

КИНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОКИСЛЕНИЯ ФЕНОЛА И ПИРОКАТЕХИНА СВОБОДНОЙ И ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ТИРОЗИНАЗОЙ

Ю. А. Шестеренко
О. В. Севастьянов
И. И. Романовская

Физико-химический институт им. А. В. Богатского
НАН Украины, Одесса

E-mail: romairina@gmail.com

Получено 13.07.2011

Из грибов *Agaricus bisporus* выделен частично очищенный препарат тирозиназы. С использованием электрофореза в нативных условиях обнаружено 17 протеиновых фракций, 12 из которых обладают выраженной фенолоксидазной активностью и составляют 92,5% общего протеина. Методом SDS-электрофореза в ПААГ выявлено 9 протеиновых фракций, основными из которых являются фракции с молекулярной массой 12 и 41–48 кДа.

Изучены кинетические параметры окисления фенола и пирокатехина, катализируемого свободной и иммобилизованной тирозиназой. Показано, что включение энзима в матрицу существенно не влияет на K_m и V_{\max} окисления пирокатехина, однако при биоконверсии фенола K_m увеличивается в 6,3 раза при заметном снижении V_{\max} . Установлено ингибирование субстратом при изучении окисления пирокатехина, катализируемого свободной и иммобилизованной тирозиназой, а также фенола в присутствии свободного энзима.

Ключевые слова: тирозиназа, электрофорез, окисление фенолов, кинетические параметры, иммобилизация.

Проблема очистки производственных стоков от растворенных в воде органических веществ, в частности фенолов, является одной из наиболее важных и одновременно труднорешаемых.

В связи с этим значительный интерес представляют альтернативные технологии удаления фенолов с использованием окислительно-восстановительных энзимов благодаря их селективности, высокой степени очистки, образованию малотоксичных продуктов, возможности применения в широком интервале pH, температуры и концентрации поллютантов [1].

Тирозиназа (монофенол, дигидроксид-*L*-фенилаланин: кислород оксидоредуктаза КФ 1.14.18.1) — медьсодержащий энзим, катализирующий *o*-гидроксилирование монофенольных субстратов до *o*-дифенолов и окисление *o*-дифенольных поллютантов до *o*-хинонов с последующим образованием малотоксичных олигомерных продуктов [2]. Является широко распространенным энзимом, отвечающим за биосинтез меланина и других полифенольных соединений в грибах, животных и растительных организмах [2, 3]. Наиболее активно изучаются тирозиназа грибов *Agaricus bisporus* и микробные энзимы.

Один из основных недостатков применения тирозиназы — высокая стоимость, в связи с чем актуальным является получение частично очищенных ее препаратов. Поскольку протеиново-фракционный состав препаратов энзима в значительной степени зависит от метода выделения, изучение особенностей состава выделенного частично очищенного препарата методом электрофореза вызывает большой интерес.

Для стабилизации и многократного использования тирозиназы перспективно закрепление ее на полимерных носителях [3].

В процессе иммобилизации могут изменяться конформационные особенности тирозиназы, сродство к субстрату, а также ряд других свойств, поэтому определение кинетических параметров функционирования иммобилизованных препаратов можно рассматривать как весьма актуальную задачу [2].

Цель данной работы — выделение частично очищенного препарата тирозиназы грибов *Agaricus bisporus*, исследование его протеиново-фракционного состава и кинетических особенностей окисления фенола, а также пирокатехина, катализируемого свободным и иммобилизованным энзимом.

Матеріали і методи

Частично очищений препарат тирозинази из грибов *Agaricus bisporus* выделяли согласно модифицированному нами методу [4]. В полученном препарате определяли содержание протеина методом Лоури в модификации Хартри [5], содержание меди согласно [6], фенолоксидазную активность — по тирозину [7].

Протеиново-фракционный состав препарата тирозиназы исследовали методом SDS-электрофореза в 10%-м полиакриламидном геле (ПААГ) в системе Лэмли на приборе Helicon (Россия). Окрашивание осуществляли с использованием Кумасси R-250 [8]. Препараты анализировали в пяти повторениях.

Молекулярную массу исследуемых протеинов рассчитывали по калибровочной кривой «относительная электрофоретическая подвижность/lg молекулярной массы (кДа)», построенной с использованием следующих маркерных протеинов: лизоцим (14,4 кДа), папаин (21 кДа), панкреатическая липаза (35 кДа), овальбумин (40 кДа), бычий сывороточный альбумин (67 кДа).

Нативный электрофорез осуществляли в 10%-м ПААГ по методу Орнстейн и Дэвис [8].

Кинетику реакции окисления фенола и пирокатехина, катализируемую тирозиназой, определяли по начальной скорости накопления промежуточного продукта реакции (o-хинона) спектрофотометрически с помощью 3-метил-2-бензотиазолонгидразон-гидрохлорида (МБТГ) [9].

Иммобилизацию выделенного препарата тирозиназы проводили, добавляя 4%-й раствор альгината натрия, содержащий энзим, к 5%-му раствору хлорида кальция [10].

Для изучения кинетических особенностей окисления фенола и пирокатехина, катализируемого иммобилизованной тирозиназой, гранулы биокатализатора растворяли с использованием 20%-го раствора ортофосфорной кислоты с последующим добавлением карбоната натрия (до pH 6,0–6,5) и гексаметафосфата натрия (10%). Лаг-период реакции окисления фенола определяли по зависимости количества образующихся продуктов реакции от времени. Линейную часть кривой экстраполировали до пересечения с осью абсцисс; отсекаемый на оси абсцисс отрезок соответствует лаг-периоду реакции [11].

На основе полученных данных методом Хейнса [12] находили константу Михаэлиса K_m и максимальную скорость реакции $V_{\text{макс}}$. Используя метод Диксона [12], определяли константу ингибирования субстратом k_i , затем вычисляли оптимальную концентрацию

субстрата $S_{\text{опт}}$ и оптимальную скорость реакции $V_{\text{опт}}$. Концентрации фенола и пирокатехина составили $8,75 \cdot 10^{-5}$ – $5,6 \cdot 10^{-3}$ и $4 \cdot 10^{-5}$ – $9,8 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³, соответственно.

Статистическую обработку проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Из грибов *Agaricus bisporus* выделен частично очищенный препарат тирозиназы с выходом по протеину 0,67 мг/г влажной массы грибов, содержанием ионов меди 0,19%, удельной активностью 500 ед/мг протеина в 1 мин. Метод выделения модифицировали добавлением поликапроамида (М.м. 30 кДа), связывающего продукты окисления полифенольных соединений (ингибиторы тирозиназы), что позволило повысить активность препарата в 3 раза [4].

Методом нативного электрофореза в ПААГ выявлено 17 протеиновых фракций, 12 из которых обладают выраженной фенолоксидазной активностью и составляют 92,5% общего протеина. Количество фракций может быть обусловлено наличием изоформ энзима и образованием агрегатов с присутствующими полифенолами или пигментами (табл. 1, рис. 1).

Таблица 1. Фракционный состав и фенолоксидазная активность тирозиназы (нативный электрофорез в ПААГ)

| № | R _f | Удельная доля протеиновой фракции в спектре, % | |
|----|----------------|--|-------------------------------|
| | | По протеину | По фенолоксидазной активности |
| 17 | 0,10 | 1,20 | – |
| 16 | 0,14 | 2,80 | – |
| 15 | 0,17 | 1,80 | – |
| 14 | 0,21 | 11,60 | 10,10 |
| 13 | 0,24 | 11,60 | 60,13 |
| 12 | 0,28 | 30,20 | |
| 11 | 0,30 | 8,20 | |
| 10 | 0,35 | 9,10 | 8,77 |
| 9 | 0,40 | 7,20 | 4,23 |
| 8 | 0,45 | 2,40 | 3,69 |
| 7 | 0,48 | 1,70 | 4,31 |
| 6 | 0,52 | 1,50 | – |
| 5 | 0,56 | 9,60 | 1,98 |
| 4 | 0,61 | 0,80 | 3,12 |
| 3 | 0,66 | 0,10 | 3,67 |
| 2 | 0,71 | 0,10 | – |
| 1 | 0,78 | 0,10 | – |

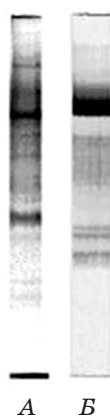


Рис. 1. Электрофореграммы (нативный электрофорез) препарата тирозиназы:
 А — протеиновые фракции;
 Б — фенолоксидазная активность фракций

Исследование протеиново-фракционного состава выделенного препарата тирозиназы методом SDS-электрофореза в ПААГ показало наличие девяти протеиновых фракций (рис. 2). Установлено, что основными являются фракции с молекулярной массой $12 \pm 1,0$ и $41-48 \pm 4,5$ кДа.

Полученные нами данные согласуются с представленными в литературе. Так, M. Schurink et al. [13] методом SDS-электрофореза выявили наличие легкой (L) и тяжелой (H) полипептидных цепей с М.м. $14 \pm 0,5$ и $49 \pm 1,7$ кДа, соответственно. Молекулярная масса нативной тирозиназы, определенная методом гель-фильтрации, составила 127 ± 4 кДа, что дало основание авторам предположить гетеротетрамерную структуру энзима состава (HL)₂.

Рядом других авторов показано, что *in vivo* энзим находится в основном в латент-

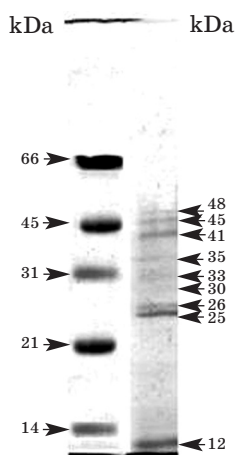


Рис. 2. Протеиновые фракции выделенной из грибов *Agaricus bisporus* тирозиназы, выявленные методом SDS-электрофореза в ПААГ

ной форме. Методом SDS-электрофореза определена его молекулярная масса — 67 кДа. Латентная тирозиназа расщепляется под действием протеаз до промежуточной формы (М.м. 58 кДа) с последующим образованием активного энзима (М.м. 43 кДа) и фрагмента (15 кДа) [14].

Латентная форма тирозиназы нами не выявлена, что может объясняться способом выделения и стадией развития плодовых тел. Однако величина молекулярной массы активной формы и отщепляющегося фрагмента согласуются с полученными нами данными.

Также существует предположение, что L-цепь не является фрагментом тирозиназы: эта фракция может быть представлена смесью лектина и маннаназы, соосажающихся в процессе выделения энзима [14].

Нами были обнаружены три минорные фракции с молекулярной массой 30–35 кДа; фракция с М.м. 35 кДа также описана в литературе [15]. Остальные фракции (25–26 кДа), вероятно, представлены балластными протеинами, либо продуктами деградации.

Несмотря на определенный объем известной информации относительно коммерческих препаратов тирозиназы, определение кинетических параметров функционирования выделенных, частично очищенных препаратов энзима является актуальной задачей.

В тирозиназном катализе участвуют два субстрата: молекулярный кислород и фенольное соединение. Известно, что в процессе катализа энзим полностью насыщен кислородом, о чем свидетельствуют значения K_m по кислороду, составляющие для различных фенольных субстратов $0,04-55,6$ мкмоль/дм³ [16], что значительно ниже растворимости кислорода в воде ($1,3$ ммоль/дм³ при 25 °С) [17], поэтому изучение кинетических особенностей катализа осуществляли по фенольному субстрату.

При окислении фенола, катализируемого тирозиназой, было показано наличие лаг-периода, обусловленного тем, что в условиях *in vivo* большая часть энзима существует в мет-форме (85%), не способной связывать молекулярный кислород. Эта форма не катализирует окисление монофенолов, однако обладает высоким сродством к ним и связывает их без протекания реакции, что и приводит к возникновению лаг-периода [2].

Кривая окисления фенола имеет S-образный вид, что согласуется с данными, представленными в [11], величина лаг-периода составила 1,22 мин (рис. 3).

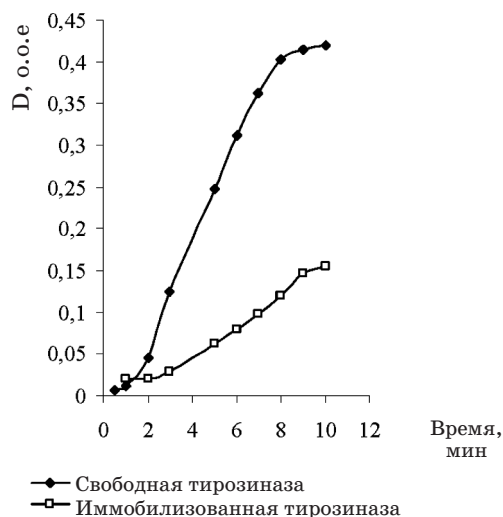


Рис. 3. Зависимость количества образующегося о-хинона от времени в реакции тирозиназного окисления фенола

Полученные значения K_m и $V_{\text{макс}}$ представлены в табл. 2. Показано, что величины K_m (0,15 и 0,16 ммоль/дм³ для фенола и пирокатехина) соответствуют данным, представленным в литературе — 0,16–4,0 ммоль/дм³ [18, 19] и 0,15–0,17 ммоль/дм³ [16, 20], соответственно.

Следует отметить, что при окислении пирокатехина максимальная скорость (39,2 мкмоль/мг протеина в 1 мин) значительно выше по сравнению с таковой для фенола (1,69 мкмоль/мг протеина в 1 мин), что обусловлено наличием стадии введения ОН-группы в о-положение молекулы фенола, являющейся

лимитирующей в процессе тирозиназного окисления, тогда как для пирокатехина эта стадия отсутствует [2].

В результате иммобилизации выделенного препарата тирозиназы в гель альгината кальция получен высокоактивный стабильный биокатализатор реакции окисления фенолов многоразового использования [10].

Исследование влияния иммобилизации тирозиназы на кинетические параметры показало, что величина лаг-периода окисления фенола, катализируемого иммобилизованным энзимом, увеличилась до 1,83 мин (рис. 3).

Выявлено, что включение тирозиназы в матрицу существенно не влияет на K_m по пирокатехину. Однако K_m по фенолу заметно увеличивается (в 6,3 раза), что, вероятно, обусловлено уменьшением сродства энзима к субстрату в результате конформационных изменений глобулы протеина (табл. 2).

Показано, что $V_{\text{макс}}$ окисления фенола, катализируемого иммобилизованным препаратом, снижается в 2,9 раза по сравнению со свободным, в то время как скорость окисления пирокатехина с использованием иммобилизованной тирозиназы уменьшается всего в 1,2 раза.

Полученные результаты подтверждают большую стабильность дифенолазной активности тирозиназы [2].

При изучении окисления пирокатехина, катализируемого свободной и иммобилизованной тирозиназой, наблюдали ингибирование

Таблица 2. Кинетические параметры окисления пирокатехина и фенола с использованием свободной и иммобилизованной тирозиназы

| Энзим | Пирокатехин | | Фенол | |
|-----------------------------|-------------------------------|--|-------------------------------|--|
| | K_m , ммоль/дм ³ | $V_{\text{макс}}$, мкмоль/мг протеина в 1 мин | K_m , ммоль/дм ³ | $V_{\text{макс}}$, мкмоль/мг протеина в 1 мин |
| Свободная тирозиназа | 0,160 | 39,2 | 0,154 | 1,69 |
| Иммобилизованная тирозиназа | 0,182 | 32,3 | 0,970 | 0,592 |

Таблица 3. Субстратное ингибирование свободной и иммобилизованной тирозиназы

| Субстрат | Энзим | K_i , ммоль/дм ³ | $S_{\text{опт.}}$, ммоль/дм ³ | $V_{\text{опт.}}$, мкмоль/мг протеина в 1 мин |
|-------------|-----------------------------|-------------------------------|---|--|
| Пирокатехин | Свободная тирозиназа | 23,44 | 1,88 | 35,90 |
| | Иммобилизованная тирозиназа | 108,60 | 3,33 | 27,25 |
| Фенол | Свободная тирозиназа | 2,0 | 0,55 | 1,33 |
| | Иммобилизованная тирозиназа | – | – | – |

субстратом: K_1 иммобилизованной тирозиназы пирокатехином ($108,6 \text{ ммоль/дм}^3$) увеличилась в 4,6 раза по сравнению со свободным энзимом ($23,44 \text{ ммоль/дм}^3$) (табл. 3). K_1 тирозиназы, катализирующей окисление фенола, составила $2,0 \text{ ммоль/дм}^3$; в присутствии иммобилизованного энзима в изученных концентрациях установлено отсутствие ингибирования фенолом. Полученные результаты свидетельствуют о стабилизирующем влиянии включения в альгинат кальция. Рассчитанные значения концентраций фенольных субстратов и скоростей

реакций, учитывающие субстратное ингибирование (табл. 3), позволяют оптимизировать процессы окисления фенола и пирокатехина, катализируемые тирозиназой.

Таким образом, согласно модифицированному методу осуществлено выделение частично очищенного препарата тирозиназы, изучен его протеиново-фракционный состав, кинетические особенности окисления монофенольного и дифенольного субстратов, катализируемого свободной и иммобилизованной тирозиназой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kameda E., Langone M. A., Coelho M. A. Tyrosinase extract from *Agaricus bisporus* mushroom and its in natural tissue for specific phenol removal // Environm. Technol. — 2006. — V. 11, N 7. — P. 1209–1215.
2. Halouli S., Aster M., Sigoillot I.-C. et al. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological application // J. Appl. Microbiol. — 2006. — V. 100. — P. 219–232.
3. Duran N., Rosa M. A., D'Annibale A. et al. Application of laccase and tyrosinase (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review // Enz. Microb. Technol. — 2002. — V. 31. — P. 907–931.
4. Романовська І. І., Осійчук О. В., Шестеренко Ю. А., Севастьянов О. В. Ферментативні методи елімінації фенольних полютантів // Мікроб. біотехнол. — 2008. — № 1(2). — С. 72–78.
5. Hartree E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. — 1972. — V. 48, N 1. — P. 422–427.
6. Stark G. R., Dawson C. R. Spectrophotometric microdetermination of copper in copper oxidases using oxalyldihydrazide // Anal. Chem. — 1958. — V. 30, N 2. — P. 191–194.
7. Ikehata K., Nicell J. Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols // Biotechnol. Progr. — 2000. — V. 16, N 4. — P. 533–540.
8. Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П. Методы биохимического исследования растений. — Л.: Агропромиздат, 1987. — 430 с.
9. Rodriguez-Lopez J. N., Escribano J., Garcia-Canovas F. A. Continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinone // Anal. Biochem. — 1994. — V. 216, N 1. — P. 205–212.
10. Романовская И. И., Шестеренко Ю. А., Севастьянов О. В. и др. Способ элиминации фенола с использованием тирозиназы *Agaricus bisporus*, иммобилизованной в альгинат // Химия и технология воды. — 2010. — Т. 32, № 1. — С. 107–115.
11. Гукасян Г. С. Исследование кинетики окисления монофенолов тирозиназой. Влияние восстановителей // Биохимия. — 2002. — Т. 67, № 2. — С. 332–336.
12. Келету Т. Основы ферментативной кинетики. — М.: Мир, 1990. — 348 с.
13. Schurink M., van Berkel W. J., Wichers H. J. et al. Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity // Peptides. — 2007. — V. 28, N 3. — P. 485–495.
14. Flurkey W. H., Inlow K. Proteolytic processing of polyphenol oxidase from plants and fungi // J. Inorg. Biochem. — 2008. — V. 102, N 12. — P. 2160–2170.
15. Espin J. C., Wichers H. J. Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecylsulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform // J. Agr. Food. Chem. — 1999. — V. 47, N 9. — P. 3518–3525.
16. Munoz-Munoz J. L., Garcia-Molina F., Garcia-Ruiz P. A. et al. Phenolic substrates and suicide inactivation of tyrosinase: kinetics and mechanism // Biochem. J. — 2008. — V. 416, N 3. — P. 431–440.
17. Rodriguez-Lopez J. N., Ros J. R., Varon R. et al. Oxygen Michaelis constants for tyrosinase // Ibid. — 1993. — V. 293. — P. 859–866.
18. Sharina A. H., Lee Y. H., Musa A. Effects of gold nanoparticles on the response of phenol biosensor containing photo curable membrane with tyrosinase // Sensors. — 2008. — V. 8, N 10. — P. 6407–6416.
19. Gu B. X., Xu C. X., Zhu G. P. et al. Tyrosinase immobilization on ZnO nanorods for phenol detection // J. Phys. Chem. — 2009. — V. 113, N 1. — P. 377–381.
20. JiuHong Y., Huangxian J. Pure organic phase phenol biosensor based on tyrosinase entrapped in a vapor deposited titania sol-gel membrane // Electroanalysis. — 2004. — V. 16, N 16. — P. 1305–1310.

**КІНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ
ОКИСНЕННЯ ФЕНОЛУ І ПІРОКАТЕХІНУ
ВІЛЬНОЮ ТА ІММОБІЛІЗОВАНОЮ
ТИРОЗИНАЗОЮ**

Ю. А. Шестеренко
О. В. Севастьянов
І. І. Романовська

Фізико-хімічний інститут
ім. О. В. Богатського НАН України,
Одеса

E-mail: romairina@gmail.com

Із грибів *Agaricus bisporus* виділено частково очищений препарат тирозинази. Із використанням електрофорезу за нативних умов знайдено 17 протеїнових фракцій, 12 з яких мають виражену фенолоксидазну активність і становлять 92,5% загального протеїну. Методом SDS-електрофорезу в ПААГ виявлено 9 протеїнових фракцій, основними з яких є фракції з молекулярною масою 12 і 41–48 кДа.

Вивчено кінетичні параметри окиснення фенолу і пірокатехіну, що каталізується вільною й іммобілізованою тирозиназою. Показано, що включення ензиму в матрицю істотно не впливає на K_m і V_{\max} окиснення пірокатехіну, однак під час біоконверсії фенолу K_m збільшується в 6,3 раза за помітного зниження V_{\max} . Встановлено інгібування субстратом у процесі вивчення окиснення пірокатехіну, що каталізується вільною й іммобілізованою тирозиназою, та фенолу в присутності вільного ензиму.

Ключові слова: тирозиназа, електрофорез, окиснення фенолів, кінетичні параметри, іммобілізація.

**PHENOL AND PYROCATECHIN
OXIDATION CATALYZED BY FREE
AND IMMOBILIZED TYROSINASE**

Yu. A. Shesterenko
O. V. Sevastyanov
I. I. Romanovskaya

Bogatsky Physico-Chemical Institute
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Odesa

E-mail: romairina@gmail.com

According to modified method, partially purified tyrosinase preparation from *Agaricus bisporus* mushroom was isolated. Using the native electrophoresis, 17 protein fractions were found, 12 of which demonstrated well-marked phenoloxidase activity, accounting for 92.5% of total protein. By the SDS-PAGE method, 9 protein fractions were revealed; the main of them were fractions with molecular masses of 12 and 41–48 kDa.

The kinetic parameters of phenol and catechol oxidation catalyzed by free and immobilized tyrosinase were studied. It was shown that absence of enzyme entrapment in matrix significantly influences on K_m and V_{\max} of catechol oxidation, but at phenol bioconversion the K_m increased 6.3-fold along with appreciable decreasing of V_{\max} . During the investigation of catechol oxidation, catalyzed by free and immobilized tyrosinase, as well as phenol by free enzyme, the substrate inhibition was revealed.

Key words: tyrosinase, electrophoresis, phenol oxidation, kinetic parameters, immobilization.