

Małgorzata CIEŃSKA, Marcin LEWAŃCZUK, Karolina LABUS, Jolanta BRYJAK

e-mail: malgorzata.cienska@pwr.wroc.pl

Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, Wrocław

Detekcja związków fenolowych z wykorzystaniem membran poliamidowych z immobilizowaną tyrozinazą

Wstęp

Wysoka selektywność enzymów w stosunku do różnorodnych związków, wydajność i szybkość reakcji biokatalitycznych oraz miniaturyzacja obszaru reakcyjnego, umożliwiająca ograniczenie wymaganej do pomiarów objętości próbek sprawia, że konstrukcja testów diagnostycznych opartych na immobilizowanych enzymach stanowi przedmiot zainteresowania wielu naukowców. Z uwagi na szeroki potencjał zastosowań takich testów, biosensory z unieruchomionymi enzymami są lub mogą być wykorzystywane m.in. w: diagnostyce klinicznej, kontroli jakości produktów spożywczych i farmaceutycznych, badaniach kryminalistycznych lub monitorowaniu poziomu zanieczyszczeń w środowisku [Shekhovtsova i in., 1997; Kouisni i in., 2009; Martinez i in., 2010; Jang i in., 2010]. Do konstrukcji biosensorów często sięga się po enzymy z klasy oksydoreduktaz, a w szczególności po oksydazy, gdyż ich użycie nie wymaga obecności kofaktorów. Ze względu na szeroką specyficzność substratów, w stosunku zarówno do związków monofenolowych, jak i difenolowych (m.in. chlorofenole, aminofenole, krezole, katechole, aminy aromatyczne) dużym zainteresowaniem cieszą się biosensory z immobilizowaną tyrozinazą [Tsai i in., 2007; Mita i in., 2007; Kaoutit i in., 2007; Zhao i in., 2009].

Tyrozinaza (oksydaza polifenolowa, PPO, EC 1. 14. 18. 1) jest szeroko rozpowszechnionym w naturze enzymem zawierającym w centrum aktywnym kationy miedzi. Enzym ten, w obecności tlenu, przeprowadza dwa typy reakcji: hydroksylację monofenoli do odpowiednich o-difenoli (aktywność monofenolazowa/krezolazowa) oraz utlenianie difenoli do o-chinonów (aktywność difenolazowa/katecholazowa), które to kolejno, w wyniku nieenzymatycznych reakcji, polimeryzują do barwnych produktów [Espin i in., 1997; Seetharam i in., 2002].

Głównym celem publikacji jest zbadanie możliwości jakościowej i ilościowej identyfikacji związków fenolowych znajdujących się w roztworach wodnych, z wykorzystaniem tyrozinazy immobilizowanej na membranach poliamidowych (PA). Podstawą detekcji jest sorpcja barwnych produktów reakcji enzymatycznej na powierzchni materiału użytego do immobilizacji. Tego typu test może znaleźć zastosowanie przy identyfikacji związków fenolowych m.in. w przemyśle farmaceutycznym lub w oczyszczalniach ścieków.

Materiały i metody

Z poliamidowych membran mikrofiltracyjnych (Sartorius, Germany) wycięto krążki o średnicy 12 mm. Tyrozinazę izolowano i oczyszczano zgodnie z opracowaną wcześniej metodyką [Zynek i in., 2009]. Enzym (stężenie białka: 3,7 mg/mL) immobilizowano na membranach poprzez adsorpcję w *pH* 7,0, co w trakcie wcześniejszych badań [Labus i in., 2012] uznano za najbardziej efektywną i tanią procedurę unieruchamiania tego białka. Membrany odmywano kilkukrotnie wodą dejonizowaną, a następnie 0,1 M buforem fosforanowym o *pH* 7,0. Po odsączeniu buforu dodawano roztwór tyrozinazy o *pH* 7,0, w ilości 10 mL. Całość mieszano okazjonalnie przez 2 h i pozostawiano w 4°C przez 12 h. Następnie odmywano nadmiar niezwiązane białka 0,1 M buforem fosforanowym o *pH* 7,0 do momentu uzyskania wartości absorbancji eluatu w 280 nm bliskiej zeru. Z eluatu pobierano próbkę do oznaczenia stężenia białka i aktywności. Analogiczna procedurę stosowano przy kolejnych roztworach odmywających: 0,1 M buforem fosforanowym o *pH* 7,0, zawierającym 0,5 M NaCl; 0,1 M buforem octanowym o *pH* 4,5 oraz wodą dejonizowaną. Krążki z immobilizowaną tyrozinazą zostały zanurzone w 10 mL odpowiednich roztworów: fenolu, 2-aminofenolu, 4-aminofenolu, 4-chlorofenolu, 4-krezolu, 4-tyrozolu, L-tyrozinie

(związki monofenolowe), oraz w katecholu, 4-*tert*-butylokatecholu i L-3,4-dihydroksyfenyloalaniny (L-DOPA) (związki difenolowe). Wszystkie roztwory sporządzane były w stężeniu 5 mM, za wyjątkiem L-tyrozyny, którą, ze względu na utrudnioną rozpuszczalność, przygotowano w stężeniu 2 mM. Jako rozpuszczalnika użyto wodę dejonizowaną. Membrany z unieruchomionym enzymem inkubowano w temperaturze pokojowej przez 0,5, 5, 15, 30, 60, 120 i 180 minut. W drugiej części badań wykorzystano L-DOPA i 4-tyrozol w stężeniach 0,5, 1, 3, 5 przez 0,5, 10, 15, 20, 25, 30 i 60 minut. Po odpowiednim czasie inkubacji obserwowany był wizualny efekt, w postaci zmiany koloru membrany. Jako kontrolę krążki z immobilizowaną tyrozinazą inkubowano w wodzie dejonizowanej. Powstające zmiany zabarwienia membrany rejestrowano przy użyciu aparatu cyfrowego.

Wyniki, omówienie wyników

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że zastosowanie preparatów PA-tyrozinaza powodowało sorpcję produktów na powierzchni membrany, umożliwiając detekcję wszystkich badanych substancji, z wyjątkiem L-tyrozyny i 4-chlorofenolu. Niemniej jednak, ten test enzymatyczny wykazywał zróżnicowaną czułość w stosunku do zastosowanych substratów. Najszybciej efekt wizualny zaobserwowano w obecności wodnych roztworów 2-aminofenolu, katecholu, 4-*tert*-butylokatecholu, fenolu oraz L-DOPA, dla których sorpcja barwnych produktów następowała już po 5 minutach od zanurzenia membrany w roztworze. Natomiast największą intensywność powstającego koloru zaobserwowano dla dwóch pierwszych związków. Z kolei, w przypadku pozostałych substancji – 4-aminofenolu, 4-tyrozolu i 4-krezolu – pozytywny efekt barwny uwidaczniał się po 15 minutach inkubacji (Tab. 1, 2). Można zatem stwierdzić, że tyrozinaza immobilizowana adsorpcyjnie na membranie PA może być wykorzystywana do niespecyficznego testów na obecność związków fenolowych w roztworach wodnych. Dzięki użyciu tego typu testu, można także określić rodzaj związku fenolowego w mieszaninie zawierającej jeden ze związków w nadmiarze.

W dalszej części badań sprawdzono czułość zaproponowanej metody dla dwóch wybranych związków, z których 4-tyrozol reprezentował grupę substratów monofenolowych, a L-DOPA difenolowych. Przy wyborze obu substratów kierowano się możliwością ich wykorzystania w przemyśle spożywczym oraz farmaceutycznym. W eksperymentach przetestowano zarówno wpływ stężenia tych substancji (0,5–5 mM), jak również czasu inkubacji (0,5–60 min) na intensywność powstającej barwy. Rozpatrując zakres możliwości detekcji 4-tyrozolu stwierdzono, że nasilenie powstającej barwy w słabym stopniu odzwierciedla obecność tego związku w różnych stężeniach i wydłużenie czasu reakcji nie powoduje lepszego rozróżnienia stężenia związku na podstawie barwy membrany (Tab. 3). Jednakże jest to test szybki, gdyż bardzo wyraźna zmiana zabarwienia pojawia się już po 10 min inkubacji.

Rozpatrując wyniki otrzymane w obecności wodnych roztworów L-DOPA stwierdzono, że intensywność powstającej barwy zależy w równej mierze od czasu trwania testu, jak i stężenia związku poddawanej identyfikacji (Tab. 3). Czas 5 minut był wystarczający do stwierdzenia obecności 3,0 i 5,0 mM roztworu L-DOPA, po upływie 15 min wyraźny efekt barwny obserwowano dla stężenia 1 mM, a po 20 min dla roztworu 0,5 mM. Na podstawie tych wyników stwierdzono, że membrany poliamidowe ze związaną tyrozinazą mogą być z powodzeniem wykorzystane do ilościowej detekcji L-DOPA, a rekomendowany czas testu to 20–25 min.

Tab. 1 Wpływ czasu inkubacji na sorpcję barwnych produktów na powierzchni membrany w reakcji substratów monofenolowych i difenolowych z tyrozynazą związaną adsorpcyjnie z membraną PA

	Substrat	Wizualne zmiany koloru membrany PA podczas inkubacji
Związki monofenolowe	L-tyrozyna	Brak zmian
	fenol	W 5. min pojawia się kolor różowy, którego intensywność wzrasta do 180. min
	4-chlorofenol	Brak zmian
	2-aminofenol	W 5. min pojawia się kolor żółty, w 60. min przechodzi w pomarańczowy
	4-aminofenol	W 15. min pojawia się kolor żółtozielony, którego intensywność wzrasta w czasie i przechodzi w brązowy w 180. min
	4-krezol	W 15. min pojawia się kolor pomarańczowy, którego intensywność nieznacznie wzrasta do 180. min
Związki difenolowe	4-tyrozol	W 15. min pojawia się kolor różowy, którego intensywność nieznacznie wzrasta do 120. min
	L-DOPA	W 5. min pojawia się kolor szary, którego intensywność wzrasta do 180. min
	katechol	W 5. min pojawia się kolor brązowy, którego intensywność wzrasta do 15. min
	4- <i>tert</i> -butylo-katechol	W 5. min pojawia się kolor pomarańczowy, którego intensywność wzrasta do 60. min

Tab. 2. Wpływ czasu inkubacji na sorpcję barwnych produktów na powierzchni membrany w reakcji substratów monofenolowych i difenolowych z tyrozynazą związaną adsorpcyjnie z membraną PA

Substrat	Czas inkubacji w obecności tyrozynazy immobilizowanej na krążkach PA [min]								
	Kontrola	0,5	5	15	30	60	120	180	
Związki mono fenolowe	L-Tyrozyna								
	fenol								
	4-chlorofenol								
	2-aminofenol								
	4-aminofenol								
	4-krezol								
Związki difenolowe	4-tyrozol								
	L-DOPA								
	katechol								
	4- <i>tert</i> -butylo-katechol								

Wnioski

Podsumowując można stwierdzić, że tyrozynaza immobilizowana adsorpcyjnie na płaskich membranach PA może być wykorzystana do niespecyficznego wykrywania różnorodnych związków fenolowych w roztworach wodnych. Natomiast w określonych sytuacjach, w których w roztworach wodnych (ściekach) pojawiają się dwa związki fenolowe, można zastosować również detekcję ilościową. Dobrym przykładem może być proces biotransformacji L-tyrozyny do L-DOPA gdyż, jak wykazano, reaktywność tyrozynazy związanej z membraną PA była bardzo niska w obecności L-tyrozyny, natomiast wizualna detekcja L-DOPA bardzo wyraźna i zależna od stężenia.

Tab. 3. Wpływ czasu inkubacji na sorpcję barwnych produktów na powierzchni membrany w reakcji substratów monofenolowych i difenolowych z tyrozynazą związaną adsorpcyjnie z membraną PA

Stężenie [mM]	Czas inkubacji w obecności tyrozynazy immobilizowanej na krążkach PA [min]								
	Kontrola	0,5	5	10	15	20	25	30	60
4-Tyrozol	0,5								
	1,0								
	3,0								
	5,0								
L-DOPA	0,5								
	1,0								
	3,0								
	5,0								

LITERATURA

Espin J.C., Morales M., Garcia-Ruiz P.A., Tudela J., Garcia-Canovas F., 1997. Improvement of a Continuous Spectrophotometric Method of Diphenolase Activities of Mushroom Polyphenol Oxidase, *J. Agric. Food Chem.* 45, 1084-1090. DOI: 10.1021/jf960428a

Jang E., Koh W.G., 2010. Multiplexed enzyme-based bioassay within microfluidic devices using shape-coded hydrogel microparticles, *Sens. Actuators, B* 143, 681-688. DOI: 10.1016/j.snb.2009.10.028

Kaoutit M.E., Naranjo-Rodriguez I., Tamsamani K.R., de Cisneros J.L., 2007. The Sonogel-Carbon materials as basis for development of enzyme biosensors for phenols and polyphenols monitoring: A detailed comparative study of three immobilization matrixes, *Biosens. Bioelectron.* 22, 2958-2966. DOI: 10.1016/j.bios.2006.12.008

Kouisni L., Rochefort D., 2009. Confocal microscopy study of polymer microcapsules for enzyme immobilisation in paper substrates, *J. Appl. Polym. Sci.* 111, 1-10. DOI: 10.1002/app.28997

Labus K., Gancarz I., Bryjak J., 2012. Immobilization of laccase and tyrosinase on untreated and plasma-treated cellulosic and polyamide membranes, *Materials Science and Engineering C* 32, 228-235. DOI: 10.1016/j.msec.2011.10.023

Martinez A.W., Phillips S.T., Whitesides G.M., Carrilho E., 2010. Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices, *Anal. Chem.* 82, 3-10. DOI: 10.1021/ac9013989

Mita D.G., Attanasio A., Arduini F., Diano N., Grano V., Bencivenga U., Rossi S., Amine A., Moscone D., 2007. Enzymatic determination of BPA by means of tyrosinase immobilized on different carbon carriers, *Biosens. Bioelectron.* 23 60-65. DOI: 10.1016/j.bios.2007.03.010

Seetharam G., Saville B. A., 2002. L-DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite, *Enzyme and Microbial Technology* 31, 747-753. DOI: 10.1016/S0141-0229(02)00182-5

Shekhovtsova T.N., Muginova S.V., Bagirova N.A., 1997. Determination of organomercury compounds using immobilized peroxidase, *Anal. Chim. Acta* 344, 145-151. DOI: 10.1016/S0003-2670(97)00027-5

Tsai Y.Ch., Chiu Ch.Ch., 2007. Amperometric biosensors based on multiwalled carbon nanotube-Nafion-tyrosinase nanobiocomposites for the determination of phenolic compounds, *Sens. Actuators B* 125, 10-16. DOI: 10.1016/j.snb.2007.01.032

Zhao J., Wu D., Zhi J., 2009. A novel tyrosinase biosensor based on biofunctional ZnO nanorod microarrays on the nanocrystalline diamond electrode for detection of phenolic compounds, *Bioelectrochem.* 75, 44-49. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2009.01.005

Zynek K., Bryjak J., 2009. Isolation and purification of tyrosinase from *Agaricus bisporus*, *Inż. Ap. Chem.* 48, nr 3 125-126

Badania były finansowane w ramach Grantu „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym” nr POIG.01.03.01-00-158/09, współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka.