

Karolina ZYNEK, Agnieszka TOMASZEWSKA, Jolanta BRYJAK

karolina.zynek@pwr.wroc.pl

Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska, Wrocław

Stabilność operacyjna tyrozynazy w reaktorze okresowym w obecności rozpuszczalników organicznych

Wstęp

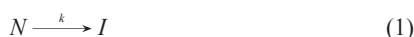
Efektywne wykorzystanie enzymów w przemyśle wymaga opracowania skutecznych metod ich stabilizacji w warunkach procesowych. Jest to szczególnie istotne w przypadku oksydaz specyficznych względem związków fenolowych, które często generują tworzenie wolnych rodników, będących czynnikami wywołującymi inaktywację biokatalizatora. W takich przypadkach można wykorzystać dodatek rozpuszczalników organicznych mieszających się z wodą, które zwiększają rozpuszczalność hydrofobowych substratów oraz tlenu [1], a także stabilizują wolne rodniki, które są częstą przyczyną inaktywacji enzymów [2].

Tyrozynaza należy do grupy oksydaz polifenolowych i katalizuje dwa typy reakcji: hydroksylowanie monofenoli do difenoli oraz utlenianie difenoli do chinonów. Jest to enzym o bardzo szerokiej specyficzności substratowej, a główne potencjalne obszary zastosowań przemysłowych to otrzymywanie difenoli o właściwościach przeciwutleniających (np. hydroksytyrozol), produkcja leków (np. L-DOPA) czy enzymatyczne sieciowanie białek [3]. Jednak jednym z największych ograniczeń, związanych z wykorzystaniem tego enzymu, jest występowanie zjawiska inaktywacji samobójczej, które przy założeniu mechanizmu rodnikowego można znacząco ograniczyć przez zastosowanie odpowiedniego ko-rozpuszczalnika.

Głównym celem pracy było zbadanie możliwości zastosowania wybranych rozpuszczalników organicznych mieszających się z wodą jako środowiska reakcji dla tyrozynazy, wyznaczenie parametrów kinetycznych dla inaktywacji w obecności różnych stężeń wybranych rozpuszczalników oraz dobór takiego ich stężenia, aby badany enzym nie ulegał denaturacji.

Materiały i metody

Do badań wykorzystano tyrozynazę z pieczarek (*Agaricus bisporus*) uzyskaną przy użyciu wcześniej opisanej procedury [4]. W celu wstępnego oszacowania wpływu stężenia poszczególnych rozpuszczalników organicznych (acetonitryl, *o*-propanol, etanol, dimetyloformamid) na stabilność tyrozynazy, roztwory rozpuszczalników o stężeniach od 5 do 60% preinkubowano w termostatowanych reaktorach okresowych w 30°C, a następnie, po dodaniu enzymu, wykonywano pomiar aktywności w chwili początkowej oraz po 1 i 5h trwania eksperymentu. Badania kinetyki inaktywacji tyrozynazy w obecności różnych stężeń wybranych rozpuszczalników organicznych (etanol, dimetyloformamid) prowadzono analogicznie, a próbki do pomiarów aktywności pobierano w różnych interwałach czasowych. Aktywność tyrozynazy oznaczano spektrofotometrycznie względem 10 mM *o*-aminofenolu jako substratu ($\lambda = 435 \text{ nm}$; $T = 30^\circ\text{C}$). Za jedną jednostkę aktywności (1U) przyjęto taką ilość enzymu, która w warunkach testu powoduje przyrost absorbancji o 0,001 w czasie 1 minuty. Parametry kinetyczne procesu inaktywacji tyrozynazy wyznaczano przy użyciu programu statystycznego *Athena Visual Workbench* (*Stewart & Associates Engineering Software, Madison, WI, USA*; <http://www.athenavisual.com>). Dla enzymu inkubowanego w roztworze wodnym użyto modelu pierwszorzędowego (1).



gdzie:

N – enzym natywny,*I* – forma enzymu, która uległa nieodwracalnej inaktywacji,*k* – stała inaktywacji

Natomiast dla tyrozynazy znajdującej się w poszczególnych roztworach rozpuszczalników organicznych wykorzystano model *Lumry-Eyring* (2), który jest często stosowany do opisywania dwufazowej inaktywacji enzymów [5, 6].

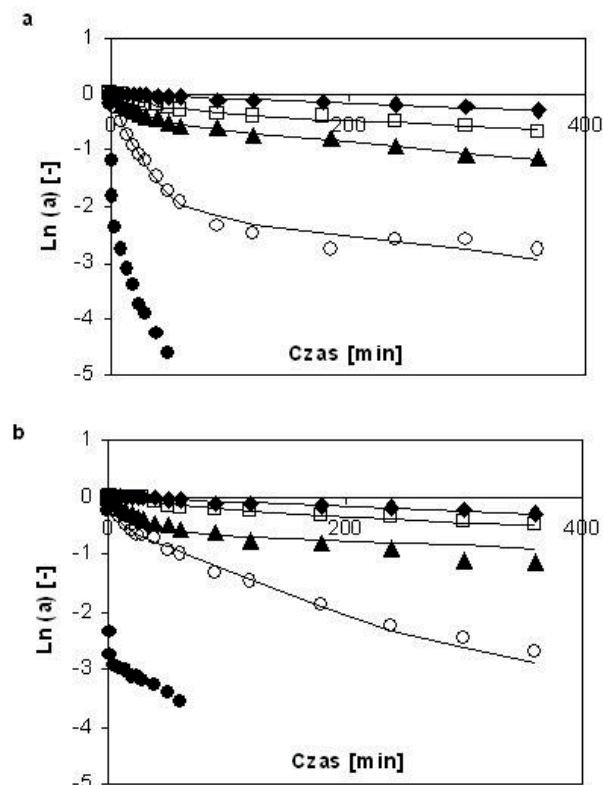


gdzie:

D – forma enzymu, która uległa odwracalnej inaktywacji,*k*₁, *k*₂, *k*₃ – stałe inaktywacji.

Wyniki i ich omówienie

W pierwszym etapie badań wstępnie oszacowano stabilność tyrozynazy w roztworach poszczególnych rozpuszczalników organicznych o różnym stężeniu i, uwzględniając zanik aktywności tyrozynazy po 5 godzinach trwania eksperymentu, stwierdzono, że roztwory acetonitrylu i *o*-propanolu powyżej stężenia wynoszącego 10% należy zaliczyć do silnych denaturatów badanego enzymu (dane nie prezentowane). W związku z tym do dalszych badań, obejmujących kinetyczne pomiary inaktywacji tyrozynazy, wybrano etanol oraz dimetyloformamid w stężeniach od 10 do 60%, a otrzymane wyniki przedstawiono na rys. 1 w formie wykresów pół-logarymicznych. Na podstawie analizy danych eksperymentalnych z przebiegu inaktywacji tyrozynazy w obecności różnych stężeń dimetyloformamidu oraz etanolu (punkty na rys. 1a i 1b) stwierdzono, że enzym w roztworze wodnym ulega inaktywacji zgodnie z modelem I rzędu (rezultat ten potwierdzają wyniki uzyskane



Rys. 1. Inaktywacja tyrozynazy w roztworach dimetyloformamidu (a) oraz etanolu (b) o stężeniach: \blacklozenge – 0%, \square – 10%, \blacktriangle – 20%, \circ – 40%, \bullet – 60%; a – względna aktywność enzymu

w niezależnych badaniach [7]). Natomiast po wprowadzeniu ko-rozpuszczalnika do układu, obserwuje się zmianę mechanizmu inaktywacji na zgodny z modelem dwufazowym.

Powyższe obserwacje zostały potwierdzone przez wyznaczenie parametrów kinetycznych inaktywacji przy użyciu programu statystycznego *Athena Visual Workbench*. Dla enzymu inkubowanego w roztworze wodnym, z modelu I rzędu, wyznaczono stałą inaktywacji (k), która uzyskała wartość $0,00082 \pm 0,00006 \text{ min}^{-1}$ z 1,3% odchyleniem standardowym. Z kolei modelowanie dla enzymu znajdującego się w roztworach obu badanych ko-rozpuszczalników pozwoliło na otrzymanie wartości parametrów kinetycznych dla inaktywacji dwufazowej z odchyleniem standardowym nie przekraczającym 2,6% (Tabela 1, 2) oraz dobrym odwzorowaniem przebiegu tego procesu (linie ciągłe na rys. 1a i 1b).

Tab. 1. Wyniki modelowania inaktywacji tyrozynazy w obecności różnych stężeń dimetyloformamidu; model inaktywacji *Lumry-Eyring*

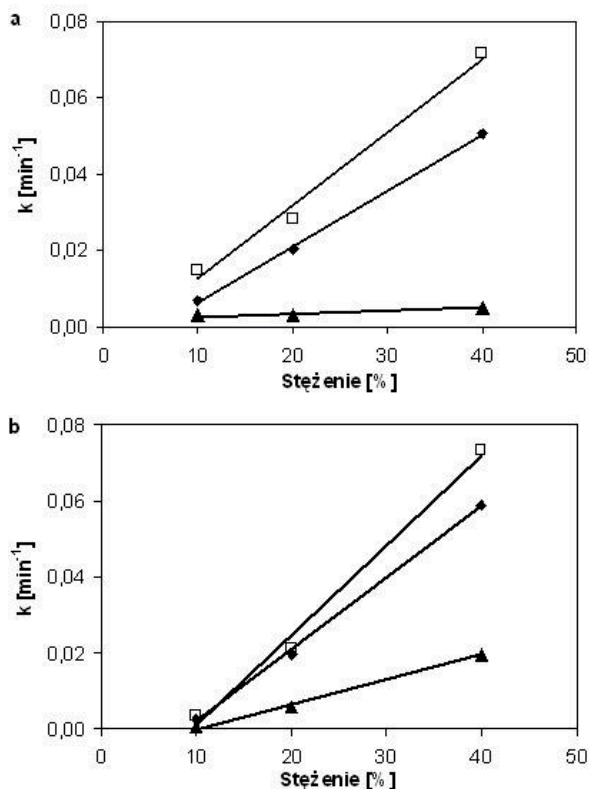
DMF [%]	k_1 [min^{-1}]	k_2 [min^{-1}]	k_3 [min^{-1}]	SD [%]
10	$0,0069 \pm 0,0002$	$0,0146 \pm 0,0086$	$0,0030 \pm 0,0003$	2,2
20	$0,0201 \pm 0,0025$	$0,0281 \pm 0,0072$	$0,0030 \pm 0,0001$	1,6
40	$0,0506 \pm 0,0030$	$0,0714 \pm 0,0022$	$0,0050 \pm 0,0002$	1,6
60	—*	—*	—*	—*

*Bardzo szybka inaktywacja – brak możliwości wyznaczenia parametrów kinetycznych; DMF – dimetyloformamid, SD – odchylenie standardowe

Tab. 2. Wyniki modelowania inaktywacji tyrozynazy w obecności różnych stężeń etanolu; model inaktywacji *Lumry-Eyring*

etanol [%]	k_1 [min^{-1}]	k_2 [min^{-1}]	k_3 [min^{-1}]	SD [%]
10	$0,0026 \pm 0,0006$	$0,0035 \pm 0,0002$	$0,00017 \pm 0,00004$	2,6
20	$0,0195 \pm 0,0024$	$0,0212 \pm 0,0053$	$0,0058 \pm 0,0009$	1,9
40	$0,0590 \pm 0,0014$	$0,0733 \pm 0,0032$	$0,0197 \pm 0,0053$	2,4
60	—*	—*	—*	—*

*Bardzo szybka inaktywacja – brak możliwości wyznaczenia parametrów kinetycznych; SD – odchylenie standardowe



Rys. 2. Zależność stałych inaktywacji k_1 , k_2 , k_3 od stężenia rozpuszczalnika organicznego: (a) dimetyloformamid, (b) etanol: \blacklozenge – k_1 , \square – k_2 , \blacktriangle – k_3

Na podstawie uzyskanych wyników, stwierdzono, że oba rozpuszczalniki w stężeniu przekraczającym 60% można zaliczyć do silnych denaturantów tyrozynazy; enzym, po 10 minutach od rozpoczęcia procesu, zachowywał jedynie 5,0% aktywności wyjściowej w roztworze etanolu oraz 9,3% w dimetyloformamidzie. Pomimo, że w obu przypadkach przebieg inaktywacji miał charakter dwufazowy (Rys. 1), z uwagi na zbyt szybki postęp tego procesu, wyliczone wartości stałych były obciążone bardzo dużym błędem statystycznym. Analiza wyników dla pozostałych stężeń dimetyloformamidu oraz etanolu pozwoliła również stwierdzić, że oba rozpuszczalniki w stężeniach 10% wywołują niewielkie zmiany w stabilności tyrozynazy.

Zgodnie z modelem *Lumry-Eyring* (2) stałe k_1 i k_2 odpowiadają za odwracalny (równowagowy) etap inaktywacji. Natomiast największy wpływ na szybkość powstawania całkowicie nieaktywnej (zdenaturowanej) formy enzymu ma stała inaktywacji k_3 . W związku z tym analiza wartości tego parametru, które zostały wyznaczone dla poszczególnych roztworów rozpuszczalników, pozwoliła stwierdzić, że dimetyloformamid ma mniejszy wpływ na spadek aktywności enzymu niż etanol. Wniosek ten potwierdzony został również przez porównanie zależności stałej szybkości inaktywacji k_3 od stężenia rozpuszczalnika dla dimetyloformamidu oraz etanolu (Rys. 2a i 2b).

Na podkreślenie zasługuje również to, że zależność wszystkich stałych inaktywacji od stężenia danego ko-rozpuszczalnika, w obu przypadkach, udało się opisać prostym równaniem liniowym (Rys. 2), co jest bardzo istotne z punktu widzenia procesowego, ponieważ takie odwzorowanie może znacznie ułatwić dobór stężenia rozpuszczalnika do konkretnej reakcji. Jednakże obserwowana zależność liniowa powinna być potwierdzona dodatkową serią eksperymentów z rozpuszczalnikami o większej liczbie stężeń w zakresie 5–60%.

Podsumowanie

Głównym celem pracy było zbadanie stabilności tyrozynazy w obecności rozpuszczalników organicznych mieszających się z wodą. Na podstawie uzyskanych wyników wybrano dimetyloformamid i etanol jako potencjalne ko-rozpuszczalniki w biotransformacjach prowadzonych przez badany enzym. W wyniku analizy danych z przebiegu inaktywacji, w obecności różnych stężeń obu rozpuszczalników, stwierdzono, że inaktywacja enzymu ma charakter dwufazowy, podczas gdy enzym w buforze ulega inaktywacji jednofazowej.

W następnej kolejności, wyznaczono parametry kinetyczne inaktywacji i na tej podstawie wybrano dimetyloformamid jako rozpuszczalnik, który ma mniejszy wpływ na spadek aktywności enzymu w trakcie trwania procesu. Stwierdzono również, że zarówno etanol jak i dimetyloformamid w stężeniu 10% mogą być zastosowane jako potencjalne stabilizatory wolnych rodników, powstających w trakcie przetwarzania pochodnych fenolowych przez tyrozynazę.

LITERATURA

- [1] M.D. Truppo, J. Kim, M. Brower, A. Madin, M.G. Sturr, J.C. Moore: J. Mol. Catal. B: Enzym. **38**, 158 (2006).
- [2] E.J. Land, C.A. Ramsden, P.A. Rile: Tohoku J. Exp. Med. **212**, 341 (2007).
- [3] S. Halaouli, M. Asther, J.C. Sigoillot, M. Hamdi, A. Lomascolo: J. Appl. Microbiol. **100**, 219 (2006).
- [4] K. Zynek, J. Bryjak: Inż. Ap. Chem. **48**, nr 3, 125 (2009).
- [5] Ch. Aymard, A. Belarbi: Enzyme Mikrob. Technol. **27**, 612 (2000).
- [6] M. Polaković, J. Bryjak: J. Mol. Catal. B: Enzym. **19-20**, 443 (2002).
- [7] K. Zynek, J. Bryjak, M. Polaković: J. Mol. Catal. B: Enzym. submitted (2010).

Badania współfinansowane przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (GRANT – wsparcie prac badawczych poprzez stypendia naukowe dla doktorantów).