Cabral, L.P. Fonseca, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2001, **15**, 147.
- [340] J. Ogawa, S. Shimizu, *Curr. Opinion Biotechnol.*, 2002, **13**, 367.
- [341] K.M. Koeller, C.H. Wong, *Nature*, 2001, **409**, 232.

- [342] A. Zaks, *Curr. Opinion Chem. Biol.*, 2001, **5**, 130.
- [343] A.J.J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Curr. Opinion Biotechnol.*, 2002, **13**, 367.
- [344] M. Mahmoudian, *Biocatal. Biotransform.*, 2000, **18**, 105.
- [345] F.W. Scheller, U. Wollenberger, A. Warsinke, F. Lisdat, *Curr. Opinion Biotechnol.*, 2001, **12**, 35.
- [346] E. Tothill, *Comp. Electr. Agr.*, 2001, **30**, 205.
- [347] H. Gulce, I. Ataman, A. Gulce, A. Yildiz, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **30**, 41.
- [348] M. Situmorang, J.J. Gooding, D.B. Hibbert, *Anal. Chim. Acta*, 1999, **394**, 211.
- [349] S. Suye, Y. Aramoto, M. Nakamura, I. Tabata, M. Sakakibara, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **30**, 139.
- [350] J. Liu, J. Wang, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1999, **30**, 177.
- [351] S. Shipovskov, E. Ferapontova, T. Ruzgas, A. Levaskov, *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, **1620**, 119.
- [352] D. Ling, G. Wu, C. Wang, F. Wang, G. Song, *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, **27**, 516.
- [353] J.P. Chen, J.Y. Chen, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 1998, **5**, 798.
- [354] V.M. Balcao, C. Mateo, R. Fernandez-Lafuente, F.X. Malcata, J.M. Guisan, *Biotechnol. Progr.*, 2001, **17**, 537.
- [355] V.M. Balcao, C. Mateo, R. Fernandez-Lafuente, F.X. Malcata, J.M. Guisan, *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, **28**, 696.
- [356] M. Vellard, *Curr. Opinion Biotechnol.*, 2003, **14**, 444.
- [357] A.M. Klivanov, *Curr. Opinion. Biotechnol.*, 2003, **14**, 427.
- [358] B. Avalle, A. Friboulet, D. Thomas, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2000, **10**, 39.
- [359] J.T. Yli-Kauholuoma, K.D. Janda, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1996, **799**, 26.

Praca wpłynęła do Redakcji 13 kwietnia 2004

IMMOBILIZACJA ENZYMÓW. CZEŚĆ 2: REAKTORY MEMBRANOWE

ENZYMES IMMOBILIZATION. PART 2: MEMBRANE REACTORS

Jolanta Bryjak

*Instytut Inżynierii Chemicznej, Politechnika Wrocławska,
ul. Norwida 4/6, 50-373 Wrocław*

Abstract

Wstęp

1. Immobilizacja enzymów w reaktorach membranowych
 - 1.1. Membrany
 - 1.2. Klasyfikacja metod immobilizacji enzymów w reaktorach membranowych
2. Metody immobilizacji enzymów rozpuszczalnych w wodzie
 - 2.1. Immobilizacja w objętości mieszalnikowych reaktorów przepływowych
 - 2.2. Immobilizacja w wydzielonym obszarze modułu ultrafiltracyjnego
3. Immobilizacja enzymów na/w membranie – membrany katalityczne
 - 3.1. Immobilizacja w warstwie żelowej
 - 3.2. Zamykanie w materiale membrany
 - 3.3. Adsorpcyjne lub jonowe wiązanie z powierzchnią membrany
 - 3.4. Kowalencyjne wiązanie z powierzchnią membrany
 - 3.5. Wiązanie biospecyficzne
4. Charakterystyka enzymów immobilizowanych w reaktorach membranowych. Modelowanie matematyczne procesów
5. Zastosowania enzymów immobilizowanych z wykorzystaniem systemów membranowych

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

ABSTRACT

Biocatalysis involves the enzyme-promoted transformations of a substrate into useful product in either a homogeneous or heterogenous system. The separation of reactants from products and the recovery and reuse of the catalyst from the reaction mixture is an important step that significantly decreases the cost of the process. Membrane reactors constitute an attempt to integrate catalytic conversion, product separation and/or concentration, and catalyst recovery into a single operation unit that lowers the overall cost of final product.

In an enzyme membrane reactor biocatalyst is immobilized within the reaction vessel or on/in a membrane (catalytic membrane). The paper shows two possibilities for immobilization of enzymes:

1 – localization of the soluble biocatalyst in a certain defined region of space of a membrane reactor; e.g. in a volume of a reactor and separation unit or in lumen/shell side of ultrafiltration unit;

2 – adsorbed, deposited or bound (physically, via affinity ligand or by covalent attachment) to the surface of a membrane or entrapped within pores or material of the membrane.

Arguments counting for membrane supported or soluble enzymes are also presented. Reactors with soluble biocatalyst in a volume of a membrane reactor seem be suited to carry out complex enzymatic transformations, involving several enzymes and cofactor regeneration. Membrane reactors with catalytic membranes are particularly appropriate for nonconventional media such as organic-aqueous two-phase systems and for production of biosensing elements of enzyme electrodes. It is therefore the intention of the paper to outline the common immobilization methods and technologies to facilitate proper applications of enzymes immobilized in a membrane reactor.

WSTĘP

Wdrożenie nowych technologii opartych o reakcje enzymatyczne to efekt wieloletnich badań laboratoryjnych nad dostępnością różnych enzymów, metodami izolacji i oczyszczania, zwiększeniem ich stabilności w roztworach wodnych i rozpuszczalnikach organicznych oraz możliwościami transformacji nienaturalnych substratów. Wraz ze wzrostem ilości tanich i stabilnych białek enzymatycznych, rośnie liczba ich potencjalnych zastosowań w przemyśle chemicznym, spożywczym, farmaceutycznym, w medycynie i rolnictwie. O atrakcyjności transformacji enzymatycznych decyduje kilka podstawowych właściwości [1–5]:

1. kataliza w łagodnych warunkach temperatury (25–100°C), ciśnienia (1 atmosfera) i pH (4,0–8,0), co, w porównaniu z klasycznymi procesami chemicznymi, powoduje stosunkowo nieduże zużycie energii oraz nie wymaga stosowania specjalnych urządzeń;

2. enzymy to biokatalizatory chemo-selektywne, regio-selektywne i stereo-selektywne. Będąc katalizatorami chiralnymi, są w stanie produkować związki optycznie czynne, co ma szczególne znaczenie przy otrzymywaniu leków i związków do ochrony roślin;

3. możliwość prowadzenia reakcji trudnych bądź niemożliwych do przeprowadzenia metodami chemicznymi;

4. kataliza może przebiegać w środowisku wodnym i rozpuszczalnikach organicznych oraz na granicy faz ciecz/ciecz i ciecz/gaz.

Obok zalet, katalizatory białkowe posiadają kilka wad: wysoka cena czystych enzymów, ograniczona stabilność oraz kłopotliwe oddzielenie białka od produktów (substratów) reakcji. Zatem, praktyczne wykorzystanie unikalnych właściwości enzymów wymaga obniżenia kosztu biokatalizatora lub/ oraz umożliwienia wykorzystania go w procesie ciągłym czy wielokrotnie w procesie okresowym, zmniejszenia podatności enzymu na rozfałdowanie, a także ułatwienia procesu rozdziału reagentów po zakończeniu reakcji. Problem ograniczeń związanych z ceną enzymów maleje wraz z rozwojem biotechnologii, co w efekcie pozwala na otrzymanie tańszych i często stabilniejszych enzymów [1, 6, 7]. Trudności związane z niską stabilnością enzymów były motorem rozwoju inżynierii białek, a szczególnie badań nad czynnikami warunkującymi stabilność i technikami stabilizacji, oferując szeroką gamę procedur zwiększających efektywnie okres wysokiej trwałości w roztworach wodnych, rozpuszczalnikach organicznych i w podwyższonych temperaturach (> 60°C) [6, 8–11]. Natomiast problemy związane z oddzieleniem enzymu od reagentów można rozwiązać, stosując immobilizację enzymu na nośnikach rozpuszczalnych lub nierozpuszczalnych w wodzie albo w reaktorach membranowych [2, 4, 12–15].

Z procesowego punktu widzenia, idealna reakcja przebiega w reaktorze o wysokiej produktywności, ze stabilnym biokatalizatorem i z efektywnym oraz tanim rozdziałem reagentów. Reaktory z immobilizowanym enzymem oferują możliwość prowadzenia reakcji z jednoczesnym rozdziałem, ponieważ separacja jest inherentnym elementem procesu ciągłego z unieruchomionym enzymem. Wybór sposobu immo-

bilizacji i typu reaktora, decydujących o produktywności, zależy od wielu czynników takich jak: stabilność enzymu, typ reakcji i rozpuszczalnik, właściwości kinetyczne enzymu, masa cząsteczkowa i rozpuszczalność reagentów, koszt immobilizacji, możliwości utrzymania warunków sterylnych, preferowany rodzaj transportu masy (konwekcyjny, dyfuzyjny), łatwość sterowania i kontroli procesu oraz przenoszenia skali. Wielość metod immobilizacji, łączących często stabilizację aktywności, pozwala dobrać grupę preferowanych technik, korzystnych dla enzymu i opłacalnych procesowo. Jednak brak jest generalnych wskazań co do doboru sposobu immobilizacji. W efekcie, w chwili obecnej, wszystkie enzymy stosowane w skali przemysłowej były immobilizowane wszystkimi znanymi technikami; od wiązania z nośnikami nierozpuszczalnymi w wodzie (adsorpcyjnie, jonowo, kowalencyjnie), z polimerami rozpuszczalnymi w wodzie, poprzez sieciowanie, kopolimeryzację, zamykanie w sieci żelu, czy kapsułkowanie, po immobilizację w reaktorach membranowych w formie rozpuszczalnej w wodzie lub związanej na/w membranie. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie aktualnych doniesień, dotyczących immobilizacji enzymów z wykorzystaniem technik membranowych.

1. IMMOBILIZACJA ENZYMÓW W REAKTORACH MEMBRANOWYCH

Nawet pobieżny przegląd literatury dotyczącej immobilizacji enzymów w układach zawierających membrany selektywnie przepuszczalne, wywołuje odruchową akceptację stwierdzenia [4]: „...reaktor membranowy to elegancka i ekonomiczna droga odzysku enzymu z mieszaniny reakcyjnej w procesie ciągłym lub okresowym...”. Ten entuzjazm, datowany na rok 1996, znalazł słabe odbicie w ilości przemysłowych procesów enzymatycznych prowadzonych w tym czasie z wykorzystaniem membran półprzepuszczalnych. W powyżej cytowanej monografii przedstawiono 4 takie procesy, w tym jeden z lipazą immobilizowaną na membranie. Ale już 4 lata później, w informacjach przedstawionych w *Industrial Biotransformations* [16], na 69 przemysłowych procesów enzymatycznych 9 (6 enzymów) dotyczyło wykorzystania technik immobilizacji z zastosowaniem membran selektywnie przepuszczalnych. Dane zamieszczone w Tabeli 1 wskazują dwa przypadki, dla których stosowanie enzymów immobilizowanych w reaktorach membranowych jest szczególnie uzasadnione; są to reakcje z regeneracją koenzymu i reakcje w układach dwufazowych.

Powyższy wykaz nie ujmuje wykorzystania immobilizowanych enzymów w:

- membranowej chromatografii powinowactwa ([17–19] – prace przeglądowe; [20–22] – prace szczegółowe), w której enzymy stosowane są głównie do oczyszczania inhibitorów białkowych i koenzymów z brzeczek pochodowlanych oraz aktywatorów i substratów;
- produkcji biosensorów ([23] – praca przeglądowa; [24–28] – prace szczegółowe) z użyciem przede wszystkim oksydazy glukozowej, peroksydazy, katalazy, oksydazy cholesterolowej;

- detoksykatorach krwi; są to: katalaza, oksydaza bilirubinowa, heparynaza, arginaza i asparaginaza, trypsyna, papaina [14], ureaza [29] oraz α -oksydaza L-lizyny [30];
- produkcji małotonażowej, o możliwościach której świadczą bardzo liczne przykłady zamieszczone w wydawnictwach zwartych [4, 7, 12, 14, 31], pracach przeglądowych [15, 32–34] i w pracach szczegółowych z ostatnich lat (reakcje w reaktorach dwufazowych [35–41] i w środowiskach niewodnych [41, 42], hydroliza białek, tłuszczów, skrobi, celobiozy [43–56], procesy klasyczne z enzymami, jak: inwertaza, β -galaktozydaza, acylaza penicylanowa, fumaraza, penicylinaza, katalaza, ureaza, β -glikozydaza, dehydrogenaza mleczanowa [29, 38, 44, 45, 57–67] czy mające zastosowanie w ochronie środowiska [42, 68–71]).

Tabela 1. Przemysłowe procesy enzymatyczne prowadzone w reaktorach membranowych do 2000 roku [16] (* – enzymy z różnych gatunków mikroorganizmów)

| Enzym | Sposób immobilizacji | Informacje dodatkowe | Produkcja: |
|--|----------------------|---|---|
| 1.1. *dehydrogenaza alkoholowa EC 1.1.1.1 | objętość reaktora | enzymatyczna regeneracja koenzymu | feromonu (S)-(+)-sulkatolu |
| 1.2. *dehydrogenaza alkoholowa EC 1.1.1.1 | objętość reaktora | enzymatyczna regeneracja koenzymu | amfetamin i pochodnych leków z (S)-4-fenyl-2-butanolu |
| 1.3. *dehydrogenaza alkoholowa EC 1.1.1.1 | objętość reaktora | enzymatyczna regeneracja koenzymu | prekursorów leków antycholesterolowych |
| 2. dehydrogenaza mleczanowa EC 1.2.1.2 | objętość reaktora | enzymatyczna regeneracja koenzymu | prekursorów inhibitorów enzymów konwertujących agiotensynę |
| 3. dehydrogenaza leucynowa EC 1.4.19? | objętość reaktora | enzymatyczna regeneracja koenzymu | <i>tert</i> -leucyny do syntezy leków antyrakowych oraz inhibitorów proteaz HIV |
| 4.1. * lipaza EC 3.1.1.3 | w porach membrany | reaktor membranowy z trójfazowym ekstraktem membranowym | (S)- enancjomeru ibuprofenu |
| 4.1. * lipaza EC 3.1.1.3 | w porach membrany | reaktor dwufazowy | prekursora diltiazemu, stosowanego w chorobach serca |
| 5. subtylizyna EC 3.4.21.62 | ? | reaktor dwufazowy | (S)-fenyloalaniny do wyrobu aspartamu |
| 6. aminoacylaza EC 3.5.1.14 | ? | reaktor dwufazowy reaktor jednofazowy | prekursorów do syntezy chiralnej wybranych L-aminokwasów z rozтворów racemicznych |

Olbrymie zainteresowanie immobilizacją enzymów w reaktorach membranowych (ERM – enzymatyczny reaktor membranowy) wynika z faktu, że proces może być prowadzony w jednej jednostce operacyjnej, integrującej reakcję katalityczną z jednoczesną separacją produktu (ewentualnie z jego koncentracją) i odzyskiem biokatalizatora. Centralną funkcję spełnia oczywiście membrana selektywnie przepuszczalna, która może rozdzielać enzym (substrat) od produktu lub/ oraz być nośnikiem

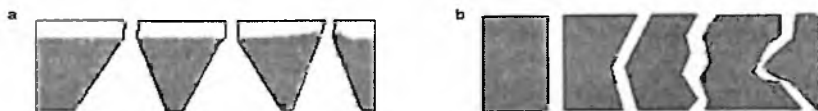
dla enzymu, lub/ oraz stanowić granicę faz ciecz–ciecz. Ze względu na kluczową rolę membran w ERM należy, przed omówieniem sposobów immobilizacji enzymów, wprowadzić podstawowe informacje dotyczące typów membran i ich właściwości.

1.1. MEMBRANY

Do lat 90. technologie z udziałem membran półprzepuszczalnych były zaliczane do technologii zaawansowanych i drogich. Jednak olbrzymi postęp w opanowywaniu metod wytwarzania membran obniżył ich koszt na tyle, że procesy je wykorzystujące stały się ekonomicznie akceptowalne. Poszerzył się również asortyment membran ze względu na materiał, formę, budowę i właściwości chemiczne, a lista głównych producentów ustabilizowała się (Amafilter, Berghof, Filtron, Fuji-Filter, Hoechst, Millipore-Amicon, Osmonics, Pall, PCI Membrane, Rochem, Romicon, Sartorius, Sepracor [4]).

Różnorodność membran dostępnych na rynku narzuca konieczność ich klasyfikacji. Przede wszystkim membrany różnią się selektywnością, czyli średnim rozmiarem porów, szacowanym również tzw. wartością punktu odcięcia (ang. *cut-off* lub *Nominal Molecular Weight Cut-Off*, NMWCO). *Cut-off* membrany jest definiowany jako masa cząsteczki, która jest zatrzymywana przez membranę w 90%, w ściśle zdefiniowanych warunkach filtracji [32]. Do immobilizacji enzymów wykorzystuje się głównie trzy typy membran [33]:

- mikroporowate (MF); *cut-off* powyżej 100 000 Da; rozmiar porów powyżej 100 nm;
- ultrafiltracyjne (UF); *cut-off* od 500 do 100 000 Da; rozmiar porów od 1 do 100 nm;
- dializacyjne; *cut-off* poniżej 500 Da; rozmiar porów poniżej 1 nm.



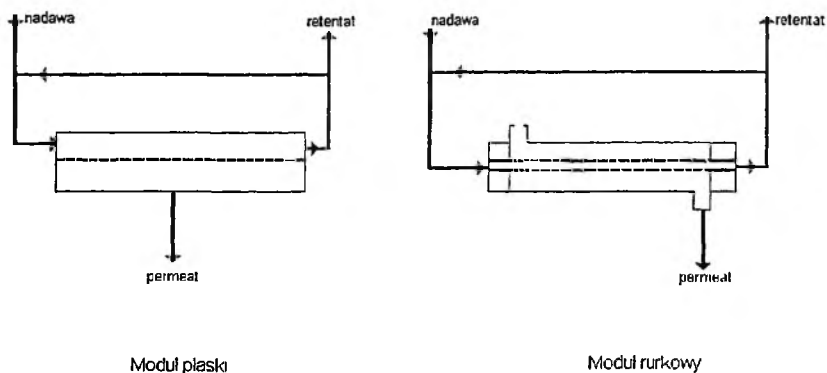
Rysunek 1. Membrany półprzepuszczalne asymetryczne (a) i symetryczne (b)

Membrany dzieli się również rozpatrując ich budowę i otrzymywanie (Rys. 1) na:

- symetryczne, otrzymywane przez rozciąganie, wytłaczanie lub napromienianie i wytrawianie. W membranach tych pory mają względnie zbliżoną średnicę przez całą grubość membrany;
- asymetryczne, otrzymywane przez inwersję faz. Tak otrzymane membrany zbudowane są z gąbczastej warstwy nośnej i tzw. skórki, o gęstszej strukturze i grubości 1–50 μm , stanowiącej właściwy element separacyjny membrany. Główną ce-

czą, odróżniającą je od membrany symetrycznej, jest mniejszy opór strumienia przepływającego przez pory.

Membrany, niezależnie od NMWCO i budowy, mogą być płaskie lub rurkowe. Bardziej dokładny podział obejmuje sposób upakowania membran w module. I tak membrany płaskie mogą być ułożone jedna nad drugą w formie stosu (moduł płaski; około $100\text{--}400\text{ m}^2/\text{m}^3$) lub stanowić jedną membranę zwiniętą spiralnie (moduł spiralny; $300\text{--}1000\text{ m}^2/\text{m}^3$). Natomiast moduły z membranami o kształcie cylindrycznym dzielone są na rurkowe ($\phi > 1,2\text{ mm}$; do $100\text{ m}^2/\text{m}^3$) oraz kapilarne ($\phi < 1,2\text{ mm}$; do $1000\text{ m}^2/\text{m}^3$; ang. *hollow-fiber*, HF) [14] (Rys. 2). Obudowa membran(y) spełnia kilka zadań: zapewnia prawidłowy dopływ i rozptyły surowca na powierzchni membrany (retentat), stanowi kolektor ciecchy po separacji membranowej (permeat), jest mechanicznym zabezpieczeniem membran, może stanowić element ograniczający obszar występowania enzymu w module, ułatwia okresowe czyszczenie membran lub wymianę modułu.



Rysunek 2. Moduł płaski i rurkowy

Uwzględniając materiał, z którego membrany są wytworzone, są one dzielone na:

- membrany z polimerów naturalnych, jak chitozan, kolagen, celuloza czy gluten;
- membrany półsyntetyczne z estrów celulozy (np. octan celulozy, nitroceluloza);
- membrany syntetyczne, otrzymywane z poli(chlorku winylu), poli(amidu), poli(metakrylanu metylu), poli(akrylonitrylu), poli(chlorku winylidenu), poli(tetrafluoroetyleny), poli(dimetylosiloksanu), poli(alkoholu winylowego), poli(tereftalanu etylu), poli(uretanu), poli(propylenu), poli(węglanu), poli(imidów), poli(fluorku winylidenu), poli(eterosulfonów), poli(aryloketonów), poli(eteroimidów), poli(imidosulfonów) i poli(ftaliimidów);
- membrany nieorganiczne z proszków metali, grafitu, tlenku aluminium, krzemianów, glinokrzemianów i szkła porowatego.

Do powyższej klasyfikacji warto dołączyć dwie grupy membran, które nie są wykonane z jednorodnego materiału. Są to:

- membrany kompozytowe, w których na membranę podporową (zwykle MF) nanoszona jest dodatkowa cienka warstwa (film) z innego materiału, która stanowi właściwą warstwę separacyjną i jest trwale związana z częścią podporową. Jest to bardzo różnorodna grupa membran z praktycznie nieograniczoną możliwością kombinacji i często stosowana w immobilizacji enzymów [29, 46, 47, 65, 72, 73];

- membrany dynamiczne, w których na membranie podporowej (zwykle MF) zdeponowana jest warstwa ułatwiająca filtrację (ang. *precoat*) i którą można łatwo z powierzchni membrany usunąć. W tym przypadku liczba kombinacji jest również ogromna, a niektóre z nich wykorzystano do immobilizacji enzymów [73–75].

Materiał membrany determinuje jej właściwości chemiczne. I tak membrany z polimerów naturalnych, półsyntetyczne oraz z poli(chloroku winylu) i poli(amidów) posiadają na powierzchni grupy funkcyjne, podatne na modyfikację chemiczną. Pozostałe membrany, wyłączając membrany kompozytowe i dynamiczne, są obojętne chemicznie. Ponieważ w większości przypadków immobilizacji enzymów w układach z membraną półprzepuszczalną zaleca się stosowanie materiałów, które są umiarkowanie hydrofobowe i jednocześnie posiadają grupy jonocenne, stąd większość dostępnych na rynku membran musi być poddana dalszej obróbce, która ma zwykle zhydrofobizować powierzchnię hydrofilową lub odwrotnie, zhydrofilizować hydrofobową.

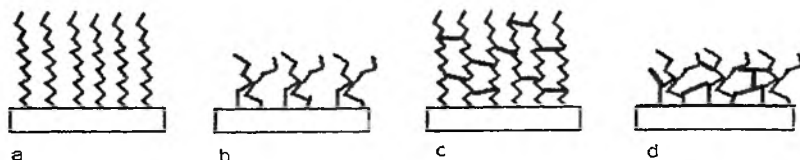
Techniki modyfikacji powierzchni polimerowych można podzielić na trzy grupy [76] (odnośniki literaturowe dotyczą zastosowań w immobilizacji enzymów):

1. Modyfikacje fizyczne jak traktowanie wysoką temperaturą w obecności poliolenfin, działanie wysokoenergetycznym polem elektromagnetycznym czy zimną plazmą, promieniowaniem UV, X i γ , wiązką fotonów, elektronów lub jonów lub metalizacja. W efekcie otrzymuje się zaktywowaną powierzchnię, najczęściej poprzez wbudowanie tlenu lub/ oraz utworzenie wiązań podwójnych węgiel–węgiel. Modyfikacja fizyczna (aktywizacja membran) zwykle jest etapem wstępnym funkcjonalizacji membran, czyli wprowadzania grup funkcyjnych [19, 61]. W tej grupie najczęstszą modyfikacją, poprzedzającą immobilizację enzymu, jest traktowanie powierzchni membrany zimną plazmą [19, 25, 77];

2. Modyfikacje chemiczne dzielone są na dwie grupy. W pierwszej reakcja chemiczna polega na przekształceniu istniejących w sieci łańcuchów polimerowych (np.: utlenianie, hydroliza, funkcjonalizacja) [19, 27, 40, 78]. Grupa druga obejmuje kowalencyjne związanie z powierzchnią membrany gotowych, krótkich łańcuchów polimerowych lub polimeryzacja łańcuchów na zaktywizowanej membranie (ang. *grafting*). Jest to szczególnie efektywna i popularna metoda modyfikacji membran [19, 25, 26, 27, 65, 66, 72, 77–89] (Rys. 3);

3. Modyfikacja materiału przed wykonaniem membran. Polega na chemicznej modyfikacji części polimeru wyjściowego lub wykorzystanie w produkcji membran dwóch różnych typów polimerów (ang. *blends*), czy stosowanie polimeru o róż-

nych, ale powtarzających się, elementach w jednym łańcuchu (ang. *block copolymers*) [61, 90, 91].



Rysunek 3. Modyfikacja powierzchni membrany łańcuchami polimerowymi; (a) i (b) – typ „grzebień” lub „szczotka”, (c) i (d) – naszczepianie z jednoczesnym sieciowaniem

Wprowadzanie grup funkcyjnych na powierzchnię membrany ma dwojaki cel; umożliwia immobilizację jonową lub kowalencyjną białka i stwarza odpowiednie mikrośrodowisko dla enzymu lub/ oraz modyfikuje właściwości filtracyjne i separacyjne membran. Modyfikacja membran syntetycznych jest często korzystniejsza, niż stosowanie membran naturalnych czy półsyntetycznych, gdyż te pierwsze są bardziej odporne na działanie kwasów, zasad, podwyższonej temperatury, enzymów i mikroorganizmów, niektórych rozpuszczalników organicznych oraz są wytrzymalsze mechanicznie.

Wszystkie typy membran, omówione powyżej, były wykorzystane do praktycznej immobilizacji enzymów. Dlatego w częściach dalszych nie podano szczegółowych informacji o membranach i sposobach ich aktywacji (od strony chemicznej takiej, jak w stosowaniu nośników ziarnistych – patrz część I), poza przypadkami nietypowymi.

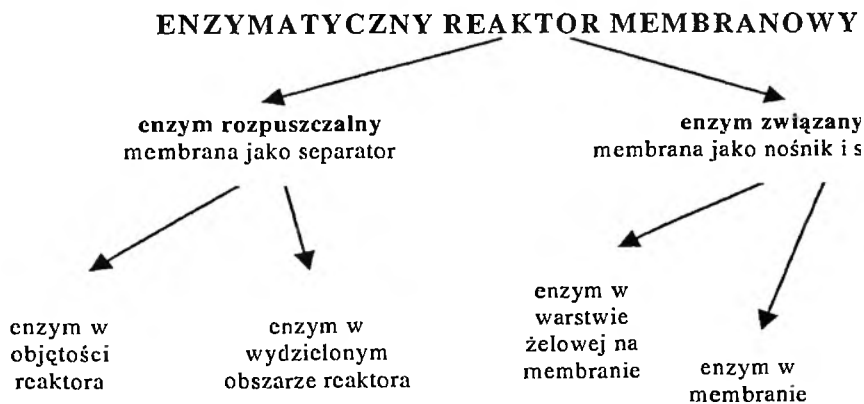
1.2. KLASYFIKACJA METOD IMMOBILIZACJI ENZYMÓW W REAKTORACH MEMBRANOWYCH

Klarowna klasyfikacja metod immobilizacji enzymów z wykorzystaniem membran półprzepuszczalnych jest skomplikowana, gdyż enzymatyczny reaktor membranowy (ERM) to system łączący reakcję katalityczną z separacją i immobilizacją enzymu. Membrana może być nośnikiem dla enzymu, ale przede wszystkim ma za zadanie wydzielać obszary, w których znajduje się enzym, substrat, produkt lub/ oraz granica faz ciecz/ciecz. Uwzględniając separację membranową należy zwrócić uwagę na rodzaj siły napędowej, wymuszającej transport masy przez pory membrany (potencjał chemiczny, różnica ciśnień, pole elektryczne) i typ transportu (dyfuzyjny lub konwekcyjny, wymuszony zwykle różnicą ciśnień). W reaktorach membranowych niebagatelną rolę spełnia również sposób realizacji procesu (np.: reaktor ciągły mieszalnikowy czy reaktor z przepływem tłokowym) i typ filtracji (filtracja wyczerpująca i diafiltracja). Z kolei, uwzględniając miejsce występowania biokatalizatora w reaktorze membranowym, rozpatruje się, czy jest on lub nie jest związany z mem-

braną, czy ma bezpośredni kontakt z substratem, czy reakcja jest kontrolowana kinetycznie lub dyfuzyjnie i czy ma miejsce kataliza heterogeniczna lub homogeniczna. W efekcie funkcjonuje szereg równocennych klasyfikacji immobilizacji enzymów w reaktorach membranowych.

Prazeres i Cabral [32] podzielili, stosownie do systemu hydraulicznego i kontaktu substratu z enzymem, reaktory membranowe na dwa typy: ciągły mieszalnikowy reaktor zbiornikowy z bezpośrednim kontaktem enzymu z substratem oraz reaktor z przepływem tłokowym i substratem kontaktującym się z enzymem podczas kontaktu z membraną. Autorzy ci przedstawili również drugą możliwość klasyfikacji, rozróżniającą miejsce występowania enzymu w reaktorze i pośredni lub bezpośredni kontakt enzymu z substratem. W tym przypadku wydzielili trzy grupy reaktorów: reaktory z enzymem i substratem po tej samej stronie membrany (enzym rozpuszczalny w rozpuszczalniku), reaktory dyfuzyjne z substratem po przeciwnej, niż enzym, stronie membrany (z recyrkulacją i bez) oraz reaktory wielofazowe z substratem po tej samej lub przeciwnej stronie membrany co enzym (z recyrkulacją i bez).

Cheryan i Mehaia [77] podzielili reaktory membranowe na mieszalnikowe i bez mieszania, przy czym w mieszalnikowych wyróżnili reaktory pracujące w warunkach wyczerpującej filtracji i diafiltracji, a w reaktorach bez mieszania przedstawili 4 konfiguracje, różniące się miejscem występowania enzymu, substratu i produktu. Natomiast Drioli i Giorno [14] za podstawę klasyfikacji uznali jednofazowość i wielofazowość układu, z dalszym podziałem na reaktory z enzymem natywnym i związanym.



Rysunek 4. Podstawowe metody immobilizacji enzymów z wykorzystaniem membran półprzepuszczalnych

W prezentowanej pracy zdecydowano się zastosować klasyfikację opartą o formę i sposób immobilizacji enzymu najbardziej zbliżoną do omówionej w pracy Giorno i Drioli [15] oraz Gekas [33], którą poszerzono o elementy o charakterze procesowym [4, 7, 12–14, 31–34, 77]. Enzym, immobilizowany w reaktorach membranowych

wych, może występować w formie rozpuszczalnej albo być związany z powierzchnią membrany (Rys. 4). Rozpatrując rolę membrany, w przypadku pierwszym stanowi ona przede wszystkim przegrodę nieprzepuszczalną dla enzymu i przepuszczalną dla produktu (ewentualnie substratu), a w przypadku drugim spełnia rolę separatora i nośnika dla enzymu (membrana katalityczna). Idąc dalej, enzym rozpuszczalny w wodzie może znajdować się w objętości układu reakcyjnego (mieszalnikowy reaktor przepływowy z wbudowaną membraną albo z zewnętrznym modułem separacyjnym) i mieć bezpośredni kontakt z substratem lub jego występowanie jest ograniczone do określonego obszaru modułu ultrafiltracyjnego, z dozowaniem substratu po przeciwnej, niż enzym, stronie membrany. Z kolei membrana katalityczna może być utworzona poprzez umieszczenie enzymu w membranie, w warstwie żelowej na membranie lub związanie z powierzchnią membrany (adsorpcyjnie, jonowo, kowalencyjnie, poprzez sieciowanie). Reaktory z membraną katalityczną mogą być okresowe lub przepływowe, a kontakt z substratem może być bezpośredni lub pośredni.

2. METODY IMMOBILIZACJI ENZYMÓW ROZPUSZCZALNYCH W WODZIE

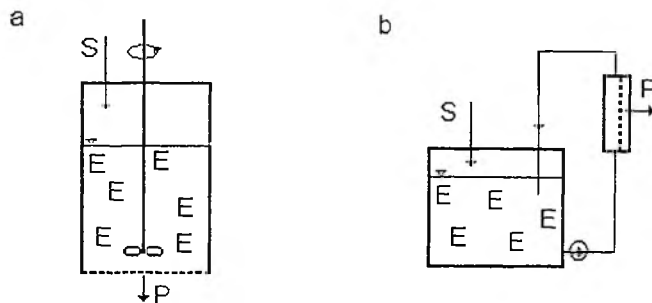
Zatrzymanie enzymu rozpuszczalnego w wodzie w określonym obszarze układu reakcyjnego z wykorzystaniem membran półprzepuszczalnych spełnia dwa podstawowe wymogi, zawarte w definicji immobilizacji: odpowiednio dobrana membrana całkowicie zatrzymuje enzym a produkt swobodnie opuszcza mieszaninę reakcyjną (1) oraz enzym jest wykorzystywany w układzie przepływowym lub wielokrotnie użyty w reaktorze okresowym (2).

2.1. IMMOBILIZACJA W OBJĘTOŚCI MIESZALNIKOWYCH REAKTORÓW PRZEPIYWOWYCH

Dla użytkownika jest to zdecydowanie najłatwiejsza procedura immobilizacji enzymów, gdyż polega na umieszczeniu roztworu biokatalizatora w reaktorze z wbudowaną membraną separacyjną (Rys. 5a) lub w reaktorze z zewnętrznym modułem separacyjnym (Rys. 5b). W reaktorze pierwszym wymieszanie reagentów zapewnia mieszadło rotacyjne, umieszczone nad membraną, a w drugim pompa obiegowa. W obu przypadkach substrat jest dozowany od tej strony membrany, od której znajduje się enzym, a przepływ przez membrany jest wymuszany różnicą ciśnień. Teoretycznie, po osiągnięciu stanu ustalonego, reaktory powinny pracować stabilnie.

W obu przypadkach kluczowym problemem jest prawidłowy dobór membrany filtracyjnej. Przede wszystkim musi ona całkowicie zatrzymywać enzym i nie wywoływać jego inaktywacji w kontakcie z materiałem membrany. Dodatkowo membrana nie może zatrzymywać produktu, podczas gdy nie stawia się ostrych wymogów separacyjnych względem substratu. Ważne jest również, aby materiał membrany nie

był dobrym sorbentem dla dowolnego z reagentów i nie reagował z nimi chemicznie. Poza tym membrana musi być trwała biologicznie, chemicznie i mechanicznie w warunkach danego procesu i nie ulegać zatrutowaniu (ang. *fouling* – nieodwracalne zatykanie porów membrany). Z powodu braku reguł, dobór membrany odpowiedniej dla danego procesu odbywa się doświadczalnie.



Rysunek 5. Schemat idcowy enzymatycznego reaktora membranowego z enzymem rozpuszczalnym w wodzie; (a) – reaktor z wbudowaną membraną, (b) – reaktor z zewnętrznym modulem separacyjnym. S – substrat, P – produkt, E – enzym

Kolejny problem, łączący oba rozwiązania aparaturowe, jest związany z filtracją membranową, podczas której część enzymu osiada na membranie, co nosi nazwę *zjawiska polaryzacji stężeniowej* (zwiększające się stężenie białka w kierunku powierzchni membrany; tzw. warstwa dynamiczna). Obecność tej warstwy obniża szybkość filtracji, co można kompensować zwiększeniem nadciśnienia (stabilność strumieni warunkuje stabilność pracy reaktora), wywołując zwiększoną polaryzację stężeniową. Efektywniejsze sterowanie grubością warstwy polaryzacyjnej osiąga się, regulując dynamikę przepływu cieczy nad membraną mieszaniem rotacyjnym lub cyrkulacyjnym z zastrzeżeniem, że nie wystąpi inaktywacja enzymu, wywołana stresem hydrodynamicznym lub/oraz kontaktem z granicą faz ciecz/gaz. Konieczna jest zatem optymalizacja dynamiki przepływów, będąca subtelnym kompromisem pomiędzy stabilnością enzymu a potrzebą regulacji strumienia permeatu i powstawania warstwy polaryzacyjnej. Dodatkowo, wszystkie roztwory nie mogą zawierać elementów nierozpuszczalnych w wodzie, które powodują uszkodzenie delikatnej powierzchni membrany.

Trzecim ograniczeniem w stosowaniu immobilizacji enzymów rozpuszczalnych w reaktorach membranowych jest ich ogólna niestabilność w warunkach procesowych. Stąd wynika duże zainteresowanie stosowaniem enzymów modyfikowanych metodami inżynierii genetycznej i inżynierii białek, które mogą być dodatkowo stabilizowane np.: sieciowaniem, dodatkiem makrocząsteczkowych i rozpuszczalnych stabilizatorów lub wiązane kowalencyjnie z polimerami rozpuszczalnymi w wodzie. Należy jednak pamiętać, że koszt takiego enzymu może uczynić proces nieopłacalnym ekonomicznie.

Wymienione powyżej trzy główne wady immobilizacji enzymów w objętości reaktorów membranowych kompensuje szereg zalet:

- uniwersalność metody immobilizacji. Zasadniczo każdy enzym jest zatrzymywany przez membrany o *cut-off* 10 000 (membrany UF) a procedura testowania membran jest niezależna od układu reakcyjnego;
- brak strat w aktywności enzymu, związanej z procedurą immobilizacji. Nie-wielkie straty aktywności mogą jedynie wynikać z depozycji enzymu w warstwie polaryzacyjnej (ograniczony dostęp enzymu dla substratu);
- wysoka (praktycznie dowolna) aktywność w przeliczeniu na jednostkową objętość reaktora i łatwość dodania świeżej porcji enzymu celem wyrównania strat związanych z jego inaktywacją;
- łatwość sterylizacji układu (reaktor – para wodna, membrana – alkohol etylo-owy, formaldehyd albo kwas nadoctowy) i utrzymania sterylności dozowaniem enzy-mu i substratu przez sączki mikrofiltracyjne;
- pełna kontrola i regulacja warunków reakcji. Przereagowanie kontrolowane kinetycznie, czyli zależne od typu, aktywności i specyficzności enzymu, stosunku stężenia enzymu do stężenia substratu i stabilności;
- modelowanie procesu w oparciu o dane uzyskane w klasycznym reaktorze okresowym.

Poza tym produkt nie zawiera białka i pyrogenów, układ jest homogeniczny, a całość charakteryzuje łatwość obsługi i przenoszenia skali. Natomiast różnice pomi-ędzy reaktorem z wbudowaną membraną ultrafiltracyjną i z zewnętrznym modu-łem separacyjnym zebrano w Tabeli 2. W efekcie różnic uznaje się, że reaktor z inte-gralną membraną ultrafiltracyjną służy głównie do badań o charakterze podstawo-wym (badania kinetyki enzymów, testowanie membran płaskich), natomiast zastoso-wania aplikacyjne wiąże się z reaktorem z modulem zewnętrznym.

Tabela 2. Różnice pomiędzy reaktorem z wbudowaną membraną i z zewnętrznym modulem separacyjnym

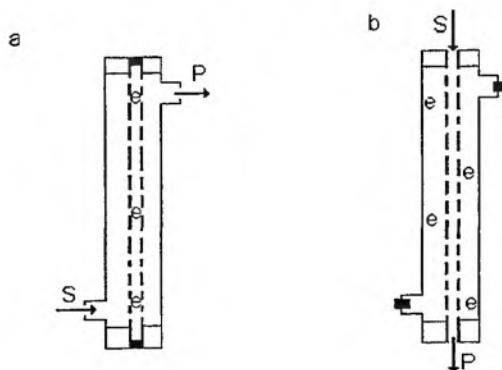
| Reaktor z wbudowaną membraną | Reaktor z zewnętrznym modulem UF |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • duża rola warstwy polaryzacyjnej i zatrucia membran • mieszanie rotacyjne nad membraną • reaktor pod ciśnieniem • wymiana membrany przerywa proces • membrana płaska • ograniczona powierzchnia membrany | <ul style="list-style-type: none"> • mniejszy problem z warstwą polaryzacyjną i zatrucianiem membran • mieszanie recyrkulacyjne, wymuszone pompą • moduł separacyjny pod ciśnieniem • łatwość wymiany jednostki separacyjnej • moduł płaski, spiralny lub rurkowy • dowolna powierzchnia membran |

Praktycznie wszystkie enzymy o zastosowaniu przemysłowym były immobili-zowane w reaktorach z wbudowaną membraną i zostały omówione w pracach prze-głądowych [4, 7, 12–15, 31–34]. Z nowszych doniesień należy wymienić gluukoamy-lazę [52], ω -transaminazę [35], β -glukozydazę [43], β -galaktozydazę [92]. Rozpa-trując reaktory z zewnętrznym modulem UF, podaje się grupy procesów, w których

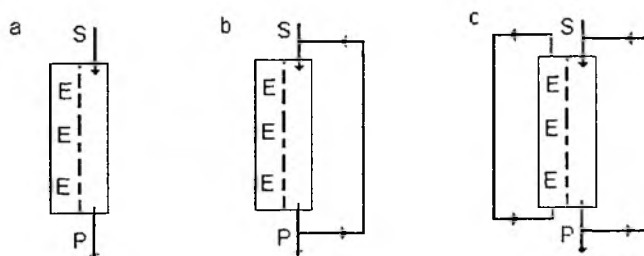
immobilizowane enzymy znalazły lub mogą znaleźć zastosowanie. Są to reakcje hydrolizy polimerów (skrobia, celuloza, pektyny, κ -kazeina, kolagen [15, 31, 50, 51, 93], wieloenzymatyczne [4, 48], z enzymatyczną regeneracją koenzymów [14], utleniania polifenoli [15], syntezy cyklodekstryn i cukrów nukleotydowych [4, 94], hydrolizy laktozy [15] i produkcji aminocukrów [53] lub kwasu 6-aminopenicylanowego [95]. Niezależnie od typu reakcji, zaleca się stosowanie modułów HF, które posiadają wyjątkowo dużą powierzchnię w przeliczeniu na objętość układu (łatwość sterowania strumieniem) [31] oraz przepływów w module o wielkości około 20 razy większej od szybkości dozowania substratu, aby osiągnąć prawidłowe wymieszanie [4]. W przypadku hydrolizy roztworów polimerów o wysokiej lepkości, wskazane jest stosowanie cyklicznego nadciśnienia od strony permeatu (ang. *back-flushing*), zrywającego warstwę polaryzacyjną oraz okresową wymianę modułu, celem regeneracji membrany [50, 51]. W reakcjach z regeneracją koenzymów początkowo wiązano je z polimerem rozpuszczalnym w wodzie, celem zatrzymania w układzie reakcyjnym (np.: masa cząsteczkowa koenzymów z NAD – 700–1000 Da) [14]. Jednak zmodyfikowane koenzymy zwykle są słabo rozpoznawane przez enzymy. Obecnie wykorzystuje się fakt, że NAD(P) w pH powyżej 3,0 jest elektroujemny i jest zatrzymywany w układzie w obecności membrany silnie elektroujemnej.

2.2. IMMOBILIZACJA W WYDZIELONYM OBSZARZE MODUŁU ULTRAFILTRACYJNEGO

Jeżeli enzym jest szczególnie podatny na inaktywację na granicy faz ciecz/gaz lub/oraz na stres hydrodynamiczny, a jednocześnie inne sposoby jego immobilizacji są nieefektywne, wówczas można wykorzystać przedziałowość modułów ultrafiltracyjnych do jego immobilizacji. Roztwór enzymu wprowadzany jest do modułu od strony retentatu lub permeatu i po wypełnieniu wolnej przestrzeni dopływ i odpływ są szczelnie zamykane (Rys. 6). Substrat jest dozowany od strony nie zawierającej enzymu i może się kontaktować z membraną (enzymem) jeden raz (Rys. 7a) lub wielokrotnie (Rys. 7b). Jeżeli biokatalizator nie ulega szybkiej inaktywacji wywołanej mieszaniem, również roztwór enzymu można poddać łagodnej recyrkulacji (Rys. 7c). Reaktory 7b i 7c mogą także funkcjonować jako reaktory okresowe. Tego typu reaktory działają jak dializatory; siłą napędową transportu masy jest różnica stężeń. Zwykle szybkość reakcji jest limitowana dyfuzją, co oznacza, że zarówno substrat jak i produkt muszą być niskocząsteczkowe. Szybkość dyfuzji można zwiększyć, wprowadzając recyrkulację substratu i/lub enzymu albo wywołać strumień konwekcyjny poprzez pulsację naprzemiennego ciśnienia od strony permeatu i retentatu (ang. *swing*) albo różnicę temperatur czy pola elektrycznego [32].



Rysunek 6. Przykład immobilizacji enzymu w wydzielonym obszarze rurkowego modułu ultrafiltracyjnego; (a) – enzym zamknięty w świetle rurki, (b) – enzym zamknięty w obudowie modułu rurkowego, S – substrat, P – produkt, e – enzym



Rysunek 7. Reaktor membranowy z enzymem immobilizowanym w wydzielonym obszarze modułu z jednokrotnym kontaktem substratu z enzymem (a) i wielokrotnym (b i c) oraz z recyrkulacją enzymu (c)

Zasady doboru membrany UF są identyczne, jak w przypadku immobilizacji w objętości reaktora. Łączy te metody brak strat aktywności, wynikający z procedury postępowania, uniwersalność, możliwość uzupełniania ubytków aktywności, homogeniczność, możliwość wielokrotnego użycia modułu, sterylność, czystość reagentów, łatwość obsługi i przenoszenia skali. Istotną różnicą jest brak zatrutowania membran i polaryzacji stężeniowej. Inną różnicą to praktyczna nieobecność substratu po stronie enzymu, a zatem brak często spotykanej stabilizacji aktywności enzymu w obecności substratu. Dodatkowo kontrola i sterowanie procesem, ze względu na transport dyfuzyjny, mogą być kłopotliwe a globalna wydajność zależy głównie od powierzchni membrany. Stąd w zastosowaniach dominują moduły dializacyjne HF, rozwijające dużą powierzchnię w jednostce objętości [14].

Przedstawioną metodę immobilizacji wykorzystano w reakcjach z oksydoreduktazami z regeneracją koenzymów [31], w syntezie glukuronidów [32], w procesach wykorzystujących β -galaktozydazę [67], heparynazę [96], ureazę i proteazy [32]. Enzym występował w formie wolnej, był immobilizowany na nośnikach nieroz-

puszczalnych w wodzie lub w odwróconych micelach [31, 32]. Z nowszych zastosowań, warto zwrócić uwagę na procesy ekstrakcji membranowej, zastępujące procesy prowadzone z wykorzystaniem membran ciekłych [32, 34, 41]. W ekstrakcji membranowej przegroda półprzepuszczalna rozdziela fazę wodną od organicznej a celem przyspieszenia szybkości dyfuzji, po stronie rozpuszczalnika organicznego umieszcza się enzym przekształcający ekstrahowany związek. Zastosowania, ze względu na stabilność i rozpuszczalność enzymów w rozpuszczalnikach organicznych, są zasadniczo ograniczone do lipaz i fosfolipaz, a sam proces nosi nazwę ekstrakcji membranowej z reakcją enzymatyczną. Specyfika układu wymaga stosowania odpowiednich membran. Szczególnie korzystne są membrany kompozytowe o zdecydowanie hydrofilowych i hydrofobowych stronach, co zwiększa zwilżalność powierzchni przez, odpowiednio, fazę wodną i organiczną.

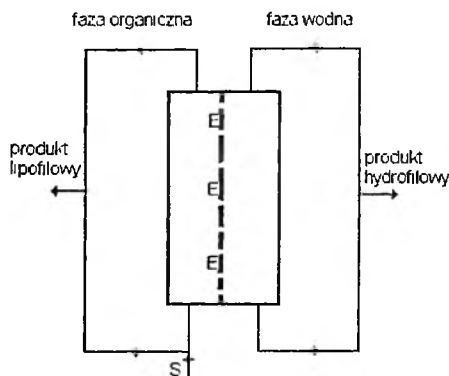
3. IMMOBILIZACJA ENZYMÓW NA/W MEMBRANIE – MEMBRANY KATALITYCZNE

W drugiej grupie technik immobilizacji enzymów w reaktorach membranowych, przegroda półprzepuszczalna stanowi nośnik dla enzymu, tworząc membranę katalityczną. Zgodnie z opracowaniem Giorno i Drioli [15], membrany takie otrzymuje się zamykając enzym w materiale membrany, tworząc warstwę żelową na jej powierzchni lub wiążąc enzym z powierzchnią. W ostatniej technice autorzy wyróżniają adsorpcję fizyczną, wiązanie jonowe, wiązanie kowalencyjne i sieciowanie. W tej pracy, z powodu podobieństw i łączenia w praktyce technik immobilizacji, adsorpcję fizyczną i jonową omówiono razem (Rys. 8). Za autorami cytowanego opracowania przyjęto, że enzym wprowadzony w porowatą strukturę membrany w procesie ultrafiltracji można potraktować jako odmianę immobilizacji w materiale membrany. Natomiast pominięto technikę sieciowania, gdyż jest ona głównie uzupełnieniem innych procedur, a w jej miejsce umieszczono jedną z najnowszych metod – wiązanie biospecyficzne.



Rysunek 8. Metody tworzenia membran katalitycznych

W ostatnich latach membrany katalityczne, niezależnie od sposobu immobilizacji, znalazły szczególnie atrakcyjne zastosowania, które dotyczą reakcji z substratami trudno rozpuszczalnymi w wodzie i z tego powodu prowadzonych w układach dwufazowych woda/rozpuszczalnik organiczny lub w środowisku bezwodnym [7, 14, 15, 32, 34]. Reaktory dwufazowe z membraną katalityczną mają za zadanie: utrzymać granicę faz woda/rozpuszczalnik organiczny, utrzymać enzym w pobliżu granicy faz (szczególnie lipazy i fosfolipazy aktywowane przez granicę faz), poprzez immobilizację zwiększyć stabilność enzymu i/lub stanowić ekstraktor dla produktu (reakcja z ekstrakcją). Najpopularniejszą konfiguracją procesową przedstawiono na Rysunku 9. W takim reaktorze dwie fazy są oddzielone hydrofilową (np.: poliamid, pochodne celulozy, poliakrylonitryl), hydrofobową (np.: polipropylen, polietylen, polisulfon, politetrafluoroetan, polifluorek winylidenu) lub kompozytową membraną, która jest najczęściej utworzona z hydrofobowego materiału i hydrofilowej powierzchni do kontaktu z fazą wodną. Powierzchnia granicy faz odpowiada powierzchni porów, stąd popularność membran asymetrycznych typu HF. Enzymy zazwyczaj znajdują się po kontaktującej się z wodą stronie membrany, natomiast technika immobilizacji zależy od specyfiki reakcji. Substrat jest dozowany od strony fazy organicznej a produkt przebywa w fazie organicznej lub wodnej, stosownie do swoich właściwości hydrofilowo/hydrofobowych. Dyfuzyjny transport masy przez membranę oraz ograniczona wytrzymałość membran w rozpuszczalnikach organicznych to główne problemy do rozwiązania. Obecnie wszyscy producenci membran podają informacje dotyczące dopuszczalności stosowania danego materiału w różnych rozpuszczalnikach.



Rysunek 9. Schemat reaktora z membraną katalityczną dla układów dwufazowych
E – enzym, S – substrat

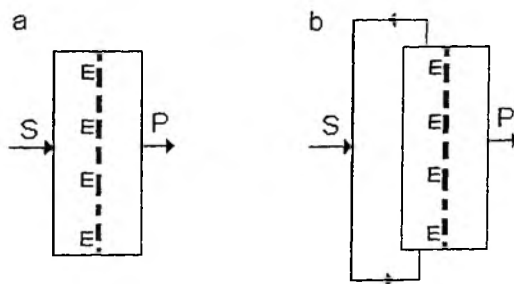
Znaczące problemy z doбором membrany, jej modyfikacją, utrzymaniem granicy faz oraz doбором efektywnej metody immobilizacji kompensuje atrakcyjność reakcji. Przede wszystkim są to liczne biotransformacje stereospecyficzne z jednoczesną ekstrakcją produktu do fazy organicznej lub reakcje syntezy z substratem słabo rozpuszczalnym w wodzie [7, 13, 15, 32, 34–40, 73]. Z enzymów najczęściej

wykorzystuje się lipazę [7, 14, 32, 36, 40, 73] a także ω -transaminazę [35], esterazę [40], fosfatazę alkaliczną [7], α -chymotrypsynę i papainę [14].

Badania nad katalizą w środowiskach niewodnych rozwinęli Klibanov i Zaks [97–100], którzy wykazali, że w rozpuszczalnikach organicznych, zawierających około 0,01% wody:

- hydrolazy prowadzą reakcje estryfikacji, transestryfikacji lub aminolizy;
- zmienia się specyficzność substratowa (np.: synteza dipeptydów przez esterazę i lipazę lub transestryfikacja przez subtylizynę czy papainę);
- redukuje się inhibicja substratem i produktem, zmienia się wrażliwość na inne inhibitory;
- ze wzrostem hydrofobowości rozpuszczalnika obniża się stereoselektywność enzymów, co, między innymi, umożliwia syntezę dipeptydów z udziałem D-aminokwasów;
- znacząco wzrasta termostabilność enzymów.

Inne zalety, to: sterylność układu, wysoka rozpuszczalność niepolarnych substratów i łatwa separacja. Natomiast największe problemy stwarza dobór odpowiedniego materiału membrany, obudowy modułu i wszystkich przyłączy. Z membran syntetycznych, z wyłączeniem dipolarnych rozpuszczalników aprotycznych, zastosowanie znalazły membrany z poliamidu aromatycznego (aramid) [7]. Zasadniczo zaleca się stosowanie modułów z membranami ceramicznymi, zwłaszcza z dynamicznym filmem hydrofilowym [14]. Kolejnym problemem, w reakcjach z uwalnianiem wody, jest utrzymanie jej stałego stężenia.



Rysunek 10. Przykłady rozwiązań aparaturowych dla reaktorów z membraną katalityczną i konwekcyjnym transportem masy oraz jednokrotnym (a) i wielokrotnym kontaktem substratu z enzymem (b)

Wśród możliwych konfiguracji aparaturowych wymienia się [7]:

- immobilizację w objętości reaktora z membraną MF, co jest dyskusyjne, gdyż enzym, bez odpowiedniej modyfikacji, jedynie roztwarza się w rozpuszczalnikach organicznych;
- immobilizację na membranie, bez wykorzystania jej możliwości separacyjnych. Membrana jest jedynie nierozpuszczalnym nośnikiem i zasadniczo to rozwiązanie aparaturowe nie powinno się zaliczać do reaktorów membranowych;

– immobilizację na membranie z konwekcyjnym (Rys. 10) lub dyfuzyjnym (Rys. 9) transportem masy. Schemat 10 ogólnie dotyczy procesów jednofazowych z enzymem immobilizowanym na/w membranie.

Przykłady zastosowań to produkcja D-aminokwasów przez hydantoinazę [7], utlenianie fenoli przez tyrozynazę [97–99], modyfikacje węglowodorów aromatycznych przez lakkazę [42], estryfikacje cukrów przez lipazy [97–100], reakcje estryfikacji, transestryfikacji i syntezy dipeptydów przez α -chymotrypsynę, subtylizynę Carlsberg, papainę i oksydoreduktazy [7, 14, 37, 73, 97–100].

3.1. IMMOBILIZACJA W WARSTWIE ŻELOWEJ

W uproszczeniu metoda ta wykorzystuje zjawisko tworzenia warstwy polaryzacyjnej w procesie filtracji. W miarę zatężania roztworu białka, w obecności membrany UF całkowicie zatrzymującej enzym, jego stężenie w warstwie przymembranowej rośnie aż do przekroczenia stężenia granicznego, w którym dochodzi do formowania żelu. Enzym w warstwie żelowej jest bardzo gęsto upakowany, co powoduje spadek aktywności stosownie do występujących ograniczeń transportu i przeszkód sterycznych. Z kolei stabilność enzymów wzrasta ze wzrostem stężenia, stąd tego typu membrany katalityczne długo zachowują aktywność na poziomie wyjściowym [14]. Sama procedura immobilizacji jest uniwersalna; enzym zagęszcza się ultrafiltracyjnie do momentu osiągnięcia punktu żelowania. O ile aktywność enzymu w warstwie żelowej jest stabilna, to żel jest bardzo podatny na uszkodzenia hydrodynamiczne. Stąd szereg technik stabilizacji żelu: dodanie do roztworu białka związków współżelujących; związanie enzymu ze związkiem wielkocząsteczkowym lub kopolimeryzacja; aktywacja membrany jak do wiązania kowalencyjnego; sieciowanie żelowanej warstwy; nałożenie na warstwę żelowanego białka kolejnej membrany (ang. *sandwich*) [14, 57, 101]. Zazwyczaj żel jest tworzony od strony skórki membrany ale można wykorzystać również jej stronę gąbczastą. Żel jest wówczas dodatkowo immobilizowany w porach membrany i mniej podatny na stres hydrodynamiczny [101]. Poza metodą trwałego związania żelu z powierzchnią membrany, żelowane białko można stosunkowo łatwo odmyć, stosując standardowe procedury regeneracji modułu.

Omówioną powyżej metodę zastosowano między innymi do immobilizacji inwertazy, fosfatazy kwaśnej, urcazy, β -glukozydazy, lipazy, DNA-zy [14], oraz mieszaniny enzymów do usuwania fenolu i katechołu [69, 70].

3.2. ZAMYKANIE W MATERIALE MEMBRANY

Wyróżnia się tutaj dwie podstawowe techniki. Pierwsza polega na dodaniu enzymu w trakcie formowania membran, przy czym białko może znajdować się w roztworze wodnym (największa inaktywacja), w emulsji lub w formie liofilizatu (naj-

mniejsza inaktywacja). Dodanie białka w formie emulsji prowadzi do formowania tworów przypominających enkapsulację, natomiast dodanie liofilizatu białka pozwala otrzymać preparaty trwałe, ale część enzymu nie ulega uwodnieniu a tym samym jest nieaktywna. Metodę zamykania enzymu w sicci polimerowej uznaje się jako technikę tanią i dającą trwałe preparaty. Nie jest istotne, czy membrana jest ultrafiltracyjna, mikrofiltracyjna, czy dializacyjna. Pozostałe cechy są wadami: duże opory dyfuzyjne reakcji, brak możliwości odzysku membrany, ograniczenie zastosowań do niskocząsteczkowych substratów i produktów, znacząca inaktywacja enzymu w warunkach formowania membran (rozpuszczalniki organiczne i wysoka temperatura). Mimo to szereg enzymów efektywnie immobilizowano tą metodą (np.: lipaza, β -galaktozydaza, aldolaza, β -glukozydaza [33], czy penicylinaza [38]).

Druga technika jest bardziej zachowawcza dla enzymów. W ogólnym zarysie roztwór enzymu jest wfiltrowywany pod ciśnieniem w gąbczastą strukturę membrany ale bez wytworzenia warstwy żelowej. Jeżeli substrat ma być dozowany od strony przeciwnej, niż znajduje się enzym (konwekcyjny transport masy, wymuszony różnicą ciśnień), wówczas zaleca się dodatkowe ususzenie enzymu, celem zmniejszenia szybkości jego wymywania. Reakcja jest heterogeniczna z umiarkowanymi oporami dyfuzyjnymi przy konwekcyjnym transporcie masy i większymi oporami w procesie beczłnieniowym. Wymogi odnośnie własności separacyjnych membran są analogiczne do opisanych przy immobilizacji enzymów w objętości reaktora, a samą metodę immobilizacji traktuje się jako w pełni odwracalną. Dodatkowe zalety to: uniwersalność procedury, niewielkie straty aktywności, metoda tania, prosta i wydajna oraz łatwość przenoszenia skali. Obok doboru membrany, najwięcej problemów stwarza wymywanie enzymu lub/oraz zatrucie membran, co nie zmienia faktu, że jest to jedna z najpopularniejszych metod immobilizacji enzymów w reaktorach membranowych. Szczególnie często immobilizowano lipazy [7, 14, 31, 34, 40, 41, 75] a także: glukozylotransferazę cykloizomaltooligosacharydową [87], inwertazę [44, 45], glukoamylazę [44, 63], fumarazę [60], α -oksydazę L-lizyny [30] czy β -galaktozydazę [67]. Celem zwiększenia stabilności enzymu, w strukturę gąbczastą membrany wfiltrowywano również enzymy związane z krzemionką [58].

3.3. ADSORPCYJNE LUB JONOWE WIĄZANIE Z POWIERZCHNIĄ MEMBRANY

Adsorpcja fizyczna i/lub jonowe wiązanie enzymu z powierzchnią membrany jest realizowane poprzez cyrkulację roztworu białka nad membraną od strony skórki lub/oraz gąbczastej podpory membrany przez 1–6 h, po czym moduł membrany jest drenowany. Wartość *cut-off* membrany nie ma znaczenia, a sama metoda jest bardzo prosta, tania i uniwersalna. Wydajność immobilizacji nie jest wysoka, gdyż większość enzymu jest usuwana z modułu, ale znaczna część enzymu związanego nie traci aktywności i często obserwuje się jego zwiększoną stabilność [4, 14, 33, 34, 42, 56]. Obie techniki łączy również łatwość regeneracji modułu, częstsze wiązanie enzymu z gąbczastą strukturą membrany (większa powierzchnia wiązania) w modu-

le HF i nagminne sieciowanie związanego białka, celem zwiększenia jego stabilności. Uważa się, że adsorpcja fizyczna enzymu jest rozwiązaniem lepszym, gdy białko kontaktuje się z fazą organiczną, gdyż wówczas nie obserwuje się desorpcji enzymu [34]. Podstawowe różnice dotyczące obu technik immobilizacji zebrano w Tabeli 3. Od strony klasyfikacyjnej wiele problemów sprawia używanie do obu technik immobilizacji hydrofilizowanych membran hydrofobowych, hydrofobizowanych hydrofilowych i membran kompozytowych, hydrofilowo-hydrofobowych [34].

Tabela 3. Podstawowe różnice pomiędzy techniką adsorpcji fizycznej a wiązaniem jonowym enzymu na powierzchni membrany

| Adsorpcja fizyczna | Wiązanie jonowe |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • wiązanie z powierzchnią membrany z przewagą oddziaływań hydrofobowych • brak desorpcji w rozpuszczalnikach organicznych, w roztworach wodnych desorpcja w niskiej sile jonowej oraz przy dużych przepływach • głównie membrany hydrofobowe (jak poliamid, polipropylen, polietylen, politetrafluoroetylen) | <ul style="list-style-type: none"> • wiązanie z powierzchnią membrany z przewagą oddziaływań jonowych • desorpcja w roztworach wodnych o wyższej sile jonowej, przy zmianie wartości pH oraz przy dużych przepływach • dowolna membrana, posiadająca grupy zdolne do dysocjacji elektrolitycznej |

Obu metodami wiązano liczne enzymy, m.in. celulazy, pektynazy, proteazy [4, 14, 15, 32, 33, 49, 54, 101], lipazy [4, 33, 36, 56, 102], lakkazy [42, 71, 103–106], amylazy [45, 47], inwertazę [45], ureazę [29], katalazę [78], oksydazę kwasu askorbinowego [86]. Techniki te zostały również wykorzystane do tworzenia tzw. membran przeciwwztruciowych, redukujących tworzenie warstwy żelowej i trwałego blokowania porów w membranie w trakcie filtracji białek (proteazy), olejów i emulsji (lipazy) czy soków i win (celulazy, pektynazy) [33, 91].

Ciekawym rozwiązaniem, od strony procesowej, jest zastosowanie nicizotermicznego reaktora membranowego, ze związaną adsorpcyjnie acylazą penicylanową [81] lub β -galaktozydazą [84, 107]. W reaktorze tym membrana rozdziela roztwór substratu o różnych temperaturach, co pozwala osiągnąć 20–40% wzrost aktywności enzymu przy różnicy temperatur o 1°C po obu stronach membrany. Obserwowany wzrost aktywności jest tłumaczony zmniejszonymi oporami dyfuzyjnymi, wywołanymi obecnością dwóch różnych strumieni przepływów przez membranę: przepływ rozpuszczalnika od strony o temperaturze wyższej do temperatury niższej i przeciwnie skierowany przepływ związków rozpuszczonych (termodializa).

3.4. KOWALENCYJNE WIĄZANIE Z POWIERZCHNIĄ MEMBRANY

Aby wytworzyć wiązanie kowalencyjne pomiędzy powierzchnią membrany a enzymem, membrana musi posiadać grupy funkcyjne zdolne do związania białka (np. grupy oksiranowe) lub podatne na aktywację (np. grupy –OH, –COOH, –NH₂) [4, 14, 32–34]. Zasadniczo każdy typ membran może być w tym celu wykorzystany,

z włączeniem membran kompozytowych [29, 34, 82] i dynamicznych [73, 75]; problem stanowi jedynie liczba operacji poprzedzających wiązanie enzymu. Ciekawą grupą membran są membrany kompozytowe, złożone z hydrofobowej membrany MF z naszczepioną warstwą termowrażliwego hydrożelu [29, 46, 47, 79–84, 107]. Żel ten pęcznieje poniżej i kurczy się powyżej określonej temperatury krytycznej (LCST – ang. *Lower Critical Solution Temperature*), co daje układ zbliżony do „pompy” hydraulicznej, która zasysa roztwór (substrat) podczas chłodzenia i wypycha roztwór (produkt) podczas ogrzewania. Kowalencyjne wiązanie enzymu z termowrażliwym hydrożelem pozwala zminimalizować opory dyfuzyjne w transporcie masy i kontrolować szybkość dyfuzji zmianami temperatury. Minimalizację oporów dyfuzyjnych osiągnięto również stosując reaktor nieizotermiczny (omówiony przy immobilizacji adsorpcyjnej) z immobilizowaną kowalencyjnie acylazą penicylanową [66, 82] i β -galaktozydazą [79, 80, 83].

Podczas wiązania kowalencyjnego enzymu z membraną nieistotny jest rozmiar porów, natomiast czynnikiem istotnym jest liczba potencjalnych miejsc (grup) do wiązania białka oraz materiał membrany. Należy podkreślić brak reguł w doborze materiału membrany; zwraca się jednak uwagę na fakt, że materiał hydrofobowy z reguły charakteryzuje się znaczącą sorpcją niespecyficzną, ale może, poprzez lokalne wykluczenie wody z powierzchni białka, dodatkowo stabilizować jego aktywność. Uważa się, że dobra membrana powinna posiadać umiarkowany charakter hydrofilowo-hydrofobowy, z umiarkowaną liczbą grup zdolnych wiązać białko. Korzystne bywa również zdystansowanie enzymu od powierzchni polimeru, co często jest realizowane poprzez łączenie enzymu z naszczepionymi na powierzchnię membrany krótkimi łańcuchami polimerowymi [86–88]. Ze względu na charakterystyczną budowę takich membran, noszą one nazwę szczotkowych lub grzebieniowych.

Wydajność immobilizacji poprzez wiązanie kowalencyjne waha się od wartości bliskich zeru po 90% i, podobnie jak przy immobilizacji na nośnikach ziamistych, jest to metoda mało uniwersalna (duża liczba procedur wiązania), droga, czasochłonna, z niewielką możliwością ponownego użycia membrany. Od strony kinetycznej reakcja jest heterogeniczna, z koniecznością uwzględnienia ograniczeń dyfuzyjnych. Poza tym wykluczona jest sterylizacja membrany przed procesem jak również uzupełnianie ubytków aktywnościowych w trakcie procesu. Podobnie do pozostałych układów z membranami katalitycznymi, wysokie aktywności w objętości reaktora można osiągnąć stosując jedynie moduły z membranami HF. W efekcie jedynie znaczący wzrost stabilności enzymu uzasadnia stosowanie tak drogiej i skomplikowanej metody immobilizacji.

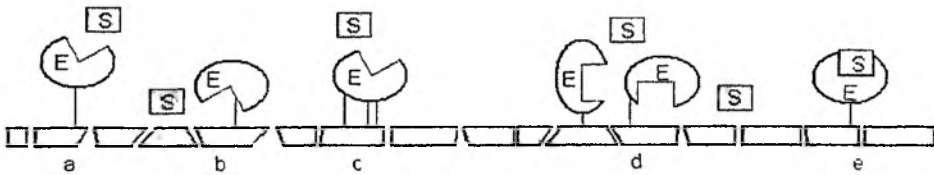
Utratę aktywności enzymu, związaną z procedurą immobilizacji, może wywołać kilka czynników (Rys. 11):

- a) inaktywacja enzymu wywołana zbyt wysoką lub niską wartością pH, temperaturą, stosowanym rozpuszczalnikiem i reagentami;
- b) wiązanie enzymu z membraną poprzez aminokwas wchodzący w skład centrum aktywnego, wiążącego substrat lub stabilizującego określoną konformację białka;

c) wielopunktowe związanie enzymu z matrycą, zwiększające prawdopodobieństwo utraty funkcji katalitycznej;

d) centrum aktywne jest przestrzennie niedostępne.

O ile czynniki przedstawione w pozycjach a–c można minimalizować, dobierając odpowiednie techniki i optymalizując proces wiązania (ograniczeniem finansowym może być jednorazowość użycia membran), to przypadkowość orientacji przestrzennej enzymu względem membrany w trakcie tworzenia wiązania jest trudna do ominięcia. Jeżeli znana jest budowa przestrzenna enzymu, to można zastąpić wybrany aminokwas, zlokalizowany po przeciwnej do centrum aktywnego stronie białka, innym aminokwasem (korzystnie cysteiną), który może być wykorzystany do wiązania z powierzchnią membrany (korzystnie z ugrupowaniami tiolowymi) [37, 108–112].



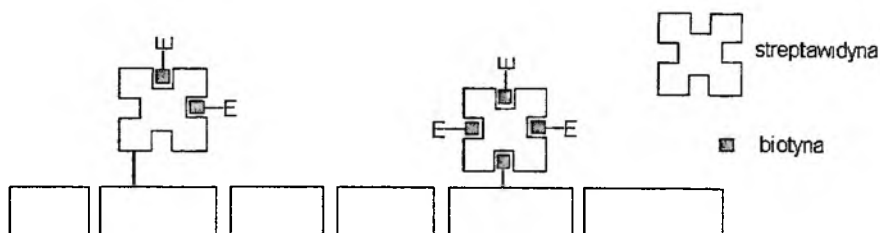
Rysunek 11. Przykłady przyczyn powodujących niską aktywność enzymów (E) immobilizowanych kowalencyjnie: zmiany konformacji białka (a, c), brak zmian konformacji z centrum przestrzennie niedostępnym dla substratu (S) (d); prawidłowa konformacja i orientacja przestrzenna centrum aktywnego (e)

Przykładami enzymów wiązanych kowalencyjnie z powierzchnią membrany są: α -amylaza [46, 53, 54], glukoamylaza [45], α -chymotrypsyna [8], β -galaktozydaza [65, 79, 80, 83, 84, 107], β -glukozydaza [59], lipaza [14, 40, 73], esteraza [40], acylaza penicylanowa [66, 81, 82], penicylinaza [63], oksydaza glukozowa [25–27], peroksydaza [25], katalaza [64], fosfataza alkaliczna [108, 112], proteaza alkaliczna [113], subtilyzyna [37, 108, 109], trypsyna [22], papaina [108], lakkaza [68], inwertaza [45], dehydrogenaza mleczanowa [61, 63], lizozym [104], fruktozotransferaza [89], oksydaza cholesterolowa [115] czy ureaza [116].

3.5. WIĄZANIE BIOSPECYFICZNE

Wiązanie to ani nie ma charakteru wiązania adsorpcyjnego, ani kowalencyjnego. Jest wiązaniem relatywnie mocnym, ale z możliwością odzysku membrany celem ponownej immobilizacji enzymu. Generalnie jest to metoda wykorzystująca bardzo silne powinowactwo pomiędzy antygenem a jego przeciwciałem albo określonymi związkami jak, na przykład, glikoproteina:lektyna [117] czy (strept)awidyna:biotyna [28, 108, 118–120]. W przykładzie przedstawionym na Rysunku 12 (strept)awidynę wiąże się z membraną kowalencyjnie lub za pośrednictwem biotyny. Kolejnym krokiem jest dodanie enzymu, który musi posiadać wbudowaną biotynę, korzystnie po

stronie przeciwnej niż centrum aktywne. Metoda, sama w sobie bardzo atrakcyjna, bo łącząca ze specyficznością wiązania określone zorientowanie centrum aktywnego względem membrany, jest wysoce kosztowna, co jest spowodowane koniecznością stosowania zmodyfikowanych białek enzymatycznych. Takie enzymy można otrzymać poprzez fuzję genów (wprowadzenie elementu afinitywnego jak antygen lub awidyna), modyfikacją chemiczną (wprowadzenie np.: biotyny) i/lub wprowadzenie odpowiedniego aminokwasu (korzystnie cysteiny), zlokalizowanego po przeciwnej stronie, niż centrum aktywne, celem umożliwienia związania białka z elementem afinitywnym [108, 119, 120].



Rysunek 12. Wiązanie enzymu z powierzchnią membrany za pośrednictwem (strept)awidyny

Wiązaniem biospecyficznym typu –biotyna–awidyna–biotyna– wiązano z membranami oksydazę glukozową i peroksydazę [28], papainę [118] czy subtylizynę [108]. Jako metoda wyjątkowo droga nic posiada walorów technologicznych, natomiast może znaleźć zastosowanie w wysublimowanych metodach separacji (ultrafiltracja powinowactwa) czy w produkcji biosensorów [108].

4. CHARAKTERYSTYKA ENZYMÓW IMMOBILIZOWANYCH W REAKTORACH MEMBRANOWYCH. MODELOWANIE MATEMATYCZNE PROCESÓW

Podstawowe właściwości związanego enzymu określa wartość optimum pH i temperatury, pH- i termostabilność, stabilność operacyjna oraz podstawowe parametry równania kinetycznego Michaelisa-Menten (stała szybkości reakcji k_3 , stała Michaelisa K_m i stałe inhibicji substratem/produktem reakcji). W przypadku enzymów immobilizowanych w reaktorach membranowych badania takie są rzadko prezentowane, z wyłączeniem reaktorów z enzymem rozpuszczalnym, gdyż ten typ immobilizacji nie zmienia właściwości enzymu [51, 93, 121]. Informacje dotyczące charakterystyki enzymu po immobilizacji najłatwiej można uzyskać korzystając z membran płaskich, które, pocięte na drobne kawałki, są badane w warunkach mieszalnikowego reaktora okresowego [56, 65, 79, 84, 87, 90, 113, 122–124]. Ze względów finansowych taka procedura jest niemożliwa, gdy moduł tworzą membrany rurkowe lub kapilarnie. W tych przypadkach najczęściej wyznaczane są parametry równania kine-

tycznego które, w zależności od przyjętej procedury badań i obliczeń, nie uwzględniają oporów dyfuzyjnych reakcji [43, 45, 60, 69, 79, 80, 84, 90] lub, po wprowadzeniu członów dyfuzyjnych, pozwalają otrzymać rzeczywiste wartości stałych [125, 126].

Modelowanie procesów z enzymem immobilizowanym w objętości reaktora membranowego wymaga wyznaczenia parametrów równania kinetycznego w reaktorze zbiornikowym i uwzględnienia przepływów [51, 93, 121]. W pozostałych typach reaktorów dominuje dyfuzyjny transport masy, nawet jeżeli przepływ przez membrany jest wymuszony różnicą ciśnień (szybkość dyfuzyjnego transportu masy rośnie o komponent transportu konwekcyjnego). W takich przypadkach modelowanie wymaga, obok wyznaczenia parametrów kinetycznych, uwzględnienia co najmniej dyfuzji reagentów i modułu Thielego [35, 36, 39, 67, 101, 127–130]. Dobrym przykładem wielości czynników, wpływających na przebieg reakcji enzymatycznej w reaktorze z przepływem wymuszonym różnicą ciśnień i enzymem immobilizowanym w materiale membrany, jest praca Calabro i wsp. [130]. Autorzy uwzględnili parametry kinetyczne enzymu, współczynniki dyfuzji reagentów, szybkość przepływu objętościowego i cyrkulacyjnego, wymiary reaktora, średnią średnicę porów skórki i warstwy gąbczastej, powierzchnię właściwą i dystrybucję enzymu w różnych regionach membrany. W efekcie otrzymali 15 równań opisujących profile przepływów w rurkach i porach oraz 6 równań bilansu masy, uwzględniających stężenia enzymu, substratu i produktu w skórcie, części gąbczastej i w świetle kapilary. Rozwiązanie tych równań pozwoliło stwierdzić, że produktywność reaktora zależy od liczby Pecleta, modułu Thielego i dystrybucji enzymu w membranie. Z punktu widzenia procedur immobilizacji wykazano, że najlepsze wyniki osiąga się, immobilizując enzym w porach gąbczastej membrany.

Zagadnienia związane z modelowaniem procesów wykorzystujących enzymy immobilizowane w systemach membranowych dotyczą również membranowej separacji powinowactwa [22] oraz optymalizacji parametrów fizycznych i biochemicznych w biosensorach enzymatycznych [131].

5. ZASTOSOWANIA ENZYMÓW IMMOBILIZOWANYCH Z WYKORZYSTANIEM SYSTEMÓW MEMBRANOWYCH

O możliwościach zastosowań enzymów immobilizowanych z pomocą membran najlepiej świadczy liczba dotychczas cytowanych prac. Większość z nich dotyczy procesów, które już znalazły zastosowanie w przemyśle z tym, że enzym był immobilizowany innymi metodami (np.: wiązanie kowalencyjne z powierzchnią nośnika, zamknięcie w sieci żel, sieciowane kryształy). Dotyczy to zarówno procesów prowadzonych w środowisku wodnym, wodno-organicznym jak i bezwodnym, a konkretne przykłady zostały podane przy omawianiu poszczególnych metod immobilizacji. Natomiast do klasycznych procesów w skali przemysłowej należy zaliczyć hydrolizę laktozy z jednoczesną sterylizacją mleka, hydrolizę pektyn w sokach owocowych oraz hydrolizę β -laktoglobuliny oraz, z nowszych, produkcję aspartamu,

ibuprofenu, L-fenylalaniny, naproksenu, diltiazemu i pochodnych D-fenyloglicyny [14]. Nowsze technologie to głównie produkcja związków optycznie czynnych i/lub z udziałem koenzymów. Warto podkreślić, że reakcje z regeneracją koenzymów w reaktorach membranowych praktycznie wyparły inne rozwiązania z immobilizowanymi enzymami i kofaktorami. Innymi przykładami zastosowań enzymów immobilizowanych z wykorzystaniem membran są bardzo dynamicznie rozwijająca się membranowa separacja powinowactwa oraz produkcja biosensorów.

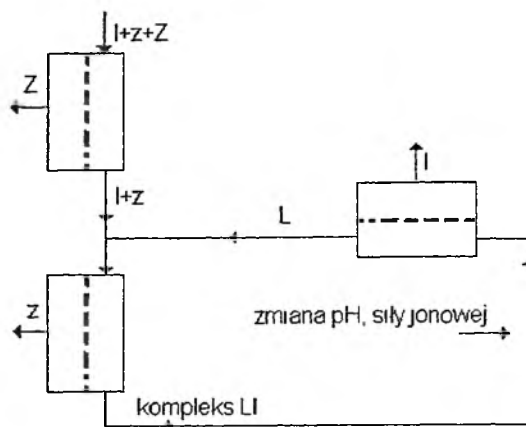
Chromatografia powinowactwa (chromatografia afinitywna) opiera się na specyficznym i odwracalnym wiązaniu ligatu (związek oczyszczany) z ligandem (cząsteczka o dużym powinowactwie do ligatu). Przykładami par związków oddziałujących specyficznie są: substrat (produkt, inhibitor, koenzym)/enzym; hormon/receptor; antygen/przeciwciało; glikoproteina/lektyna. W przypadku stosowania enzymów jako ligandów, zwykle oczyszcza się ich inhibitory lub koenzymy [20, 22].

Membranowa separacja powinowactwa jest procesem zastępującym oczyszczanie biocząsteczek w kolumnach chromatograficznych ze złożem afinitywnym i zazwyczaj jest realizowana na dwa sposoby. W pierwszym enzym jest immobilizowany – najczęściej kowalencyjnie – w porach membrany a ligat wraz z zanieczyszczeniami transportowany konwekcyjnie (różnica ciśnień) przez pory [85]. Następnie rozdziela się połączony ligat i ligand przez zmianę warunków (pH, siła jonowa, podstawienie kompetycyjne). Proces jest okresowy i bardzo zbliżony do chromatografii kolumnowej. Zaletą układu membranowego jest krótsza droga dyfuzji niż w złożach ziarnistych i możliwość odseparowania na membranie związków o masach cząsteczkowych kilka razy większych niż ligat.

W drugim przypadku ligand, związany kowalencyjnie z makrocząsteczką, występuje w formie rozpuszczalnej w wodzie, a proces może być okresowy lub ciągły. W układzie okresowym ligat jest dozowany do reaktora z makroligandem, po czym, w warunkach diafiltracji, zanieczyszczenia przechodzą do permeatu [18, 22]. Po rozłączeniu kompleksu ponowna diafiltracja pozwala rozdzielić ligat i ligand, przy czym jest korzystniejszej, gdy makroligand pozostaje w retentacie.

Ultrafiltracja powinowactwa jako proces ciągły wymaga zastosowania 3 modułów membranowych (Rys. 13), z których pierwszy pełni rolę prefiltra, oddzielającego związki znacznie większe od ligatu [17, 18]. Drugi moduł służy do odseparowania związków mniejszych niż ligat i ligand a trzeci, po uprzedniej zmianie warunków, do rozdzielenia ligandu i ligatu.

Najczęściej stosowane membrany to mikrofiltry z octanu celulozy, nylonu, polichlorku winylu i polisulfonu, gdyż uważa się, że charakteryzują się względnie niską sorpcją niespecyficzną [18]. Celem zwiększenia wydajności procesu, szczególnie w przypadku wiązania enzymu z membraną, zaleca się stosowanie białek tak modyfikowanych, aby centrum aktywne było skierowane w stronę przeciwną niż membrana [37, 108–112].



Rysunek 13. Schemat ciągłego procesu ultrafiltracji powinowactwa.
 Oznaczenia: l – ligand; L – ligand; z – zanieczyszczenia niskocząsteczkowe;
 Z – zanieczyszczenia wysokocząsteczkowe

Biosensory (prace przeglądowe – [23, 132–136]; prace szczegółowe [24–28, 137–139]) składają się z dwóch, umiejscowionych blisko siebie, elementów; pierwszy odpowiedzialny jest za biospecyficzne rozpoznanie określonego związku (enzymy, przeciwciała, lektyny, receptory hormonów, komórki) a drugi ma za zadanie przekształcić sygnał biologiczny na odpowiadający mu ilościowo sygnał elektryczny, elektrochemiczny, optyczny, kalometryczny lub piezoelektryczny. Uwzględniając sposób oznaczania danego związku, biosensory enzymatyczne bazują na dwóch typach procedur [133]. W pierwszej związek oznaczany jest substrat enzymu a jego stężenie określone na podstawie uwolnionego produktu. W drugiej, jeżeli oznaczany związek jest inhibitorem enzymu, jego stężenie określa się na podstawie spadku szybkości reakcji (substrat jest immobilizowany w biosensorze lub dodawany do analizowanego roztworu).

W biosensorych enzymatycznych membrany powinny być cienkie (grubość $< 50 \mu\text{m}$); aby zminimalizować opory w transporcie masy, posiadać grupy funkcyjne odpowiednie dla danej techniki immobilizacji i być pozbawione wyraźnego ładunku po immobilizacji [23]. Materiałem membrany są najczęściej pochodne celulozy [24], poli(piro) [28], poli(tetrafluorooctan) [26], akrylany [32], poli(chlorek winylu) [138, 139] lub korzysta się z gotowych membran jak Nafion™ [139] lub aktywowanych już membran typu Immunodyne™ czy Immobililon™ [23]. Enzym sporadycznie jest używany w formie rozpuszczalnej w wodzie; najczęściej jest immobilizowany na/w membranie z przewagą wiązania kowalencyjnego od strony detektora. Zatem membrana jest zwykle nośnikiem dla enzymu, może stanowić barierę fizyczną dla związków blokujących pory membrany i powodujących „zatrucie” elementu przetwarzającego sygnały (np.: elektroda) i ograniczać możliwość zajścia reakcji ubocznych [139]. Poza tym membrana nie może stanowić bariery dla reagentów, chyba że

służy również do immobilizacji substratu [133]. Celem przyspieszenia szybkości transportu elektronów pomiędzy produktem reakcji i, na przykład, elektrodą, na/w membranie immobilizuje się także związki redukujące jak: NADH, żelazocyjanek, tetracyjanochinodimetan czy L-askorbinian [135]. Generalnie, największym problemem jest zbyt niska stabilność operacyjna enzymów, szczególnie gdy biosensor służy do wykrywania takich związków, jak: herbicydy, fungicydy, insektycydy i pestycydy lub gdy w trakcie utleniania substratu powstają wolne rodniki [134–137]. W takich przypadkach zaleca się stosowanie pośredników redukujących.

Biosensory enzymatyczne znalazły zastosowanie w przemyśle spożywczym [133], w ochronie środowiska [135, 138], rolnictwie [135], w medycynie i weterynarii [23] i w monitorowaniu bioprocessów [132]. Klasyczne już przykłady enzymów immobilizowanych w biosensorach, to: oksydaza mleczanowa, glukozydaza, alkoholowa, katalaza, inne peroksydazy, aminoacylaza, penicylinaza, ureaza, invertaza, β -galaktozydaza [132, 133, 135, 137]. Nowsze zastosowania dotyczą ochrony środowiska i rolnictwa, a w szczególności monitorowania stężenia pestycydów, fungicydów, herbicydów, insektycydów z wykorzystaniem esterazy acetylocholinowej lub butyrylocholinowej i oksydazy cholinowej, oksydazy glukozydowej, fosfatazy kwasnej i alkalicznej, tyrozynazy, lakkazy i dehydrogenazy aldehydowej [133, 135–138]. Zwraca się także szczególną uwagę na biosensory do monitorowania reakcji enzymatycznych i/lub oznaczania związków w rozpuszczalnikach organicznych [137]. W takich przypadkach można oznaczać stężenie fenoli i jego pochodnych oraz anilin, a także aminy aromatyczne i chloropochodne fenolu (oksydaza glukozydowa, tyrozynaza, monooksygenaza monofenolowa, peroksydazy). Zalety wykonywania analiz w rozpuszczalnikach organicznych to: detekcja związków słabo rozpuszczalnych w wodzie, ograniczenie reakcji ubocznych, immobilizacja przez prostą adsorpcję i brak polimeryzacji chinonów.

PODSUMOWANIE

Połączenie katalizy enzymatycznej i procesów separacji membranowej doprowadziło do utworzenia licznych konfiguracji enzymatycznych reaktorów membranowych. Rosnące zainteresowanie przemysłu procesami hybrydowymi wynika z możliwości obniżenia kosztów inwestycyjnych i zużycia energii w porównaniu z procesami o wydzielonych etapach reakcji i separacji, a także z ograniczenia lub z możliwości sterowania poziomem reakcji ubocznych lub/oraz inhibicją. Jednakże zintegrowanie procesów jednostkowych podwyższa stopień komplikacji sterowania procesem i jego modelowania w celu dalszej optymalizacji. Nie bez znaczenia jest również koszt membran i modułów membranowych oraz niewystarczająca zwykle trwałość enzymów i membran w warunkach realnego procesu.

Efektywne łączenie reakcji enzymatycznej i separacji membranowej wymaga współdziałania i postępu w trzech dziedzinach: technologii enzymów i inżynierii białek, technologii membran oraz inżynierii reaktorów. Zadaniem pierwszej z nich jest

produkcja taniego enzymu i o wysokiej stabilności operacyjnej w odpowiednim dla reakcji rozwiązaniu aparaturowym. Jest to warunek konieczny, gdyż jedynie wysoce selektywne i stabilne enzymy mają szansę zastąpić istniejące już procesy chemiczne lub enzymatyczne. Należy zaznaczyć, że wysoka aktywność posiada znaczenie drugorzędne, natomiast bardziej istotnym elementem jest trwałość układu, łatwość separacji oraz możliwość regeneracji membran.

Z punktu widzenia technologii membran, lepsze zrozumienie relacji pomiędzy budową i właściwościami membrany a układem reakcyjnym, powinno pozwolić na bardziej racjonalny dobór membrany do układu reakcyjnego i rozwiązania aparaturowego. Mimo licznych, dostępnych na rynku, rodzajów membran i modułów membranowych, informacje producentów o ich właściwościach są nikłe i często mylące [140], co wymusza okazjonalną produkcję własnych membran w poszczególnych laboratoriach badawczych, w celu śledzenia relacji między typem polimeru i jego porowatością a sorpcją i dyfuzją reagentów. Z kolei prace dotyczące optymalizacji procesów łączących reakcję z separacją są nieliczne i mocno rozproszone, oferując najczęściej wyrywkowe opracowania inżynierskie prostych reakcji modelowych, w przypadkowo dobranych rozwiązaniach aparaturowych.

Znaczące zwiększenie ilości wdrożonych w przemyśle procesów enzymatycznych z wykorzystaniem reaktorów membranowych wydaje się ciągle odległe, ale istniejące już w przemyśle technologie wskazują, że integracja badań nad procesami membranowymi jest konieczna i efektywna.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] S.R. Weijers, K. vant'Riet, *Biotechnol. Adv.*, 1992, **10**, 237.
- [2] A.S. Bommarius, *Biotechnology*, vol. 3. *Bioprocessing*, ed. G. Stephanopoulos, VCH, Weinheim 1993, 427.
- [3] S.M. Roberts, N.J. Turner, A.J. Willets, M.K. Turner eds, *Introduction to Biocatalysis Using Enzymes and Micro-organisms*, Cambridge University Press, New York 1995.
- [4] U. Kragl, *Industrial Enzymology*, eds T. Godfrey, S. West, Macmillan Press Ltd., London 1996.
- [5] S.M. Thomas, R. DiCosimo, V. Nagarajam, *Trends Biotechnol.*, 2002, **20**, 238.
- [6] B.A. Law, *Industrial Enzymology*, eds T. Godfrey, S. West, Macmillan Press Ltd., London 1996, 387.
- [7] K. Drauz, H. Waldmann eds, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. A Comprehensive Handbook*, vol. 1, VCH, Weinheim 1995.
- [8] M. Lehmann, M. Wyss, *Curr. Opinion Biotechnol.*, 2001, **12**, 371.
- [9] H. Zhao, K. Chockalingam, Z. Chen, *Curr. Opinion Biotechnol.*, 2002, **13**, 104.
- [10] R. Jaenicke, *J. Biotechnol.*, 2000, **79**, 193.
- [11] M.A. Longo, D. Combes, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 1999, **74**, 25.
- [12] A. Liese, K. Seelbach, N.N. Rao, *Industrial Biotransformations*, A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey eds, Wiley-VCH, Weinheim 2000, 57.
- [13] L.W. Powell, *Industrial Enzymology*, eds T. Godfrey, S. West, Macmillan Press Ltd., London 1996, 267.

- [14] E. Drioli, L. Giorno eds, *Biocatalytic Membrane Reactors. Applications in Biotechnology and the Pharmaceutical Industry*, Taylor and Francis Ltd., London 1999.
- [15] L. Giorno, E. Drioli, *TIBTECH*, 2000, **18**, 339.
- [16] A. Liese, K. Seelbach, A. Buchholz, *Industrial Biotransformations*, A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, eds, Wiley-VCH, Weinheim, 2000, 93.
- [17] J.T.M. Sluys, H.W. Bakkenes, R.J.M. Crensen, L.H.J.M. Schneiders, J.H. Hanemaaijer, *NATO ASI Ser. E*, 1994, **272**, 395.
- [18] S. Sundaram, M.L. Yarmush, *Biotechnology*, vol. 3. *Bioprocessing*, ed. G. Stephanopoulos, VCH, Weinheim 1993, 643.
- [19] E. Klein, *J. Membr. Sci.*, 2000, **179**, 1.
- [20] H.R. Oxley, P.H. Corkhill, J.H. Fitton, B.J. Tighe, *Biomaterials*, 1993, **14**, 1064.
- [21] K. Kato, Y. Ikada, *Biotechnol. Bioeng.*, 1995, **47**, 557.
- [22] S. Vedajnananda, R. Chowdhury, P. Bhattacharya, *Biochem. Engn. J.*, 2001, **9**, 41.
- [23] W.H. Scouten, J.H.T. Luong, R.S. Brown, *TIBTECH*, 1995, **13**, 178.
- [24] D. Stollner, F.W. Scheller, A. Warsinke, *Anal. Biochem.*, 2002, **304**, 157.
- [25] A. Nagvi, P. Nahar, R.P. Gandhi, *Anal. Biochem.*, 2002, **306**, 74.
- [26] S. Turmanova, A. Trifonov, O. Kalajiev, G. Kostov, *J. Membr. Sci.*, 1997, **127**, 1.
- [27] T. Godjevargova, V. Konsulov, A. Dimov, *J. Membr. Sci.*, 1999, **152**, 235.
- [28] M. Amounas, C. Innocent, S. Cosnier, P. Seta, *J. Membr. Sci.*, 2000, **176**, 169.
- [29] J.-P. Chen, S.-H. Chu, *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, **26**, 359.
- [30] Reiken S.R., Briendis D.M., *Chem. Eng. Comm.*, 1990, **94**, 1.
- [31] M. Cheryan, M.A. Mehaia, *Membrane Separations in Biotechnology*, ed. W.C. McGregor, Marcel Dekker, New York 1986, 255.
- [32] D.M.F. Prazeres, J.M.S. Cabral, *Enzyme Microb. Technol.*, 1994, **16**, 738.
- [33] V. Gekas, *Enzyme Microb. Technol.*, 1986, **8**, 450.
- [34] C. Sisak, E. Nagy, J. Burfeind, K. Schugerl, *Bioproc. Engn.*, 2000, **23**, 503.
- [35] J.S. Shin, B.-G. Kim, A. Liese, C. Wandrey, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **73**, 179.
- [36] K.E. Rice, J. Watkins, C.G. Hill Jr., *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, **63**, 33.
- [37] S. Viswanath, J. Wang, L.G. Bachas, D.A. Butterfield, D. Bhattacharyya, *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, **60**, 608.
- [38] H.-P. Chao, W.-C. Lee, *J. Chin. Inst. Chem. Eng.*, 2000, **30**, 457.
- [39] C.-K. Lee, C.-H. Fan, P.-F. Yang, *Biochem. Engn. J.*, 2001, **7**, 233.
- [40] H.A. Sousa, C. Rodrigues, E. Klein, C.A.M. Afonso, J.G. Crespo, *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, **29**, 625.
- [41] X.-P. Dai, Z.-F. Yang, R.G. Luo, K.K. Sirkar, *J. Membr. Sci.*, 2000, **171**, 183.
- [42] A.I. Ruiz, A.J. Malave, C. Felby, K. Griebenow, *Biotechnol. Lett.*, 2000, **22**, 229.
- [43] F. Alfani, L. Cantarella, A. Gallifuoco, M. Cantarella, *J. Membr. Sci.*, 1990, **52**, 339.
- [44] M. Gille, E. Stande, *Biotechnol. Bioeng.*, 1994, **44**, 557.
- [45] M. Ulbricht, A. Papra, *Enzyme Microb. Technol.*, 1997, **20**, 61.
- [46] Y.-M. Sun, J.-P. Chen, D.-H. Chu, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999, **45**, 125.
- [47] J.-P. Chen, Y.-M. Sun, D.-H. Chu, *Biotechnol. Progress*, 1998, **14**, 473.
- [48] O. Gabuar, C. Aymard, N. Zakhia, G.M. Rios, *J. Chem. Tech., Biotechnol.*, 1997, **69**, 367.
- [49] S. Curcio, V. Calabro, G. Iorio, *J. Membr. Sci.*, 2000, **173**, 247.
- [50] D. Paolucci-Jeanjean, M.P. Belleville, G.M. Rios, N. Zakhia, *Biochem. Engn. J.*, 2000, **5**, 17.
- [51] D. Paolucci-Jeanjean, M.P. Belleville, G.M. Rios, N. Zakhia, *Biochem. Engn. J.*, 2000, **6**, 233.
- [52] D. Darnoko, M. Cheryan, W.E. Artz, *Enzyme Microb. Technol.*, 1989, **11**, 154.
- [53] Y.-H. Ju, W.-J. Chen, C.-K. Lee, *Microb. Technol.*, 1995, **17**, 685.
- [54] D. Tonyolac, B.I. Yuruksoy, A.R. Ozdural, *Biochem. Engn. J.*, 1998, **2**, 179.

- [55] M. Nakajima, T. Shoji, H. Nabetani, Proc. Biochem., 1992, 27, 155.
- [56] M.Y. Arica, Y. Kacar, A. Ergene, A. Denizli, Process Biochem., 2001, 36, 847.
- [57] A., Bossi, S. Guerrero, P.G. Righetti, Biotechnol. Bioeng., 1999, 64, 383.
- [58] R.S. Peterson, C.G. Hill Jr., C.H. Amundson, Biotechnol. Bioeng., 1989, 34, 438.
- [59] F. Febbraio, M. Portaccio, S. Stellato, S. Rossi, U. Bancivenga, R. Nucci, M. Rossi, F.S. Gacta, D.G. Mita, Biotechnol. Bioeng., 1998, 59, 108.
- [60] L. Giorno, E. Drioli, G. Carvoli, A. Cassano, L. Donato, Biotechnol. Bioeng., 2001, 72, 77.
- [61] M. Keusgen, J. Glodek, P. Milka, I. Krest, Biotechnol. Bioeng., 2001, 72, 530.
- [62] W.-C. Lee, S.-H. Guo, Biotechnol. Bioeng., 2001, 76, 311.
- [63] T.J. Harrington, J.L. Gainer, D.J. Kirwan, Enzyme Microb. Technol., 1991, 13, 610.
- [64] S.A. Cetinus, H.N. Oztop, Enzyme Microb. Technol., 2000, 26, 497.
- [65] M.S. Mohy Eldin, A. De Maio, S. Di Martino, N. Diano, V. Grano, N. Pagliuca, S. Rossi, U. Bencivenga, F.S. Gacta, D.G. Mita, J. Membr. Sci., 2000, 168, 143.
- [66] M.S. Mohy Eldin, M. Santucci, S. Rossi, U. Bencivenga, P. Conciglia, F.S. Gacta, J. Tramper, A.E.M. Janssen, C.G.P.H. Schroen, D.G. Mita, J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 2000, 8, 221.
- [67] J.E. Prenosil, T. Hediger, Desalination 1985, 53, 265.
- [68] C. Jolival, S. Brenon, E. Caminade, C. Mouglin, M. Pontic, J. Membr. Sci., 2000, 180, 103.
- [69] E. Erhan, B. Keskinler, G. Akay, O.F. Algur, J. Membr. Sci., 2002, 206, 361.
- [70] G. Akay, E. Erhan, B. Keskinler, O.F. Algur, J. Membr. Sci., 2002, 206, 61.
- [71] A. Lante, A. Crapisi, A. Krastanov, P. Spettoli, Process Biochem., 2000, 36, 51.
- [72] L. Liang, X. Feng, L. Peurrung, V. Viswanathan, J. Membr. Sci., 1999, 162, 235.
- [73] P. Lozano, A.B. Perez-Marin, T. De Diego, D. Gomez, D. Paolucci-Jeanjean, M.P. Belleville, G.M. Rios, J.L. Iborra, J. Membr. Sci., 2002, 201, 55.
- [74] K. Yamagiwa, H. Kobayashi, M. Onodera, A. Ohkawa, Y. Kamiyama, K. Tasaka, Biotechnol. Bioeng., 1993, 43, 301.
- [75] P. Lozano, T. De Diego, M.P. Belleville, G.M. Rios, J.L. Iborra, Biotechnol. Lett., 2000, 22, 771.
- [76] F. Garbassi, M. Morra, E. Occhiello eds, *Polymer Surfaces. From Physics to Technology*, J. Wiley and Sons, Chichester 1998, 233.
- [77] A.J. Martinez, S. Manolache, V. Gonzales, R.A. Young, F. Denes, J. Biomat. Sci. Polymer Edn, 2000, 11, 415.
- [78] S. Akgol, Y. Kacar, S. Ozkara, H. Yavuz, A. Denizli, M.Y. Arica, J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 2001, 15, 197.
- [79] M.M. El-Masry, A. De Maio, P.L. Martelli, R. Casadio, A.B. Moustafa, S. Rossi, D.G. Mita, J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 2001, 16, 175.
- [80] A. De Maio, M.M. El-Masry, Z.H. Abd El-Latif, M. Portaccio, U. Bencivenga, D.G. Mita, J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 2001, 16, 191.
- [81] M.S. Mohy Eldin, U. Bencivenga, S. Rossi, P. Conciglia, J. Tramper, D.G. Mita, J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 2000, 8, 197.
- [82] C.G.P.H. Schroen, M.S. Mohy Eldin, A.E.M. Janssen, G.D. Mita, J. Tramper, J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 2001, 15, 163.
- [83] M.M. El-Masry, A. De Maio, S. Di Martino, V. Grano, S. Rossi, N. Pagliuca, Z.H. Abd El-Latife, A.B. Moustafa, A. D'Uva, F.S. Gacta, D.G. Mita, J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 2000, 11, 113.
- [84] M.M. El-Masry, A. De Maio, S. Di Martino, N. Diano, U. Bencivenga, S. Rossi, V. Grano, P. Conciglia, M. Portaccio, F.S. Gacta, D.G. Mita, J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 2000, 9, 219.
- [85] S. Miura, N. Kubota, H. Kawakita, K. Saito, K. Sugita, K. Watanabe, T. Sugo, Radiat. Physics Chem., 2002, 63, 143.
- [86] T. Kawai, K. Saito, K. Sugita, T. Sugo, H. Misaki, J. Membr. Sci., 2001, 191, 207.
- [87] H. Kawakita, K. Sugita, K. Saito, T. Sugo, H. Kawamoto, J. Membr. Sci., 2002, 205, 175.

- [88] T. Kawai, K. Sugita, K. Saito, T. Sugo, *Macromolecules*, 2000, **33**, 1306.
- [89] H.G. Hicke, M. Ulbricht, M. Becker, S. Radosta, A.G. Heyer, *J. Membr. Sci.*, 1999, **161**, 239.
- [90] G. Poźniak, B. Krajewska, W. Trochimczuk, *Biomaterials*, 1995, **16**, 129.
- [91] M. Rucka, G. Poźniak, B. Turkiewicz, W. Trochimczuk, *Enzyme Microb. Technol.*, 1996, **18**, 477.
- [92] M.I. Foda, M. Lopez-Leiva, *Process Biochem.*, 2000, **35**, 581.
- [93] L. Słomińska, A. Szostek, A. Grześkowiak, *Carbohydr. Polym.*, 2002, **50**, 423.
- [94] Q. Gan, S.J. Allen, G. Taylor, *Biochem. Eng. J.*, 2002, **12**, 223.
- [95] J. Bryjak, M. Bryjak, A. Noworyta, *Enzyme Microb. Technol.*, 1996, **19**, 196.
- [96] A.R. Comfort, E.C. Albert, R. Langer, *Biotechnol. Bioeng.*, 1989, **34**, 1366.
- [97] A. Zaks, A.M. Klibanov, *Science*, 1984, **224**, 1249.
- [98] A.M. Klibanov, A. Zaks, *Proc. Natl Acad., Sci., USA*, 1985, **82**, 3192.
- [99] A. Zaks, A.M. Klibanov, *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**, 3194.
- [100] A.M. Klibanov, *TIBS*, 1989, **14**, 141.
- [101] E. Drioli, G. Iorio, G. Catapano, *Handbook of Industrial Membrane Technology*, ed. M.C. Porter, Noyes Publications, Park Ridge 1989, 401.
- [102] A. Trusek-Hołownia, A. Noworyta, *Desalination*, 2002, **144**, 427.
- [103] W. Edwards, W.D. Leukes, J.J. Bezuidenhout, *Desalination*, 2002, **149**, 275.
- [104] S. Akgol, Y. Yalcinkaya, G., Bayramoglu, A. Denizli, M.Y. Arica, *Process Biochem.*, 2002, **38**, 675.
- [105] C. Lopcz, I. Mielgo, M.T. Moreira, G. Feijoo, J.M. Lema, *J. Biotechnol.*, 2002, **99**, 249.
- [106] A. Boshoff, M.H. Burton, S.G. Burton, *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, **63**, 1.
- [107] M.M. El-Masry, A. De Maio, S. Di Martino, U. Bencivenga, S. Rossi, B.A. Manzo, N. Pagliuta, P. Canciglia, M. Portaccio, F.S. Gaeta, D.G. Mita, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2000, **9**, 231.
- [108] D.A. Butterfield, D. Bhattacharyya, S. Daunert, L. Bachas, *J. Membr. Sci.*, 2001, **181**, 29.
- [109] S. Vishwanath, J. Wang, L.G. Bachas, D.A. Butterfield, D. Bhattacharyya, *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, **60**, 608.
- [110] S.V. Rao, K.W. Anderson, L.G. Bachas, *Mikrochim. Acta*, 1998, **128**, 127.
- [111] S. Viswanath, D. Bhattacharyya, W. Huang, L.G. Baches, *J. Membr. Sci.*, 1995, **108**, 1.
- [112] S. Viswanath, C.R. Watson, W. Huang, L.G. Baches, D. Bhattacharyya, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 1998, **6**, 294.
- [113] A. Tanksale, P.M. Chandra, M. Rao, V. Deshpande, *Biotechnol. Lett.*, 2001, **23**, 51.
- [114] A. Kurimoto, T. Tanabe, A. Tachibana, K. Yamauchi, *J. Biotechnol.*, 2001, **86**, 1.
- [115] C.-C. Lin, M.-C. Yang, *Biomaterials*, 2003, **24**, 549.
- [116] T. Godjevargova, K. Gabrovska, *J. Biotechnol.*, 2003, **103**, 107.
- [117] P. Gemeiner, P. Docolomansky, J. Nahalka, V. Stefuca, B. Danielsson, *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, **49**, 26.
- [118] A. Bhardwaj, J. Lee, K. Glauner, S. Ganapathi, D. Bhattacharyya, D.A. Butterfield, *J. Membr. Sci.*, 1996, **119**, 241.
- [119] D.A. Clare, V.W. Valentine, G.L. Catignani, H.E. Swaisgood, *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, **28**, 483.
- [120] M.K. Walsh, H.E. Swaisgood, *Biotechnol. Bioeng.*, 1994, **44**, 1348.
- [121] R. Lopez-Ulibarri, G.M. Hall, *Enzyme Microb. Technol.*, 1997, **21**, 398.
- [122] Y. Yang, H.A. Chase, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1998, **28**, 145.
- [123] J. Ida, T. Matsuyama, H. Yamamoto, *Biochem. Eng. J.*, 2000, **5**, 179.
- [124] M.S. Mohy-Eldin, U. Bencivenga, S. Rossi, P. Canciglia, F.S. Gaeta, J. Tarmper, D.G. Mita, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2000, **8**, 233.
- [125] M. Goto, F. Nakashio, K., Yoshizuka, K. Inoue, *J. Membr. Sci.*, 1992, **74**, 207.

- [126] D.M.F. Prazeres, F.A.P. Garcia, J.M.S. Cabral, *Biotechnol. Bioeng.*, 1993, **41**, 761.
- [127] A.R. Comfort, E.C. Albert, R. Langer, *Biotechnol. Bioeng.*, 1989, **34**, 1374.
- [128] H. Ishikawa, T. Tanaka, S. Takase, H. Hikita, *Biotechnol. Bioeng.*, 1989, **34**, 357.
- [129] G. Salzman, R. Tadmor, S. Guzy, S. Sideman, N. Lotan, *Eng. Proc.* 1999, **38**, 289.
- [130] V. Calabro, S. Curcio, G. Iorio, *J. Membr. Sci.*, 2002, **206**, 217.
- [131] V. Rossokhaty, N. Rossokhata, *Comp. Phys. Comm.*, 2002, **147**, 366.
- [132] K. Ramanathan, M. Rank, J. Svitel, A. Dzgoev, B. Danielsson, *TIBTECH*, 1999, **17**, 499.
- [133] P.D. Patel, *Trends Anal. Chem.*, 2002, **21**, 96.
- [134] F. Scheller, U. Wollenberger, A. Warsinke, F. Lisdat, *Curr. Opinion Biotech.*, 2001, **12**, 35.
- [135] I.E. Tothill, *Comp. Electron. Agricult.*, 2001, **30**, 205.
- [136] A. Gill, G. Farace, G. Lillie, P. Vadgama, *Bioelectrochem.*, 2002, **55**, 123.
- [137] C. Nistor, J. Emneus, *Waste Management*, 1999, **19**, 147.
- [138] F.N. Kok, F. Bozoglu, V. Hasirci, *Biosens. Bioelectron.*, 2002, **17**, 531.
- [139] N. Tinkilic, O. Cubuk, I. Isildak, *Anal. Chim. Acta*, 2002, **452**, 29.
- [140] I.F.J. Vencelecom, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 3779.

Praca wpłynęła do Redakcji 13 kwietnia 2004

Redakcja „Wiadomości Chemicznych” informuje, że są u nas do nabycia następujące pozycje „Biblioteki Wiadomości Chemicznych”:

Nomenklatura steroidów (Zalecenia 1989), tłum. J.W. Morzycki i W.J. Szczepek, cena 3 zł

Nomenklatura chemii nieorganicznej. Zalecenia 1990, red. Z. Stasicka, cena 25 zł
Z. Kluz, M. Późniczek, *Nomenklatura związków chemicznych. Poradnik dla nauczycieli*, cena 10 zł

Podstawowa terminologia stereochemii oraz Słownik podstawowych terminów w nauce o polimerach. Zalecenia 1996, red. O. Achmatowicz, B. Szechner i P. Kubisa, cena 12 zł

Nomenklatura węglowodanów. Zalecenia 1996, tłum. i red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 18 zł

I.Z. Siemion, *Bronisław Radziszewski i lwowska szkoła chemii organicznej*, cena 18 zł

K. Maruszewski, *Fizykochemia molekuł zamkniętych w zeolitach i zol-żelach*, cena 18 zł

Praca zbiorowa, *Uporządkowane materiały mezoporowate*, red. B. Burczyk, cena 18 zł

Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych indywiduali chemicznych. Zalecenia 1993, red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 15 zł

I.Z. Siemion, *Lutum sapientiae, czyli Notatek chaotycznych część pierwsza*, cena 18 zł

M. Zabłocka-Malicka, *Ruchliwość jonów w podwójnych układach stopionych soli*, cena 8 zł.

Bibliografia „Wiadomości Chemicznych” za lata 1988–1997, cena 3 zł.

Praca zbiorowa, *Nanomateriały*, red. D. Hreniak, W. Łojkowski, W. Stręk, M. Suszyńska, cena 25 zł.

Książki wysyłamy na koszt zamawiającego. Zamówienia prosimy kierować pod adresem: Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław. Opłaty należy wносить na konto: BPH SA I O/Wrocław, Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, NRB 83 1060 0076 0000 3200 0040 0597.

REGULAMIN DLA AUTORÓW

„Wiadomości Chemiczne” publikują artykuły referatowe, nie oryginalne prace doświadczalne, dotyczące wszystkich dziedzin chemii i nie drukowane przedtem w innych czasopismach. Artykuły publikowane w „Wiadomościach Chemicznych” nie mogą być bez zgody Redakcji drukowane w innych czasopismach. Treść artykułów powinna odpowiadać stanowi wiedzy w chwili pisanania artykułu. Piśmiennictwo cytowane powinno uwzględniać najnowsze prace krajowe i zagraniczne z dziedziny, której dotyczy artykuł.

Maszynopisy (wydruki komputerowe) należy nadsyłać Redakcji w **dwóch egzemplarzach**: oryginał i kopia lub kserokopia pisana jednostronnie, z zachowaniem podwójnej interlinii i marginesu szerokości 5 cm z **prawej** strony; pierwszy wiersz akapitu należy zaznaczyć wcięciem na 5 uderzeń w klawisz.

Na pierwszej stronie pod tytułem polskim należy umieścić tytuł w języku angielskim, adres autora oraz spis rozdziałów. Praca powinna zawierać obszernie streszczenie w języku angielskim (do 1,5 strony maszynopisu z cytowaniem piśmiennictwa i odsyłaczami do tabel i rysunków w tekście). Na osobnej karcie prosimy o krótką (do 150 wyrazów) notkę z informacją o uprawianej przez Autora tematyce naukowej i przebiegu pracy. Prosimy o podanie tytułu naukowego i miejsca pracy oraz o dołączenie aktualnego zdjęcia. Przesłanie tych informacji będziemy traktować jako zgodę na ich publikację.

Artykuły należy opracowywać zwięźle i nie zamieszczać szczegółów, odsyłając czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego. Maszynopis nie powinien przekraczać 25 stron wraz z tabelami i wykazem piśmiennictwa lub 100 stron, jeśli jest monografią przeznaczoną do druku w „Bibliotece Wiadomości Chemicznych”. Artykuły powinny być napisane za pomocą komputera. Redakcja prosi o dołączenie dyskietki z tekstem pracy i ilustracjami wraz z wyczerpującą informacją o użytym edytorze. Pożyczany edytor Word (co najmniej wersja 6).

Rysunki (mogą być kolorowe, ale za dopłatą do druku) należy nadsyłać w dwóch egzemplarzach (oryginały i kopie lub kserokopie). Oryginały rysunków muszą mieć taką formę graficzną, by nadawały się do reprodukcji. Na odwrotnej stronie należy podać ołówkiem nazwisko autora i numer rysunku i ten sam numer zaznaczyć w odpowiednim miejscu maszynopisu. Na osobnym arkuszu dołączyć podpisy pod rysunki. **Wzory chemiczne i schematy reakcji chemicznych**, których nie można w prosty sposób napisać na maszynie lub komputerze, powinny być wpisane ręcznie, w odpowiednich miejscach tekstu. Niezależnie od tego **do pracy należy dołączyć jeden komplet wzorów i schematów narysowanych oddzielnie w formie nadającej się do reprodukcji**.

Tabele należy ponumerować cyframi arabskimi oraz podać ich tytuły.

Piśmiennictwo zestawia się w kolejności cytowania w tekście; powinno ono zawierać kolejno inicjały imion i nazwisko, skrót tytułu czasopisma zgodny z przyjętymi normami, rok wydania, tom podkreślony i numer pierwszej strony cytowanej pracy. Wykaz skrótów ważniejszych czasopism chemicznych jest podany w „Wiadomościach Chemicznych”, 1989, 43, 979. Jeśli część piśmiennictwa zebrana jest w monografiach lub innych wydawnictwach, nie należy podawać szczegółowo wykazu tego piśmiennictwa, lecz cytować odnośne wydawnictwo.

O przyjęciu pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny. **Maszynopisy nie odpowiadające podanym warunkom nie będą przez Komitet rozpatrywane**. Artykuły nie zakwalifikowane do druku Redakcja zwraca, zachowując kopię maszynopisu. Autorzy przeprowadzają jedną korektę tekstu. Po zakwalifikowaniu pracy do druku nie będą uwzględniane żadne poprawki rysunków.

Honoraria za wydrukowane prace są wypłacane wyłącznie tym Autorom, których artykuły zostały zamówione przez Redakcję. Autorzy wydrukowanych prac otrzymują bezpłatnie 20 nadbitek.

**DO CZYTELNIKÓW
„WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”**

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2005 r. wynosi 120 zł dla instytucji i nie zrzeszonych prenumeratorów indywidualnych oraz 60 zł dla bibliotek szkół średnich i podstawowych. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

Bank Przemysłowo-Handlowy S.A.
Oddział we Wrocławiu
pl. Powstańców Śl. 9, 53-316 Wrocław
Redakcja „Wiadomości Chemicznych”
NRB 83 1060 0076 0000 3200 0040 0597

Prenumerata „Wiadomości Chemicznych” dla członków PTCh, połączona z opłatą składek członkowskich, jest znacznie niższa i przedstawia się następująco:

- prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2005 wraz ze składką członkowską wynosi 60 zł (składka – 50 zł, prenumerata – 10 zł);
- emeryci, doktoranci oraz studenci płacą 25 zł (składka – 15 zł, prenumerata – 10 zł); a nauczyciele szkół średnich i podstawowych płacą 30 zł (składka – 20 zł, prenumerata – 10 zł).

Członkowie PTCh, którzy zechcą zaprenumerować „Wiadomości Chemiczne” na podanych tu warunkach, proszeni są o wnoszenie opłat na konto:

PTCh Warszawa, ul. Freta 16
Millennium BIG BG SA, Nr 5711602202-0000000027202458

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”



SPIS TREŚCI

| | |
|---|-----|
| Jolanta BRYJAK: Immobilizacja enzymów. Część 1: Metody konwencjonalne | 691 |
| Jolanta BRYJAK: Immobilizacja enzymów. Część 2: Reaktory membranowe | 747 |

W NASTĘPNYM ZESZYCIE UKAZĄ SIĘ:

- Miroslaw JABŁOŃSKI: Niekonwencjonalne wiązania wodorowe. II. Natura przesunięcia do wyższych częstości
- Janina KOPYRA, Wiesława BARSZCZEWSKA, Iwona SZAMREJ: Mechanizm i kinetyka wychwytu elektronów przez haloetany
- Iwona SKIERA, Zdzisław PARYZEK: Reakcje rozszczepienia laktonów – zastosowanie w syntezie organicznej
- Anna TOMASZKIEWICZ-POTĘPA, Otmar VOGT: Juglon – biologicznie aktywny metabolit roślin *Juglandeaceae*
- Agnieszka OLEJNICZAK: Karborany i metalokarborany. Cz. I. Karborany
- Elżbieta SKRZYDLEWSKA, Maria BALCERZAK: Wielopierwiastkowa analiza materiałów opakowaniowych techniką ICP–TOFMS
- Paweł DZYGIEL, Piotr P. WIECZOREK: Zastosowanie ekstrakcji i technik membranowych do rozdzielenia stereoizomerów aminokwasów i ich pochodnych
- Krzysztof KILIAN, Krystyna PYRZYŃSKA: Zastosowanie reakcji kompleksowania metali porfirynami w analizie chemicznej
- Krystyna SROGI, Mariusz MINKINA: Jakość wyników analitycznych w śladowej analizie nieorganicznej

Felieton naukowy

Ignacy Z. SIEMION: Notatki chaotyczne. LIV. O pracach analityczno-chemicznych w XVIII-wiecznej Polsce

Kronika

Nowe wydawnictwa