

Dr inż. Katarzyna TARNOWSKA
 Dr Marta ŁOBACZ
 Prof. dr hab. Bolesław KOWALSKI
 Wydział Nauk o Żywności, SGGW w Warszawie

IMMOBILIZACJA FIZYCZNA LIPAZ

Część II

IMMOBILIZACJA LIPAZ PRZEZ PUŁAPKOWANIE®

W tej części artykułu przedstawiono problematykę immobilizacji fizycznej lipaz obejmującą techniki zamykania w sieci żelu, w mikro (makro) emulsjach, kapsułkowanie oraz otoczkowanie. Przedyskutowano wpływ procesu immobilizacji na aktywność, stabilność oraz selektywność unieruchomionych enzymów.

WPROWADZENIE

Lipazy (EC 3.1.1.3), hydrolazy estrów gliceryny, należą do najczęściej stosowanych biokatalizatorów w syntezie chemicznej, zarówno w skali laboratoryjnej jak i przemysłowej [3, 16]. O atrakcyjności biotransformacji z udziałem lipaz, jak też i innych enzymów, w porównaniu z klasycznym procesem chemicznym decyduje szereg właściwości, m.in. łagodne warunki reakcji, energooszczędność, możliwość przeprowadzenia reakcji trudnych bądź niemożliwych do wykonania metodami chemicznymi, wykorzystanie regio- i stereoselektywności biokatalizatorów. Lipazy stosowane są w katalizie w postaci rozpuszczalnej lub immobilizowanej. Enzymy immobilizowane wykazują szereg zalet, a do najważniejszych należą: możliwość wielokrotnego zastosowania oraz znaczne uproszczenie metodyki wydziałania produktów. Wybór metody immobilizacji i związana z tym ostateczna forma enzymu, w wielu przypadkach narzuca ograniczenia jego praktycznego zastosowania.

Immobilizacja enzymów

Immobilizacja polega na związaniu białka enzymatycznego z nośnikiem nierozpuszczalnym w środowisku reakcji, bądź też na zamknięciu enzymu w przestrzeni ograniczonej strukturą żelu lub membraną (rys. 1).

Wśród technik immobilizacji można wyróżnić procedury unieruchamiania enzymów poprzez wiązanie kowalencyjne (metody chemiczne) oraz wiązanie niekowalencyjne (metody fizyczne). Do grupy pierwszej zaliczymy techniki wiązania kowalencyjnego białek enzymatycznych z nośnikiem oraz sieciowanie białka rozpuszczonego w formie agregatów bądź kryształów. W grupie drugiej znajdują się metody oparte na adsorpcji enzymów na nośniku i inkluzji, tj. inkludowanie w sieci żelu, w kapsułkach, w emulsjach, w membranie ultrafiltracyjnej i otoczkowanie [5].

Opracowanie to stanowi kontynuację problematyki unieruchamiania lipaz metodami fizycznymi. W pierwszej części artykułu przedstawiono zagadnienia związane z adsorpcją lipaz na nośnikach stałych.

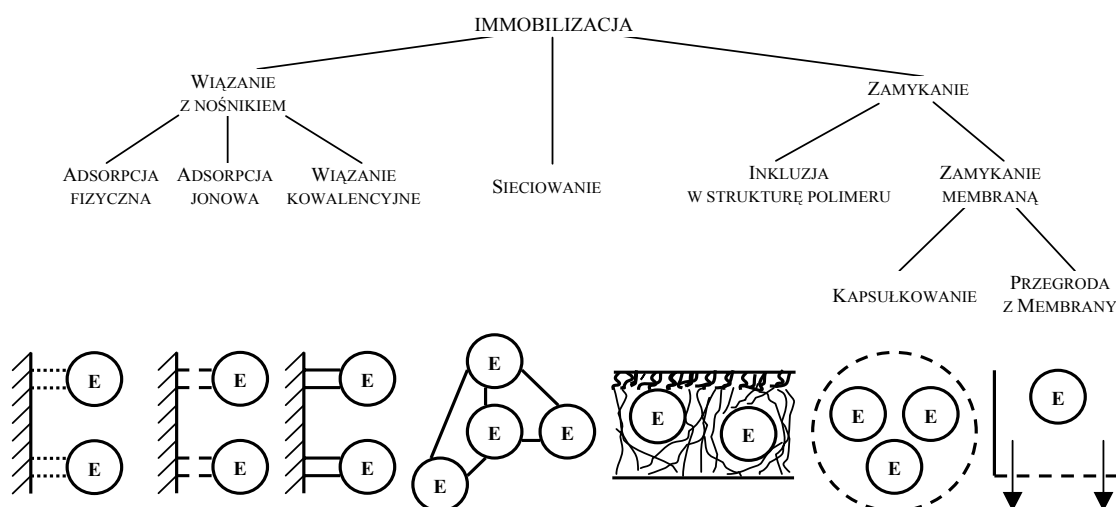
Celem artykułu jest zaprezentowanie problemów dotyczących immobilizacji lipaz poprzez pułapkowanie w sieci żelu, zamykanie w mikro (makro) kapsułkach, w mikro (makro) emulsjach, w materiale membrany oraz otoczkowanie.

ZAMKNIĘCIE LIPAZ W SIECI ŻELU POLIMEROWEGO

Metoda polega na zmieszaniu monomeru lub polimeru

z roztworem enzymu oraz dodaniu czynników sieciujących i ewentualnych inicjatorów, celem wywołania polimerizacji bez udziału cząstek enzymu. Taka procedura może być stosowana do wszystkich enzymów, jednak warunki polimerizacji mogą powodować denaturację białka [5]. Aby zminimalizować dzia-

łanie niekorzystnych dla enzymu warunków tworzenia żelu,



Rys. 1. Sposoby immobilizacji enzymów [29].

w przypadku lipaz można stosować powlekanie białka enzymatycznego lipidowym substratem [1, 2, 13, 28]. Metodę zamykania enzymu w sieci polimerowej uznaje się za technikę tanią i dającą trwałe preparaty. Wadami omawianego sposobu immobilizacji są duże opory dyfuzyjne reakcji, brak możliwości odzysku nośnika, ograniczenie zastosowań do niskocząsteczkowych substratów i produktów.

W badaniach dotyczących immobilizacji lipaz w sieci spolimerizowanych związków naturalnych stosowano agarozę [4], chitozan [4, 22], alginian [1, 2, 4, 12, 17, 23, 33], karagenian [2] i krzemiany [23]. Wśród polimerów syntetycznych dominowały żele z poli (glikolu propylenowego) [13], poli (alkoholu winylowego) [18, 27, 28] oraz polisulfonowe [31].

Betigeri i Neau [4] porównywali wydajność pułapkowania lipazy *Candida rugosa* w różnych, pod względem fizycznym i chemicznym, polimerach pochodzenia naturalnego. Kuleczki agarozy, w warunkach procesowych wykazywały niepożądane pęcznienie i z tego względu polimer ten nie był używany w dalszych doświadczeniach. Żel alginianowy i chitozany przygotowane w wyniku żelowania jonowego z użyciem CaCl_2 lub trójpolifosforanu sodu jako czynnika sieciującego w żelującym roztworze. Stwierdzono, że niezależnie od stężeń alginianu i chitozanu, wydajność pułapkowania enzymu przez oba polimery była podobna (43-50%). Aktywność biokatalizatora związanego z chitozaniem była średnio 4-krotnie większa od osiągniętej przez enzym zamknięty w alginianie.

Preparaty otrzymane przez inkluzję w sieci polimeru w zasadzie zawierają enzym w formie niezmienionej. W porównaniu z enzymem nieimmobilizowanym aktywność biokatalizatora jest zbliżona lub niższa. Główną zaletą tej techniki unieruchamiania jest wzrost stabilności i/lub aktywności enzymu w kontakcie z rozpuszczalnikiem organicznym. Badano wpływ różnych rozpuszczalników organicznych na aktywność immobilizowanej lipazy *Pseudomonas*. Enzym unieruchomiono w sieciowanej światłem żywicy poli (glikolu propylenowego) [13]. W każdym testowanym układzie najlepsze efekty reakcji estryfikacji osiągnęto w obecności eteru diizopropylowego. Wzmocniona została także stabilność temperaturowa i odporność na działanie środowiska organicznego. Po inkubacji w benzenie w 60°C enzym immobilizowany zachował 75% wyjściowej aktywności, natomiast lipaza natywna była aktywna w 28%.

W badaniach Antczaka i wsp. [2] dotyczących lipaz kapsułkowanych w żelach alginianu wapnia i karagenianu potasu, optymalnym środowiskiem dla prowadzenia reakcji estryfikacji był eter naftowy z dodatkiem bezwodnego siarczanu sodu jako czynnika usuwającego wodę. Ponadto decydujący wpływ na efektywność działania unieruchomionych lipaz wywarła impregnacja enzymów kwasem oleinowym.

Aktywność otrzymanych biokatalizatorów w środowisku hydrofobowym limitowana jest szybkością wymiany masy przez warstwę alginianu. Jedną z możliwości przyspieszenia dyfuzji reagentów przez błonę polisacharydową jest utworzenie systemu mikroporów w warstwie żelu, w której zawieszony jest enzym. Zwiększenie porowatości matrycy polimerowej można osiągnąć przez dodanie związków wielkocząsteczkowych do roztworu wodnego podczas formowania się kapsułki alginianu. Stosowane związki porotwórcze to oligomery tlenku etylenu (Polikol) oraz celuloza mikrokrystaliczna [1].

Ostatnio szczególnym zainteresowaniem cieszą się tzw. preparaty zol-żel, otrzymywane głównie z alkoholanów krzemu [7, 9, 10, 11, 14]. Związki te są poddawane wstępnej hydrolizie, a następnie polikondensacji. W zależności od sposobu postępowania przyjętego po etapie polikondensacji, otrzymuje się hydrożele, kserożele (po suszeniu) lub aerożele (po suszeniu w nadkrytycznym CO_2). Cenną cechą technologii zol-żel jest możliwość tworzenia ich z domieszkami różnych cząstek, jak np. cząstki magnetyczne, ułatwiające oddzielenie nośnika z białkiem enzymatycznym od mieszaniny reakcyjnej [11] oraz tworzenie żeli mieszanych z naturalnymi lub syntetycznymi polimerami [9, 11]. W celu zwiększenia odporności mechanicznej można stosować dodatek włókien ceramicznych [7].

Problemem w procedurze immobilizacji enzymów w zol-żelu jest uwalnianie się podczas polimeryzacji alkoholu (głównie etanolu), co działa denaturująco na wiele biokatalizatorów. Z tego względu opracowywane są techniki oparte na transestryfikacji prekursorów krzemionkowych z wyżej rzędownym alkoholem jak glicerol. W ten sposób uzyskuje się nowe prekursory, które nie wydzielają szkodliwego alkoholu podczas żelowania. Inną alternatywą jest użycie jako prekursorów krzemionki – krzemianów sodu zamiast alkoholanów. Niemniej najprostszą techniką jest hydroliza wstępna prekursorów krzemionkowych w warunkach, gdzie hydroliza jest szybka a kondensacja wolna. Odparowanie tworzonego alkoholu przeprowadzane jest przed dodaniem enzymu. Ta metoda była zastosowana do unieruchomienia lipazy *Candida rugosa* w aerożelu krzemionkowym w badaniach prowadzonych przez Buisson i Pierre [7].

Zaobserwowano wyjątkowy wzrost aktywności tej samej lipazy po pułapkowaniu w sieci żelu zsyntetyzowanego z tetrametoksylanu i alkiltrimetoksylanu [11]. Wydajność immobilizacji wynosiła 95% białka w nośniku, a aktywność specyficzna była 59 razy większa w porównaniu z lipazą nieimmobilizowaną. Czynnikiem zasadniczo wpływającym na aktywność enzymu była długość łańcucha węglowodorowego grupy alkilowej $\text{RSi}(\text{OCH}_3)_3$. Według autorów, lipofilowe oddziaływanie grup alkilowych w żelu z cząsteczkami lipazy podczas tworzenia nośnika może utrzymywać biokatalizator w aktywnej, otwartej konformacji wywołując efekt podobny do aktywacji międzyfazowej. Jednak trudno tak duży wzrost aktywności przypisywać tylko temu zjawisku. Prawdopodobnie występują tutaj także inne interakcje nośnik – lipaza, a jednym z ważnych czynników jest lepsze rozproszenie enzymu. System z immobilizowaną lipazą odznaczał się dużą stabilnością termiczną. Po uwięzieniu biokatalizatora w zol-żelu odporność enzymu na podwyższoną temperaturę wzrosła 55 razy w porównaniu z odpowiednikiem natywnym.

Należy wspomnieć także o immobilizacji enzymów w porach membrany przy zastosowaniu procesu ultrafiltracji. Zgodnie z Bryjak [6] oraz Giorno i Drioli [15] przyjęto, że wspomnianą technikę można potraktować jako odmianę immobilizacji w materiale membrany polimerowej.

Po opracowaniu procedury wytwarzania membran asymetrycznych przez inwersję faz pojawiły się nowe możliwości w zakresie unieruchamiania enzymów. Uzyskanie struktury asymetrycznej jest możliwe w przypadku, kiedy polimeryzacja przebiega szybciej od inwersji faz. Po tej stronie membrany, z której doprowadza się środek wywołujący polimeryzację

(precypitat), tworzy się mikroporowata warstwa aktywna lub „naskórkowa” o grubości od 0,1 do 1 μm . „Skórka” ma pory o znacznie mniejszych rozmiarach od warstw leżących głębiej lub może mieć nawet strukturę jednorodną (bez porów). W tej warstwie uzyskuje się właściwy efekt sita molekularnego. Pozostały przekrój membrany, makroporowata warstwa nośna o strukturze od typowo gąbczastej do palczastej, spełnia funkcję nośnika nadającego membranę kształt i wytrzymałość. Stanowi ona wprost idealną przestrzeń dla umieszczenia w niej cząsteczek enzymu. Wprowadzenie enzymu do gotowej membrany odbywa się przez filtrowanie roztworu zawierającego enzym przez asymetryczną membranę w kierunku odwrotnym do normalnego przepływu ultrafiltracyjnego. Ten sposób immobilizacji wymaga dobrania odpowiedniej wielkości porów warstwy podporowej membrany w stosunku do wielkości białka enzymatycznego. Aby zapobiec wymywaniu enzymu z nośnika można dodatkowo stosować czynnik sieciujący, np. aldehyd glutarowy [29].

Innym prostym sposobem immobilizacji jest wykorzystanie zjawiska polaryzacji stężeniowej towarzyszącej procesowi ultrafiltracji. Podczas ultrafiltracji roztworu enzymu stężenie jego cząsteczek przy powierzchni membrany może być na tyle duże, że wytworzona w ten sposób warstwa uzyskuje strukturę żelu [29].

Z najnowszych doniesień dotyczących lipaz immobilizowanych metodą „wtłoczenia” w pory membrany należy wspomnieć o pracy Wang i wsp. [32]. Zaprojektowano membranę o specjalnej mikrostrukturze złożoną z hydrofilowego octanu celulozy i hydrofobowego politetrafluoroetyleny. Nośnik ten wykorzystano do immobilizacji przez ultrafiltrację lipazy *Candida rugosa*. Enzym pułapkowany był na granicy warstwy hydrofilowej i hydrofobowej membrany kompozytowej oraz w gąbczastej części octanu celulozy. Unieruchomienie katalizatora na granicy warstw nośnika jest zbieżne z granicą fazy wodnej i organicznej, co w przypadku lipaz, jest korzystne dla katalizy. Zastosowana technika immobilizacji nie naruszyła struktury enzymu, stąd utrzymywał on wysoką aktywność. Po immobilizacji wzmocniona została enancjoselektywność lipazy w hydrolizie mieszaniny racemicznej ibuprofenu. Czas utraty 50% wyjściowej aktywności białka enzymatycznego sprzężonego z polimerem wynosił 183,3 godziny, co stanowi 373% czasu połowicznego zaniku aktywności natywnego odpowiednika.

OTOCZKOWANIE

Metoda polega na zamknięciu cząsteczek enzymu poprzez otoczenie go różnymi związkami wielkocząsteczkowymi jak polielektrolity, lipidy lub surfaktanty [25, 26, 34].

Zamknięcie enzymu z wykorzystaniem polielektrolitów zachodzi podczas traktowania białka enzymatycznego kolejno polianionem i polikationem (kolejność zależy od ładunku białka). 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. Technika ta jest jednak rzadko stosowana ze względu na znaczne ograniczenia transportu masy, szczególnie gdy

otrzymanie stabilnych i nierozpuszczalnych preparatów wymaga utworzenia większej ilości warstw polielektrolitów [5]. Aktywność immobilizowanych enzymów tą metodą zależy od warunków procedury: wartości pH podczas tworzenia kompleksu, stosunku stężenia polielektrolitu i enzymu oraz masy molowej polielektrolitów [34]. Kompleksowe badania immobilizacji lipaz w układach z polielektrolitami zostały przeprowadzone przez Zaitseva i wsp. [34]. Unieruchomieniu poddano trzy preparaty lipaz: formę nieoczyszczoną, liofilizowaną oczyszczoną *Pseudomonas fluorescens* oraz z trzustki wieprzowej. Stosowane polielektrolity to Na-poli (sulfonian styrenu) jako polianion oraz poli (chlorek dialilometyloamoniowy) jako polikation. Najwyższą aktywność enzymu w kompleksie polielektrolitów (ok. 62–68%) mierzona względem aktywności lipazy w supernatancie stwierdzono dla pH 9 i wysokiej nadwyżce polielektrolitu (100 razy) w stosunku do lipazy. Użycie buforu fosforanowego jako rozpuszczalnika dla lipaz i polielektrolitów pozwoliło uzyskać biokatalizatory o wyższej aktywności niż enzymy natywne. Efekty te najprawdopodobniej spowodowane były zarówno hydrofobowymi, jak i elektrostatycznymi oddziaływaniami pomiędzy lipazą a otoczką polielektrolitów.

ZAMYKANIE LIPAZ W MIKRO (MAKRO) EMULSJACH

Mikro (makro) emulsja to układ obejmujący wodne mikroobszary otoczone cząsteczkami polarnego surfaktanta, którego łańcuchy hydrofobowe kontaktują się z otaczającym niepolarnym rozpuszczalnikiem organicznym [5]. Enzymy zamykane w mikro (makro) emulsiach zwykle znajdują się w fazie wodnej, a białko enzymatyczne wprowadza się do emulsji w formie wodnego roztworu lub liofilizatu. Stosuje się też dodawanie enzymu do roztworu odwróconych miceli [26, 30]. Efektem tych działań jest otrzymanie dynamicznego układu stabilizowanego oddziaływaniami hydrofobowymi, van der Waalsa, elektrostatycznymi i wodorowymi. O stabilności i reaktywności układu decyduje rodzaj i stężenie enzymu, surfaktanta (kosurfaktanta), elektrolitów, substratów i produktów oraz stosunek masy wody do surfaktanta [5, 19, 26]. Zaletami tego systemu są: duża powierzchnia kontaktu faz bez ograniczeń transportu masy, brak agregacji białka, przejrzystość optyczna umożliwiającą bezpośrednie pomiary spektrofotometryczne, zwiększona solubilizacja niepolarnych reagentów, możliwość przesunięcia równowagi termodynamicznej w kierunku produktów, zwiększona stabilność termiczna enzymów. Do największych ograniczeń tej metody należy częsta denaturacja enzymów w obecności surfaktantów i rozpuszczalników organicznych oraz utrudniony odzysk produktu i enzymu [5].

Powyższe układy reakcyjne stosowane są w: asymetrycznej transestryfikacji lipidów, syntezie makrocyclicznych laktonów, hydrolizie tłuszczów, produkcji emulgatorów, syntezach enancjoselektywnych oraz biotransformacjach steroidów [5, 8]. Stąd też najczęściej mikro (makro) emulsje tworzone są z lipazami [8, 19, 20, 21, 26, 30].

W badaniach Persson i wsp. [26] do immobilizacji lipaz zastosowano Span 60 (monostearynian sorbitanu). Aktywność uzyskanych układów w heksanie porównywano ze specyficzną aktywnością (w przeliczeniu na ilość białka enzymatycznego) sproszkowanych preparatów handlowych. Lipazy w ukła-

dzie z surfaktantem były od 1, 9 do 150 razy bardziej aktywne niż ich „surowe” odpowiedniki. Istotnym elementem wpływającym na aktywność katalityczną biokatalizatora była ilość lipazy w układzie z surfaktantem. Przy mniejszym stężeniu enzymu w emulsji aktywność specyficzna lipazy była wyższa, natomiast większa zawartość białka powodowała ograniczenia transportu masy. Z powodu słabej rozpuszczalności w medium reakcyjnym preparaty lipaza – surfaktant tworzyły agregaty. Autorzy publikacji postawili hipotezę, że lipazy adsorbują się na nierozpuszczalnym surfaktancie, którego cząsteczkę możemy traktować jak nośnik do immobilizacji. Zgodnie z tym założeniem oczekiwano, że zwiększenie powierzchni Span 60 zaowocuje większym obsadzeniem białkiem enzymatycznym. Homogenizacja surfaktanta zwiększyła ilość lipazy w układzie z 4, 5 do 9, 2%. Zależność ilości wiązanej białka od stosunku wagowego Span 60/białko wskazywała na adsorpcję wielowarstwową, gdzie enzym wiąże się preferencyjnie z zaadsorbowaną już warstwą lipazy a nie bezpośrednio z nośnikiem.

W pracy tej testowano także unieruchamianie lipaz w systemie odwróconych micel złożonych z AOT/izooktan/woda. AOT jest anionowym surfaktantem o nazwie systematycznej [bis (2-etyloheksylo) sulfobursztynian sodu]. Zastosowanie tego układu pozwoliło przeprowadzić efektywną estryfikację 1-fenylotanolu kwasem kapronowym, ale specyficzna aktywność katalizatora była dużo niższa w porównaniu z lipazą modyfikowaną Span 60.

W badaniach Lopez i wsp. [21] do immobilizacji lipazy z *Candida rugosa* opracowano układ mikroemulsji, w której sieć żelatynową z wodnymi „prętami” stabilizowano warstwą kationowego surfaktanta CTAB (bromek heksadecylometylamoniumowy). Ze względu na stosowaną strukturę mikroemulsji (stały żel), enzym można było wykorzystać w kilku cyklach reakcyjnych, przy czym nie zaobserwowano znaczącego obniżenia aktywności biokatalizatora.

ZAMYKANIE LIPAZ W MIKRO (MAKRO) KAPSUŁKACH

Metoda zamykania lipaz w mikro (makro) kapsułkach jest rzadko stosowana w immobilizacji enzymów [5]. Istota tej metody polega na zamykaniu fazy wodnej zawierającej enzym w półprzepuszczalnej membranie polimerowej, otrzymywanej w wyniku polikondensacji na granicy faz lub międzyfazowej koacerwacji i podwójnego emulgowania [5, 24]. Wielkość kapsułek waha się od 1 µm do kilku milimetrów, przy grubości ścianki od 0, 01 do 1 µm. Wadami tej metody są duże ograniczenia w odniesieniu do wielkości substratu i produktu oraz możliwa denaturacja enzymu w warunkach tworzenia się kapsułek. Membrany mikro (makro) kapsułek najczęściej wytwarzane są na bazie azotanu lub octanu celulozy, poliuretanów, poliamidu, nylonu, polichloroku winylu, polietylenoiminy, poliakrylamidu, karaginanu lub z błony komórkowej erytrocytów [5].

Zespół Matsumoto [24] podjął próbę zamknięcia lipazy *Candida rugosa* w mikrokapsułkach utworzonych przez polimeryzację diwinylobenzenu oraz chlorku wapnia z krzemianem sodu. Rozmiar mikrokapsułek organicznych wynosił 63, 3 µm, a nieorganicznych 34, 7 µm. Pomimo, że szybkość reakcji hydrolizy trimaślanu katalizowana przez lipazy kapsułkowane była niska w porównaniu z enzymem wolnym, to reakcja ta zachodziła efektywnie. Ograniczenie szybkości ka-

talizy w mikrokapsułkach organicznych wywołane było najprawdopodobniej termiczną dezaktywacją enzymu podczas polimeryzacji. Natomiast kapsułkowanie lipazy w polimerze nieorganicznym spowodowało prawie całkowitą utratę aktywności biokatalizatora.

PODSUMOWANIE

Unieruchomienie lipaz ma na celu zwiększenie ich wydajności w procesach przemysłowych poprzez wielokrotne użycie biokatalizatora. Z powodu różnorodności systemów reakcyjnych, w których można wykorzystać lipazy, procedura opracowania preparatu z immobilizowanym enzymem powinna uwzględniać różne punkty widzenia. Sposób przygotowania optymalnej immobilizowanej pochodnej lipazy zależy od typu katalizowanej reakcji. Dodatkowo lipazy, jak większość enzymów, nie są perfekcyjnymi chemicznymi katalizatorami. Mogą być niestabilne i nie osiągać ani maksymalnej aktywności, ani optymalnej enancjo- lub regioselektywności. W związku z tym, immobilizacja lipaz, oprócz dopasowania do określonego projektu przemysłowego, powinna być też narzędziem poprawiającym i optymalizującym niektóre parametry aktywności i stabilności. Ponadto, procedura immobilizacji musi uwzględniać skomplikowany mechanizm akcji katalitycznej tych enzymów. Tak więc opracowanie odpowiedniej techniki unieruchomienia każdej lipazy do różnych biotransformacji jest kombinacją czynników takich jak mechanizm katalizy, wymagania procesowe i aparaturowe oraz konieczność ulepszenia niektórych właściwości enzymu.

Immobilizacja lipaz jest niekończącym się wyzwaniem dla naukowców chemii bio-organicznej.

LITERATURA

- [1] Antczak T., Bugła J., Mastalerz M., Niemiec A., Szeja W., Ślęk M., Galas E.: Immobilizacja unieruchomionych *in situ* lipaz *Mucor* w mikroporowatych kapsułkach alginianowych, *Biotechnologia*, 2000, 4, 51, 142-151.
- [2] Antczak T., Bugła J., Szeja W., Galas E.: Kapsułkowanie immobilizowanych *in situ* endolipaz *Mucor*, *Biotechnologia*, 1999, 1, 44, 173-179.
- [3] Antczak T., Graczyk J.: Lipazy: źródła, struktura i właściwości katalityczne, *Biotechnologia*, 2002, 2, 57, 130-145.
- [4] Betigeri S.S., Neau S.H.: Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads, *Biomaterials*, 2002, 23, 3627-3636.
- [5] Bryjak J.: Immobilizacja enzymów, Część I: Metody konwencjonalne, *Wiadomości Chemiczne*, 2004, 58, 9-10, 691-746.
- [6] Bryjak J.: Immobilizacja enzymów, Część II: Reaktory membranowe, *Wiadomości Chemiczne*, 2004, 58, 9-10, 747-780.
- [7] Buisson P., Pierre A.C.: Immobilization in quartz fiber felt reinforced silica aerogel improves the activity of *Candida rugosa* lipase in organic solvents, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2006, 39, 1-4, 77-82.
- [8] Carvalho C.M.L., Cabral J.M.S.: Reverse micelles as reaction media for lipases, *Biochimica*, 2000, 82, 1063-1071.

- [9] Chaubey A., Parshad R., Koul S., Taneja S.C., Qazi G.: Enantioselectivity modulation through immobilization of *Arthobacter sp.* lipase: Kinetic resolution of fluoxetine intermediate, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2006, 42, 1-2, 39-44.
- [10] Chen J.-P., Hwang Y.-N.: Polyvinyl formal resin plates impregnated with lipase-entrapped sol-gel polymer for flavor ester synthesis, *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, 33, 513-519.
- [11] Chen J.-P., Lin W.-S.: Sol-gel powders and supported sol-gel polymers for immobilization of lipase in ester synthesis, *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, 32, 801-811.
- [12] Dharmstithi S., Luchai S.: Production and immobilization of lipase from *Aeromonas sorbia* harboring a heterologous gene, *J. Ferment. Bioeng.*, 1998, 86, 3, 335-337.
- [13] Fukunaga K., Minamijima N., Sugimura Y., Hang Z., Nakao K.: Immobilization of organic solvent-soluble lipase in nonaqueous conditions and properties of the immobilized enzymes, *J. Biotechnol.*, 1996, 52, 81-88.
- [14] Furukawa S., Ono T., Ijima H., Kawakami K.: Enhancement of activity of sol-gel immobilized lipase in organic media by pretreatment with substrate analogues, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2001, 15, 65-70.
- [15] Giorno L., Drioli E.: Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives [Reviews], *Tibtech*, 2000, 18, 339-349.
- [16] Hasan F., Shah A.A., Hameed A.: Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme Microb. Technol.*, 2006, 39, 235-251.
- [17] Hertzberg S., Kvittingen L., Anthonen T., Skjåk-Bræk G.: Alginate as immobilization matrix and stabilizing agent in two-phase liquid system: Application in lipase-catalysed reactions, *Enzyme Microb. Technol.*, 1992, 14, 42-47.
- [18] Kanwar L., Goswami P.: Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in pure hydrocarbon substrate and its application in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilised lipase, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, 31, 727-735.
- [19] Kierkels J.G.T., Vleugels L.F.W., Gelade E.T.F., Vermeulen D.P., Kamphuis J., Wandrey C., van den Tweel W.J.J.: *Pseudomonas fluorescens* lipase adsorption and kinetics of hydrolysis in a dynamic emulsion system, *Enzyme Microb. Technol.*, 1994, 16, 513-521.
- [20] Lopez F., Cinelli G., Ambrosone L., Colafemmina G., Ceglie A., Palazzo G.: Role of the cosurfactant in water-in-oil microemulsion: interfacial properties tune the enzymatic activity of lipase, *Colloids Surf. A.*, 2004, 237, 49-59.
- [21] Lopez F., Venditti F., Cinelli G., Ceglie A.: The novel hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) based organogel as reactor for ester synthesis by entrapped *Candida rugosa* lipase, *Process Biochem.*, 2006, 41, 1, 114-119.
- [22] Magnin D., Dumitriu S., Magny P., Chornet E.: Lipase immobilization into porous chitoxan beads: activities in aqueous and organic media and lipase localization, *Biotechnol. Prog.*, 2001, 17, 734-737.
- [23] Matsumoto M., Ohashi K.: Effect of immobilization on thermostability of lipase from *Candida rugosa*, *Biochem. Eng. J.*, 2003, 14, 1, 75-77.
- [24] Matsumoto M., Sumi N., Ohmowi K., Kondo K.: Immobilization of lipase in microcapsules prepared by organic and inorganic materials, *Process Biochem.*, 1998, 33, 5, 535-540.
- [25] Okahata Y., Mori T.: Lipid-coated enzymes as efficient catalysis in organic media, *Tibtech*, 1997, 15, 50-54.
- [26] Persson M., Mladenoska I., Wethje E., Adlercreutz P.: Preparation of lipases for use in organic solvents, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, 31, 6, 833-841.
- [27] Plieva F.M., Kochetkov K.A., Singh I., Parmar V.S., Belokon Yu.N., Lozinsky V.I.: Immobilization of hog pancreas lipase in macroporous poly(vinylalcohol)-cryogel carrier for biocatalysis in water-poor media, *Biotechnol. Lett.*, 2000, 22, 551-554.
- [28] Rucka M., Turkiewicz B.: Ultrafiltration membranes as carriers for lipase immobilization, *Enzyme Microb. Technol.*, 1990, 12, 52-55.
- [29] Rucka M., Winnicki T., Żuk J.S.: Membrany (błony) enzymatyczne, *Post. Biochem.*, 1987, 33, 81-92.
- [30] Soni K., Madamwar D.: Ester synthesis by lipase immobilized on silica and microemulsion based organogels (MBGs), *Process Biochem.*, 2001, 36, 607-611.
- [31] Sroka Z.: The activity of lipase from *Rhizopus sp.* in native form and after immobilization on hollow-fiber membranes, *J. Membr. Sci.*, 1994, 97, 209-214.
- [32] Wang Y., Hu Y., Xu J., Luo G., Dai Y.: Immobilization of lipase with a special microstructure in composite hydrophilic CA/hydrophobic PTFE membrane for the chiral separation of racemic ibuprofen, *J. Membr. Sci.*, 2007, 293, 133-141.
- [33] Yadav G.D., Jadhav S.R.: Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non-aqueous medium, *Microporous and Mesoporous Materiale*, 2005, 86, 215-222.
- [34] Zaitsev S.Y., Gorokhova I.V., Kashtigo T.V., Zintchenko A., Dautzenberg H.: General approach for lipases immobilization in polyelectrolyte complexes, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2003, 221, 209-220.

PHYSICAL IMMOBILIZATION OF LIPASES

Part II

IMMOBILIZATION OF LIPASES BY ENTRAPMENT

SUMMARY

This paper summarizes methods of lipases physical immobilization, including entrapment within the membrane and in polymeric matrices, coating, microencapsulation and micro (macro) emulsion system. The influence of immobilization process on changes of enzyme activity, stability, selectivity and other properties important in practical applications are considered.