



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Zastosowanie lipazy B *Candida antarctica* w chemo-enzymatycznej reakcji Baeyera-Villigera

Instrukcja do zajęć laboratoryjnych z przedmiotu
Biotechnologia

Dla studentów kierunku Chemia specjalność Chemia Bioorganiczna

Materiały zostały wykonane w ramach realizowanego na Politechnice Śląskiej projektu nr UDA-POKL.04.01.01-00-114/09-01 pt.: „Unowocześnienie i rozszerzenie oferty edukacyjnej na kierunku Chemia na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej – otwarcie specjalności Chemia Bioorganiczna” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

CEL ĆWICZENIA

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z reakcjami enzymatycznymi na przykładzie chemo-enzymatycznej reakcji Baeyera-Villigera. W reakcji tej lipaza B *Candida antarctica* katalizuje proces generacji "in situ" utleniacza, który następnie utlenia ketony do odpowiednich laktonów. Laktony odznaczają się szerokim spektrum aktywności biologicznej, charakteryzują się one również właściwościami sensorycznymi zapachowymi jak i smakowymi. Wykorzystywane są w przemyśle do produkcji biodegradowalnych polimerów, herbicydów oraz środków powierzchniowo czynnych. Aktualnie prowadzone są badania nad podwyższeniem stabilności enzymów w środowisku reakcyjnym. Jednym z takich czynników, chętnie wykorzystywanych w biokatalizie są ciecze jonowe (IL). Realizowana w ramach ćwiczenia innowacyjna metoda pozwala na stabilizację enzymu oraz wzrost jego aktywności, a także możliwość wielokrotnego użycia biokatalizatora.

PODSTAWY TEORETYCZNE

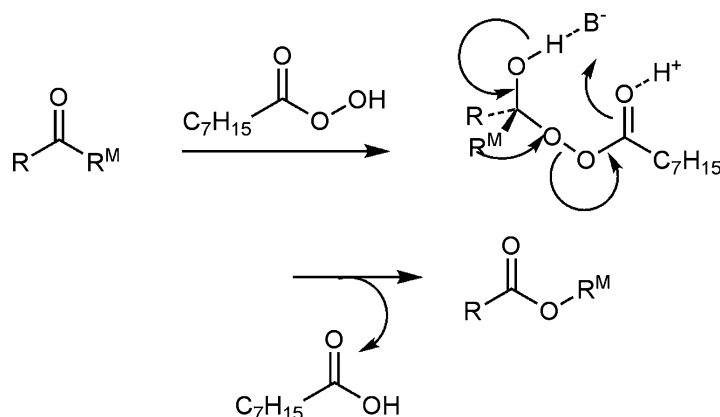
Lipazy (EC. 3.1.) są jednymi z najbardziej wszechstronnych enzymów należących do klasy hydrolaz, podklasa esterazy. Lipazy są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Występują głównie w nasionach i organach wegetatywnych wielu roślin oraz w niektórych mikroorganizmach a także w organizmach ludzi i zwierząt (trzustka, wątroba, ściana żołądka i jelit). Znajdują szerokie zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, mleczarskim, środków czyszczących, kosmetycznym, oleochemicznym i innych. Są to enzymy rozpuszczalne w wodzie oraz termostabilne dlatego też posiadają ogromny potencjał przemysłowy. Optymalne pH działania dla lipaz roślinnych mieści się w granicach od 4,5 do 5,0, natomiast dla lipaz pochodzenia zwierzęcego od 7,0 do 8,0. Ogromny wpływ na efektywności działania ma temperatura, która powinna mieścić się w granicach od 35°C do 37°C.

Lipazy pochodzenia mikrobiologicznego syntezowane przez różne szczepy drożdży, pleśni czy bakterii (*Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Aspergillus niger*, *Bacillus piocyanus*) wykorzystywane są w przemyśle spożywczym do otrzymywania komercyjnie ważnych, niskocząsteczkowych estrów o określonych walorach smakowo-zapachowych obecnych w napojach, sokach, nektarach, budyniach, dżemach i ciastkach.

Lipazy odznaczają się niezwykle dużą aktywnością w zakresie budowy i modyfikacji polimerów wielkocząsteczkowych, dzięki swej zdolności tworzenia wiązań estrowych. Łagodne warunki tego procesu i duża selektywność katalizatora powoduje, iż reakcje tego typu mają znaczną przewagę nad tradycyjnymi polimeryzacjami przebiegającymi w obecności katalizatorów chemicznych i są od nich bardziej atrakcyjne pod względem ekonomicznym oraz ekologicznym. Lipazy katalizują hydrolizę (rozszczepiają wiązanie C-O) w trójglicerydach, podczas gdy w syntezach poliestrów enzymy te działają odwrotnie, czyli zamiast rozszczepiać tworzą nowe wiązanie C-O. Udowodniono, że immobilizowanie lipaz na nośnikach hydrofobowych zwiększa ich aktywność.

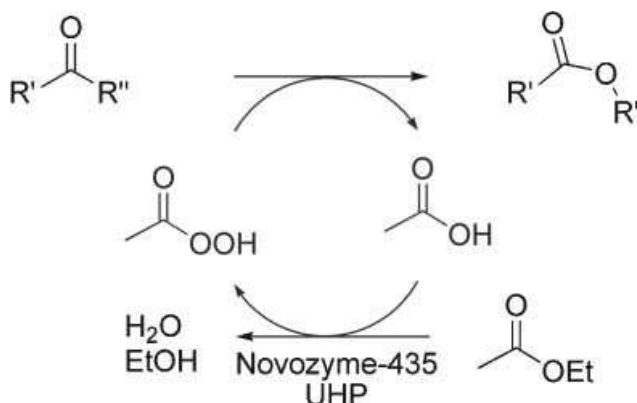
Najczęściej stosowana w biokatalizie lipazą jest immobilizowana lipaza B *Candida antarctica* w skrócie **CALB** znana pod nazwą handlową **Novozyme-435** (nośnik: porowata żywica akrylowa). Novozyme-435 to popularny preparat enzymatyczny do procesów peroksydacji, o czym świadczy jego wysoka stabilność w rozpuszczalnikach organicznych oraz zdolność do przetwarzania *in situ* różnych średnich łańcuchów kwasów karboksylowych do odpowiednich nadtlenokwasów w łagodnych warunkach. Znalazła ona również zastosowanie w chemo-enzymatycznej reakcji utleniania Baeyera-Villigera (BV).

Reakcja Baeyera-Villigera jest narzędziem wykorzystywanym do syntezy laktonów. Charakteryzują się one szerokim spektrum aktywności biologicznej, przy czym najlepiej poznane jest ich działanie antyfidantne, antydnobnoustrojowe oraz cytostatyczne. Pełnią one również funkcje feromonów w świecie drobnooustrojów, owadów i organizmów wyższych. Odznaczają się one także ciekawymi właściwościami sensorycznymi, zwłaszcza zapachowymi. Przykładem są γ -butyrolaktony wykorzystywane jako budulec do syntezy substancji biologicznie czynnych, takich jak alkaloidy, antybiotyki makrocykliczne, ligniny laktonowe, środki przeciwnowotworowe oraz leki zwalczające białaczkę. Jako czynniki utleniające w reakcji BV najczęściej używa się kwasu *m*-chloronadtlenobenzoowego (*m*CPBA), kwasu nadoctowego lub kwasu nadtrójfluorooctowego, które generują znaczną ilość odpadów oraz produktów ubocznych, często są drogie i wybuchowe (schemat 1). Dlatego stosuje się alternatywne metody wykorzystujące inne czynniki utleniające, takie jak H_2O_2 , wodoronadtlenki alkilowe czy tlen wraz z katalizatorami w postaci metali przejściowych, organokatalizatorów lub biokatalizatorów.



Schemat 1. Mechanizm reakcji BV wobec nadkwasu jako czynnika utleniającego.

Szczególnie interesująca metoda otrzymywania laktonów polega na zastosowaniu H_2O_2 oraz lipazy (Novozyme-435) jako czynnika katalizującego reakcję utleniania kwasu karboksylowego obecnego w środowisku reakcji do odpowiedniego nadkwasu. Tak wygenerowany nadkwas jest właściwym czynnikiem utleniającym keton do laktonu (schemat 2). Proces ten jest przyjazny dla środowiska oraz minimalizuje koszty co może mieć ogromne znaczenie dla potencjalnych zastosowań przemysłowych.



Schemat 2. Schemat chemo-enzymatycznego utleniania Baeyera-Villigera.

Novozyme-435 wykorzystano w reakcji utleniania BV szerokiej gamy cyklicznych ketonów w toluenie jako rozpuszczalniku stosując stechiometryczne ilości kwasu mirystynowego w stosunku do ketonu oraz czterokrotny nadmiar 30% nadtlenku wodoru. Wykazano, że nadtlenek wodoru jest toksyczny dla enzymu pomimo, że dodawano go porcjami. Dlatego zastąpiono go kompleksem H_2O_2 z mocznikiem (urea hydrogen peroxide, UHP), który użyto w dziesięciokrotnym nadmiarze dozując w jednej porcji. Reakcja ta była powolna, po 6 dniach otrzymano nieco niższą wydajność laktonów niż w przypadku zastosowania klasycznego utleniacza *m*-CPBA.

Do przeprowadzenia chemo-enzymatycznej reakcji utleniania Baeyera-Villigera wykorzystano również octan etylu w roli prekursora kwasu nadtlenooctowego oraz rozpuszczalnika (Schemat 2). Octan etylu wybrano ze względu na niską temperaturę wrzenia tego związku, zdolność do rozpuszczania wielu substratów, łagodne warunki prowadzenia reakcji oraz brak toksyczności.

Badania nad enzymem lipazą B (CALB) wykazały, że proces immobilizacji tego enzymu na powierzchni stałego nośnika wpływa pozytywnie na stabilność termiczną i odporność na działanie chemicznych odczynników denaturujących oraz wpływa na podwyższenie aktywności tak powstałego biokatalizatora.

Z technologicznego punktu widzenia, unieruchomienie enzymu na nierozpuszczalnym nośniku pozwala na łatwe oddzielenie go od mieszaniny reakcyjnej po zakończeniu procesu. Dzięki temu uzyskuje się czysty produkt a katalizator można wykorzystać w kolejnym cyklu reakcji (praca w systemie ciągłym).

Pierwszą technologią przemysłową, w której zastosowano biokatalizator unieruchomiony, była mikrobiologiczna produkcja kwasu octowego. Do dzisiaj w octowniach stosuje się metodę ociekową, w której wykorzystywane są bakterie z rodzaju *Acetobacter* zaadsorbowane na powierzchni porowatego materiału, którym są najczęściej wióry bukowe. Złoża biologiczne z unieruchomioną biomasą wykorzystywane są również w technologii oczyszczania ścieków. Stosowana w oczyszczalniach metoda osadu czynnego bazuje na zdolności mikroorganizmów do samoagregacji i wzrostu w postaci kuleczek lub kłacek biomas.

Podsumowując, technologia unieruchamiania biokatalizatorów niesie za sobą ogromne korzyści, a mianowicie:

- biokatalizator można łatwo usunąć ze środowiska reakcyjnego,
- biokatalizator może być wielokrotnie wykorzystany a recykling nie powoduje spadku aktywności,
- immobilizacja zwiększa termostabilność enzymu poprzez stabilizację trzeciorzędowej struktury białka,
- wydłużenie aktywności i stabilności biokatalizatora, ponieważ nośnik może działać ochronnie w przypadku zmian pH, temperatury i składu podłoża,
- zwiększenie gęstości komórek w przeliczeniu na jednostkę objętości układu reakcyjnego, co prowadzi do wyższej produktywności, skrócenia czasu reakcji,
- lepsze wykorzystanie substratu, w związku z czym proces przebiega z wyższą wydajnością, możliwość prowadzenia procesów ciągłych,
- ograniczenie występowania zakażeń mikrobiologicznych,
- obniżenie pracochłonności i kosztów procesu, ponieważ biokatalizator wykorzystywany jest przez długi okres czasu.

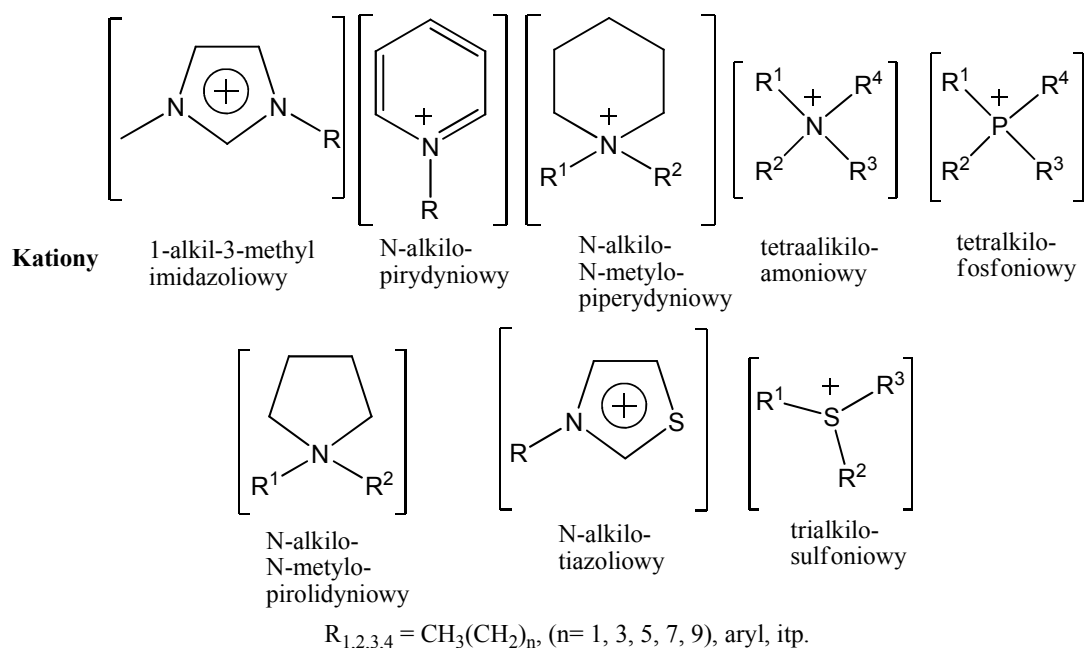
Do unieruchamiania lipaz może być wykorzystane kilka technologii na przykład:

- **Adsorpcja na nierozpuszczalnych nośnikach** np. na cząsteczkach polimerów. Polega na zastosowaniu procesu adsorpcji komórek na nośniku, wykorzystując oddziaływania elektrostatyczne, jonowe, kowalencyjne lub hydrofobowe.
- **Kowalencyjne związanie z nośnikiem** np. na powierzchni żywicy epoksydowej. Wytworzenie wiązań chemicznych między określonymi centrami aktywnymi enzymu lub składników ściany komórkowej mikroorganizmów a odpowiednim nośnikiem. Mogą tworzyć się wiązania C-C, C-N, peptydowe, estrowe lub dzięki wprowadzeniu przez biokatalizator grup funkcyjnych (ligandów) na powierzchnie nośnika.
- **Sieciowanie związkami wielofunkcyjnymi** np. za pomocą aldehydu glutarowego. Działanie na biokatalizatory związkami chemicznymi, w wyniku czego powstaje żelowy produkt. Aktywność preparatu zależy od stopnia usieciowania. Jeżeli stężenie czynnika sieciującego jest zbyt wielkie, to aktywność spada. Mniejsze straty zachodzą z zastosowaniem białek inertnych (albuminy, żelatyny). Metoda ma zastosowanie wspomagające po przeprowadzeniu właściwej immobilizacji.
- **Inkluzja** (pułapkowanie) – zamykanie komórek w matrycy polimeru. Stosowane polimery to alginiany, kappa-karageniany, chitozan, agar, pektyna, żywice epoksydowe, poliakryloamid.
- **Nanoszenie na hydrofilowe materiały nieorganiczne** np. takiego typu jak silikażel.

W czasie procesu technologicznego immobilizowany biokatalizator stopniowo traci swoją produktywność, co spowodowane jest:

- wymywaniem enzymu ze złoża oraz rozpuszczaniem się lub ścieraniem matrycy,
- utratą aktywności na skutek zatruwania lub denaturacji enzymu,
- pogorszeniem się warunków kontaktu substratu z enzymem na skutek zanieczyszczenia i zatkania się porów złoża lub mechanicznego zgniatania matrycy,
- zanieczyszczeniem mikrobiologicznym

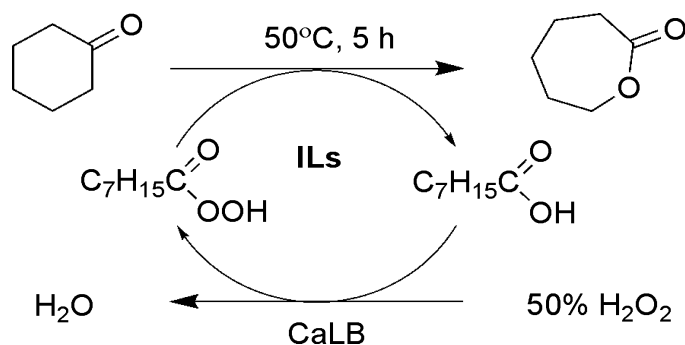
Gwałtowny rozwój przemysłu chemicznego przypadający na wiek XIX i XX pozostawił w spadku znaczącą degradację środowiska naturalnego. Spowodowało to intensywny rozwój badań nad otrzymaniem uniwersalnych przyjaznych dla środowiska naturalnego rozpuszczalników. Na przełomie XX i XXI wieku nastąpił intensywny wzrost zainteresowania cieczami jonowymi (ILs) czyli substancjami ciekłymi składającymi się wyłącznie z jonów. ILs to sole, które topią się poniżej 100°C (373,15 K) posiadają szereg interesujących właściwości, dzięki którym znajdują coraz to szersze zastosowania w przemyśle chemicznym, a także w innych gałęziach przemysłu. W porównaniu do powszechnie stosowanych rozpuszczalników organicznych posiadają one korzystne właściwości fizyczne, takie jak niska prężność par, a więc i znikoma lotność, wysoka temperatura wrzenia, która jest jednocześnie temperaturą ich rozkładu oraz niska temperatura topnienia, dzięki czemu występują w stanie ciekłym w szerokim zakresie temperatur. Inne ich cechy to wysoka stabilność termiczna oraz zdolność rozpuszczania szerokiej gamy związków chemicznych, niepalność oraz możliwość recyklu. Poprzez dobór anionu, jak również długości łańcucha w kationie można sterować ich hydrofilowością i hydrofobowością.



Aniony	niemieszalne z wodą	rozpuszczalne w wodzie
$[\text{PF}_6]^-$	$[\text{BF}_4]^-$	$[\text{CH}_3\text{CO}_2]^-$
$[\text{NTf}_2]^-$	$[\text{OTf}]^-$	$[\text{CF}_3\text{CO}_2]^-$
	$[\text{N}(\text{CN})_2]^-$	Br^- , Cl^-
		$[\text{Al}_2\text{Cl}_7]^-$, $[\text{AlCl}_4]^-$

Schemat 3. Struktura cieczy jonowych.

Dzięki swoim właściwościom ILs znalazły zastosowanie również jako medium w chemo-enzymatycznej reakcji utleniania Baeyera-Villigera (Schemat 4).



Schemat 4. Chemo-enzymatyczna reakcja BV w cieczach jonowych.

Reakcja w środowisku cieczy jonowych z zastosowaniem Novozymu-435 będzie znacznie szybciej niż z zastosowaniem konwencjonalnych rozpuszczalników takich jak octan etylu. W reakcji utleniania cykloheksanonu za pomocą UHP w środowisku octanu etylu otrzymano lakton z wydajnością 80%, natomiast w środowisku cieczy jonowej czas reakcji skrócił się do 5h. Świadczy to o tym iż ciecze jonowe stabilizują oraz aktywują biokatalizator poprzez tworzenie wiązań wodorowych i koordynację substratu.

Podsumowując, ciecze jonowe to alternatywne medium dla reakcji enzymatycznych. Wiąże się to przede wszystkim ze wzrostem stabilności oraz aktywności enzymów w ich środowisku. Struktura ILs to rozbudowana sieć kationów i anionów powiązanych wiązaniami

wodorowymi, w którą włączenie innych cząsteczek może prowadzić do powstania polarnych i niepolarnych regionów. Pozwala to na ochronę enzymu. Niezwykłe uporządkowanie supramolekularnych struktur ILs w fazie ciekłej może działać jak „forma” utrzymująca aktywną strukturę 3-D enzymu w wodnym nanoo-otoczeniu, co nie pozwala na zmiany struktury czwartorzędowej białka. Dodatkowo ciecze jonowe są dobrymi rozpuszczalnikami dla organicznych reagentów. Po zakończeniu biotransformacji produkty reakcji można w łatwy sposób wydzielić z cieczy jonowej poprzez ekstrakcję za pomocą klasycznego rozpuszczalnika. Enzym pozostaje „uwięziony” w cieczy jonowej i układ taki można użyć w kolejnym cyklu reakcji.

PRZEBIEG ĆWICZENIA

1. Reakcja chemo-enzymatycznego utleniania Baeyera-Villigera 2-metylocykloheksanonu wobec NOVOZYME-435 w środowisku cieczy jonowej ([BMIM]NTf₂)

Odczynniki:

- 2-metylocykloheksanon,
- kwas oktanowy
- imidek bis(trifluorometanosulfonylo) 1-butyl-3-metylimidazoliowy ([BMIM]NTf₂)
- NOVOZYME-435
- 50% r-r H₂O₂

Szkło i inne materiały oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- Kolbka jednoszyjna na 25 ml
- pipeta miarowa
- gumowa septa
- cylinder miarowy
- strzykawka miarowa z igłą
- wytrząsarka
- łaźnia grzewcza (45°C)

Wykonanie ćwiczenia

W kolbie na 25 ml należy umieścić 0,5 mmol ketonu, 1 ml cieczy jonowej (imideku bis(trifluorometanosulfonylo) 1-butyl-3-metylimidazoliowego) oraz 1 mmol kwasu oktanowego, następnie wprowadzić 0,1 g immobilizowanej lipazy (Novozyme-435). Wkrapla się 50% roztwór H₂O₂ (1 mmol). Kolbkę należy zabezpieczyć gumową septą i umieścić na wytrząsarce z łaźnią grzewczą. Mieszaninę reakcyjną doprowadzić do temperatury 45-50° C. W trakcie reakcji (po 1h, 2h i 3h) pobiera się próbki do analizy za pomocą chromatografii gazowej. Próbki o objętości 100 µl, rozcieńcza się 300 µl octanu etylu i analizuje na kolumnie kapilarnej SUPELCOWAXTM10 (30m×0,2mm×0,2µm).

2. Reakcja chemo-enzymatycznego utleniania Baeyera-Villigera 2-metylocykloheksanonu wobec natywnej lipazy B *Candida antarctica* w środowisku cieczy jonowej ([BMIM]NTf₂)

Odczynniki:

- 2-metylocykloheksanon,
- kwas oktanowy
- imidek bis(trifluorometanosulfonylo) 1-butyl-3-metylimidazoliowy ([BMIM]NTf₂)
- lipaza B *Candida antarctica*
- 50% r-r H₂O₂

Szkło i inne materiały oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- Kolbka jednoszyjna na 25 ml
- pipeta miarowa
- gumowa septa
- cylinder miarowy
- strzykawka miarowa z igłą
- wytrząsarka
- łaźnia grzewcza (45°C)

Wykonanie ćwiczenia

W kolbie na 25 ml należy umieścić 0,5 mmol ketonu, 1 ml cieczy jonowej (imidku bis(trifluorometanosulfonylo) 1-butyl-3-metylimidazoliowego) oraz 1 mmol kwasu oktanowego, następnie wprowadzić 0,1 g natywnej lipazy B *Candida antarctica*. Wkrapla się 50% roztwór H₂O₂ (1 mmol). Kolbkę należy zabezpieczyć gumową septą i umieścić na wytrząsarce z łaźnią grzewczą. Mieszaninę reakcyjną doprowadzić do temperatury 45-50° C. W trakcie reakcji (po 1h, 2h i 3h) pobiera się próbki do analizy za pomocą chromatografii gazowej. Próbki o objętości 100 µl, rozcieńcza się 300 µl octanu etylu i analizuje na kolumnie kapilarnej SUPELCOWAXTM10 (30m×0,2mm×0,2µm).

3. Reakcja chemo-enzymatycznego utleniania Baeyera-Villigera 2-metylocykloheksanonu wobec NOVOZYME-435 w środowisku klasycznego rozpuszczalnika (toluen)

Odczynniki:

- 2-metylocykloheksanon,
- Kwas oktanowy
- Toluen
- NOVOZYME-435
- 50% r-r H₂O₂

Szkło i inne materiały oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- Kolbka jednoszyjna na 25 ml
- szkiełko wagowe
- pipeta miarowa
- gumowa septa
- cylinder miarowy

- strzykawka miarowa z igłą
- wytrząsarka

Wykonanie ćwiczenia

W kolbie na 25 ml należy przygotować roztwór ketonu (0,5 mmol) w toluenie (1,5 ml). Następnie do mieszaniny wkrapla się 50% roztwór H_2O_2 (1 mmol) po czym miesza się ok. minuty oraz wprowadza 0,1 g immobilizowanej lipazy (NOVOZYME-435).

Kolbę zamyka się szczelnie gumową septą i umieszcza na wytrząsarce. Reakcję należy monitorować za pomocą chromatografii gazowej. W trakcie reakcji (po 1h, 2h i 3h) pobiera się próbki do analizy za pomocą chromatografii gazowej. Próbkę o objętości 100 μ l, rozcieńcza się 300 μ l toluenem i analizuje na kolumnie kapilarnej SUPELCOWAXTM10 (30m $\times$ 0,2mm $\times$ 0,2 μ m).

4. Reakcja chemicznego utleniania Baeyera-Villigera 2-metylocykloheksanonu za pomocą kwasu m-chloronadtlenobenzoesowego w środowisku klasycznego rozpuszczalnika organicznego

Odczynniki:

- 70% kwas m-chloronadtlenobenzoesowy,
- chlorek metylenu,
- 2-metylocykloheksanon,

Szkło i inne materiały oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- trójszyjna kolba kulista 50 ml
- termometr
- wkraplacz
- szkiełko wagowe
- mieszadło magnetyczne
- chłodnica Lebiega
- kolbka stożkowa 25 ml
- pipeta miarowa

Wykonanie ćwiczenia

W trójszyjnej kolbie okrągłodennej o pojemności 50 ml, zaopatrzonej w wkraplacz, chłodnicę, termometr i mieszadło magnetyczne umieszcza się 70% kwas m-chloronadtlenobenzoesowy (2,25 mmol) oraz 10 ml chlorku metylenu. Do kolbki stożkowej o pojemności 25 ml naważa się 2-metylocykloheksanon (1,5 mmol), rozpuszcza się w 5 ml chlorku metylenu i przenosi się do wkraplacza. Zawartość kolby trójszyjnej intensywnie miesza się i wkrapla roztwór 2-metylocykloheksanonu. Następnie zawartość kolby miesza się w temperaturze pokojowej. Reakcję należy monitorować za pomocą chromatografii gazowej. W trakcie reakcji (po 15, 30, i 60 minutach) pobiera się próbki do analizy za pomocą chromatografii gazowej. Próbkę o objętości 100 μ l, rozcieńcza się 300 μ l octanu etylu i analizuje na kolumnie kapilarnej SUPELCOWAXTM10 (30m $\times$ 0,2mm $\times$ 0,2 μ m).

PRZYGOTOWANIE DO ZAJĘĆ

1. Przeczytaj uważnie instrukcję i dokładnie przeanalizuj czynności oraz techniki laboratoryjne opisane w części eksperymentalnej.
2. Zapoznaj się z zagrożeniami związanymi z stosowanymi odczynnikami oraz poszczególnymi czynnościami wykonywanymi na zajęciach (karty charakterystyk)
2. Zwróć uwagę czy znasz następujące pojęcia: enzym, bioreaktor, katal, unit, frakcjonowanie, regioselektywność, prawo Lamberta-Beera, absorbancja
3. Zastanów się czy wiesz:
 - [Patrz instrukcje na stronie Chemii Bioorganicznej](#)

OPRACOWANIE WYNIKÓW

W celu opracowania sprawozdania należy:

- a) przygotować krótki wstęp, w którym opisany zostanie cel pracy, wady i zalety stosowania chemo-enzymatycznej reakcji utleniania Baeyera-Viligera z udziałem natywnej i immobilizowanej lipazy, jako biokatalizatora.
- b) zamieścić opis przebiegu prowadzonych reakcji,
- c) na podstawie danych otrzymanych z chromatografii gazowej zamieścić obliczenia dotyczące konwersji i wydajności reakcji, wykres stopnia konwersji od czasu reakcji.
- d) przedstawić podsumowanie oraz wnioski dotyczące prowadzonych badań; podać przykłady innych związków, które również można otrzymać w procesach przemysłowych z zastosowaniem Novozyme-435.

LITERATURA

- A. Chmiel, S. Grudziński, *Biotechnologia i chemia antybiotyków*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa (1998).
- A. Chmiel, *Biotechnologia. Podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa (1998).
- M. Turkiewicz, K. Makowski, *Nowe metody immobilizacji enzymów* (2004), *Biotechnologia*, 3 (66), 113-128.
- B. Krajewska, *Application of chitin- and chitosan-based materiale for enzyme immobilizations: a review* (2004), *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 126-139.
- E. Lasoń, J. Ogonowski, *Lipaza-charakterystyka, zastosowanie, sposoby immobilizacji*, CHEMIK (2010), (64), 2, 97-102.
- J. Synowiecki, S. Wołosowska, *Otrzymywanie i niektóre zastosowania unieruchomionych enzymów*, BIOTECHNOLOGIA 2, (2007), (77), 7-26.
- M. Ren, B. Meunier, *100 Years of Baeyer-Villiger Oxidation*, *European Journal of Organic Chemistry*, (1999), 737-750.