

Małgorzata Cieńska

Biotransformacje związków fenolowych z wykorzystaniem tyrozynazy z *Agaricus bisporus*
w formie natywnej i immobilizowanej

STRESZCZENIE

Tyrozynaza jest enzymem posiadającym unikalną podwójną aktywność katalityczną, polegającą na zdolności do hydroksylacji monofenoli do difenoli oraz utlenianiu difenoli do chinonów. Ponadto enzym ten posiada szeroką specyficzność substratową, co dodatkowo czyni go niezwykle interesującym z punktu widzenia możliwości wykorzystania w przemyśle. Jednak liczne badania dotyczące mechanizmu katalitycznego tyrozynazy wykazują, że sporym utrudnieniem związanym z zastosowaniem tyrozynazy, może być zjawisko inaktywacji samobójczej tego enzymu, występujące podczas reakcji ze związkami difenolowymi. Pomimo tego faktu, liczne publikacje opisujące potencjał aplikacyjny tyrozynazy nie poruszają tematyki inaktywacji samobójczej, co z praktycznego punktu widzenia wydaje się być kluczowym elementem warunkującym możliwości aplikacyjne.

Głównym celem rozprawy było zbadanie możliwości zastosowania tyrozynazy z *Agaricus bisporus* do syntezy L-DOPA, 3-hydroksytyrozolu oraz kwasu cynobrowego, z uwzględnieniem badań dotyczących wpływu inaktywacji samobójczej na procesy oraz możliwości ograniczenia tego zjawiska.

W pierwszej części badań, na podstawie testów stabilności mechanicznej nośnika Grancel oraz próby immobilizacji tyrozynazy w postaci CLEA, stwierdzono, że separacja sieciowanych agregatów jest utrudniona z powodu ich nierównomiernych rozmiarów, zatem do dalszej części badań wybrano tyrozynazę wiązaną kowalencyjnie z nośnikiem Granocel. Po spełnieniu określonych warunków (objętość preparatu, stabilizacja złoża), nośnik ten można zastosować do prowadzenia procesów w reaktorze mieszalnikowym oraz w kolumnie ze złożem upakowanym. Ponadto zaletami zastosowania tego nośnika jest brak zjawiska sorpcji substratów monofenolowych i produktów ich hydroksylacji oraz brak występowania wewnętrznych oporów dyfuzyjnych, co ma związek z powierzchniowym związaniem enzymu z nośnikiem.

Procesy otrzymywania L-DOPA oraz 3-hydroksytyrozolu zostały przeprowadzone w podobny sposób. W obu przypadkach wykazano potrzebę zastosowania napowietrzania mieszanin reakcyjnych, a reakcje prowadzono z użyciem enzymu natywnego

i immobilizowanego, w układach zawierających (i) 1mM L-tyrozynę lub 2,5 mM tyrozol i dwukrotny nadmiar AH_2 w buforze fosforanowym; (ii) 1mM L-tyrozynę lub 2,5 mM tyrozol i dwukrotny nadmiar AH_2 i 6,7 mM HA w buforze boranowym o pH 9,0, 8,0 lub 7,0 oraz, w przypadku produkcji 3-HTyr, zastosowano także układ (i), zawierający dodatkowo 6,7 mM HA (iii). W pierwszym układzie uzyskano maksymalnie 34% L-DOPA oraz 50% 3-HTyr, a dwukrotne zwiększenie obojętności preparatu immobilizowanego oraz dodatkowa suplementacja AH_2 pozwoliła zwiększyć stopień przereagowania do 69%. Natomiast wprowadzenie do układu z enzymem natywnym 6,7 mM HA przekształcającą formę *met*-tyrozynazy do *oksy*- pozwoliło na uzyskanie 98,5% 3-HTyr. Podczas prowadzenia procesów zaobserwowano zjawisko inaktywacji samobójczej wywoływanej przez związki difenolowe, co wiązało się z brakiem możliwości uzyskania wyższego stopnia przereagowania oraz z niską stabilnością operacyjną tyrozynazy immobilizowanej. Wprowadzenie jonów boranowych

w układzie (ii) pozwoliło ograniczyć inaktywację samobójczą poprzez kompleksowanie produktów difenolowych, dzięki czemu, w pH 7,0 uzyskano 95% stopień przereagowania z enzymem natywnym oraz 70% z enzymem immobilizowanym w przypadku L-DOPA oraz prawie 100% w procesach produkcji 3-HTyr. Pomimo wysokich wydajności reakcji osiągniętych w procesach z wykorzystaniem enzymu immobilizowanego, stwierdzono, że zbyt niska stabilność operacyjna wyklucza użycie tego preparatu. Optymalnymi układami reakcyjnymi do produkcji tych dwóch difenoli są układy z enzymem natywnym oraz, odpowiednio, z 1 mM L-tyrozyną, 2 mM AH_2 , 6,7 mM HA w buforze boranowym pH 7,0 lub 2,5 mM tyrozolem, 5 mM AH_2 , 6,7 mM HA w 0,5 M buforze fosforanowym pH 7,0.

W badaniach dotyczących reakcji tyrozynazy z 3-HAA wykazano, że głównym produktem jest kwas cynobrowy. Na podstawie badań stabilności substratu i produktu w danym pH, zjawiska sorpcji oraz stabilności tyrozynazy w procesach dimeryzacji, stwierdzono, że optymalnym odczynem reakcji jest pH 6,0. Ze względu na brak konieczności dodatkowego napowietrzania mieszaniny reakcyjnej, procesy prowadzono w reaktorach mieszalnikowych, mikroreaktorze oraz w kolumnie ze złożem upakowanym. Badania te udowodniły, że tyrozynaza wykazuje bardzo wysoką stabilność w obecności składników mieszaniny reakcyjnej, a co za tym idzie, 3-HAA może zostać zaliczony do związków wywołujących inaktywację samobójczą w bardzo niewielkim stopniu. Maksymalny stopień przereagowania uzyskany w reaktorze mieszalnikowym wyniósł 80%, a jego zwiększenie było niemożliwe z powodu powstających produktów ubocznych reakcji. Ponieważ zjawisko inaktywacji

samobójczej w tej reakcji jest znikome, do prowadzenia procesów dimeryzacji 3-HAA z powodzeniem można wykorzystać zarówno enzym natywny, jak i immobilizowany.