

Nośniki do immobilizacji enzymów oraz ich aplikacje

Jerzy Łobarzewski

Grażyna Ginalska

Zakład Biochemii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

Lublin

1. Wstęp

Nośniki do immobilizacji i wysoce specyficznej techniki chromatografii powinowactwa są z powodzeniem opracowywane do chwili obecnej, chociaż początki tych doświadczeń mają już pewną historię. Przyczyną dalszych poszukiwań optymalnych nośników, używanych do unieruchamiania enzymów, są coraz wyższe wymagania stawiane opracowywanym produktom. Są nimi: odporność mechaniczna, ujednolicona porowatość, wielkość, precyzyjna kulistość ziaren matryc. Ważną sprawą jest również długość ramienia przestrzennego (*spacer arm*) pomiędzy matrycą a białkiem (enzymem), a także właściwości hydrofilowe bądź hydrofobowe samego nośnika (matrycy). Dotychczas nie udało się opracować idealnej matrycy, spełniającej wszystkie wymienione wymagania, co determinuje aktualne doświadczenia w tej dziedzinie. Zawsze jednak należy pamiętać, że zanim nośnik zostanie uznany chociażby za dobry do immobilizacji białek, musi być przebadany laboratoryjnie, w doświadczeniach sprawdzających jego przydatność z użyciem co najmniej kilku enzymów. Techniki immobilizacji wykorzystujące wiązania chemiczne pomiędzy nośnikiem i ligandem (zwłaszcza gdy ligandem jest związek wielkocząsteczkowy) natrafiają na wiele niewiadomych, które mogą być sprawdzone wyłącznie eksperymentalnie, przy użyciu różnorodnego materiału biologicznego.

W celu zilustrowania takich poszukiwań i osiągnięć pozwalamy sobie zamieścić w naszym przeglądzie wyniki około dziesięcioletnich badań uzyskanych w kilku pracowniach naukowych, tworzących nieformalny zespół badawczy. Osiągnięte w tym czasie wyniki pozwoliły na istotny postęp w zakresie badań nowych, często niekonwencjonalnych nośników do immobilizacji enzymów i chromatografii powinowactwa. W składzie tego zespołu badawczego uczestniczyli: prof. B. Kolarz (Politechnika Wrocławska); prof. T. Wolski (AM Lublin); dr A. Wójcik, prof. Z. Ilczuk, dr J. Fiedurek, prof. A. Dawidowicz, prof. A. Leonowicz (UMCS Lublin), oraz autorzy tego opracowania.

2. Nośniki do immobilizacji ligandów i ich właściwości

Nośniki (matryce) do immobilizacji ligandów dzielimy na nieorganiczne i organiczne. Wśród nieorganicznych uznana rolę pełnią szkła porowate (CPG), ale także żel krzemionkowy. Chociaż oba te materiały są dobrze znane od lat, jednak można uzyskiwać modyfikacje właściwości ich powierzchni kilkoma opracowanymi niedawno technikami, np. ilość boru na powierzchni szkła porowatego modyfikuje się przez ogrzewanie go w temperaturze 700°C przez 2 – 55 godzin. Taka preparatyka pozwala następnie na istotną optymalizację rozdziału, techniką chromatograficznego powinowactwa, peroksydazy grzybowej od innych białek zawartych w homogenacie grzybni *Trametes versicolor* (1 – 4). Należy dodać, że dla opracowania warunków izolacji peroksydazy grzybowej zastosowano szkło porowate z unieruchomionym ligandem — aldehydem wanilinowym (rys. 1), (3).

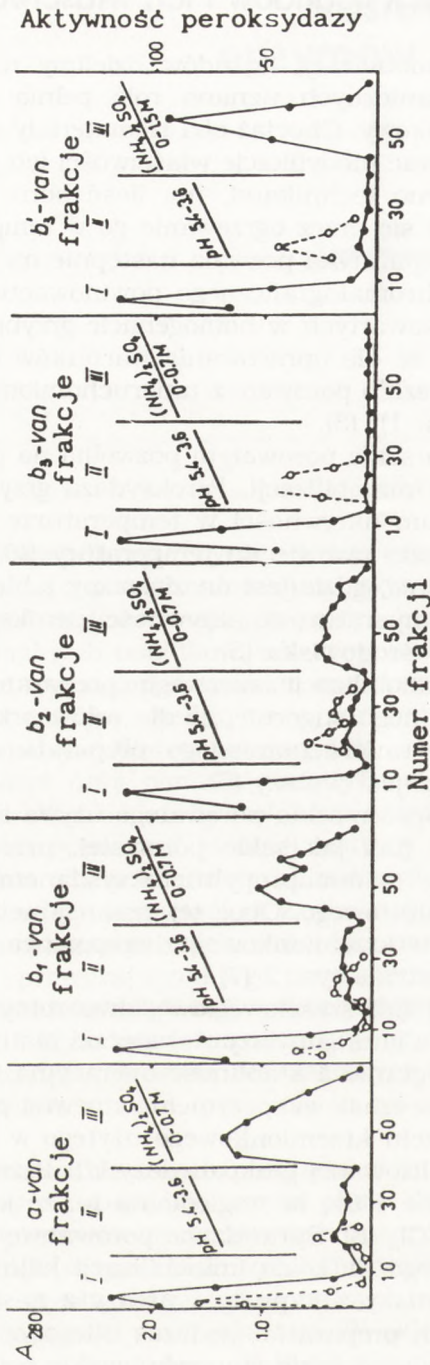
Technika immobilizacji na szkłe porowatym pozwoliła na porównanie właściwości enzymu przed i po immobilizacji. Peroksydaza grzybowa przed immobilizacją wykazuje optimum aktywności w temperaturze ok. 50°C, a po immobilizacji optimum to przesuwają się do temperatury 20°C. Implikuje to właściwości enzymu w komórce, gdzie jest on związany z błonami komórkowymi i wówczas optimum temperaturowe aktywności peroksydazy może być przystosowane do warunków środowiska (5).

Porównanie wyników immobilizacji surowego preparatu glukoamylazy (*A. niger*) i enzymu oczyszczonego sugeruje, że dla celów przemysłowych korzystniejsze jest stosowanie unieruchomionego preparatu o podwyższonej czystości, mimo że jego koszt jest wyższy (6).

Do immobilizacji białek, oprócz szkła porowatego używa się żel krzemionkowy. Można go aktywować (tak jak szkło porowate), przed immobilizacją enzymów poprzez silanizację (γ -aminopropyltrietyloksysilanem), a dalej przez przyłączenie np. aldehydu glutarowego. Obok tej uznanej metody opracowano nowe sposoby aktywacji żelu krzemionkowego, za pomocą BCl_3 lub SiCl_4 (7,8). Powstałe pochodne ilustruje rys. 2 (7).

Przyłączenie dwuwęglowej lub sześciowęglowej dwuaminy modyfikuje odstęp immobilizowanego białka glukoamylazy *A. niger* od matrycy. Dłuższe ramię przestrzenne znacznie ogranicza stabilność operacyjną tego enzymu po immobilizacji (7). Wykazano w czasie eksperymentów pewną proporcjonalność pomiędzy wielkością porów żelu krzemionkowego użytego w badaniach (30 – 120Å) a stabilnością immobilizowanej glukoamylazy (7). Później do aktywacji żelu krzemionkowego wybrano SiCl_4 ze względu na to, że jest to odczynnik łatwy w użyciu i tańszy od BCl_3 (8). Sprawdzone porównawczo zdolności żelu krzemionkowego aktywowanego SiCl_4 do immobilizacji kilku enzymów: glukoamylazy *A. niger*, peroksydazy z kapusty i ureazy z nasion soi, a także stabilności immobilizowanych preparatów podczas czterotygodniowych okresów przechowywania (8). Badania takie stanowią zwykle rutynowe doświadczenia dla określenia przydatności nośnika dla immobilizacji białek.

Dalszym krokiem w uzyskiwaniu nowych nośników do immobilizacji en-



Rys. 1. Wyniki chromatografii powinowactwa białek z grzybni *Trametes versicolor* na kolumnach ze szkła porowatego aktywowanego waniliną. a-van: wanilina związana ze szkłem porowatym o powierzchni właściwej 46,8 m²/g; b₁-van, b₂-van, b₃-van: wanilina związana ze szkłem ogrzewanym w temp. 700°C odpowiednio przez 2, 25 i 55 godz. Kolumny o wymiarach 6 x 0,5 cm (3).

zymów było porównanie właściwości immobilizowanej peroksydazy grzybowej z *Trametes versicolor* na nośnikach nieorganicznych i kopolimerach. Jako nośnik nieorganiczny zastosowano żel krzemionkowy aktywowany BCl_3 (7). Natomiast kopolimery organiczne syntetyzowano z:

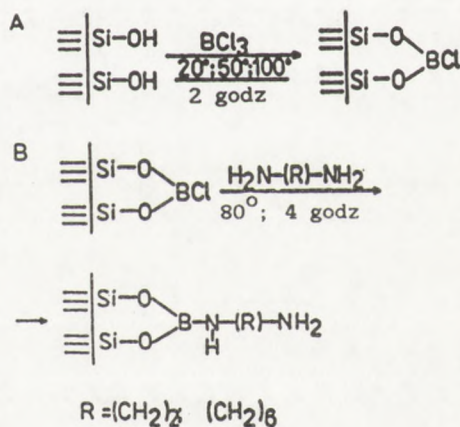
- akrylonitrylu i diwinylobenzenu (seria N),
- akrylanu butylu, akrylonitrylu i diwinylobenzenu (seria B),
- akrylanu etylu, akrylonitrylu i diwinylobenzenu (seria E),
- akrylanu butylu, akrylonitrylu z etylenoglikolem dimetakrylu (seria G).

Kopolimery te aktywowano do immobilizacji enzymów etylenodiaminą lub dietylenotriaminą (9).

Stwierdzono, że zarówno żel krzemionkowy, jak i kopolimery organiczne spełniają podstawowe warunki dla immobilizacji enzymów, zwłaszcza ze względu na ich odporność mechaniczną i niewrażliwość na zakażenia bakteryjne (9). Wykazano także dobrą stabilność operacyjną immobilizowanych enzymów (peroksydaza, glukoamylaza, ureaza).

Opracowano następnie całą serię nośników do immobilizacji enzymów przez adhezyjne pokrycie klasycznych szklanych nośników (szkło porowate, żel krzemionkowy, piasek), poliamidem lub keratyną z piór rozpuszczoną w dimetylosulfotlenku (10). W ten sposób powstało 7 niekonwencjonalnych matryc. Przydatność tych nośników określono immobilizując na nich glukoamylazę z *A. niger*. Glukoamylaza immobilizowana na wymienionych nośnikach wykazywała dobrą stabilność operacyjną w ciągu 30 dni eksperymentów (10,11). Optymalizując adhezyjnie pokryte poliamidem lub keratyną nośniki, tym razem w postaci kulistych kopolimerów metakrylanu metylu i di(metakrylometoksy)naftalenu, stwierdzono znaczną poprawę porowatości otrzymanych matryc (12). Podczas gdy wyjściowe kopolimery wykazywały $34 \text{ m}^2/\text{g}$ powierzchni właściwej, po pokryciu np. keratyną powierzchnia ta wzrastała do $65 \text{ m}^2/\text{g}$. Zmieniając ilości poliamidu lub keratyny przy oplaśszczaniu, udało się uzyskać przyrost wydajności immobilizacji białka peroksydazy z *Trametes versicolor* i glukoamylazy z *A. niger*, a także stabilności operacyjnej tych enzymów (12). Te proste w produkcji i tanie nośniki wydają się odpowiednie do wdrożeń biotechnologicznych.

Dalszym łatwym w uzyskaniu nośnikiem jest odmineralizowana ziemia glinokrzemianowa. Tak przygotowany materiał o wyselekcjonowanej średnicy ok. 0,5 – 1 mm trzeba następnie silanizować (γ -aminopropylotrietoksylanem), tak jak postępuje się ze szkłem porowatym. Wiązanie białka następuje po przyłączeniu aldehydu glutarowego (13).

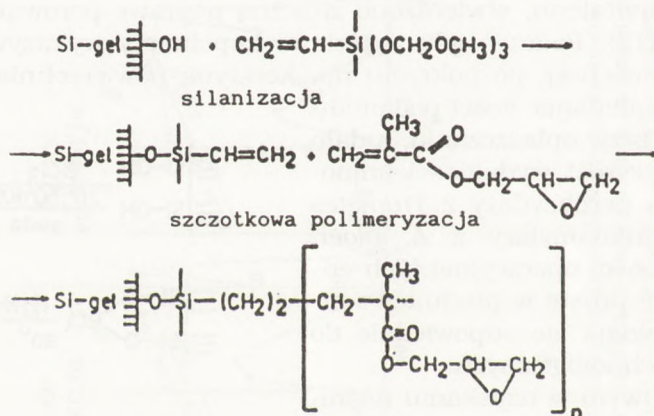


Rys. 2. Schemat aktywacji żelu krzemionkowego przy użyciu BCl_3 (A) i amin alifatycznych (B) (7).

Przydatność tego nośnika sprawdzono wiążąc z nim peroksydazę i lakazę grzybową. Enzymy te są zdolne do biotransformacji ligniny, tego trudnego do degradacji, naturalnego składnika drewna (14,15).

Poszukując konsekwentnie nowych nośników do immobilizacji określono wpływ supermolekularnej struktury nośników na ich zdolność wiązania białek. Strukturę tę uzyskano przez aminolizę nitryli lub grup estrowych kopolimerów związanych z diwinylobenzenem albo dimetyloakrylanem etylenu. Powstały w ten sposób nośniki o zróżnicowanej porowatości i nadmolekularnej strukturze sieciowanych kopolimerów. Mało usieciowane kopolimery wykazywały rozprężoną strukturę, co pozwalało na łatwe pęcznienie w wodzie. Nośniki te aktywowano dalej przez podstawienie grup aminowych w postaci etylenodiaminy (16). Wyniki dotyczące immobilizacji trzech enzymów, takich jak: peroksydaza grzybowa (*Trametes versicolor*), glukoamylaza (*A. niger*), i ureaza (*Soja hispida*) na wymienionych nośnikach prowadzą do wniosku, że enzymy te związane z matrycami o porowatej strukturze są aktywniejsze od enzymów unieruchomionych na nośnikach o rozprężonej strukturze (16).

Trzy typy organicznych polimerów [RVB-styren-diwinylobenzen, ES 861-Duolit i alifatyczno-aromatyczny kopolimer metakrylanu i naftalenu] (17) oraz kulisty żel krzemionkowy (18) aktywowano poprzez szczotkową polimeryzację przy użyciu 2,3-epoksypropylometakrylanu (rys. 3), w wyniku której na powierzchni nośników powstały ugrupowania epoksydowe lub aminowe. Obie formy umożliwiają wiązanie białek — epoksydy bezpośrednio, a grupy aminowe za pośrednictwem np. aldehydu glutarowego (19).



Rys. 3. Schemat polimeryzacji szczotkowej 2,3-epoksypropylometakrylanu sodu na żelu krzemionkowym (19).

Zastosowane matryce różniły się między sobą porowatością powierzchni. Żywica RVB nie posiadała porów, ES 861 była mikroporowata, a MMA-DMN miała duże pory. Rosnąca wielkość porów użytych matryc okazała się od-

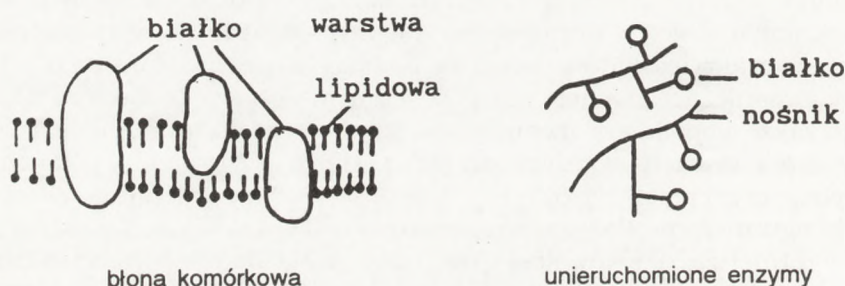
wrotnie proporcjonalna do stężenia szczotkowo przyłączonego 2,3-epoksypropylometakrylanu, natomiast porowatość nośników była wprost proporcjonalna do ilości immobilizowanych trzech białek [peroksydaza z kapusty (EC 1.11.1.7.), glukoamylaza (EC 3.2.1.3.), ureaza (EC 3.5.1.5.)]. Okazało się, że ilości związanych białek były wyższe w przypadku nośników zawierających aktywne grupy NH_2 , niż nośników posiadających grupy epoksydowe (19).

Interesującą — naszym zdaniem — modyfikację organicznych i nieorganicznych nośników zaproponowano na drodze wytworzenia w nich wewnątrzpenetrującej sieci (IPN — *interpenetrating network*) (20). Ten sposób szczotkowej polimeryzacji jednego polimeru wewnątrz i na powierzchni innego polimeru (IPN) przeprowadzono używając 4 kopolimerów organicznych oraz 2 kulistych żeli krzemionkowych. Użyte nośniki miały znacznie zróżnicowaną wielkość porów. Monomery akryloamidu doprowadzono do polimeryzacji, optymalizując ich proporcje w obecności 6 zastosowanych nośników. Po współpolimeryzacji akryloamidu na powierzchni i we wnętrzu nośników, (kopolimery organiczne i żel krzemionkowy) najwyższą ilość grup aminowych stwierdzono w żelu krzemionkowym. Było to wynikiem silnej hydrofilności żelu krzemionkowego, a jednocześnie mogło prowadzić do wytwarzania specyficznej sieci akryloamidu z żelem za pomocą wiązań wodorowych (21). Kopolimery organiczne, mające właściwości hydrofobowe (zwłaszcza Chromosorb, ale także kopolimery metakrylanu i naftalenu, które nie ulegają solwatacji) w środowiskach wodnych znacznie słabiej wytwarzały połączenia ze współwytrącanym poliakryloamidem. Przez to i ilość grup NH_2 na ich powierzchni była ograniczona. Podczas immobilizacji enzymów na opracowanych nośnikach istotniejsza dla kowalencyjnego związania białek była struktura porowata użytych matryc, niż specyficzna wielkość ich powierzchni. Z wyników doświadczeń z trzema enzymami o zróżnicowanej masie cząsteczkowej (peroksydaza 40 000 d, glukoamylaza 70 000 d i ureaza 480 000 d) można sądzić, że enzymy o większej masie cząsteczkowej wiązały się z nośnikiem jedynie powierzchniowo (glukoamylaza i ureaza), natomiast peroksydaza o małej cząsteczce mogła wnikać do porowatej struktury matryc, zwiększając ilość związanego enzymu i tym samym jego aktywność po immobilizacji (20). Przedstawione IPN nośniki z wbudowaną aktywną strukturą poliakryloamidu są łatwe i tanie do przygotowania zarówno na skalę laboratoryjną, jak i w skali technicznej (22).

3. Zastosowania immobilizowanych enzymów w badaniach podstawowych

Immobilizacje enzymów służą zazwyczaj stabilizacji ich aktywności, umożliwiając wielokrotne użycie tej samej porcji enzymu. Jest to więc zabieg, który przy drogim surowcu, jakim jest izolowany z materiału biologicznego preparat enzymu, umożliwia jego użycie przez kilka miesięcy, co w istotny sposób obniża koszty procesów biotechnologicznych. Oprócz tak ważnego aspektu

użycia enzymów immobilizowanych w biotechnologii, stosuje się je w badaniach podstawowych, wykorzystując wymienione ich zalety. Można przyjąć, że enzymy immobilizowane, w swojej nowej formie mogą naśladować środowisko naturalne (23), a związany z hydrofobową lub bardziej hydrofilową matrycą enzym uzyska właściwości podobne do enzymu związanego z błonami lipidowo-białkowymi w komórce (23). Pogląd ten powtarzamy za Bickerstaffem (23). Trzecio- i czwartorzędowa struktura rozpuszczalnych białek, charakteryzująca się dużą labilnością ulega — naszym zdaniem — po immobilizacji zmianom, tworząc bardziej sztywne struktury, podobne do układu zamrażanego. Umożliwić to może łatwiejszy dostęp substratu do aktywnego centrum enzymu, co implikuje zmiany kinetyki reakcji chemicznych w obecności enzymów immobilizowanych. Przyniesiony schemat jest ilustracją porównawczą białek w błonach i enzymów immobilizowanych (rys. 4), (24). Pamiętać należy, że w mitochondriach zewnętrzna błona zawiera 52% białek i 48% tłuszczu, podczas gdy ich wewnętrzna błona ma już 76% białek, a tylko 24% tłuszczu (25).



Rys. 4. Schemat błony komórkowej i enzymu immobilizowanego (24).

Podczas immobilizacji za pomocą wiązań kowalencyjnych, enzymy łączą się nie tylko z powierzchnią matrycy, ale także, przy odpowiedniej jej porowatości z grupami czynnymi, znajdującymi się wewnątrz nośnika. Powstają więc układy przestrzenne zbliżone w swojej konformacji do układu przestrzennego białek w błonach lipidowo-białkowych. Wydaje się zatem, że enzymy immobilizowane można traktować jako układy modelowe, naśladowujące układy błon występujące w przyrodzie.

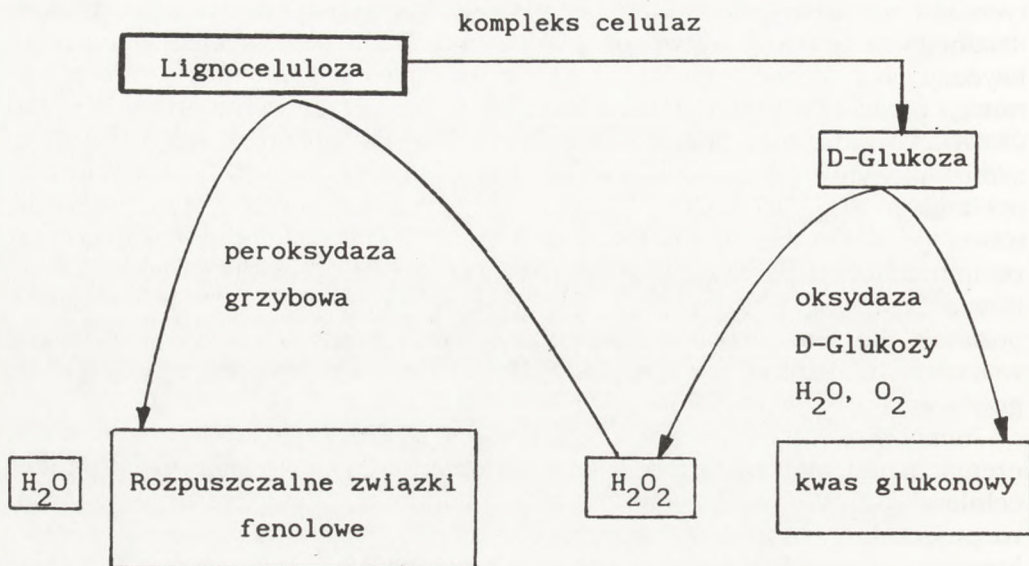
Białka mogą być połączone z matrycami za pomocą ich wolnych grup NH_2 , COOH lub komponenty węglowodanowej często w nich obecnej. Tak zróżnicowane sposoby immobilizacji białek mają niewątpliwie istotny wpływ na właściwości produktu. Korzystając z matryc, hydrofilnych lub hydrofobowych, jak i zmieniając rodzaj wiązania białka z nośnikiem — uzyskuje się naszym zdaniem — kompleksy o właściwościach zbliżonych do struktur białek w błonach komórkowych. Idąc tym tokiem rozumowania określono funkcję wolnych grup karboksylowych w peroksydazie (26). Dla wyjaśnienia trzeba dodać, że

peroksydaza u roślin ma podwójną funkcję. Aktywność „peroksydazowa” umożliwia redukcję H_2O_2 w obecności donorów wodoru, takich jak aminy aromatyczne lub związki fenolowe. Równocześnie sugeruje się, że peroksydaza ma zdolność utleniania kwasu indolilo-3-octowego (IAA) (27 – 31). Jednak dotychczas nie określono budowy centrum aktywnego peroksydazy, odpowiedzialnego za tę drugą aktywność. W naszych badaniach wykorzystano peroksydazy pochodzące z dwóch źródeł: z *Trametes versicolor* i z orzecha ziemnego (*Arachis hypogaea*). Immobilizowano je poprzez wolne grupy NH_2 lub $COOH$. Po związaniu białek z nośnikami określano obydwie aktywności enzymu. Aktywność „peroksydazowa” po immobilizacji zarówno przy użyciu wolnych grup NH_2 , jak i $COOH$ białka, utrzymywała się na stałym poziomie, nawet po kilku dniach inkubacji. Natomiast aktywność „IAA – oksydazowa” po immobilizacji peroksydaz przy użyciu grup $COOH$ spadła prawie do zera. Równocześnie stwierdzono zachowanie zdolności utleniania IAA na znacznym poziomie dla obu enzymów immobilizowanych przez grupy NH_2 . Wyniki te wskazują na istotną rolę grup $COOH$ w utlenianiu IAA przez peroksydazę grzybową i z orzecha ziemnego (26).

Immobilizowana peroksydaza grzybowa znalazła zastosowanie w doświadczeniach nad biotransformacją lignosulfonianów sodu (odpady po produkcji celulozy) (32). We wstępnych doświadczeniach okazało się, że użyty w formie rozpuszczalnej enzym traci aktywność w momencie zmieszania go z roztworem kwasów lignosulfonowych. Dopiero immobilizacja peroksydazy grzybowej umożliwiała stabilizację tego enzymu. Stosując immobilizowaną peroksydazę grzybową udało się wykazać podczas kilkugodzinnych inkubacji enzymu z kwasami lignosulfonowymi, że jest ona w stanie katalizować ich biotransformację. Masy cząsteczkowe kwasów lignosulfonowych określono za pomocą sączenia molekularnego na żelu Sephadex G-50. Okazało się, że są one mieszaniną polimerów fenylopropanowych o masach od 4,5 Kd poprzez frakcje 12 Kd do 50 Kd. Te trzy frakcje kwasów poddano działaniu immobilizowanej peroksydazy przez 3, 12 i 24 godziny. Następnie przy użyciu Sephadexu G-50 określano masy cząsteczkowe produktów działania enzymu. Udało się wykazać istotne ich zmiany, a zatem pojawienie się produktów o znacznie mniejszych masach (spadek nawet do 2,5 Kd), a także powstawanie lignosulfonianów o masach 7, 11, 30 Kd (32). W dalszych doświadczeniach używano także immobilizowanych fragmentów błon komórkowych grzybni *Trametes versicolor*. Zawarta tam peroksydaza katalizowała również biotransformacje kwasów lignosulfonowych, podobnie jak enzym wyizolowany z tego grzyba (33). Na podstawie tych i wcześniej uzyskanych wyników postawiono tezę, że peroksydaza grzybowa jest zdolna do de- i repolimeryzacji lignosulfonianów (32,33).

Lignina jest złożonym, fenylopropanowym polimerem występującym w przyrodzie w kompleksie z celulozą i ksyłanami. Dotychczas, kompleksowa biotransformacja tego złożonego konglomeratu związków organicznych, określanych jako drewno, jest problemem nie rozwiązany (34 – 40). W pracy Łoborzewskiego i Paszczyńskiego (34) zaproponowano i sprawdzono prakty-

cznie oddziaływanie katalityczne trzech immobilizowanych enzymów: celulazy, oksydazy glukozy i peroksydazy na kompleks ligninowo-celulozowy (rys. 5), (34).



Rys. 5. Schemat enzymatycznej biotransformacji lignocelulozy (34).

Osiągnięto zamierzony efekt katalityczny. Kompleks celulaz zdegradował celulozę do glukozy. Wykazano, że glukoza została utleniona za pomocą oksydazy glukozy do kwasu glukonowego z równoczesnym utworzeniem H₂O₂ — substratu niezbędnego do działania peroksydazy grzybowej. Skutkiem tego ciągu reakcji było uzyskanie i określenie jakościowe prostych związków fenolowych powstałych przez biodegradację ligniny. Tak skonstruowany układ unieruchomionych kilku enzymów ma szanse zastosowania dla ciągłej biodegradacji lignocelulozy (34 – 37). Przegląd aplikacji immobilizowanych enzymów z grzyba *Trametes versicolor* opublikowany w 1990 r. podsumowuje serię doświadczeń nad biotransformacją ligniny przy udziale immobilizowanej peroksydazy grzybowej z *Trametes versicolor* (36).

Bickerstaff pisze w książce *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*: „Idealnie byłoby badać wewnątrzkomórkowe enzymy w ich naturalnym środowisku przez związanie wyizolowanych enzymów ze strukturą zbliżoną do żelu. Alternatywą takich badań, jednocześnie posiadających aspekt praktyczny, byłoby immobilizowanie izolowanych enzymów do mechanicznie stabilnych, sztucznych nośników o właściwościach hydrofilowych” (23). W celu spełnienia sugestii Bickerstaffa przeprowadzono serię badań z użyciem enzymów unieruchomionych na nośnikach hydrofilowych i dla porównania rów-

niez hydrofobowych. Zaproponowano doświadczenia mające na celu określenie zmian aktywności dwóch immobilizowanych enzymów: endopoligalakturonazy i peroksydazy, w obecności kilku wybranych jonów metali (39). Endopoligalakturonaza (EndoPG) zawarta w *Aspergillus niger* jest izolowana z tego źródła na skalę przemysłową. Enzym ten następnie jest używany w przemyśle spożywczym, tekstylnym i farmaceutycznym. Zarówno w środowisku naturalnym namnażania grzybni, jak i podczas zastosowań przemysłowych tego enzymu mogą być obecne jony Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} . Zwykle działają one stymulująco na aktywność większości enzymów. W warunkach przemysłowych zawarta w komórkach *A. niger* endopoligalakturonaza styka się z metalami o właściwościach szkodliwych dla białek jak Cd, Hg, Pb. Wydało się zatem istotne określenie wpływu metali na aktywność endopoligalakturonazy użytej w warunkach modelowych jako enzym immobilizowany.

Oczyszczoną endopoligalakturonazę (EC 3.2.1.15) z *Aspergillus niger* 71 immobilizowano kowalencyjnie przez grupy NH_2 lub $COOH$ białek do żelu krzemionkowego pokrytego adhezyjnie keratyną (matryca hydrofilowa) (10,38). Określono wpływ Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , a także Pb^{2+} , Hg^{2+} oraz Cd^{2+} w stężeniach 0,1 do 1,2 mM na rozpuszczalny i immobilizowany enzym. Stwierdzono, że jego aktywność po unieruchomieniu ulega stabilizacji, także w obecności Pb^{2+} , Hg^{2+} i Cd^{2+} .

Endopoligalakturonaza (EndoPG) unieruchamiana na nośniku przy użyciu wolnych grup $COOH$ traci aktywność łatwiej w obecności użytych metali niż enzym w formie rozpuszczalnej. Natomiast połączenie badanego enzymu przez wolne grupy aminowe nie tylko powoduje jego stabilizację, ale także wzrost aktywności, zwłaszcza w obecności Cu^{2+} , Mg^{2+} , a także Cd^{2+} (40 – 60% wzrost) (39).

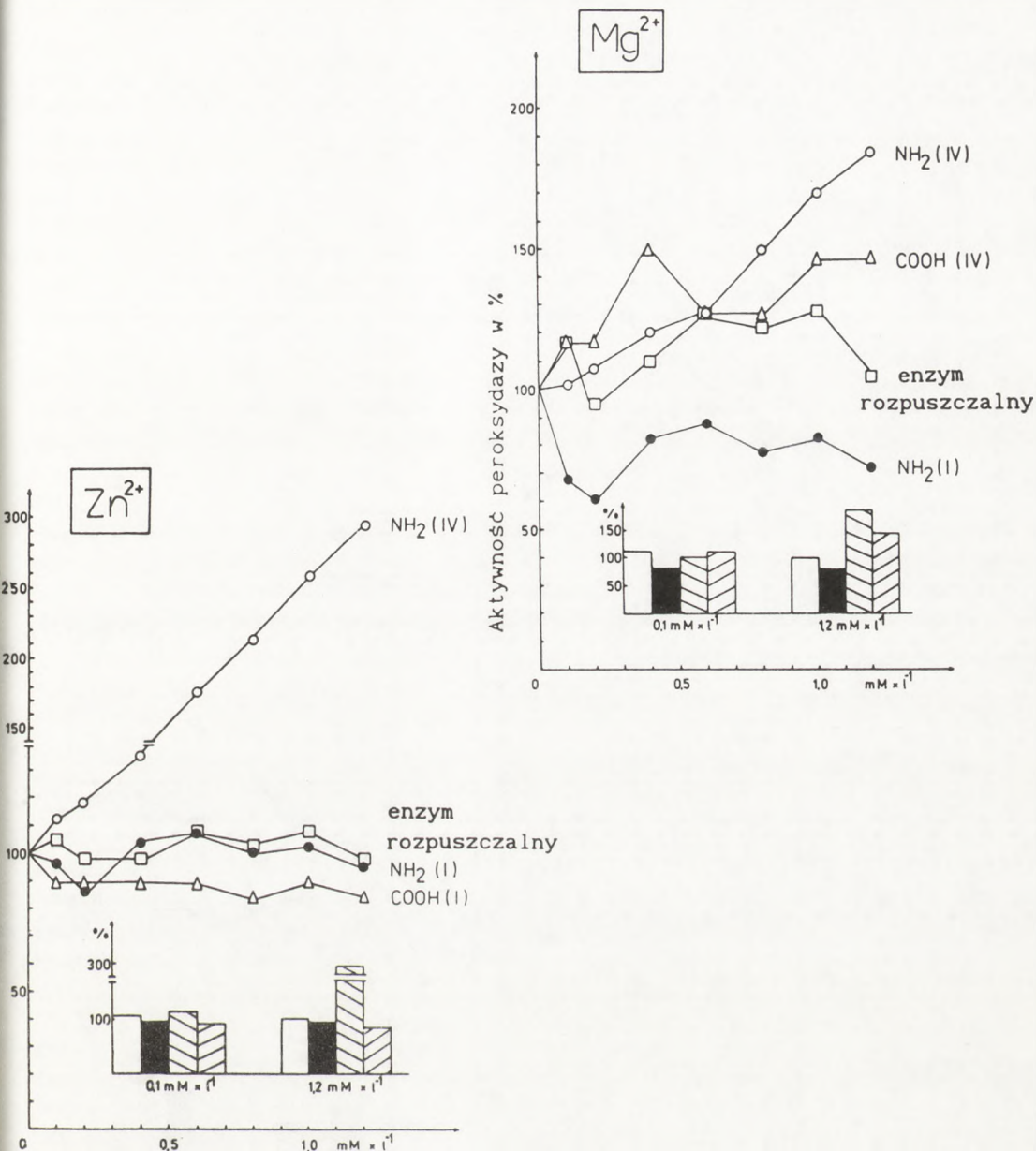
Spostrzeżenia dotyczące stymulującego wpływu magnezu na aktywność immobilizowanej EndoPG zainicjowały dalsze doświadczenia z tym enzymem (41). Określono zależności pomiędzy aktywnością endopoligalakturonazy immobilizowanej i rozpuszczalnej od obecności Mg^{2+} i równocześnie Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} (41). Już doświadczenia z rozpuszczalną EndoPG wykazały skuteczne działanie stymulujące jonów Mg^{2+} na aktywność tego enzymu, mimo obecności Hg^{2+} , Pb^{2+} lub Cd^{2+} w zakresie stężeń do 1,2 mM. Po immobilizacji aktywność endopoligalakturonazy była stymulowana przez obecność Mg^{2+} przy niskich stężeniach Pb^{2+} i Hg^{2+} do koncentracji 0,4 mM. Większe stężenia Pb^{2+} lub Hg^{2+} działały hamująco na aktywność poligalakturonazy, mimo obecności Mg^{2+} (0,1 i 1,0 mM). Wykazano również, że aktywności immobilizowanego enzymu są zależne od sposobu jego wiązania z nośnikiem. Aktywność EndoPG po immobilizacji przez grupy $COOH$ była stymulowana przez rosnące stężenia Cd^{2+} w obecności Mg^{2+} . Natomiast EndoPG immobilizowana przez grupy NH_2 traciła aktywność w powyższych warunkach. Sądzymy zatem, że blokada grup $COOH$ EndoPG przez immobilizację stworzyła warunki dla stymulacyjnego efektu Mg^{2+} , mimo obecności Cd^{2+} w stężeniach do 0,4 mM (41). Przeciwny efekt, czyli hamowanie aktywności EndoPG zaobserwowano po immobilizacji przez grupy NH_2 i poddano ten enzym doświadczeniom jak wyżej (41).

W dalszych doświadczeniach modelowych z użyciem enzymów immobilizowanych w obecności jonów metali, oceniono modyfikacje aktywności peroksydazy z kapusty (*Brassica ol. var. capitata*) (42). W doświadczeniach tych zastosowano porównawczo nośniki hydrofobowe i hydrofilowe. Oba typy nośników mogą, naszym zdaniem, dobrze naśladować warunki w naturalnym środowisku lipidowo-białkowym błon komórkowych. Było to tym bardziej ważne, gdyż wiadomo, że peroksydaza u roślin wyższych występuje w formie związanej z błonami.

Porównano wartości stałych Michaelisa peroksydazy rozpuszczalnej (wobec H_2O_2 jako pierwszego substratu) z analogicznymi wartościami dla peroksydazy immobilizowanej. Peroksydazę immobilizowano na pięciu matrycach przez wolne grupy NH_2 lub $COOH$. Wyznaczone dla niej stałe Michaelisa przez grupy NH_2 były wyższe od tychże wartości peroksydazy rozpuszczalnej. Natomiast po immobilizacji peroksydazy przez grupy $COOH$ wartości K_m były niższe od K_m peroksydazy rozpuszczalnej. Zmiany stałych K_m peroksydazy immobilizowanej sugerują istotną funkcję zarówno nośnika jak i rodzaju wiązania białka z matrycą. Stworzone warunki modelowe determinują zatem stopień powinowactwa enzymu do substratu (H_2O_2). Jeśli słuszne jest odnośnienie uzyskanych wyników do warunków naturalnych, uważamy, że peroksydaza występująca w komórkach w formie związanej (42,43,44) ma również w podobny sposób zmodyfikowane powinowactwo substratowe (41).

Tak jak wykazano dalej, aktywność peroksydazy immobilizowanej na nośniku hydrofilowym była w znacznym stopniu stymulowana przez jony Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , a także Cd^{2+} (rys. 6, 7), (42). Peroksydaza unieruchomiona na matrycy hydrofobowej bądź traciła aktywność w stosunku do enzymu rozpuszczalnego lub aktywność tego enzymu nie zmieniała się w obecności wymienionych jonów (rys. 6, 7). Ochronne działanie hydrofilowej matrycy wykazano także w doświadczeniach z peroksydazą immobilizowaną, poddaną następnie działaniu Cu^{2+} , Ca^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} (41).

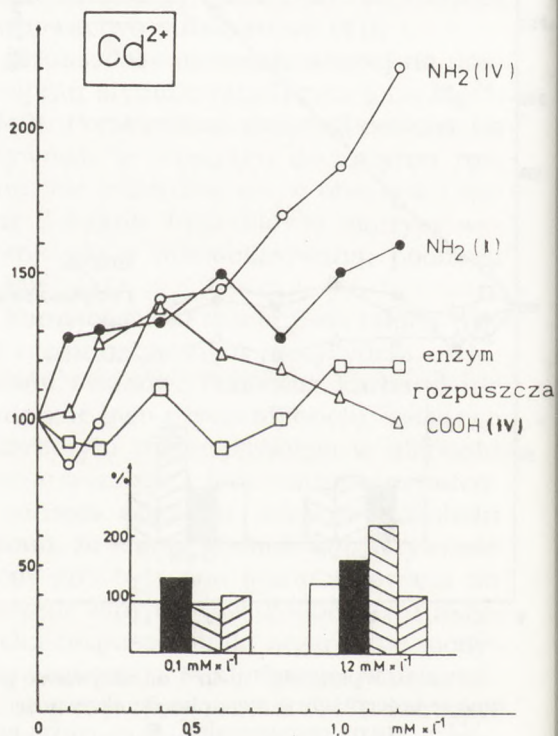
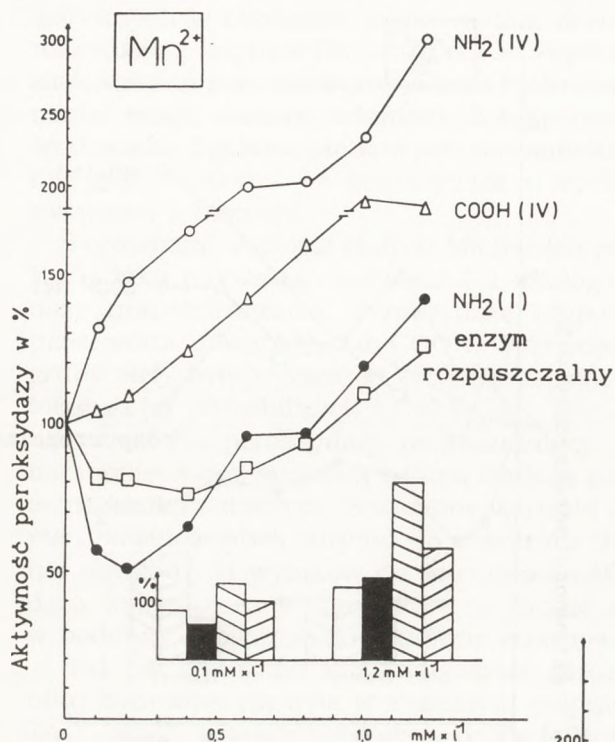
Immobilizacja chroni peroksydazę z kapusty przed działaniem takich trucizn jak karbaryl (45,46). Karbaryl jest często używanym pestycydem, zwłaszcza dla ochrony kapusty przed larwami owadów. Ponieważ karbaryl nie rozpuszcza się w wodzie, wobec tego konieczne było użycie alkoholu etylowego jako rozpuszczalnika. Badano wpływ karbarylu rozpuszczonego w alkoholu etylowym na aktywność peroksydazy rozpuszczalnej i immobilizowanej. Jednocześnie sprawdzono oddziaływanie samego alkoholu (stężenie alkoholu 16,7%) na obie formy enzymu. Stwierdzono, że etanol stymulował aktywność peroksydazy z kapusty szczególnie, wtedy gdy była ona immobilizowana na nośnikach hydrofobowych (kopolimer octanu winylu i diwinylobenzenu aktywowany etylenodiaminą). Według Dordicka rozpuszczalniki organiczne modyfikują aktywności enzymów następująco: zmieniają konformację białek, oddziałują bezpośrednio na substrat, albo na powstający produkt (47). Karbaryl rozpuszczony w alkoholu etylowym i użyty w stężeniach (do 20 mM) analogicznych do stężeń stosowanych w opryskach całych roślin kapusty, działał hamująco na aktywność badanego enzymu. Stopień obniżenia aktywności



Rys. 6. Wpływ Mg²⁺ i Zn²⁺ na aktywność peroksydazy z kapusty. Aktywność enzymu wyrażona w procentach w stosunku do aktywności początkowej.

□ — enzym rozpuszczalny, ● — enzym immobilizowany przez grupy NH₂ białka, Δ — enzym immobilizowany przez grupy COOH białka (42).

Enzym unieruchamiano na nośniku I — żel krzemionkowy z grupami epoksydowymi oraz IV — kopolimer akrylanu z grupami aminowymi pochodzącymi z etylenodiaminy.



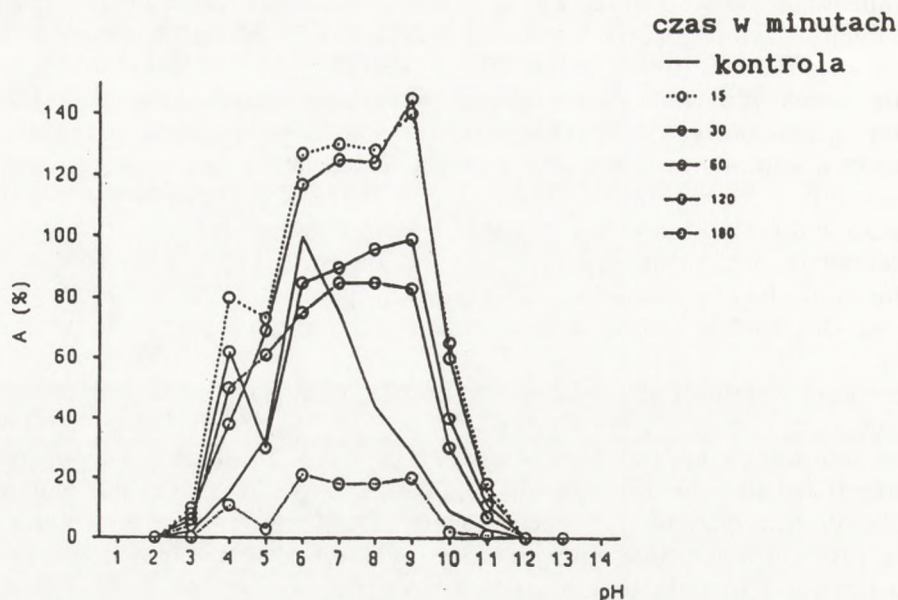
Rys. 7. Wpływ Mn²⁺ i Cd²⁺ na aktywność peroksydazy z kapusty wyrażona w procentach w stosunku do aktywności początkowej. Oznaczenia jak na rys. 6 (42).

immobilizowanej peroksydazy był w tych doświadczeniach zawsze mniejszy od inhibicji enzymu rozpuszczalnego. Zależał on także od rodzaju wiązania enzymu z nośnikiem (przez grupę NH_2 , COOH , lub też węglowodanową komponentę peroksydazy), a także od jego właściwości hydrofilowych i jeszcze bardziej hydrofobowych (46). Obecność karbarylu w środowisku reakcji peroksydazy z kapusty zwiększa powinowactwo tego enzymu, użytego w formie rozpuszczalnej, jak i immobilizowanej, do H_2O_2 . Powinowactwo to rośnie, zwłaszcza w doświadczeniach z użyciem hydrofobowego nośnika zbudowanego z kopolimerów organicznych (octan winylu, diwinylobenzen aktywowany etylenodiaminą). Jest to znamienna obserwacja, sugerująca, że hydrofobowe matryce są dla białek dobrą osłoną przed działaniem czynników trujących (42,46).

Wcześniej wspomniano, że roślinne peroksydazy są obecne w cytoplazmie w formie rozpuszczalnej, ale występują także w postaci związanej z błonami oraz ze ścianami komórkowymi (44,49 – 51). Także proteinazy są obecne we wszystkich ważniejszych częściach komórki, w związku z tym ich wpływ na inne obecne tam enzymy może być znaczny. Eksperymentalnie wywołana częściowa proteoliza rozpuszczalnych enzymów wyizolowanych z komórki jest często używaną metodą badania ich funkcji i struktury (48 – 58). Proteoliza nie zawsze powoduje całkowitą inaktywację enzymów, lecz zwykle jest przyczyną zmniejszenia ich masy cząsteczkowej (55 – 58). Z reguły jednak centrum aktywne jest dobrze chronione przed działaniem proteinaz (48,59).

Kontakt pomiędzy proteinazami i innymi enzymami w komórce, także i peroksydazą roślinną, jest łatwy, gdy enzymy są rozpuszczalne w cytozolu. Trudniej natomiast o reakcję pomiędzy proteinazami a innymi enzymami, gdy są one związane ze składnikami komórkowymi. Dlatego też w naszych kolejnych doświadczeniach przebadano wpływ kilku wybranych proteinaz na aktywność rozpuszczalnej i immobilizowanej peroksydazy z kapusty. W przeprowadzonych doświadczeniach peroksydazę z kapusty poddano działaniu serynowej proteinazy izolowanej także z kapusty (układ homogeny). Oprócz tego zastosowano 6 dalszych proteinaz z innych źródeł roślinnych i zwierzęcych (układ heterogeny). Wyznaczono zmiany aktywności peroksydazy rozpuszczalnej i immobilizowanej w zależności od czasu i pH oddziaływania proteinaz (rys. 8, 9), (48).

Przy względnie krótkich czasach (60 min) oddziaływania proteinazy z kapusty (układ homogeny) na pochodzącą z tego samego źródła peroksydazę rozpuszczalną i immobilizowaną obserwuje się aktywację badanego enzymu, która później zanika (rys. 8, 9). Znamienne są zmiany aktywności peroksydazy od pH, pod wpływem proteinazy z kapusty. Optymalna wartość aktywności peroksydazy zostaje zmieniona, a mianowicie w przypadku enzymu rozpuszczalnego następuje przesunięcie optimum pH z 6–7 do 9–10 (rys. 8). W analogicznych warunkach doświadczenia, jednak z użyciem immobilizowanej peroksydazy powstają wyraźne dwa optima aktywności: przy pH 4 i pH 10–11 (rys. 9). Te ostatnie zmiany mogą być wynikiem odsłonięcia drugiego centrum aktywnego w peroksydazie działaniem proteinazy z kapusty.

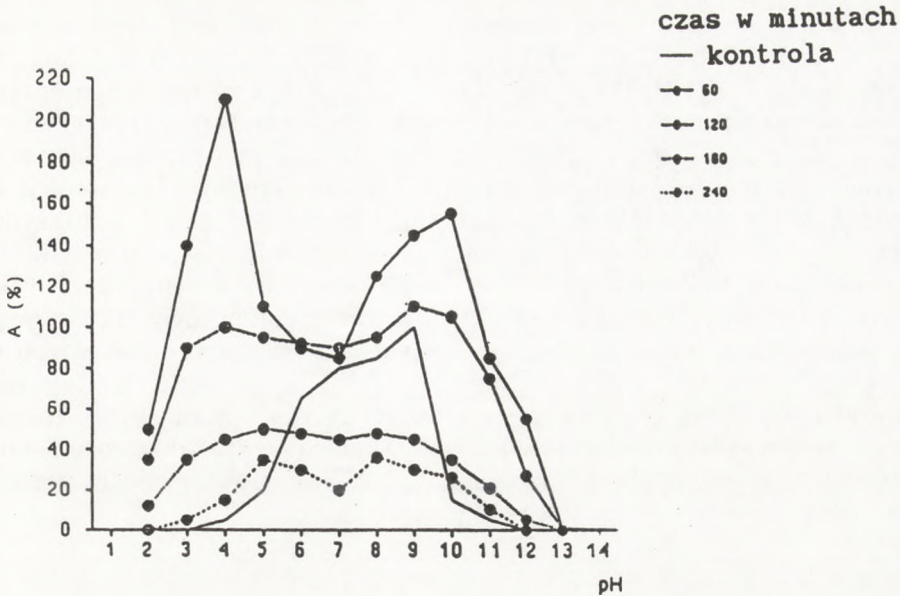


Rys. 8. Wpływ serynowej proteinyzy z kapusty na aktywność rozpuszczalnej peroksydazy z kapusty w zależności od pH i czasu reakcji. Aktywność peroksydazy wyrażona w procentach w odniesieniu do aktywności kontroli (48).

Wysoki stopień aktywacji (dwukrotny) immobilizowanej peroksydazy stwierdzono po inkubacji tego enzymu z pepsyną, natomiast enzym rozpuszczalny tracił szybko swą aktywność w obecności tego enzymu. Należy zwrócić uwagę, że pepsyna znacznie zmienia optimum pH immobilizowanej peroksydazy, z zaznaczeniem tylko jednego optimum i to przy pH 3.

Interesujące okazały się dalsze doświadczenia z użyciem peroksydazy immobilizowanej i rozpuszczalnej, gdzie oprócz wpływu proteinaz zbadano także interakcję z metalami (48). Uzyskane wyniki wskazują, że niektóre metale (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) są zdolne do ograniczenia inhibicji aktywności peroksydazy przez proteinyzy. Przy krótkich (1 – 2 godz) okresach inkubacji immobilizowanej peroksydazy z kapusty z proteinyzami (serynowa proteinaza z kapusty, trypsyna, proteinaza K) w obecności niektórych jonów metali uzyskano ewidentną aktywację badanego enzymu, zamiast, jak się spodziewano, inhibicji przez proteolizę (48). Aktywację immobilizowanej peroksydazy o około 50 – 80% stwierdzono w doświadczeniu z trypsyną i jonami Mg^{2+} , a także Cu^{2+} i Hg^{2+} . Stymulujące działanie jonów magnezu na wiele enzymów jest znane, natomiast aktywacja peroksydazy w obecności Cu^{2+} i Hg^{2+} , jak się wydaje, jest zarówno efektem szybkiego ograniczenia aktywności proteinaz, jak i ochrony peroksydazy przed proteolizą w wyniku jej immobilizacji.

Peroksydaza u roślin jest enzymem pełniącym zróżnicowane funkcje fizjologiczne. Enzym uczestniczy w procesach ochrony przed zimmem, dojrzewania



Rys. 9. Wpływ serynowej proteinazy z kapusty na aktywność immobilizowanej peroksydazy z kapusty w zależności od pH i czasu reakcji. Enzym immobilizowano na szkło o kontrolowanej porowatości. W doświadczeniach użyto 100 mg immobilizowanej peroksydazy i 100 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ proteinazy. Aktywność peroksydazy wyrażono w procentach w odniesieniu do aktywności kontroli (48).

owoców, pełni też funkcje odpornościowe w zakażeniach, chroni roślinę przed owadami, uczestniczy w różnicowaniu cech płciowych oraz tuberyzacji (49,60,61). Z racji pełnienia tak wielu istotnych funkcji fizjologicznych peroksydaza jest obecna we wszystkich komórkach i tkankach roślinnych i w związku z tym, często dochodzi do jej kontaktu ze związkami mineralnymi. Ilość związków nieorganicznych, które wywołują stresy biologiczne jest zredukowana przez substancje zwane fitochelatynami (62 – 66).

Obecnie uważa się, że fitochelatyny są peptydami syntetyzowanymi w tkankach roślinnych w obecności metali ciężkich przez enzym o nazwie transpeptydaza γ -glutamylcysteina:dipeptyd (syntetaza fitochelatyn). Enzym ten katalizuje przeniesienie γ -glutamylcysteiny ze zredukowanego glutationu (GSH) na akceptor albo oligomery fitochelatyn (62,64,67 – 70). Fitochelatyny są zdolne do wiązania metali ciężkich przy udziale grup sulfhydrylowych (71). Zredukowany glutation, jako jeden z prekursorów polipeptydów wiążących metale ma strukturę analogiczną do struktury fitochelatyn: $-(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, gdzie $n = 2 - 11$. Równocześnie sam glutation jest zdolny do wiązania metali za pomocą grup SH cysteiny. Z tych względów wydało się istotne określenie wpływu metali ciężkich na aktywność peroksydazy rozpuszczalnej i immobilizowanej w obecności GSH jako prekursora fitochelatyn. W doświadczeniach użyto 6 metali (Ag^{1+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+}). Wykazano, że aktywność

immobilizowanej peroksydazy była znacznie stymulowana (w 180 – 300%), gdy obok wymienionych metali w środowisku był obecny GSH (60). Jego obecność warunkowała dalej stymulację aktywności immobilizowanej peroksydazy, nawet w obecności Pb^{2+} , Hg^{2+} , a także Cd^{2+} . Przy aktywacji badanego enzymu do 300%, kontrola zachowywała aktywność na poziomie 60% aktywności wyjściowej. Uznając strukturę i właściwości immobilizowanej peroksydazy z kaptusy za model tego enzymu zawartego w błonach lipidowo-białkowych komórki roślinnej, uważamy, że zachowanie aktywności przez peroksydazę w obecności silnie toksycznych metali jest ważną informacją nie tylko badawczą, ale także praktyczną. Nie jest wykluczone, że w komórkach roślin peroksydaza związana w błonach struktur wewnątrzkomórkowych reaguje podobnie na obecność metali ciężkich, jak wykazano w przeprowadzonych doświadczeniach. Może to być tym bardziej realne ze względu na tworzenie „zmrożonych” struktur białkowych w błonach lipidowo-białkowych komórki i ochronie w ten sposób centrum aktywnego enzymów, a także dzięki interakcji metali z fitochelatynami, umożliwiając stymulację aktywności peroksydaz jako efekt obronny w środowisku przyrodniczym.

4. Podsumowanie

Przedstawione opracowanie zawiera wyniki około dziesięcioletnich badań nad nowymi nośnikami do immobilizacji białek i możliwości ich aplikacji. W tym czasie uzyskano siedem nowych rodzajów nośników i sprawdzono ich przydatność w laboratorium. Pośród opracowanych nowych matryc do immobilizacji białek, na uwagę zasługują: żele krzemionkowe aktywowane BCl_3 i $SiCl_4$ (7), kopolimery organiczne akrylonitrylu i diwinylobenzenu (9), pokrywane adhezyjnie keratyną lub poliamidem nośniki nieorganiczne (10), polimeryzacje z użyciem 2,3-epoksy-propylometakrylanu (19), nośniki z wewnątrzpenetrującą siecią IPN (20). Nowe nośniki zostały następnie użyte w badaniach aplikacyjnych.

1. Określono stopień biotransformacji ligniny w reakcji katalizowanej przez grzybową peroksydazę (32,36).

2. Stwierdzono istotną funkcję grup COOH w enzymatycznej reakcji utleniania kwasu indolilo-3-octowego (26).

3. Zastosowano immobilizowane enzymy jako układy modelowe ich występowania w błonach komórkowych.

4. Określono zmiany aktywności wybranych enzymów immobilizowanych w obecności metali, proteinaz i glutationu. Zasugerowano analogie tych zmian do warunków środowiska komórkowego.

Podsumowując, uważamy, że zastosowanie większej gamy matryc do immobilizacji białek, przez swoje zróżnicowane właściwości fizyko-chemiczne, stwarza możliwości naśladowania warunków środowiska naturalnego. Na podstawie obserwacji Bickerstaffa (23) i własnych sądzimy, że enzymy po immobilizacji mogą uzyskiwać właściwości bardziej zbliżone do właściwości enzy-

mów występujących w komórkach roślin i zwierząt, a przez to można poznać lepiej ich funkcje i cechy właściwe dla struktur komórkowych w naturze.

Autorzy wyrażają podziękowanie prof. prof. E. Galasowi, J. Ościkowi i K. Wierzychowskiemu za ich zainteresowanie i umożliwienie wykonania opisanych badań.

Literatura

1. Łoborzewski J., (1981), *J. Biol. Macromol.*, 3, 77 – 81.
2. Dawidowicz A., Łoborzewski J., (1984), *Chromatographia*, 18, 41 – 43.
3. Dawidowicz A., Łoborzewski J., (1984), *Chromatographia*, 18, 389 – 392.
4. Łoborzewski J., Waksmundzki A., (1986), *Chromatography'85*, Akademiai Kiado, Budapest, Eds. Kalasz H., Ettre L.S., 223 – 232.
5. Łoborzewski J., (1981), *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 2161 – 2165.
6. Łoborzewski J., Paszczyński A., (1983), *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 3207 – 3212.
7. Wójcik A., Łoborzewski J., Błaszczczyńska T., Fiedurek J., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 983 – 986.
8. Łoborzewski J., Wójcik A., Błaszczczyńska T., (1989), *Acta Biotechnol.*, 9, 239 – 246.
9. Łoborzewski J., Kolarz B. N., Wójcik A., Wojaczyńska M., Trochimczuk A., Błaszczczyńska T., (1988), *Acta Biotechnol.*, 8, 47 – 53.
10. Łoborzewski J., Paszczyński A., Wolski T., Fiedurek J., (1984), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 121, 220 – 228.
11. Łoborzewski J., Wolski T., Wójcik A., Fiedurek J., (1985), *Hidrolise Enzimatica De Biomassas*, Eds. de Maraes F.F., Zanin G.M., Maringa F., (Parana) 2, 367 – 374.
12. Fiedurek J., Łoborzewski J., Wójcik A., Wolski T., (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 747 – 750.
13. Łoborzewski J., Leonowicz A., (1990), *Interbiotech'89, Mathematical Modelling in Biotechnology*, Eds. Błażej A., Ottova A., Elsevier, 387 – 391.
14. Leonowicz A., Wojtaś-Wasilewska M., Rogalski J., Luterek J., (1988), *Interbiotech'87, Enzyme Technologies*, Eds. Błażej A., Zemek J., Elsevier, 415 – 451.
15. Łoborzewski J., (1986), *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*, Eds. Greppin H., Penel C., Gaspar Th., Univ. of Geneva, Switzerland, 321 – 346.
16. Kolarz B. N., Łoborzewski J., Trochimczuk A., Wojaczyńska M., (1989), *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 171, 201 – 211.
17. Wójcik A., (1983), *Angew. Makromol. Chem.*, 119, 193 – 200.
18. Wójcik A., Kwietniewski L. J., (1988), *Chromatogr.*, 435, 55 – 62.
19. Wójcik A., Łoborzewski J., Błaszczczyńska T., (1990), *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 48, 287 – 301.
20. Wójcik A., Łoborzewski J., (1991), *Polymeric Materials Science and Engineering (PMSE)*, New York, 65, 169 – 170.
21. Kolarz B. N., Wojaczyńska M., Herman B., (1989), *Reactive Polymers*, 11, 29 – 35.
22. Wójcik A., Łoborzewski J., (1991), zgłoszenie patentowe nr P – 292506.
23. Bickerstaff G. F., (1984), *Topics in enzyme and fermentation biotechnology*, Ed. Wiseman A., Ellis Horwood, Chichester, 9, 162 – 171.
24. Łoborzewski J., (1986), *Self regulation of plant metabolism*, Pub. House of the Bulgarian Acad. Sci., Sofia, 214 – 222.
25. Rawn J. D., (1983), *Biochemistry*, Harper and Row Pub. Inc., New York, 463 – 467.
26. Łoborzewski J., Wolski T., (1985), *Phytochemistry*, 24, 2211 – 2213.
27. Hoyle M., (1977), *Plant Physiol.*, 60, 787 – 793.

28. Hoyle M., (1977), *Plant Physiol.*, 50, 15 – 22.
29. Srivastava O. P., van Huystee R. B., (1976), *Phytochemistry*, 16, 1527 – 1535.
30. Fieldes M. A., Deal C. L., Tyson H., (1982), *Phytochemistry*, 21, 1875 – 1880.
31. Henry E. W., Gordon C. J., (1980), *J. Exp. Botany*, 31, 1297 – 1305.
32. Łoborzewski J., Trojanowski J., Wojtaś-Wasilewska M., (1982), *Holtzforschung*, 36, 173 – 176.
33. Łoborzewski J., (1984), *Holtzforschung*, 38, 105 – 108.
34. Łoborzewski J., Paszczyński A., (1985), *Enzyme Microb. Technol.*, 7, 564 – 566.
35. Kirk K. T., (1983), *Recent Advances in Lignin Biodegradation Research*, Eds. Higuchi T., Chang H., Kirk T. K., Uni Publishers Co., Ltd, Tokyo, 1 – 11.
36. Łoborzewski J., (1990), *J. of Biotechnology*, 13, 111 – 117.
37. Łoborzewski J., Paszczyński A., (1985), *Hidrolise Enzimatica de Biomassas*, Eds. de Moraes F. F., Zanin G. M., Maringa (Parana), 2, 353 – 366.
38. Łoborzewski J., (1986), *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*, Eds. Greppin H., Penel C., Gaspar Th., Univ. of Geneva, Switzerland, 231 – 246.
39. Ginalska G., Brzyska M., Łoborzewski J., Wolski T., (1989), *J. Mol. Catal.*, 50, 251 – 257.
40. Kurek B., (1992), *Plant Peroxidases 1980 – 1990*, Eds. Penel C., Gaspar Th., Greppin H., University of Geneva, Switzerland, 139 – 186.
41. Brzyska M., Ginalska G., Łoborzewski J., (1991), *Biotechnology and Biochemistry*, 13, 83 – 89.
42. Łoborzewski J., Brzyska M., Wójcik A., Kolarz B. N., (1990), *J. Mol. Catal.*, 59, 373 – 383.
43. Goldberg R., Le T., Catesson A. M., (1985), *J. Exp. Botany*, 36, 503 – 510.
44. *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*, (1986), Eds. Greppin H., Penel C., Gaspar Th., University of Geneva, Switzerland.
45. Łoborzewski J., Brzyska M., (1991), *Biochemical Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*, Eds. Łoborzewski J., Greppin H., Penel C., Gaspar Th., University of Geneva, Switzerland, 479 – 493.
46. Brzyska M., Łoborzewski J., Ginalska G., (1991), *Biotechnol. Appl. Biochemistry*, 15, 11 – 21.
47. Dordick J. S., (1989), *Enzyme Microbiol. Technol.*, 11, 194 – 211.
48. Grzywnowicz K., Brzyska M., Łoborzewski J., Greppin H., (1992), *J. Mol. Catal.*, 77, 365 – 376.
49. *Peroxidases 1970 – 1980*, (1982), Eds. Gaspar Th., Penel C., Thorpe T., Greppin H., University of Geneva, Centre Botanique, Switzerland.
50. Mader M., (1976), *Planta*, 131, 11 – 17.
51. Mader M., Meyer Y., Bopp M., (1976), *Planta*, 129, 33 – 38.
52. Neurath H., (1980), *Protein Folding*, Ed. Jaenicke R., Elsevier/North – Holland, Amsterdam, 501 – 510.
53. Gilbert H. J., Jack G. W., (1981), *Biochem. J.*, 199, 715 – 725.
54. Monroe D. M., Noyes C. M., Lundblad R. J., Kingdom H. S., Griffith M. J., (1984), *Biochemistry*, 24, 1798 – 1801.
55. Vita C., Dalzoppo D., Fontuna A., (1985), *Biochemistry*, 23, 4565 – 4567.
56. Hannappel E., Mac Gregor J. S., Davoust S., Horecker B. L., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, 214, 293 – 302.
57. Lill U., Schrell A., Henschen A., Eggerer H., (1984), *Eur. J. Biochem.*, 143, 205 – 212.
58. Hino Y., Rothman J. E., (1985), *Biochemistry*, 24, 800 – 815.
59. Finel M., (1988), *FEBS Lett.*, 236, 415 – 420.
60. Brzyska M., Grzywnowicz K., Łoborzewski J., Greppin H., (1993), *J. Mol. Catal.*, 78, 113 – 120.
61. *Biochemical Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*, (1991), Eds. Łoborzewski J., Greppin H., Penel C., Gaspar Th., University of Geneva, Switzerland.

62. Steffens J. C., (1990), *Annu. Rev. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 41, 553 – 562.
63. Rauser W. E., (1990), *Annu. Rev. Biochem.*, 59, 61 – 67.
64. Grill E., Winnacker E. L., Zenck M. H., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 439 – 443.
65. Grill E., Loeffler S., Winnacker E. L., Zenck M. H., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6838 – 6845.
66. Leita L., Contin M., Maggioni, (1991), *Plant Sci.*, 77, 139 – 145.
67. Scheller H. V., Huang B., Hatch E., Goldsbrough P. B., (1987), *Plant Physiol.*, 85, 1031 – 1039.
68. Gekeler W., Grill E., Winnacker E. L., Zenck M. H., (1989), *Z. Naturforsch.*, 44c, 361 – 368.
69. Tukendorf A., Rauser W. E., (1990), *Plant Sci.*, 70, 155 – 161.
70. Loeffler S., Hockberger A., Grill E., Winnacker E. L., Zenck M. H., (1989), *FEBS Lett.*, 258, 42 – 47.
71. Delhaize E., Jackson P. J., Lujan L. D., Robinson N. J., (1989), *Plant Physiol.*, 89, 700 – 715.

The Supports for Enzymes Immobilization and Their Applications

Summary

The new supports prepared during the last ten years for enzymes immobilization are described. These supports were used for immobilization of some biotechnologically important enzymes.

It was found out that only immobilized peroxidase enables to observe the degree of lignin biotransformation. It is believed that the properties of immobilized enzymes could be similar to those of the natural protein-lipid membranes. Therefore changes of the properties of immobilized enzymes after treatment with heavy metals and proteinases were reviewed.

Key words:

biocatalysis, supports for enzyme immobilization, immobilized peroxidase, endopolygalacturonase, interactions with metal ions, effect of proteinases.

Adres dla korespondencji:

Jerzy Łobarzewski, Zakład Biochemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, pl. M. Curie-Skłodowskiej 3, 20 – 031 Lublin.