

KAROLINA ZYNEK
JOLANTA BRYJAK

Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, Wrocław

Dobór warunków izolacji i oczyszczania tyrozynazy z *Agaricus bisporus*

Wstęp

Tyrozynaza (EC 1.14.18.1) należy do grupy oksydoreduktaz miedziowych i jest endogennym enzymem szeroko rozpowszechnionym w naturze. Najczęściej używanym źródłem są pieczarki (*Agaricus bisporus*). Ze względu na szeroką specyficzność substratową jest uważana za enzym o potencjalnie dużych zastosowaniach biotechnologicznych np. produkcja o-difenoli o właściwościach przeciwutleniających (hydroksytyrozol) [1], biosynteza leków (L-Dopa) [2], oligomeryzacja związków fenolowych i ich naszczepianie na powierzchnie biopolimerów [3], biotransformacje związków fenolowych i ich pochodnych [4] oraz jako element biosensorów umożliwiających szybkie i dokładne monitorowanie poziomu zanieczyszczeń fenolowych w środowisku i w produktach spożywczych [5]. W zależności od potencjalnych zastosowań używane są enzymy o różnym stopniu czystości. Celem przeprowadzonych badań było opracowanie taniej i wydajnej procedury izolacji i oczyszczania tyrozynazy z *Agaricus bisporus*.

Materiały i metody

Punktem wyjścia prowadzonych badań była procedura izolacji tyrozynazy opisana przez Gąsowską i in. [6]. Do wstępnego rozdrabniania pieczarek sprawdzono przydatność takich urządzeń jak: elektryczna maszynka, elektryczny młyn, homogenizer, młyn kulowy oraz ucieranie w moździerz w ciekłym azocie. Następnie sprawdzono przydatność dezintegracji ultradźwiękowej do rozbijania komórek materiału wyjściowego. Proces ten prowadzono w sposób ciągły przy różnych długościach czasu (10, 20, 60 s). Do oczyszczania surowego ekstraktu tyrozynazy wykorzystano proces wysalania białek siarczanem amonu (30 i 60% wysycenia) oraz chromatografię prowadzoną równolegle na dwóch kolumnach (DEAE-*Granocel*-2000 i DEAE-*Sepharose* DFF100) w temperaturze 4°C, przy ustalonym przepływie (0,1 mLs⁻¹). Białko wmywane było 0,01 M buforem fosforanowym o pH 7,0. Ilość białka w badanych preparatach oznaczano metodą *Lowry'ego* [7], a aktywność enzymu testem z 1 mM L-tyroziną jako substratem ($\lambda = 475$ nm).

Wyniki i ich omówienie

Wybór źródła pieczarek do izolacji tyrozynazy był etapem kluczowym dla uzyskania preparatu enzymu o wysokiej aktywności. Materiał wyjściowy charakteryzował się dużą niejednorodnością i zmiennością, związaną przede wszystkim z wiekiem, jak również rodzajem hodowli, dlatego też kilkakrotnie sprawdzono aktywność surowych ekstraktów tyrozynazy, otrzymanych z pieczarek dwojakiemu pochodzenia (lokalny sprzedawca lub pieczarkarnia). Zaobserwowano, że

najlepsze wyniki uzyskano dla roztworów enzymu wyizolowanych z pieczarek otrzymanych bezpośrednio od producenta (715,9±258,1 U mL⁻¹). Wyniki aktywności dla tych preparatów były około dziesięciokrotnie wyższe, niż dla ekstraktów otrzymanych z grzybów kupionych u lokalnego sprzedawcy (69,2±20,4 U mL⁻¹). Ponadto duży wpływ na aktywność izolowanego enzymu miała również wielkość, kolor i kształt użytych pieczarek. Wykazano, że najwyższą aktywnością charakteryzowały się roztwory tyrozynazy otrzymane z niewielkich, białych pieczarek o zamkniętych kapeluszach. Natomiast użycie grzybów o lekko brązowym zabarwieniu, posiadających w pełni wykształcone blaszki dawało wyniki dwukrotnie niższe. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że pieczarki uzyskiwane bezpośrednio od producenta są najkorzystniejszym źródłem materiału wyjściowego do izolacji tyrozynazy.

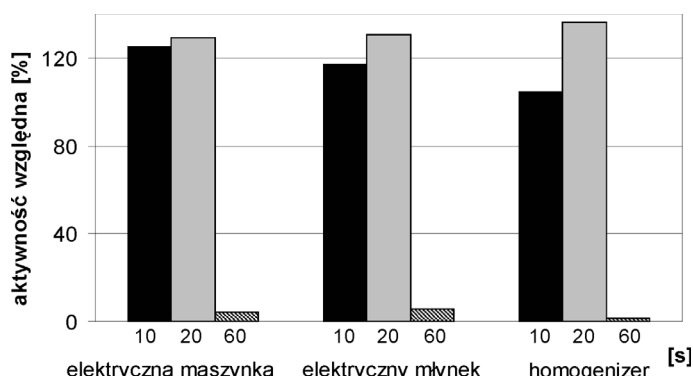
Ponieważ tyrozynaza jest enzymem produkowanym endogennie i rozbitcie struktur ściany komórkowej jest konieczne do uwolnienia tego enzymu poza komórkę, bardzo ważnym czynnikiem podczas izolacji tego enzymu był wybór metody rozdrabniania materiału wyjściowego. Podczas doświadczeń sprawdzano przydatność takich urządzeń jak: elektryczna maszynka, elektryczny młyn, młyn kulowy, homogenizer oraz ucieranie w moździerz w ciekłym azocie (Tabl. 1). Wykazano, że homogenizacja pieczarek w acetonie pozwalała otrzymać ekstrakt tyrozynazy o aktywności około 6–21 razy wyższej w porównaniu z innymi metodami.

Tablica 1
Wpływ metody rozdrabniania materiału wyjściowego na aktywność izolowanej tyrozynazy.
Ilość materiału wyjściowego – 150 g, $V_{\text{próbek}} = 100$ mL

Metoda rozdrabniania	Aktywność [U mL ⁻¹]
młyn kulowy + świeże pieczarki	45,90
ucieranie w moździerz w ciekłym azocie	108,0
elektryczna maszynka	129,6
młyn kulowy + liofilizowane pieczarki	16,20
elektryczny młyn	167,4
homogenizer	958,5

Procedurą rozdrabniania pieczarek zalecaną w publikacjach preparatywnych dotyczących izolacji tyrozynazy [6] było rozcieranie w ciekłym azocie, które jest metodą czasochłonną i kosztowną, dlatego też krótki czas homogenizacji (2–3 min) i łatwość zwiększenia skali procesu również przemawiały za wyborem właśnie tej metody.

Rozbitcie komórek jest zabiegiem niezbędnym do wyizolowania wewnątrzkomórkowej tyrozynazy, dlatego też sprawdzono przydatność dezintegracji ultradźwiękowej do otrzy-



Rys. 1. Wpływ czasu dezintegracji ultradźwiękowej oraz metody rozdrabniania pieczarek na aktywność tyrozynazy. Zmiany aktywności mierzone względem enzymu bez dezintegracji (100%); czas dezintegracji 10, 20, 60 s

wania tego enzymu. Duży wpływ na powodzenie tego procesu miał sposób rozdrobnienia materiału wyjściowego (stopień zaburzenia struktury komórek) przed procesem dezintegracji jak również czas prowadzenia procesu (Rys.1).

Dezintegracja ultradźwiękowa badanych roztworów powodowała wzrost aktywności od 5 do 36% względem próbki bez dezintegracji. Przy czasie 60 s aktywność enzymu była niewielka, co najprawdopodobniej spowodowane było inaktywacją termiczną badanego roztworu, zwiększoną obecnością acetonu. Natomiast najwyższy wzrost aktywności tyrozynazy obserwowany był dla dezintegracji prowadzonej przez 20 s. Zjawisko to powtarzało się dla każdego rodzaju rozdrabniania, jednak najwyższe wyniki otrzymano dla homogenizacji, co ponownie potwierdziło wybór właśnie tej metody. Dezintegracja ultradźwiękowa przynosiła opisane wyżej efekty jedynie dla preparacji enzymu ze stosunkowo niewielkiej ilości pieczarek (50-150 g). Przy zwiększeniu skali do 600 g materiału wyjściowego, proces ten napotykał na wiele trudności, związanych przede wszystkim z dużą objętością mieszaniny (około 2-2,5 L). Dla porównania, w badaniach mikrobiologicznych, jednorazowo dezintegracji poddaje się roztwór o objętości 15-25 mL. Ze względu na powyższe obserwacje, w dalszych badaniach zrezygnowano z tego etapu, jako utrudniającego zwiększenie skali procesu.

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie wydajności oczyszczania tyrozynazy z wykorzystaniem dwóch metod: frakcjonowania białek przy użyciu siarczanu amonu oraz procesu chromatografii kolumnowej. Ze względu na prostotę wykonania i szybkość procesu, jako pierwszą zastosowano metodę wysalania białek. W tym celu surowy preparat tyrozynazy poddano dwukrotnemu wysoleniu poprzez 30% oraz 60% wysolenie roztworu enzymu siarczanem amonu. Proces ten wykonano kilkakrotnie i w ten sposób uzyskano preparaty tyrozynazy oczyszczone od 2,2 do 5,6 razy. Brak powtarzalności wyników pochodzących z różnych preparacji wynikał z niejednorodności materiału wyjściowego użytego do izolacji tyrozynazy (pieczarki uzyskane od jednego producenta, ale z różnych hodowli).

Ponadto, na podstawie uzyskanych wyników (Tabl. 2) można stwierdzić, że stopień oczyszczenia tyrozynazy zależy nie tylko od partii materiału wyjściowego, lecz również od postaci biomasy wykorzystanej w procesie izolacji.

Następnie enzym po etapie dwukrotnego wysolenia siarczanem amonu oczyszczano za pomocą chromatografii jonowymiennej prowadzonej równolegle na dwóch kolumnach

Tablica 2
Oczyszczanie tyrozynazy przy użyciu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; materiał wyjściowy: świeże i mrożone pieczarki otrzymane z tej samej hodowli

Próbka	Świeże pieczarki		Mrożone pieczarki	
	aktywność właściwa [U mg^{-1}]	stopień oczyszczenia [-]	aktywność właściwa [U mg^{-1}]	stopień oczyszczenia [-]
wyjściowa	169,3	–	157,1	–
po I wysoleniu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	240,6	1,4	219,7	1,4
po II wysoleniu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	760,9	4,5	881,5	5,6

(DEAE-Granocel i DEAE-Sepharose), która umożliwiła otrzymanie preparatu enzymu oczyszczonego 5-10 razy w stosunku do surowego ekstraktu enzymu (Tabl. 3).

Tablica 3
Oczyszczanie tyrozynazy metodą chromatografii na DEAE-Granocel i DEAE-Sepharose

Próbka	Bilans białka [%]	Bilans aktywności [%]	Aktywność właściwa [U mg^{-1}]	Stopień oczyszczenia [-]
wyjściowa	–	–	395,7	–
po II wysoleniu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	–	–	1220	3,1
kolumna DEAE-Granocel	91,4	94,5	2039	5,1
kolumna DEAE-Sepharose	48,3	98,6	3840	9,7

Dwukrotnie wyższy stopień oczyszczenia otrzymano dla DEAE-Sepharose. Był to dowód na to, że duża ilość białek balastowych uległa adsorpcji na powierzchni ziaren złoża. Natomiast napotkano problemy z regeneracją kolumny (bilans białka 48,3%). Mimo, że stopień oczyszczenia tyrozynazy na DEAE-Granocel był niższy, dużą zaletą tego materiału są małe opory przepływu przez złożo oraz możliwość całkowitego odmycia związanego białka po zakończeniu chromatografii (bilans białka 91,4%), co pozwala na wielokrotne wykorzystanie złoża chromatograficznego.

Na podstawie przeprowadzonych badań ustalono, że największe ilości aktywnego enzymu można otrzymać z młodych, białych pieczarek o zamkniętych kapeluszach, uzyskiwanych bezpośrednio od producenta. Następnie materiał wyjściowy należy dezintegrować w acetonie z wykorzystaniem homogenizera (2-3 min), ekstrahować w acetonie (30 min) i usunąć pozostałości acetonu. Kolejnym etapem jest oczyszczanie surowego ekstraktu tyrozynazy poprzez dwukrotne wysolenie przy użyciu siarczanu amonu (30 oraz 60%) oraz chromatografię jonowymienną na DEAE-Granocel.

LITERATURA

- J.C. Espin, C. Soler-Rivas, E. Cantos, F.A. Tomas-Barberan, H.J. Wichers: J. Agric. Food Chem. **49**, 1187 (2001).
- G. Seetharam, B.A. Saville: Enzyme Microb. Technol. **31**, 747 (2002).
- S. Jus, V. Kokol, G.M. Guebitz: Enzyme Microb. Technol. **42**, 535 (2008).
- K. Ikehata, J.A. Niell: Bioresour. Technol. **74**, 191 (2000).
- A.T. Bieganski, A. Michota, J. Bukowska, K. Jackowska: Bioelectrochem. **69**, 41 (2006).
- B. Gąsowska, P. Kafarowski, H. Wojtasek: Biochem. Biophys. Acta **1673**, 170 (2004).
- O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall: J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951).