

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

## IMMOBILIZACJA KOWALENCYJNA LIPAZ®

*Lipazy stanowią bardzo ważną grupę enzymów o wszechstronnych możliwościach wykorzystania w procesach biotechnologicznych. W artykule przedstawiono problematykę immobilizacji lipaz poprzez wiązanie kowalencyjne z nośnikiem oraz sieciowanie. Scharakteryzowano różne nośniki pochodzenia organicznego i nieorganicznego oraz oceniono ich przydatność w unieruchamianiu lipaz.*

*Znajomość poruszanych w artykule zagadnień może pomóc w planowaniu eksperymentów związanych z unieruchamianiem lipaz metodami chemicznymi.*

### WPROWADZENIE

Lipazy (EC 3.1.1.3) zdefiniowano zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Unii Biochemicznej jako hydrolazy estrów glicerolowych. Pozytywne wyniki badań ostatnich dziesięciu lat dotyczące poszukiwania nowych źródeł pozyskiwania lipaz, poznania ich właściwości oraz opracowania efektywnych metod ich otrzymywania zwiększyły zainteresowanie tą grupą biokatalizatorów. Perspektywy zastosowania lipaz w procesach biotechnologicznych są szerokie ze względu na aktywność katalityczną tych enzymów, zarówno w wodzie, jak i w rozpuszczalnikach niewodnych. Enzymy lipolityczne mogą w tych środowiskach katalizować reakcje hydrolizy i syntezy estrów, amidów, estrów tiolowych i wodoronadtlenków. Dodatkowym atutem niektórych lipaz jest ich regio- i enancjoselektywność [1,2].

Główne zastosowanie przemysłowe tych enzymów dotyczy wykorzystania ich jako składników detergentów. Preparaty lipaz stosowane są ponadto w produkcji leków, związków smakowo-zapachowych, lipidów strukturyzowanych, produktów specjalnego przeznaczenia i bioemulgatorów [2].

Potencjalne możliwości lipaz nie są jednak w pełni wykorzystane i tylko niewielka część reakcji katalizowanych przez te enzymy znalazła zastosowanie w skali przemysłowej. Wynika to z wysokich kosztów otrzymania i oczyszczenia biokatalizatora, trudności w odzyskaniu enzymu z mieszaniny reakcyjnej lub/oraz drogiej procedur oczyszczenia produktu z domieszek białkowych. Czynnikiem ograniczającym zastosowanie przemysłowe enzymów jest ich wrażliwość na podwyższoną temperaturę i obecność rozpuszczalników organicznych. Część z tych problemów można rozwiązać wykorzystując w procesach przemysłowych enzymy w formie immobilizowanej.

#### Metody immobilizacji

Techniki unieruchamiania białek enzymatycznych ze względu na charakter wiązania można podzielić na procedury wykorzystujące metody chemiczne, między innymi obejmujące wiązania kowalencyjne, oraz techniki opierające się na oddziaływaniach fizycznych. W celu unieruchomienia białka enzymatycznego można wybrać jedną z wielu znanych metod immobilizacji (Tab.1). Wybór techniki jest jednak niezwykle trudny, szczególnie gdy ma ona na względzie praktyczne zastosowanie preparatu immobilizowanego.

**Tabela 1.** Metody unieruchamiania enzymów

Metody immobilizacji	
chemiczne	fizyczne
wiązanie kowalencyjne z nośnikiem	wiązanie adsorpcyjne z nośnikiem
sieciowanie rozpuszczonego białka	wiązanie specyficzne z nośnikiem
sieciowanie agregatów białkowych	zamknięcie w sieci polimeru
sieciowanie kryształów białka	zamknięcie w mikro(makro)emulsjach
	kapsułkowanie
	otoczkowanie

Biorąc pod uwagę wpływ proponowanych technik na strukturę białka enzymatycznego wydaje się, że metody fizyczne nie wywierają istotnego wpływu na formę enzymu. Natomiast związanie kowalencyjne białka z nośnikiem może prowadzić do pewnej modyfikacji enzymu, a w przypadku techniki sieciowania może dochodzić do istotnej modyfikacji chemicznej immobilizowanego białka.

**Celem analizy zaprezentowanej w artykule jest przedstawienie problematyki immobilizacji tj. unieruchamiania białek enzymatycznych lipaz metodami chemicznymi poprzez wiązanie kowalencyjne z nośnikiem oraz sieciowanie.**

### WIĄZANIE KOWALENCYJNE LIPAZ Z NOŚNIKIEM

Wyżej wymieniona technika polega na utworzeniu wiązania kowalencyjnego pomiędzy grupami funkcyjnymi białka i nośnika. Wskazane jest, aby w procesie immobilizacji wykorzystywać takie grupy funkcyjne enzymu, które są podatne na modyfikację chemiczną i nie są zaangażowane w proces katalizy oraz nie biorą bezpośredniego udziału w stabilizacji struktury III- i IV- rzędowej. Najczęściej w wiązaniu kowalencyjnym białka uczestniczą ugrupowania tiolowe cysteiny, fenolowe tyrozyny, imidazolowe histydyny i aminowe lizyny [3].

Rozpatrując grupy funkcyjne nośników, do wytworzenia wiązania kowalencyjnego z białkiem wykorzystywać można: grupy aminowe, hydroksylowe, karboksylowe, winylosulfonowe, winyloketonowe, oksiranowe, aldehydowe, halogenkowe, tiolowe oraz imidoestrowe. Obecność grup funkcyjnych na/w nośniku wynika albo z jego składu, albo grupy te wprowadzane są na etapie syntezy. W pozostałych przypadkach nośnik musi być poddany funkcjonalizacji metodami chemicznymi lub fizycznymi. O efekcie końcowym immobilizacji decyduje ilość, jakość i rozłożenie grup funkcyjnych na/w nośniku.

### **Materiały do unieruchamiania enzymów i stawiane im wymagania**

Dobór nośnika jest jednym z istotnych czynników wpływających na jakość produktu finalnego. Cechy charakteryzujące „idealny” nośnik to: stabilność chemiczna, fizyczna, biologiczna i mechaniczna, dostępność, niska cena, łatwość regeneracji, biodegradowalność, obojętność względem substratów i produktów reakcji, obecność grup funkcyjnych umożliwiających związanie enzymu, nietoksyczność. Nie opracowano dotychczas idealnego nośnika spełniającego wszystkie wymienione warunki. Odpowiedni w danym przypadku nośnik dobiera się doświadczalnie w połączeniu z wyborem techniki immobilizacji i warunków procesowych.

Nośniki można podzielić w zależności od: formy i kształtu materiału (kulki, proszki, tabletki, filmy, włókna, kapilary itp.), jego porowatości oraz rodzaju materiału (nieorganiczny, organiczny i hybrydowy).

### **Wiązanie kowalencyjne lipaz z nośnikami organicznymi pochodzenia naturalnego**

Wiele prac badawczych poświęcono stabilizacji lipaz poprzez unieruchomienie ich na nośnikach organicznych pochodzenia naturalnego bazujących na polisacharydach [4-12]. Matryce te posiadają dużą ilość grup aktywnych chemicznie, stosunkowo dużą powierzchnię właściwą i znaczącą pojemność sorpcyjną. Mają charakter hydrofilowy, co jest często czynnikiem korzystnym, są biodegradowalne. Cechy ujemne tego typu materiałów to głównie brak odporności na krańcowe wartości pH oraz niestabilność mikrobiologiczna.

Interesującym przykładem jest immobilizacja lipaz z *Candida cylindraceae* i *Mucor miehei* na celulozie aktywowanej chlorkiem tytanu [8]. Dzięki związaniu kowalencyjnemu białka enzymatycznego z nośnikiem poprzez mostki tytanowe i sieciowaniu aldehydem glutarowym otrzymano biokatalizatory o bardzo wysokiej aktywności w porównaniu z enzymem natywnym (aktywność lipazy z *C. cylindraceae* 125% a *M. miehei* 155%). Układy te charakteryzowały się też dużą stabilnością, ponieważ ich aktywność po 7 cyklach reakcji syntezy estrów utrzymywała się nadal na wysokim poziomie (ponad 70 % dla lipazy z *M. miehei* oraz 88% dla lipazy z *C. cylindraceae*). Ze względu na potrzebę użycia lipaz do katalizy reakcji w różnych środowiskach, zarówno w systemach wodnych, jak i niewodnych, podjęto próby immobilizacji lipazy z *C. cylindraceae* na nośnikach hydrofobowych. Były to handlowe preparaty „Accurel” EP- 400 i EP-100 wykonane z polietylenu i polipropylenu. Unieruchomienie lipazy oparte na fizycznej adsorpcji dało preparaty o niższej aktywności i stabilności w porównaniu z immobilizacją chemiczną.

Popularnym materiałem wykorzystywanym do immobilizacji lipaz jest chitozan [4,7,9]. Hung i wsp. [9] opracowali nowatorską metodę unieruchomienia lipazy z *Candida rugosa* poprzez grupy aminowe nośnika (sieciowanie aldehydem glutarowym) oraz grupy hydroksylowe aktywowane karbodiimidem – czynnikiem używanym zwykle do aktywacji grup karboksylowych. Ta „podwójna” immobilizacja pozwoliła uzyskać biokatalizator o szerszym zakresie tolerancji pH, wyższej odporności temperaturowej oraz stabilności operacyjnej. Zdolność karbodiimidu do aktywacji grup –OH chitozanu potwierdzono także w innych badaniach dotyczących lipazy *Candida rugosa* immobilizowanej na suchych i wilgotnych kuleczkach chitozanu [7]. W ustalonych optymalnych

warunkach reakcji hydrolizy (substrat – palmitynian *p*-nitrofenylu) enzym unieruchomiony na zwilżonym nośniku wykazał 389% tzw. względnej aktywności specyficznej w odniesieniu do enzymu natywnego. Według autorów przyczyną wzrostu aktywności enzymu nie była zastosowana tutaj technika wiązania kowalencyjnego, ale dodatkowo wyeksponowanie podczas immobilizacji hydrofobowego obszaru lipazy otaczającego jej miejsce katalityczne. Biokatalizator ten był stabilny podczas wielokrotnego użycia oraz przechowywania (30 dni, 25°C), a nawet zaobserwowano wzrost aktywności o ok. 2%.

Do unieruchamiania lipaz stosowana jest również agaroz [6,10-12]. Zespół Moreno [11] zajmował się kowalencyjną immobilizacją oczyszczonej lipazy *Candida rugosa* (frakcja A i B) na kuleczkach agarozy (Bio-Gel) aktywowanej chlorkiem tosyłu i krzemionce aktywowanej trichlorotriazyną. Dla porównania unieruchomiono handlowo dostępną lipazę tą samą metodą i z wykorzystaniem tych samych nośników. W przypadku preparatu handlowego (nieoczyszczonego) na nośniku zachodziła niepożądana adsorpcja. Oczyszczone formy A i B lipazy nie adsorbowały się, co mogło być spowodowane usunięciem, podczas oczyszczania, cukru – głównie laktozy, a także niskocząsteczkowych peptydów. Zdaniem autorów, dodatki te mogły poprzez tworzenie wiązań wodorowych oddziaływać z grupami hydroksylowymi nośników. Uzyskane biokatalizatory nie obniżały swej aktywności przez co najmniej miesiąc przechowywania w 4°C, miały wzmocnioną odporność termiczną, a także zwiększoną enancjoselektywność w reakcji hydrolizy 2-chloropropionianu metylu.

W innej pracy, dotyczącej także lipazy *Candida rugosa* i tej samej procedury unieruchomienia enzymu, Moreno i wsp. [10] rozważali wpływ właściwości nośnika, jego charakteru hydrofilowo / hydrofobowego na aktywność systemów z lipazą. Pomimo zbliżonej ilości białka związanego z nośnikami (33 – 40%), lipaza unieruchomiona na agarozie charakteryzowała się wyższą aktywnością (70-75% aktywności enzymu natywnego) niż lipaza związana z krzemionką (40 – 50% aktywności natywnego odpowiednika). Oczyszczone frakcje A i B lipazy były mniej stabilne termicznie w porównaniu z handlowym preparatem. Przyczyną tego zjawiska, wg autorów był proces oczyszczania enzymu i usunięcie węglowodanów.

### **Immobilizacja lipaz na nośnikach z polimerów syntetycznych**

Polimery syntetyczne stanowią najliczniejszą grupę nośników stosowanych w immobilizacji lipaz [5,13-27]. Na etapie syntezy tych materiałów można regulować ich porowatość, średnicę porów, pęcznienie, a także wprowadzać grupy funkcyjne. Nośniki syntetyczne mogą posiadać różnorodne formy i kształty, są łatwo dostępne i stosunkowo tanie. Ich charakter hydrofobowy, działający niekorzystnie na strukturę III-rzędową większości enzymów [3], w przypadku lipaz może być czynnikiem korzystnym, szczególnie podczas unieruchamiania lipaz poprzez adsorpcję. Wadami polimerów syntetycznych jest brak biodegradowalności i ograniczona możliwość regeneracji.

Do immobilizacji lipazy z *Candida rugosa* zastosowano poliamid o nazwie handlowej Nylon 6 [18,24]. Badano kinetykę reakcji estryfikacji długołańcuchowych kwasów tłuszczowych alkoholami o różnej długości łańcucha węglowodorowego [24] oraz kierowanej syntezy estrów zapachowych w reaktorze okresowym i z przepływem ciągłym [18]. W obu

przypadkach uzyskano stabilne systemy z biokatalizatorem aktywnym przez długi okres czasu.

Obserwuje się systematyczny rozwój metod kowalencyjnego łączenia enzymów z polimerami odwracalnie rozpuszczalnymi – nierozpuszczalnymi w wodzie. Polimery te posiadają unikatową właściwość zmiany rozpuszczalności wywołanej niewielką zmianą warunków fizycznych jak wartości pH, temperatury, siły jonowej, pola elektrycznego czy magnetycznego albo kilku wymienionych czynników jednocześnie [3,20,23]. Spośród licznej grupy polimerów, największym zainteresowaniem w immobilizacji lipaz cieszą się polimery, których rozpuszczalność zależy od zmian wartości pH. Najczęściej stosowanym polimerem wrażliwym na zmiany wartości pH środowiska jest kopolimer kwasu metakrylowego i metylometakrylanu znany pod nazwą handlową Eudragit S-100 [23]. Proces łączenia kowalencyjnego lipazy z *Chromobacterium viscosum* z grupami karboksylowymi Eudragit S z udziałem karbodiimidu prowadzono przy pH 5,5, w którym preparat jest całkowicie rozpuszczalny w wodzie. Obniżenie wartości pH do 4,5 powodowało wytrącenie preparatu i możliwość oddzielenia nośnika z lipazą od mieszaniny reakcyjnej. W pracy Zhu i wsp. [25] przygotowano wrażliwy na zmiany pH terpolimer kwasu metakrylowego, akrylamidu i bezwodnika kwasu maleinowego. Stosowano 5 nośników różniących się udziałem wymienionych składników. Wartość krytyczna pH tych polimerów mieściła się w zakresie 2,4 do 3,9. W porównaniu z enzymem natywnym, aktywność i enancjoselektywność immobilizowanej na tych nośnikach lipazy z *Candida rugosa* (reakcja hydrolizy estru ketoprofenu) wzrosły odpowiednio 1,5 oraz 8,7-krotnie. Po 8 cyklach katalizy unieruchomiony enzym posiadał 46% aktywności w porównaniu do aktywności wyjściowej, a jego enancjoselektywność pozostała niezmienną.

Zespół Liu przedstawił innowację w zakresie unieruchomienia lipaz na nośnikach magnetycznych [20]. Materiał do kowalencyjnej immobilizacji przygotowano na drodze polimeryzacji suspensyjnej metakrylanu i diwinylobenzenu w obecności nanocząstek magnetycznych pokrytych kwasem oleinowym. Powierzchnię nośnika funkcjonalizowano poprzez aminolizę, a następnie przeprowadzono aktywację aldehydem glutarowym. Zastosowanie tego typu nośnika, poza utrzymywaniem biokatalizatora w mieszaninie reakcyjnej, dało możliwość jego łatwego wydzielenia poprzez użycie zewnętrznego pola magnetycznego. Immobilizowana w ten sposób lipaza *Candida cylindraceae*, w porównaniu z enzymem natywnym, charakteryzowała się lepszą stabilnością termiczną i operacyjną – po 6 cyklach reakcji utrzymywała 75,6% wyjściowej aktywności.

Dużym zainteresowaniem cieszy się metoda wiązania kowalencyjnego lipaz z Eupergitem C – nośnikiem opartym na metakrylanie glicydydu [19,21,27]. Do immobilizacji enzymów na tym nośniku wykorzystuje się grupy białka enzymatycznego (aminowe, sulfhydrylowe, hydroksylowe), które mogą być istotne dla akcji katalitycznej. Stąd często trudno uzyskać stabilne wiązanie i jednocześnie wysoką aktywność enzymu. Interesującą alternatywą jest sprzężenie kowalencyjne lipaz z nośnikiem przez ich części cukrowe, które nie wpływają na aktywność enzymu [15,19]. Lipazę z *Candida rugosa* unieruchomiono na nośniku aktywowanym 1,2-diaminoetanem (Eupergit C-NH<sub>2</sub>) przez reszty węglowodanowe uprzednio utlenione nadjodanem sodu [19]. Dla porównania

wykonano też immobilizację metodami konwencjonalnymi, tj. na drodze bezpośredniego wiązania enzymu do polimerów przez grupy epoksydowe nośnika i aminowe lipazy oraz aktywację Eupergitu C-NH<sub>2</sub> aldehydem glutarowym. Badanie kinetyki dezaktywacji termicznej (37, 50 i 75°C) wykazało, że zastosowane procedury immobilizacji dały zadowalającą stabilizację biokatalizatora. Porównując czas połowicznego zaniku aktywności stwierdzono, że unieruchomienie lipazy przez jej reszty cukrowe pozwoliło uzyskać formę dwukrotnie trwalszą niż metoda immobilizacji konwencjonalnej i 18 razy stabilniejszą niż enzym natywny. Najlepsza pod względem wydajności wiązania białka z nośnikiem okazała się technika unieruchamiania przez grupy epoksydowe (52,4%). System ten jednak wykazywał najniższą aktywność specyficzną (20,7% względem lipazy natywnej). Przyczyną mogło być wielopunktowe wiązanie oraz zaangażowanie grup istotnych dla katalizy i utrzymania III- rzędowej struktury enzymu. Zaobserwowano wyższą aktywność lipazy związanej z nośnikiem za pomocą długiego ramienia przestrzennego etylenodiamino/glutaraldehydowego (31% aktywności enzymu natywnego). Taki sposób unieruchomienia gwarantował lepsze umiejscowienie enzymu dla akcji katalitycznej i ochronę przed niepożądanymi oddziaływaniami dużej cząsteczki lipazy z nośnikiem. Korzyści płynące z wbudowania pomiędzy nośnik a białko enzymatyczne ramienia przestrzennego (ang. *spacer arm*) potwierdziły też inne badania [14]. Jednak metoda wykorzystująca grupy cukrowe jako łączenie chemiczne wydaje się być najefektywniejsza (aktywność 43,3% w porównaniu z enzymem nieimmobilizowanym). Zdaniem autorów wynika to z korzystnych oddziaływań cząsteczki lipazy z nośnikiem oraz nie naruszenia miejsca aktywnego.

Na bazie metakrylanu uretanowego i glicydydu oraz hydroksyetylometakrylanu otrzymano polimer, który naniesiono w postaci cienkiego filmu na membranę z polipropylenu [22]. Uzyskano hydrofobowy nośnik o zwiększonej hydrofilowości i biokompatybilności. Na membranie tej poprzez grupy epoksydowe nośnika unieruchomiono lipazę *Candida rugosa* i dla stabilizacji enzymu sieciowano aldehydem glutarowym. W porównaniu do lipazy natywnej, biokatalizator immobilizowany miał szerszy zakres tolerancji pH, wzmocnioną stabilność termiczną i operacyjną. Po 6 cyklach reakcji estryfikacji kwasu oleinowego oktanołem w warunkach optymalnych lipaza unieruchomiona zachowała 84,1% wyjściowej aktywności, a po 10 cyklach 57,5%. Enzym natywny, po 5 godzinach syntezy (5 cykli reakcyjnych) był aktywny w 13%, natomiast po 10 cyklach ulegał dezaktywacji.

Zespół badawczy Bayramoğlu [13] określał wpływ stężenia fenyloalaniny w kopolimerze opartym na hydrofilowym 2-hydroksyetylometakrylanie na ilość i aktywność związanej lipazy. Grupy karboksylowe fenyloalaniny aktywowano karbodiimidem i łączono z grupami -NH<sub>2</sub> białka enzymatycznego. Wzrost stężenia hydrofobowego aminokwasu w nośniku prowadził do wzrostu ilości związanego enzymu, ale powodowało to obniżanie aktywności preparatu enzymatycznego. Nadmierne wysycenie porów membrany enzymem wywołało przestrzenne przeszkody w dotarciu substratu do lipazy, ograniczenie dyfuzji wielkocząsteczkowego substratu (oliwa z oliwek) lub też powstanie oddziaływań białko – białko utrudniające przemianę reagentu.

W pracach Bryjak i wsp. badano przydatność do immobilizacji lipaz nośników akrylowych o różnym stopniu

hydrofobowości, porowatości i polarności [16,17]. Część z nich modyfikowano przez aminolizę. Zaobserwowano, że w niektórych przypadkach aktywność unieruchomionej lipazy po przechowywaniu przez okres 3 miesięcy (pH 7,8; 4°C) była wyższa niż aktywność enzymu zmierzona zaraz po immobilizacji [16]. Zdaniem autorów enzym związany z nośnikiem niewielką ilością połączeń kowalencyjnych mógł podczas przechowywania przez długi okres czasu przyjąć konformację bliższą enzymowi natywnemu. Takie zjawisko zachodziło na polimerach o niskiej zawartości grup  $-NH_2$  i o wysokiej porowatości. Przesunięcia enzymu nie byłyby możliwe w przypadku zaangażowania w unieruchomienie pojedynczych cząsteczek lipazy dużej ilości grup aminowych.

### **Immobilizacja kowalencyjna lipaz na nośnikach nieorganicznych**

Nośniki nieorganiczne, oprócz wielu zalet (odporność fizyczna, chemiczna i biologiczna, łatwość regeneracji) posiadają istotną wadę. Obecność w nich małej liczby grup aktywnych chemicznie powoduje wiązanie białka w niewielkich ilościach. Z tego względu materiały te muszą być poddawane funkcjonalizacji polegającej na wiązaniu ich z polimerami syntetycznymi, naturalnymi lub organokrzemianami. Spośród nośników nieorganicznych do immobilizacji lipaz najczęściej stosuje się krzemionkę, gliniany, ceramikę, szkło nieporowate lub szkło o kontrolowanych porach oraz zeolity.

Do hydrolizy 2-fenylpropionianu etylu stosowano lipazę *Candida cylindraceae* unieruchomioną na krzemionce, glinianie oraz dwóch typach szkła o kontrolowanych porach [28]. Wymienione nośniki aktywowano trichlorotriazyną. Systemy biokatalizatora związane z krzemionką i glinianem wykazywały wyższą aktywność hydrolityczną i większą odporność na temperaturę niż ich odpowiedniki na szkle. Przyczyną były różnice w porowatości tych materiałów. Immobilizacja lipazy na mezoporowatej krzemionce i glinianie zachodziła na powierzchni nośników nie utrudniając substratowi dostępu do miejsca aktywnego enzymu. Na szkle zemulgowane krople oleju miały ograniczony kontakt z obszarem katalitycznym lipazy, ponieważ znacząca ilość białka związana była wewnątrz porów nośnika. Preparat enzymatyczny na krzemionce przechowywany w 50°C był 37 razy bardziej stabilny niż enzym natywny. Po 336 godzinach (2 cykle) procesu hydrolizy utrzymywał 80% wyjściowej aktywności, a po 3 cyklach pracy jego aktywność pozostawała na poziomie 50%.

Podjęto szereg prób uzyskania nowych funkcjonalizowanych nośników krzemionkowych [29-33]. Do żelu krzemionkowego w reakcji z 3-aminopropylotrietoksylanem wprowadzono grupy aminowe i za pomocą poliimidu kwasu bursztynowego związano lipazę trzustki wieprzowej [31]. Bai i wsp. [29,30] na drodze polimeryzacji szczepionej opracowali różne nośniki krzemionkowe z reaktywnymi grupami aldehydowymi. Najlepszy rezultat w immobilizacji lipazy trzustki wieprzowej osiągnięto poprzez zamocowanie na krzemionce długiego ramienia przestrzennego winylotrietoksylanu i aldehydu akrylowego [29]. Aktywność lipazy związanej z taką strukturą dendrytową nośnika wynosiła 118% w porównaniu z enzymem niezwiązanym. Lipazę z *Mucor javanicus* immobilizowano efektywnie na nanocząstkach krzemionki

z wbudowanym metakrylanem glicydydu [33]. Grupy epoksydowe nośnika wykorzystano do bezpośredniego wielopunktowego wiązania enzymu. Do nośnika wprowadzono także grupy aminowe, które przed unieruchomieniem lipazy aktywowano aldehydem glutarowym lub 1,4-diizotiocyanianem fenylu. Ilość lipazy na cząstkach z modyfikowanym metakrylanem glicydydu była dużo wyższa (81,3 i 60,9 mg/g nośnika) niż na nośnikach nieaktywowanych (18,9 mg/g). Aktywność hydrolityczna w środowisku wodnym lipazy związanej z nośnikiem aktywowanym glutaraldehydem wynosiła w stosunku do enzymu natywnego 115%, a po modyfikacji 1,4-diizotiocyanianem fenylu 107%.

Magnan i wsp. [34] opracowali membranę mieszaną przygotowaną z dynamicznej warstwy żelowej uzyskiwanej w wyniku ultrafiltracji roztworu żelatyny z iminą polietylenową na makroporowatym nośniku ceramicznym. Do zalet tego typu membrany należy kompatybilność z enzymem, łatwość przygotowania i regeneracji. Lipazę *Candida antarctica* B „umocowano” na membranie za pomocą aldehydu glutarowego jako czynnika sieciującego. W celu zwiększenia miejsc wiązania lipazy (grupy aminowe) zwiększono stężenie aldehydu glutarowego do 12,5%. Wysokie stężenie czynnika sieciującego poprawiło usieciowanie warstwy polimerowej, którą jednak trudno było usunąć nawet na drodze drastycznego przemywania. W ten sposób po dwóch lub trzech regeneracjach membrany opór hydrauliczny nośnika ceramicznego był tak duży, że ciśnienie membranowe wymagane do zapewnienia odpowiedniego strumienia przepływu mogło zniszczyć warstwę polimeru. Aby uniknąć tych problemów zdecydowano się na obniżenie stężenia aldehydu glutarowego do 4%, co pozwoliło na kompletną regenerację membrany. Uzyskany unieruchomiony biokatalizator miał zastosowanie w reakcjach hydrolizy i syntezy w różnych środowiskach (system wodny i heksan).

### **Immobilizacja lipaz na nośnikach hybrydowych (kompozytowych)**

Nośniki hybrydowe to materiały nieorganiczno-organiczne lub będące mieszaniną polimerów naturalnych i syntetycznych. Łączą one zalety poszczególnych grup nośników i minimalizację cech ujemnych. Zauważa się rosnącą popularność nośników hybrydowych, w skład których wchodzi karaginan, żelatyna, chitozan [34-37]. W badaniach Ye i wsp. [36] na membranę kapilarną powstałą w wyniku kopolimeryzacji akrylonitrylu i kwasu maleinowego naniesiono żelatynę. Powstały „pseudobionośnik” użyto do immobilizacji lipazy *Candida rugosa* stosując aldehyd glutarowy. Przeprowadzono również wiązanie lipazy za pomocą imidu kwasu bursztynowego i karbodiimidu na nośniku niemodyfikowanym (bez żelatyny). W porównaniu z enzymem natywnym, aktywność lipazy immobilizowanej na modyfikowanej membranie wynosiła 49,2%, natomiast na nośniku bez żelatyny 33,9%. Badania stabilności operacyjnej otrzymanych preparatów enzymatycznych wykazały, że biokatalizator połączony z warstwą biopolimeru utrzymywał 55% wyjściowej aktywności po 10 cyklach reakcyjnych, a lipaza na nośniku niemodyfikowanym 62%. Podobną technikę zastosowano do otrzymania dwuwarstwowych biomimetycznych nośników, gdzie warstwę żelatyny lub chitozanu wiązano z włóknami kopolimeru akrylonitryl - kwas maleinowy [37].

Do nośników kompozytowych zaliczyć można także nośniki nieorganiczne związane z polimerami syntetycznymi, naturalnymi lub organokrzemianami [29-34].

## SIECIOWANIE LIPAZ

Podczas sieciowania za pomocą jedno, dwu- lub wielofunkcyjnych czynników sieciujących tworzą się wielokrotne i w trzech wymiarach, wiązania kowalencyjne pomiędzy cząsteczkami enzymu. Mimo dużej różnorodności czynników sieciujących białka (m.in. karbodiimidy, diimidoestry, bisbursztynimid, diizocyjaniiny, dialdehydy, diacyloazydki i inne) najczęściej wykorzystuje się aldehyd glutarowy. Reaktywne grupy aldehydowe znajdujące się na końcach cząsteczki tego związku reagują z wolnymi grupami aminowymi (grupy ε-aminowe lub N-końcowe) enzymu tworząc struktury typu zasady Schiff'a. Swoją popularność aldehyd glutarowy zawdzięcza głównie stabilności, niskiej cenie, wydajności, łagodnym warunkom sieciowania i certyfikatu GRAS (ang. *Generally Recognized as Safe*) [3]. Sieciowaniu można poddać białko uprzednio związane (np. na drodze adsorpcji lub zamknięte w sieci żelu) z nośnikiem, co należy jednak traktować jako uzupełnienie innych technik immobilizacji. Natomiast tworzenie preparatów bez nośnika dotyczy sieciowania enzymu w roztworze wodnym lub agregatów białkowych i kryształów [3]. Sieciowanie enzymu w roztworze wodnym polega na dodaniu czynnika sieciującego w ilości zapewniającej wypadanie usieciowanych agregatów. Wadą tej metody jest to, że zazwyczaj uzyskuje się żelowane precipitaty, które najczęściej mają obniżoną aktywność i stabilność operacyjną, czego przyczyną jest zbyt silna modyfikacja cząsteczki białka. Dodatkowym problemem jest niska powtarzalność metody oraz trudności z uzyskaniem jednolitych rozmiarów agregatów i preparatów handlowych. Z wymienionych powodów metoda ta praktycznie nie jest stosowana.

Interesującą technologią w zakresie immobilizacji stosowaną dla lipaz jest sieciowanie kryształów enzymu (CLECs-ang. *Cross-Linked Enzyme Crystals*) [38,39]. Standardowa procedura polega na otrzymaniu mikrokryształów o rozmiarach 1-20 μm, które sieciuje się zwykle aldehydem glutarowym. Obecne w strukturze usieciowanych kryształów kanały ułatwiają dyfuzję substratów i produktów [39,40]. CLECs opisywane są jako biokatalizatory o dużej stabilności, odporności mechanicznej i bardzo wysokiej aktywności w przeliczeniu na jednostkę preparatu, co związane jest ze skondensowaniem cząsteczek enzymu w kryształach [38,39]. W ten sposób immobilizowano lipazy z *Candida rugosa* i *Burkholderia cepacia* [41]. Przygotowane kryształy lipaz wykazywały wysoką stereoselektywność w reakcji hydrolizy ważnych związków chemicznych, np. ibuprofenu. Preparaty te były również od 10 do 90 razy aktywniejsze w reakcjach stereoselektywnej estryfikacji i transestryfikacji prowadzonych w rozpuszczalnikach organicznych niż enzymy natywne. Kryształy lipazy z *Candida rugosa* zastosowane w chiralnym rozdziale różnych związków odznaczały się wysoką stabilnością, zarówno w układach wodnych, jak i z rozpuszczalnikiem organicznym [39]. W zależności od warunków, czas utraty 50% aktywności dla enzymu naturalnego wynosił od 2 do 20 godzin, natomiast czas połowicznego zaniku aktywności preparatu CLECs w medium wodnym to 13 dni, a w organicznym nie stwierdzono utraty aktywności po 5 dniach.

Procedura otrzymywania CLECs jest jedną z droższych i bardziej skomplikowanych metod immobilizacji. Wysoka cena wynika z kosztów uzyskania czystego enzymu, niezbędnego do produkcji kryształów [42]. Alternatywą dla tej metody może być otrzymywanie usieciowanych agregatów

enzymów – CLEAs (CLEAs- ang. *Cross-Linked Enzyme Aggregates*) [3,38], które uzyskuje się w wyniku precipitacji białek enzymatycznych, a następnie ich sieciowaniu aldehydem glutarowym. Właściwości katalityczne finalnego produktu w znacznym stopniu mogą zależeć od typu precipitacji, stężenia czynnika sieciującego i czasu sieciowania [3,38,40,43]. Do zalet tej techniki zalicza się łączenie immobilizacji z oczyszczeniem enzymu, niski koszt produkcji, wysoką aktywność w przeliczeniu na masę preparatu oraz zwiększoną stabilność.

W pracy López-Serrano jako CLEAs immobilizowano siedem lipaz pochodzenia mikrobiologicznego [43]. Lipazy z *Thermomyces lanuginosus* i *Rhizomucor miehei* wytrącone przez dodatek  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  w obecności SDS (siarczan sodowy dodecyłu) miały 3-krotnie wyższą aktywność hydrolityczną od ich natywnych odpowiedników.

Podjęto także próby wzmocnienia stabilności lipaz przez włączenie ich CLEAs w pory membrany [40]. Agregaty lipazy z *Candida rugosa* tworzone i sieciowano w środku porów mikrofiltracyjnej membrany z celulozy i PTFE. Badano wpływ składu medium organicznego oraz charakteru hydrofilowego i hydrofobowego matrycy nośnika na właściwości biokatalityczne membran. Otrzymano wysokoefektywne membrany z „wtłoczonymi” CLEAs zarówno na bazie hydrofobowych, jak i hydrofilowych polimerów. Czynnikiem znacząco wpływającym na aktywność biokatalizatorów było stężenie aldehydu glutarowego, który pełnił rolę czynnika wywołującego agregację i równocześnie reagenta sieciującego. W badaniach zastosowano dodatkowo „bio-imprinting” lipaz kwasem oleinowym, co jednak nie wpłynęło znacząco na poprawę aktywności enzymu w reakcjach estryfikacji.

## PODSUMOWANIE

Biokataliza z udziałem mikrobiologicznych lipaz jest technologią o ogromnym potencjale pozwalającą otrzymywać liczne związki na potrzeby przemysłu spożywczego, chemicznego i farmaceutycznego. W celu obniżenia kosztów handlowych preparatów tych enzymów obserwuje się ciągły rozwój i optymalizację technik ich immobilizacji. Na efekt końcowy immobilizacji kowalencyjnej mają wpływ następujące czynniki: czas immobilizacji (zwykle kilka godzin), dostępność powierzchni nośnika i jego porowatość, ilość zaktywowanych grup funkcyjnych nośnika i białka, rodzaj czynnika wiążącego, odległość związanego enzymu od powierzchni nośnika i orientacja przestrzenna centrum aktywnego, mono- i wielopunktowe wiązanie enzymu z nośnikiem oraz charakter hydrofilowo / hydrofobowy materiału nośnika.

Immobilizacja kowalencyjna daje zwykle trwałe wiązanie enzymu z nośnikiem, podwyższenie stabilności lipazy, zwiększenie zakresu tolerancji pH i wyższych temperatur. Wzrost optimum temperatury związany jest z redukcją ruchliwości konformacyjnej białka wywołanej wielopunktowym wiązaniem z nośnikiem poprzez grupy  $-\text{NH}_2$  enzymu. Stąd wymagana jest większa energia aktywacji do przeorganizowania cząsteczki lipazy do właściwej dla substratu konformacji.

Dalszy rozwój technik immobilizacji pozwoli w przyszłości rozszerzyć przemysłowe zastosowania lipaz oraz otworzy nowe możliwości użytkowania tych enzymów o wszechstronnych właściwościach katalitycznych.

**Tabela 2.** Przykłady wpływu immobilizacji kowalencyjnej na właściwości lipaz

Lipaza	Rodzaj nośnika	Aktywacja nośnika	Wynik immobilizacji	Literatura
z trzustki wieprzowej	Akrilex 100 (poliakrylamid)	karbodiimid; sieciowanie aldehydem glutarowym lub difluoronitrobenzenem	uzyskanie maksymalnej aktywności hydrolitycznej: enzym natywny – 20 h, immobilizowany – 3 h; wzrost termostabilności i odporności na działanie mocznika	[26]
<i>Mucor javanicus</i>	krzemionka z metakrylanem glicydylu	aldehyd glutarowy lub 1,4-diizocyjanian fenylu	Wzrost aktywności hydrolitycznej do 115% względem enzymu natywnego	[33]
<i>Arthro-bacter sp.</i>	Sepharose (agarozą)	CNBr	Wzrost stężenia enancjomerów z E=47 do E=450; wysoka stabilność operacyjna (aktywność niezmieniona po 10 cyklach)	[6]
<i>Rhizopus oryzae</i>	Sepharose 4BCL (agarozą)	CNBr	Wzrost stężenia enancjomerów maślanu glicydylu z E=2 do E=17	[12]
<i>Candida rugosa</i>	akrylonitryl-kwas maleinowy z chitozaniem lub żelatyną	karbodiimid / imid kwasu bursztynowego; sieciowanie aldehydem glutarowym	Wzrost stabilności operacyjnej: po 10 cyklach reakcji 55% (chitozan) i 62% (żelatyna) aktywności wyjściowej	[37]
<i>Candida rugosa</i>	agarozą (Bio-Gel)	chlorek tosyłu	Wydłużenie czasu utraty 50% aktywności z 0,28 h do ok. 5 h; przechowywanie w 4°C przez 4 miesiące bez utraty aktywności	[10]
	krzemionka	trichlorotriazyna		
<i>Candida rugosa</i>	terpolimer na bazie metakrylanu glicydylu z diaminohexanem jako ramieniem przestrzennym	aldehyd glutarowy	Podwyższenie stabilności termicznej – po 2h w 60°C utrzymywał 67% aktywności, natywny – 11%	[14]
<i>Candida rugosa</i>	hydrożel na bazie akrylamidu z karaginanem	epichlorohydryna	Wysoka stabilność operacyjna: po 10 cyklach reakcji – 94% aktywności wyjściowej; 40 cykli – 39% aktywności wyjściowej	[35]

## LITERATURA

- [1] Antczak T., Graczyk J.: Lipazy: źródła, struktura i właściwości katalityczne, *Biotechnologia*, 2002, 2(57), 130-145.
- [2] Hasan F., Shah A.A., Hameed A.: Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme Microb. Technol.*, 2006, 39, 235-251.
- [3] Bryjak J.: Immobilizacja enzymów. Część I. Metody konwencjonalne, *Wiadomości Chemiczne*, 2004, 58, 9-10, 691-746.
- [4] Amorim R.V.S., Melo E.S., Carneiro-da-Cunha M.G., Ledingham W.M., Campos-Takaki G.M.: Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization, *Bioresour. Technol.*, 2003, 89, 1, 35-39.
- [5] Carneiro-da-Cunha M.G., Rocha J.M.S., Garcia F.A.P., Gil M.H.: Lipase immobilization on to polymeric membranes, *Biotechnol. Techn.*, 1999, 13, 6, 403-409.
- [6] 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.
- [7] Chiou S.H., Wu W.-T.: Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups, *Biomaterials*, 2004, 25, 197-204.
- [8] Gray C.J., Narang J.S., Barker S.A.: Immobilization of lipase from *Candida cylindraceae* and its use in the synthesis of menthol esters by transesterification, *Enzyme Microb. Technol.*, 1990, 12, 800-807.
- [9] Hung T.-Ch., Giridhar R., Chiou S.-H., Wu W.-T.: Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2003, 26, 1-2, 69-78.
- [10] Moreno J.-M., Arroyo M., Hernáiz M.-J., Sinisterra J.-V.: Covalent immobilization of pure isoenzymes from lipase of *Candida rugosa*, *Enzyme Microb. Technol.*, 1997, 21, 552-558.
- [11] Moreno J.M., Hernaiz M.J., Sánchez-Montero J.M., Sinisterra J.V., Bustos M.T., Sánchez M.E., Bello J.F.: Covalent immobilization of pure lipases A and B from *Candida rugosa*, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 1997, 2, 177-184.
- [12] Palomo J.M., Segura R.L., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R.: Enzymatic resolution of ( $\pm$ )-glycidyl butyrate in aqueous media, Strong modulation of the properties of the lipase from *Rhizopus oryzae* via immobilization techniques, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, 15, 7, 1157-1161.
- [13] Bayramođlu G., Kaçar Y., Denizli A., Arica M.Y.: Covalent immobilization of lipase onto hydrophobic group incorporated poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based hydrophilic membrane matrix, *J. Food Eng.*, 2002, 52, 4, 367-374.
- [14] Bayramođlu G., Kaya B., Arica M.Y.: Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto spacer-arm attached poly(GMA-HEMA-EGDMA) microspheres, *Food Chemistry*, 2005, 92, 261-268.
- [15] Braun B., Klein E.: Immobilization of *Candida rugosa* lipase to nylon fibers using its carbohydrate groups as the chemical link, *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, 51, 327-341.
- [16] Bryjak J., Bachmann K., PawłóW B., Maliszewska I., Trochimczuk A., Kolarz B.N.: Immobilization of lipase on various acrylic copolymers, *Chem. Eng. J.*, 1997, 65, 249-256.
- [17] Bryjak J., Trochimczuk A.W.: Immobilization of lipase

- and penicillin acylase on hydrophobic acrylic carriers, *Enzyme Microb. Technol.*, 2006, 39, 4, 573-578.
- [18] Carta G., Gainer J.L., Gibson M.E.: Synthesis of esters using a nylon-immobilized lipase in batch and continuous reactors, *Enzyme Microb. Technol.*, 1992, 14, 904-910.
- [19] Knezevic Z., Milosavic N., Bezbradica D., Jakovljevic Z., Prodanovic R.: Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment, *Biochem. Eng. J.*, 2006, 30, 269-278.
- [20] Liu X., Guan Y., Shen R., Liu H.: Immobilization of lipase onto micron-size magnetic beads, *J. Chromatogr. B*, 2005, 822, 1-2, 91-97.
- [21] Nieto I., Rocchietti S., Ubiali D., Speranza G., Morelli C.F., Fuentes I.E., Alcantara A.R., Terreni M.: Immobilization of different protein fractions from *Rhizomucor miehei* lipase crude extract, Enzymatic resolution of (R,S)-2-tetralol, *Enzyme Microb. Technol.*, 2005, 37, 514-520.
- [22] Pujari N.S., Vaidya B.K., Bagalkote S., Ponrathnam S., Nene S.: Poly(urethane methacrylate-co-glycidyl methacrylate)-supported-polypropylene biphasic membrane for lipase immobilization, *J. Membr. Sci.*, 2006, 285, 395-403.
- [23] Rodrigues Á.R., Cabral J.M.S., Taipa M.Â.: Immobilization of *Chromobacterium viscosum* lipase on Eudragit S-100: coupling, characterization and kinetic application in organic and biphasic media, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, 31, 133-141.
- [24] Zaidi A., Gainer J.L., Carta G., Mrani A., Kadiri T., Belarbi Y., Mir A.: Esterification of fatty acids using nylon-immobilized lipase in *n*-hexane: kinetic parameters and chain-length effects, *J. Biotechnol.*, 2002, 93, 209-216.
- [25] Zhu S., Wu Y., Yu Z.: Immobilization of *Candida rugosa* lipase on a pH-sensitive support for enantioselective hydrolysis of ketoprofen ester, *J. Biotechnol.*, 2005, 116, 4, 397-401.
- [26] Bagi K., Simon L.M., Szajáni B.: Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase, *Enzyme Microb. Technol.*, 1997, 20, 531-535.
- [27] Katchalski-Katzir E., Kraemer D.M.: Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.*, 2000, 10, 157-176.
- [28] Moreno J.M., Sinisterra J.V.: Immobilization of lipase from *Candida cylindracea* on inorganic supports, *J. Mol. Catal.*, 1994, 93, 357-369.
- [29] Bai Y.-X., Li Y.-F., Yang Y., Yi L.-X.: Covalent immobilization of triacylglycerol lipase onto functionalized nanoscale SiO<sub>2</sub> spheres, *Process Biochem.*, 2006, 41, 770-777.
- [30] Bai Y.-X., Li Y.-F., Yang Y., Yi L.-X.: Covalent immobilization of triacylglycerol lipase onto functionalized novel mesoporous silica supports, *J. Biotechnol.*, 2006, 125, 574-582.
- [31] Bai Z.W., Zhou Y.K.: A novel enzyme support derived from aminated silica gel and polysuccinimide: preparation and application for the immobilization of porcine pancreatic lipase, *React. Func. Polym.*, 2004, 59, 93-98.
- [32] Ivanov A.E., Schneider M.P.: Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 1997, 3, 303-309.
- [33] Kim M.I., Ham H.O., Oh S.-D., Park H.G., Chang H.N., Choi S.-H.: Immobilization of *Mucor javanicus* lipase on effectively functionalized silica, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2006, 39, 1-4, 62-68.
- [34] Magnan E., Catarino I., Paolucci-Jeanjean D., Preziosi-Belloy L., Belleville M.P.: Immobilization of lipase on ceramic membrane: activity and stability, *J. Membr. Sci.*, 2004, 241, 1, 161-166.
- [35] Tümtürk H., Karaca N., Demirel G., Sahin F.: Preparation and application of poly(*N,N*-dimethylacrylamide-co-acrylamide) and poly(*N*-isopropylacrylamide-co-acrylamide)/*k*-Carrageenan hydrogels for immobilization of lipase, *Inter. J. Biol. Macromol.*, 2007, 40, 3, 281-285.
- [36] Ye P., Xu Z.-K., Wu J., Innocent Ch., Seta P.: Entrusting poly(acrylonitrile-co-maleic acid) ultrafiltration hollow fiber membranes with biomimetic surfaces for lipase immobilization, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2006, 40, 30-37.
- [37] Ye P., Xu Z.-K., Wu J., Innocent Ch., Seta P.: Nanofibrous poly(acrylonitrile-co-maleic acid) membranes functionalized with gelatin and chitosan for lipase immobilization, *Biomaterials*, 2006, 4169-4176.
- [38] Cao L., van Langen L., Sheldon R.A.: Immobilized enzymes: carrier – bound or free ?, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2003, 14, 387-395.
- [39] Margolin A.L.: Novel crystalline catalysts, *TIBTECH*, 1996, 14, 223-230.
- [40] Hilal N., Nigmatullin R., Alpatova A.: Immobilization of cross-linked lipase aggregates within macroporous polymeric membranes, *J. Membr. Sci.*, 2004, 238, 131-141.
- [41] Khalaf N., Govardhan C.P., Lalonde J.J., Persichetti R.A., Wang Y.F., Margolin A.L.: Cross-linked enzyme crystals as highly active catalysts in organic solvents, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 5494-5495.
- [42] Lalonde J.: Practical catalysis with enzyme crystals, *Chemtech*, 1997, 38-45.
- [43] López-Serrano P., Cao L., van Rantwijk F., Sheldon R.A.: Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases, *Biotechnol. Lett.*, 2002, 24, 1379-1383.

## COVALENT IMMOBILIZATION OF LIPASES

### SUMMARY

*Lipases constitute the most important group of biocatalyst for biotechnological applications.*

*This review describes issues concerning immobilization of lipases by covalent binding and cross-linking. Properties of various organic, inorganic and composite supports were characterized along with their suitability for lipase immobilization.*

*Knowledge of issues discussed in the paper can be helpful in the planning research connected with chemical immobilization of lipases.*