

Karolina LABUS, Jolanta BRYJAK

e-mail: karolina.labus@pwr.wroc.pl

Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, Wrocław

## Kinetyka utleniania związków fenolowych z udziałem tyrozynazy natywnej i immobilizowanej

### Wstęp

Tyrozynaza (oksydaza polifenolowa, PPO, EC 1.14.18.1) jest endogennym enzymem szeroko rozpowszechnionym w środowisku naturalnym, który w obecności tlenu cząsteczkowego, katalizuje dwa typy reakcji: hydroksylowanie monofenoli do *o*-difenoli oraz utlenianie *o*-difenoli do *o*-chinonów. Dzięki zdolności biokonwersji szerokiej gamy związków fenolowych, enzym ten ma rozmaite zastosowania praktyczne, m.in. może być wykorzystany do otrzymywania *o*-difenoli o właściwościach przeciwutleniających (np. hydroksytyrozol), produkcji leków (np. L-3,4-dihydroksy-fenylalanina; L-DOPA), enzymatycznego sieciowania biopolimerów oraz detekcji lub bezpośredniej biotransformacji mono- i difenolowych pochodnych [Halaoui i inni, 2006]. Głównym ograniczeniem przemysłowego wykorzystania tyrozynazy jest znacząca podatność natywnej formy tego enzymu na inaktywację termiczną [Zynek i inni, 2010] i tzw. *inaktywację samobójczą*, wywołaną obecnością rodników, chinonów lub substratów difenolowych [Land i inni, 2007]. Dlatego uważa się, że wzrost stabilności oraz wydłużenie czasu połowicznego zaniku aktywności tego biokatalizatora można uzyskać poprzez jego immobilizację, co dodatkowo pozwala wykorzystać go wielokrotnie lub w reaktorach przepływowych oraz sterować i kontrolować proces z większą precyzją [Tischer i Wedekind, 1999].

Dobierając warunki prowadzenia procesów z udziałem enzymów należy pamiętać, że oprócz fizykochemicznych parametrów środowiska (tj. temperatura, *pH*, siła jonowa), bezpośredni wpływ na szybkość reakcji ma stężenie substratu w mieszaninie reakcyjnej oraz obecność innych czynników chemicznych (np. inhibitorów, aktywatorów, stabilizatorów). W związku z tym, wydajne wykorzystanie enzymów wymaga znajomości wartości parametrów kinetycznych dla reakcji zachodzących z ich udziałem oraz dobrania odpowiedniego stężenia substratu do reakcji.

Głównym celem pracy było wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji utleniania wybranych związków fenolowych przez natywną tyrozynazę, a następnie porównanie wyników uzyskanych dla naturalnych substratów tego enzymu – L-tyrozyny i L-DOPA – z wartościami otrzymanymi dla immobilizowanego preparatu.

### Materiały i metody

Do badań wykorzystano tyrozynazę z pieczarek (*Agaricus bisporus*) uzyskaną przy użyciu wcześniej opisanej procedury [Zynek i Bryjak, 2009]. W eksperymentach zastosowano tyrozynazę natywną, oczyszczoną przez dwukrotne wysolenie siarczanem amonu lub immobilizowaną, otrzymaną poprzez kowalencyjne wiązanie tego enzymu do nośnika celulozowego (DEAE-Granocel) zgodnie z metodą wyselekcjonowaną podczas wcześniejszych badań [Labus i inni, 2011].

Pomiary kinetyczne wykonano mierząc początkową szybkość reakcji w obecności różnych stężeń wybranych związków fenolowych. Poszczególne reakcje prowadzono w *pH* 7,0, w termostatowanych (30°C) mieszalnikowych (20 rpm) reaktorach okresowych. W eksperymentach zastosowano następujące zakresy stężeń substratów: 50-1000 µM dla L-tyrozyny; 50-2000 µM dla fenolu, 4-chlorofenolu i 4-tyrozolu; 50-3000 µM dla 4-krezolu; 400-10000 µM dla 2-aminofenolu i 4-aminofenolu; 100-5000 µM dla L-DOPA; 100-10000 µM dla catecholu oraz 500-8000 µM dla 4-*tert*-butylokatecholu. W przypadku L-tyrozyny, L-DOPA, 4-*tert*-butylokatecholu oraz 2-aminofenolu w obliczeniach wykorzystano wartości molowych współczynników absorpcji dostępnych w literaturze [Giurg i inni, 2006; Marin-Zamora i inni, 2007],

natomiast dla pozostałych związków wartości współczynników wyznaczono eksperymentalnie, zgodnie z prawem *Lamberta-Beera*:

$$A = \varepsilon C l, \quad (1)$$

gdzie:

- $A$  – absorbanca [-],
- $\varepsilon$  – molowy współczynnik absorpcji [ $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ],
- $C$  – stężenie badanego związku [M],
- $l$  – długość drogi świetlnej [cm].

Parametry kinetyczne dla enzymu natywnego i immobilizowanego wyznaczano metodą regresji nieliniowej (program *OriginPro7.5*) zgodnie z modelem *Michaelisa-Menten* [Michaelis i Menten, 1913]:

$$V = \frac{k_{KAT} E_0 C_S}{K_M + C_S} = \frac{V_{MAX} C_S}{K_M + C_S}, \quad (2)$$

gdzie:

- $V$  – szybkość reakcji [ $\mu M \cdot min^{-1}$ ],
- $V_{MAX} = k_{KAT} E_0$  – maksymalna szybkość reakcji [ $\mu M \cdot min^{-1}$ ],
- $k_{KAT}$  – stała szybkości reakcji [ $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ ],
- $E_0$  – stężenie enzymu [ $mg \cdot L^{-1}$ ],
- $C_S$  – stężenie substratu [ $\mu M$ ],
- $K_M$  – stała *Michaelisa* [ $\mu M$ ].

W celu weryfikacji poprawności otrzymywanych wyników, dla każdego testowanego substratu wykonano dwie niezależne serie eksperymentów w obecności różnych stężeń enzymu. Wartości wyliczonych parametrów podano jako średnią arytmetyczną z dwóch serii pomiarów.

Celem oszacowania możliwości wystąpienia oporów dyfuzyjnych w układach reakcyjnych z immobilizowaną tyrozynazą, zastosowano kryterium temperaturowe. W badaniach wykorzystano 1 mM L-DOPA jako substrat i wykonano pomiary początkowej szybkości reakcji w różnych temperaturach, wyłączając wyniki wskazujące na inaktywację termiczną białka. Wyniki otrzymane dla enzymu natywnego i immobilizowanego przedstawiono graficznie, wykorzystując równanie *Arrheniusa* [Brauner i Shacham, 1997]:

$$\ln(a) = -\frac{E_a}{R} \frac{1}{T} + \ln(A) \quad (3)$$

gdzie:

- $a$  – aktywność względna [-],
- $A$  – czynnik przedwykładniczy [-],
- $E_a$  – energia aktywacji [ $J \cdot mol^{-1}$ ],
- $R$  – stała gazowa [ $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$ ],
- $T$  – temperatura [K],

i na tej podstawie wyznaczono energię aktywacji procesu.

### Wyniki i ich omówienie

Wydajne wykorzystanie enzymów wymaga wiedzy na temat kinetycznego przebiegu reakcji prowadzonych z ich udziałem oraz dobrania odpowiedniego stężenia substratu do procesu. Dlatego w pierwszej kolejności wyznaczono wartości parametrów kinetycznych utleniania wybranych związków fenolowych w obecności natywnej tyrozynazy. Na podstawie uzyskanych wyników (Tab. 1) stwierdzono, że spośród związków monofenolowych badany enzym posiadał największe powinowactwo do 4-chlorofenolu, 4-tyrozolu oraz L-tyrozyny. Niemniej jednak, podczas enzymatycznej konwersji L-tyrozyny i 4-tyrozolu, szybkość katalizy (opisywana przez stałą szybkości reakcji  $k_{KAT}$ ) była odpowiednio 5,4 i 5,8-krotnie wyższa w porównaniu z 4-chlorofenolem. Z kolei najniższe powinowactwo enzym wykazywał względem

aminofenoli. Jednakże w przypadku 2-aminofenolu, stała szybkości reakcji ( $k_{KAT}$ ) była najwyższa z całej grupy testowanych związków monofenolowych. Natomiast, biorąc pod uwagę wybrane difenole, uzyskane wartości  $K_M$  względem katecholu i 4-*tert*-butylokatecholu były około 4 i 7 razy wyższe w porównaniu z L-DOPA (Tab. 1). Należy jednak zaznaczyć, że w przypadku 4-*tert*-butylokatecholu uzyskano najwyższą wartość stałej szybkości biotransformacji spośród wszystkich testowanych związków;  $\sim 33 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Z kolei rozpatrując wartości  $k_{KAT}/K_M$ , największej efektywności działania enzymu w niskich stężeniach substratu, przewidywanych pod koniec procesu w reaktorze okresowym, oczekiwano w przypadku stosowania 4-*tert*-butylokatecholu i L-DOPA, a dla katecholu około 3-krotnie wolniejszej katalizy. Natomiast spośród związków monofenolowych najlepszymi substratami dla tyrozynazy okazały się: L-tyrozyna, 4-krezol oraz 4-tyrozol.

Tab. 1. Porównanie uśrednionych wartości parametrów kinetycznych reakcji utleniania wybranych związków fenolowych, katalizowanych z udziałem natywnej tyrozynazy

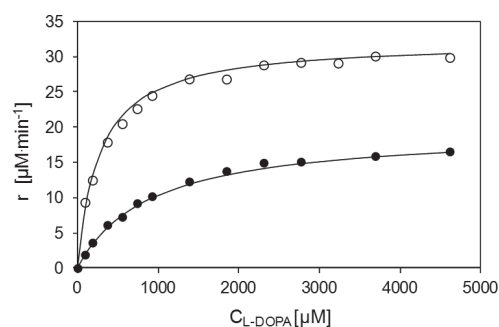
Substrat	$K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{KAT}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]	$k_3 / K_M$ [ $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]	$C_S$ [mM]
Związki monofenolowe				
L-tyrozyna	135	0,284	$2,102\cdot 10^{-3}$	1,0
fenol	220	0,296	$1,345\cdot 10^{-3}$	4,0
4-chlorofenol	117	0,045	$0,386\cdot 10^{-3}$	2,0
2-aminofenol	2586	1,449	$0,560\cdot 10^{-3}$	10
4-aminofenol	1701	0,658	$0,372\cdot 10^{-3}$	10
4-krezol	220	0,497	$2,257\cdot 10^{-3}$	5,0
4-tyrozol	128	0,288	$2,254\cdot 10^{-3}$	2,5
Związki difenolowe				
L-DOPA	267	4,65	$17,429\cdot 10^{-3}$	1,0
katechol	1111	6,334	$5,701\cdot 10^{-3}$	20
4- <i>tert</i> -butylokatechol	1968	32,73	$16,631\cdot 10^{-3}$	8,0

Następnym, niezmiernie istotnym zagadnieniem, związanym z praktycznym zastosowaniem biokatalizatorów, jest odpowiedni dobór stężenia substratu, wykorzystywanego w procesach enzymatycznych. Najkorzystniejszym rozwiązaniem jest kataliza w warunkach całkowitego wysycenia enzymu substratem. Zgodnie z powszechnie obowiązującą regułą, aby osiągnąć stan, w którym szybkość katalizowanej reakcji jest największa, początkowe stężenie substratu musi być dużo wyższe od stałej Michaelisa ( $K_M$ ). Przyjmuje się, że stężenie substratu, przy którym szybkość reakcji odpowiada w przybliżeniu 95% wartości  $V_{MAX}$  wynosi około  $20K_M$ . Niemniej jednak, czynnikiem ograniczającym wykorzystanie tej reguły w praktyce jest najczęściej limit rozpuszczalności stosowanych substratów, a w tym przypadku pochodnych fenolowych. W ramach prezentowanej pracy, na podstawie wartości stałych  $K_M$ , uzyskanych w trakcie pomiarów kinetycznych, dobrano stężenia poszczególnych substratów, które powinny być stosowane w procesach biotransformacji. Dla 5 testowanych związków (fenol, 4-chlorofenol, 4-krezol, 4-tyrozol, katechol) wybrane stężenia  $C_S$  (Tab. 1), spełniały powyższy warunek. Natomiast w przypadku pozostałych substratów wynosiły:  $\sim 4K_M$  dla 2-aminofenolu, L-DOPA i 4-*tert*-butylokatecholu ( $\sim 0,8V_{MAX}$ ),  $5,5K_M$  dla 4-aminofenolu ( $\sim 0,85V_{MAX}$ ) oraz  $7,4K_M$  dla L-tyrozyny ( $\sim 0,9V_{MAX}$ ), co jest wynikiem ograniczonej rozpuszczalności związków w roztworach wodnych.

Podsumowując ten etap badań stwierdzono, że tyrozynaza w formie natywnej jest efektywnym biokatalizatorem konwersji wszystkich przetestowanych pochodnych fenolowych. Należy jednak zaznaczyć, że obserwowana szybkość reakcji jest znacznie większa w obecności difenoli, a jedyny wyjątek od tej reguły stanowi 2-aminofenol. Natomiast rozważając możliwości zastosowania enzymu w konkretnych biotransformacjach należy podkreślić, że z praktycznego punktu widzenia, najbardziej interesującymi substratami są 4-tyrozol i L-tyrozyna, które mogą być wykorzystane odpowiednio do produkcji 4-hydroksytyrozolu (związku o silnych właściwościach przeciwutleniających [Espin i inni, 2001]) oraz L-DOPA (leku stosowanego w terapii choroby Parkinsona i chorób serca [Tuncagil i inni 2009]).

Jak już wspomniano we wstępie, głównym ograniczeniem w przemysłowym wykorzystaniu tyrozynazy w formie natywnej jest przede wszystkim jej niska stabilność termiczna oraz podatność na tzw. inaktywację samobójczą. Dlatego, zgodnie z wcześniejszymi badaniami [Labus i inni, 2011], efektywne wykorzystanie właściwości tego enzymu wymaga jego immobilizacji poprzez kowalencyjne związanie z nośnikiem celulozowym typu DEAE-Granocel, co spowodowało wzrost zarówno pH- i termostabilności jak i zwiększenie odporności na inaktywację samobójczą.

W związku z powyższym, w następnym etapie badań, skupiono się na wyznaczeniu parametrów kinetycznych biotransformacji prowadzonych w obecności naturalnych substratów tyrozynazy (L-tyrozyny i L-DOPA) z wykorzystaniem enzymu immobilizowanego oraz na porównaniu uzyskanych wartości z wynikami otrzymanymi dla natywnej formy tego enzymu. Przykładowe wyniki modelowania zależności szybkości reakcji od początkowego stężenia substratu z udziałem obu form tyrozynazy, przy tym samym stężeniu białka, przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Przykładowe wyniki uzyskane podczas wyznaczania parametrów kinetycznych dla tyrozynazy natywnej (○) oraz immobilizowanej (●) w obecności L-DOPA jako substratu; (○, ●) – punkty eksperymentalne; linie modelowe otrzymano stosując wartości parametrów zamieszczone w tab. 2 dla stężenia enzymu  $7,15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Przed omówieniem uzyskanych wyników należy zaznaczyć, że w przypadku immobilizowanego preparatu, z uwagi na heterogeniczny typ biokatalizy, w kinetycznym opisie reakcji należy uwzględnić nie tylko wpływ stężenia substratu na szybkość reakcji, lecz również obecność oporów reakcji, które powodują, że wartość stałej szybkości reakcji ( $k_{KAT}$ ) jest wypadkową rzeczywistej szybkości reakcji oraz oporów dyfuzyjnych, co prowadzi do jej obniżenia. Z kolei na stałą Michaelisa ( $K_M$ ), oprócz rzeczywistego powinowactwa enzymu do substratu, wpływają również efekty zróżnicowanej dystrybucji reagentów w pobliżu nośnika, wywołane dyfuzją oraz współczynnikami podziału i powodujące zwykle wzrost wartości tej stałej. W związku z tym, w większości przypadków heterogenicznej katalizy enzymatycznej nie wyznacza się rzeczywistych wartości  $k_{KAT}$  i  $K_M$ , a jedynie wartości wypadkowe, wynikające z kinetyki i oporów reakcji, tzw. pozorne (*apparent*) lub efektywne (*effective*) parametry kinetyczne [Martinek i Mozhaev, 1985].

Na podstawie uzyskanych wartości pozornych stałych  $K_M$  dla tyrozynazy immobilizowanej (Tab. 2) stwierdzono, że enzym ten wykazuje wyższe powinowactwo do L-tyrozyny, jednak pozorna stała szybkości reakcji jest znacząco wyższa w reakcji z L-DOPA ( $k_{KAT}$ ). W efekcie, iloraz  $k_{KAT}/K_M$ , odzwierciedlający efektywność katalizy w niskich stężeniach substratu, jest 4-krotnie większy dla reakcji z L-DOPA.

Tab. 2. Porównanie uśrednionych wartości parametrów kinetycznych reakcji utleniania L-Tyrozyny i L-DOPA z udziałem tyrozynazy natywnej i immobilizowanej

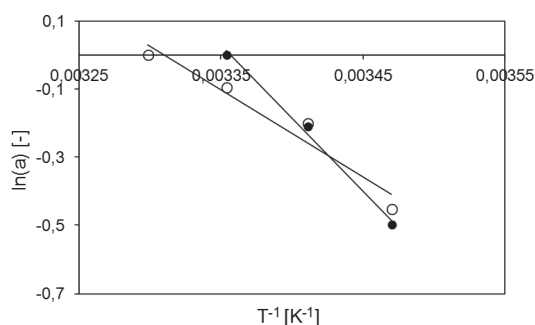
Substrat	$K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_3$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]	$k_3 / K_M$ [ $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]
Enzym immobilizowany <sup>1</sup>			
L-tyrozyna	176	0,137	$0,778\cdot 10^{-3}$
L-DOPA	924	2,85	$3,084\cdot 10^{-3}$
Enzym natywny <sup>2</sup>			
L-tyrozyna	135	0,284	$2,102\cdot 10^{-3}$
L-DOPA	267	4,650	$17,429\cdot 10^{-3}$

<sup>1</sup> dla enzymu immobilizowanego wyznaczono pozorne wartości parametrów

<sup>2</sup> dane dla enzymu natywnego (zaznaczone kursywą) pochodzą z tab. 1.

Z kolei porównując wyniki uzyskane dla tyrozynazy natywnej i immobilizowanej (Tab. 2) zaobserwowano ponad trzykrotny spadek powinowactwa enzym-substrat w przypadku L-DOPA i tyrozynazy związanej, podczas gdy pozorna stała  $K_M$  dla L-tyrozyny uległa zaledwie 30% wzrostowi po immobilizacji enzymu. Ponieważ, tak jak wcześniej wspomiano, na wartość pozornej stałej  $K_M$  wpływają zarówno opory dyfuzyjne jak i współczynniki podziału reagentów w warstwie przonośnikowej, trudno jednoznacznie wskazać przyczynę obserwowanych zmian. Jednak, zakładając dominację oporów dyfuzyjnych, powinno się obserwować ilościowo zbliżone różnice w przypadku obu substratów. Zatem przypuszczalną przyczyną niewielkiego (L-tyrozyna) i znaczącego (L-DOPA) wzrostu pozornej stałej  $K_M$  należy upatrywać raczej w większej sile oddziaływań nośnik-reagenty w przypadku stosowania substratu difenolowego, co powoduje zmianę rzeczywistego stężenia substratu w mikrootoczeniu enzymu.

W dalszej kolejności, dla obu form enzymu, wyznaczono zależność szybkości reakcji utleniania L-DOPA od temperatury, wynikającą z równania Arrheniusa (3) [Brauner i Shacham, 1997]. Na podstawie uzyskanych wyników zaobserwowano (Rys. 2), że w przypadku immobilizowanej tyrozynazy energia aktywacji ( $E_0$ ) niezbędna do zainicjowania biokonwersji L-DOPA wynosi  $35,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  i jest 1,7 razy wyższa od wartości uzyskanej dla natywnej formy tego enzymu. Otrzymane wyniki potwierdzają pojawienie się dodatkowych oporów reakcji w przypadku zastosowania enzymu immobilizowanego (zmiana kąta nachylenia prostej), jak i usztywnienie konformacji białka związanego kowalencyjnie z powierzchnią nośnika (większa wartość energii aktywacji).



Rys. 2. Wykres Arrheniusa zależności aktywności (a) od temperatury dla tyrozynazy natywnej (○) oraz immobilizowanej (●). Aktywność mierzono względem L-DOPA

Podsumowując ten etap badań stwierdzono, że wykorzystanie immobilizowanego preparatu tyrozynazy do biokonwersji L-tyrozyny i L-DOPA wiąże się z występowaniem zarówno oporów dyfuzyjnych jak i oddziaływań nośnik-reagenty w trakcie katalizowanych reakcji, co widocznie wpływa na wartości uzyskiwanych pozornych parametrów kinetycznych ( $K_M$ ,  $k_{KAT}$ ). Spadek powinowactwa enzym-substrat dla związanego enzymu obserwowano przede wszystkim w przypadku L-DOPA, jako substratu. Natomiast dla L-tyrozyny zjawisko to było znacznie mniej zauważalne.

### Podsumowanie i wnioski

Głównym celem pracy było wyznaczenie wartości parametrów kinetycznych równań opisujących utlenianie wybranych związków fenolowych w obecności natywnej tyrozynazy oraz porównanie wyników uzyskanych dla naturalnych substratów tego enzymu – L-tyrozyny i L-DOPA – z wartościami otrzymanymi dla immobilizowanego preparatu tyrozynazy.

Na podstawie przeprowadzonych badań wyznaczono wartości 2 podstawowych parametrów kinetycznych reakcji utleniania wybranych pochodnych mono- i difenolowych i zgodnie z uzyskanymi wynikami stwierdzono, że enzym natywny jest efektywnym biokatalizatorem utleniania wszystkich przetestowanych związków, niemniej jednak wśród substratów monofenolowych wykazuje największe powinowactwo do 4-chlorofenolu, 4-tyrozolu i L-tyrozyny, a spośród difenoli do L-DOPA.

Mając na uwadze fakt, że do efektywnego wykorzystania tyrozynazy niezbędna jest jej immobilizacja, w kolejnym etapie badań wyznaczono wartości pozornych parametrów kinetycznych dla L-tyrozyny i L-DOPA w reakcji prowadzonej w obecności enzymu związanego z nośnikiem, które następnie porównano z wartościami uzyskanymi dla natywnego biokatalizatora.

Zgodnie z otrzymanymi rezultatami stwierdzono, że w obecności L-DOPA immobilizowany preparat tyrozynazy charakteryzuje się ponad 3-krotnym spadkiem powinowactwa enzym-substrat w porównaniu z enzymem natywnym, podczas gdy w przypadku L-tyrozyny powinowactwo ulegało jedynie 1,3-krotnemu spadkowi. Uznano, że jest to mieszany efekt występowania oporów dyfuzyjnych oraz oddziaływań poszczególnych reagentów z powierzchnią nośnika, co dodatkowo potwierdzają wyniki otrzymane podczas badania wpływu temperatury na szybkość reakcji.

Natomiast istotną informacją jest zanotowanie jedynie trzykrotnego spadku efektywności procesu hydroksylacji L-tyrozyny do L-DOPA z udziałem enzymu immobilizowanego, podczas gdy dalsze utlenianie L-DOPA uległo spowolnieniu 5,6 razy.

Ponieważ etap hydroksylacji prowadzi do otrzymywania znanego leku, a jego dalsze utlenianie obniża wydajność reakcji, obserwowane zjawisko należy uznać za procesowo korzystne.

### LITERATURA

- Brauner N., Shacham M., 1997. Statistical analysis of linear and nonlinear correlation of the Arrhenius equation constants *Chem. Eng. Process.*, 36, 243-249. DOI: 10.1016/S0255-2701(96)04186-4
- Espin J.C., Soler-Rivas C., Cantos E., Tomas-Barberan F.A., Wichers H.J., 2001. Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1187-1193. DOI: 10.1021/jf001258b
- Giurg M., Wiech E., Piekieska K., Gebala M., Mlochowski J., Wolanski M., Ditkowski B., Peczyńska-Czoch W., 2006. A New approach to synthesis of questiomycin A: oxidative cyclocondensation of ortho-aminophenol *Pol. J. Chem.*, 80, nr 2, 297-306.
- Halaoui S., Asther M., Sigoillot J.C., Hamdi M., Lomascolo A., 2006. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications *J. Appl. Microb.*, 100, 219-232. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.02866.x
- Labus K., Turek A., Liesiene J., Bryjak J., 2011. Efficient *Agaricus bisporus* tyrosinase immobilization on cellulose-based carriers *Biochem. Eng. J.*, 56, 232-240. DOI: 10.1016/j.bej.2011.07.003
- Land E.J., Ramsden Ch.A., Riley P.A., 2007. The mechanism of suicide-inactivation of tyrosinase: a substrate structure investigation, *Tohoku J. Exp. Med.*, 212, 341-348. DOI: 10.1620/tjem.212.341
- Marin-Zamora M.E., Rojas-Melgarejo F., Garcia-Canovas F., Garcia-Ruiz P.A., 2007. Effects of the immobilization supports on the catalytic properties of immobilized mushroom tyrosinase: A comparative study using several substrates *J. Biotechnol.*, 131, 4, 388-396. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2007.05.004
- Martinek K., Mozhaev V.V., 1985. Immobilization of enzymes: an approach to fundamental studies in biochemistry *Adv. Enzymol.*, 57, 179-249.
- Michaelis L., Menten M.L., 1913. Die Kinetik der Invertinwirkung *Biochem. Z.*, 49, 333-369. [http://www.who.edu/fileserver.do?id=100865&pt=2&p=59447]
- Tischer W., Wedekind F., 1999. Immobilized enzymes: methods and applications *Top. Curr. Chem.*, 200, 95-126. DOI: 10.1007/3-540-68116-7\_4
- Tuncagil S., Kayahan S.K., Bayramoglu G., Arica M.Y., Toppare L., 2009. L-DOPA synthesis using tyrosinase immobilized on magnetic beads *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 58, 187-193. DOI: 10.1016/j.molcatb.2008.12.014
- Zynek K., Bryjak J., Polaković M., 2010. Effect of separation on thermal stability of tyrosinase from *Agaricus bisporus* *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 66 172-176. DOI: 10.1016/j.molcatb.2010.05.003
- Zynek K., Bryjak J., 2009. Dobór warunków izolacji i oczyszczania tyrozynazy z *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.**