

## APLICAȚII ALE TIROZINAZEI ȘI LACAZEI: BIOSENZORI ENZIMATICI ELECTROCHIMICI

### APPLICATION OF TYROSINASE AND LACCASE: ENZYMATIC AND ELECTOCHEMICAL BIOSENSOR

Șef lucr.dr. **Monica Florescu**, drd. **Andreea Vâlceanu**, prof.univ.dr. Gh.Coman  
Facultatea de Medicină, Universitatea „Transilvania” din Brașov  
Autor corespondent: **Monica Florescu**, e-mail florescum@unitbv.ro

#### Abstract:

Combination of microscale or nanoscale materials with biomolecules presents a great interest in medicine, environment, biotechnology and food industries. This paper presents two oxidoreductases (tyrosinase and laccase) and their applications as enzymatic biosensors for specific biomolecules detection. Electrochemical biosensors with laccase and tyrosinase, are a promising technology for in-situ monitoring of phenolic compounds, because of their advantages such as high selectivity, low production costs, high-speed response, the potential of miniaturization and simple instrumentation.

**Key-words:** enzymes, tyrosinase, laccase, electrochemical biosensors

#### Introducere

Enzimologia este o parte importantă a biochimiei, deoarece studiază structura chimică a enzimelor, cinetica enzimatică, localizarea în sistemele vii și utilizarea în practică a acestora [1, 8]. Enzimele pot fi folosite fie libere în soluții, fie imobilizate pe diferite substraturi sub formă de biosenzori [7]. Imobilizarea enzimelor se poate face prin metode diferite: adsorbția fizică sau chimică pe un suport inert; încorporarea în ochiurile de rețea ale unui gel sau polimer; micro-încapsularea; reticularea sau legarea covalenta. În alegerea tehnicii de fixare a enzimelor trebuie să se țină cont de mai mulți factori: activitatea enzimatică remanentă; posibilitățile tehnice de realizare; necesitățile de utilizare.

Scopul acestei lucrări este aducerea în prim plan a unor informații de actualitate în legătură cu două enzime, tirozinaza și lacaza și aplicațiile lor în laboratoarele de analiză.

Tirosinaza (EC 1.14.18.1) și lacaza (EC 1.10.3.2) sunt enzime care se întâlnesc în bacterii, fungi, plante și animale. Acestea sunt fenol-oxidaze și necesită pentru oxidare, oxigen molecular [28].

Aplicabilitatea acestor enzime, în vederea obținerii de biosenzori și bioreactoare enzimatice, este de mare importanță în domeniul cercetării medicale și în special în biotehnologii,

datorită combinării unor materiale la dimensiuni micrometrice sau nanometrice cu unele biomolecule.

Tirosinaza este o enzimă care posedă două situsuri catalitice: unul pentru hidroxilarea fenolilor (activitate cresolazică) și cel de-al doilea pentru oxidarea difenolilor până la chinone (activitate catecolazică), ambele situsuri fiind active în prezența oxigenului molecular (Fig.1). Tirosinaza este o metaloenzimă, care posedă la nivelul situsului activ enzimatic, doi ioni de cupru, care sunt coordinați fiecare prin intermediul unui număr de trei resturi histidinice din lanțul polipeptidic enzimatic. Acțiunea oxidoreductazică a tirosinazei este asigurată de transferul reversibil al electronilor prin intermediul ionilor de cupru ( $\text{Cu}^+$ ;  $\text{Cu}^{2+}$ ).

În oxidarea tirosinazei, în prezența tirozinazei, se obțin doi intermediari metabolici (L-DOPA și L-DOPA-chinonă).

În sistemele vii, L-DOPA-chinona se transformă necatalitic în melanină, în urma unor reacții de condensare intramoleculară, oxidare și polimerizare (Fig. 2).

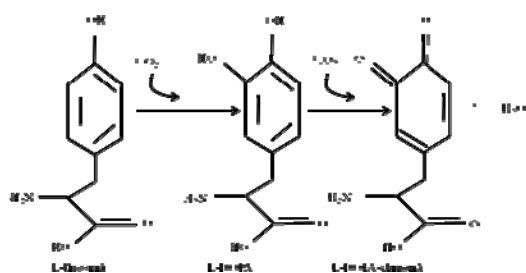


Fig.1 Oxidarea L-tirozinei până la L-DOPA-chinonă în prezența tirosinazei.

Procesul de transformare al tirozinei în melanină este controlat prin intermediul antioxidantilor prezenți în organismele vii (acidul ascorbic, acidul uric), care suferă procese de oxidare în prezența L-DOPA-chinonei [10, 26]. În transformarea enzimatică a tirozinei, în prezența oxigenului molecular, acesta este acceptorul de electroni și se reduce până la apă [26, 35].

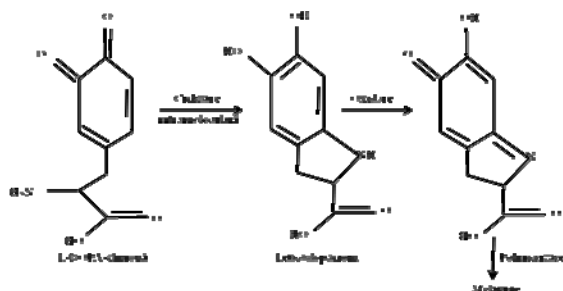


Fig.2 Transformarea L-DOPA-chinonei în melanină

Tirosinaza face parte din subclasa polifenol oxidazelor și prezintă specificitate față de substraturi derivate din fenol: catecoli, crezoli, dopamina, epinefrina. Datorită acestor caracteristici, tirosinaza poate fi utilizată pentru evidențierea analitică a fenolilor în alimente, mediu, laborator clinic [35].

Studiile de specialitate au demonstrat importanța utilizării biosenzorilor pentru detectarea nivelului dopaminei din creier, și astfel diagnosticarea și prevenirea evoluției bolii Parkinson [17, 21].

Lacaza este o oxidoreductază, care posedă, la nivelul situsului catalitic, patru atomi de cupru (metaloenzimă). Enzima catalizează oxidarea fenolilor, aminelor aromatice metoxifenolilor, aminofenolilor [22, 27] cuplată cu reducerea oxigenului molecular până la apă, în absența peroxidului de hidrogen. În Fig.3 este

prezentată oxidarea catecolului în prezența lacazei.

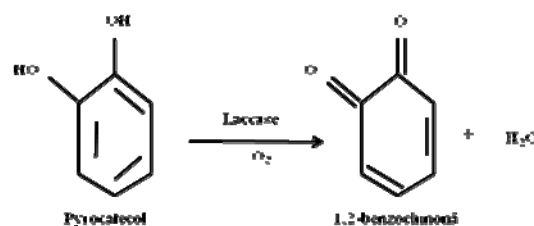


Fig.3 Oxidarea catecolului catalizată de lacază

Deoarece există mai multe surse de proveniență a lacazelor, acestea prezintă câteva deosebiri în ceea ce privește greutatea moleculară (dimeri sau tetrameri), capacitatea de oxidare, pH-ul specific de acțiune și substratul specific asupra căruia acționează [4]. Aplicațiile lacazei sunt variate: sinteza organică, albirea biologică, producerea vinului, industria farmaceutică, depoluarea apelor, mineralizarea unor coloranți sintetici [16, 34]. O altă aplicație a lacazei este de generarea de iod în situ, prin oxidarea iodurilor și producerea de iod, care este un dezinfectant folosit pe scară largă. Lacaza poate fi folosită pentru fabricarea deodoranților și vopselelor de păr, având un efect mai puțin nociv față de produsele actuale, care conțin agenți chimici [31]. Imobilizarea lacazei, poate oferi posibilitatea dezvoltării unor biosenzori, optimizarea metodelor de diagnosticare folosite în medicină și identificarea diversilor poluanți din mediu [11].

### Biosenzorii enzimatici ca metode de detecție

O alternativă pentru a ușura analiza de rutină a produselor industriale sau în laboratoarele de analiză medicală este utilizarea senzorilor și a biosenzorilor. Sensorii sunt instrumente analitice versatile, bazate pe un traductor (electrochimic, optic, termic, piezoelectric), care traduce informațiile fizico-chimice într-un semnal măsurabil. Biosenzorii sunt instrumente analitice, bazate pe combinația unui compus biologic de recunoaștere și un traductor fizic (senzor). Elementul de recunoaștere biologică (cum sunt enzimele, anticorpii, microorganismele) este capabil să interacționeze selectiv cu substratul său.

Caracteristicile originale transformă tehnologia senzorilor într-o posibilă metodologie

care se poate aplica în studiul probelor reale. Unele avantaje cum sunt selectivitatea și specificitatea mare, costul relativ redus de construcție și depozitare, potențialul de miniaturizare, facilitatea de automatizare și portabilitatea echipamentelor, permit realizarea unei analize rapide și în afara laboratorului [32]. Dezvoltarea de biosenzori este descrisă în mai multe lucrări, din diferite domenii de aplicații: medicină, mediu, agricultură și biotehnologie [2, 3, 15, 19].

Modificările fizico-chimice ale compusului biologic activ, care rezultă din interacțiunea cu substanța analizată, trebuie să fie transformate într-un semnal de ieșire măsurabil, de un traductor adecvat. Pot fi utilizate traductoare general aplicabile, dar nespecifice, care indică parametri generali, cum ar fi entalpia de reacție (termistor), modificarea de masă (cristal piezoelectric), sau grosimea stratului (reflectometrie). Pe de altă parte, o indicație specifică poate fi obținută cu electrozi electrochimici pentru specii ca  $H^+$ ,  $OH^-$ ,  $CO_2$  sau  $H_2O_2$ , sau prin metode optice ca fotometria și fluorimetria sau rezonanța plasmonilor de suprafață.

### **Biosenzorii enzimatici electrochimici**

Detecția electrochimică prevalează asupra tuturor metodelor de transducție [23]. Un biosenzor electrochimic este un dispozitiv cu un traductor electrochimic [30], cum sunt senzorii enzimatici amperometrici și potențiometrici. Biosenzorii enzimatici reprezintă cel mai vechi grup de biosenzori și sunt tot mai mult utilizați pentru testarea clinică a metaboliților, cum ar fi glucoza, lactatul, ureea, creatinina și bilirubina. În prezent, biosenzorii amperometrici mai utilizați pe scară largă sunt bazați pe oxidaze care generează  $H_2O_2$ , calea de transducție fiind oxidarea electrochimică a peroxidului format în reacția enzimatică [9, 12, 14]. În acest caz, răspunsul electrodului depinde de concentrația oxigenului din mediul de reacție.

Tirozinaza și catalaza sunt enzime folosite pentru obținerea senzorilor electrochimici pentru detecția substraturilor lor specifice, pe baza metodelor de imobilizare clasice, dar și folosind nanotehnologiile. În zilele noastre, biosenzorii electrochimici cu tirozinaza și lacaza constituie o tehnologie promițătoare pentru monitorizarea în situ a compușilor fenolici, din

cauza avantajelor lor, cum ar fi o selectivitate ridicată, costuri de producție reduse, viteză de răspuns mare, potențial de miniaturizare și instrumentație simplă. În genere, senzorii electrochimici sunt obținuți folosind electrozi din materiale inerte din punct de vedere chimic, cum sunt platina sau aurul, dar și a unor materiale carbonice, mult mai ieftine.

Tirozinaza a fost mai mult folosită pentru obținerea biosenzorilor electrochimici în comparație cu lacaza. Imobilizarea ei folosind filme polimerice, fiind des utilizată. Astfel, au fost utilizați polimeri neconductori [1] dar și polimeri conductori. Stratul biocompus din poli (3,4-etilendioxitiofen) (PEDOT) și tirozinază au fost electrodepuse pe electrozi de aur convenționali dar și pe microelectrozi [20]. Biosenzorii amperometrici au fost testați pentru dopamină și catecol, în soluții apoase tamponate și au afișat un răspuns liniar în intervalul de concentrații cuprins între 10 și 300  $\mu M$ , cu o limită de detecție de 4,18  $\mu M$ .

A fost prezentată de asemenea folosirea polimerilor de coordonare metal-organici (MOCPs), ca matrici noi și eficiente pentru imobilizarea unor enzime în biosenzorii amperometrici utilizați în evidențierea analitică a glucozei sau a fenolilor [13]. Limita de detecție pentru catecol a fost de ordinul 0.2 nM, fiind mult mai mică decât cele obținute prin alte metode.

Nanostructurarea filmelor de polipirol a fost realizată prin combinația dintre litografia unor nanosfere de latex cu electropolimerizarea monomerului pirol N-substituit și aplicată pentru imobilizarea biomoleculilor de tirozinază [5]. Nanostructurarea polipirolului prin litografie cu nanosfere permite o creștere a concentrației de suprafață a enzimelor ancorate pe electrodul cu film de polipirol funcționalizat. Între biosenzorii bazați pe filme polimerizate fără nanosfere și cu nanosfere de 100 nm, valorile maxime ale densității de curent cresc de la 4 la 56  $mA\ cm^{-2}$ .

Electrozii carbonici au fost de asemenea folosiți pentru dezvoltarea biosenzorilor cu tirozinază. Tirozinaza a fost imobilizată pe nanoparticule de Au încapsulate în dendrimeri și legate de un film polimeric conductor pe un electrod de cărbune sticlos pentru detecția catecolului [29].

Principiul de măsurare s-a bazat pe reducerea speciilor de chinonă produse în reacția de biocataliză la 0.2V, față de Ag / AgCl (3 M KCl), cu o bună stabilitate și sensibilitate, oferind o limită de detecție redusă (aproximativ 0,002  $\mu\text{M}$ ). Metoda sol-gel de asemenea a fost folosită pentru imobilizarea tirozinazei prin reticularea ei într-un redox-hidrogel pe rețele de electrozi de Au, a căror suprafață a fost modificată cu grafit și Carbopack C [25]. Materiale compozite au fost preparate și folosite ca electrozi, cum este compozitul obținut din nanotuburi 3-dimensionale de carbon (SWNTs) și polipirol (PPy) prin polimerizarea polipirolului pe SWNTs folosind ca oxidant  $\text{LiClO}_4$ . Tirozinaza fost imobilizată pe SWNTs funcționalizate și compozitul tirozinază-SWNTs-PPy a fost preparat în același mod și utilizat pentru detecția amperometrică a dopaminei în prezența acidului ascorbic, la o sensibilitate ridicată ( $467 \text{ mA} / \text{M cm}^2$ ) și limită de detecție inferioară (5  $\mu\text{M}$ ) în comparație cu rapoartele precedente [17]. Nano-grafenul a fost folosit ca o platformă de imobilizare enzimatică și material de electrod pentru a construi un biosenzor electrochimic cu tirozinază pentru detecția bisfenolului A (BPA) [33]. A fost arătat că pe baza nano-grafenului biosenzorul cu tirozinaza a prezentat un răspuns rapid, repetabilitate și sensibilitate mare, curent de fond și limită de detecție mici. Aceste performanțe electrochimice ale biosenzorului cu nanografen au fost atribuite suprafeței sale specifice mari și imobilizării enzimei prin auto- asamblare strat cu strat.

Biosenzorii electrochimici cu lacază au fost de asemenea dezvoltati pentru detecția compușilor fenolici, dar mult mai puțin față de tirozinază. Nanostructurarea biosenzorilor a fost realizată prin folosirea nanoparticulelor. Astfel, un biosenzor amperometric a fost obținut pentru detecția compușilor fenolici bazat pe imobilizarea covalentă a lacazei pe materialele compozite cu nanotuburi de carbon cu pereți multipli carboxilate (cMWCNTs) și polianilină decorate cu nanoparticule de oxid de fier electrodepuse pe un electrod de Au. Limita de detecție a fost 0.03  $\mu\text{M}$  în domenii lineare de 0,1-10  $\mu\text{M}$  (interval de concentrație mai mică) și 10-500  $\mu\text{M}$  (domeniu de concentrație mai mare) [24]. Un biosenzor amperometric extrem de sensibil pentru detecția compușilor fenolici

totali în vin, a fost obținut prin imobilizarea covalentă a lacazei pe un nanocompozit format din nanoparticule de argint/nanoparticule de oxid de zinc electrochimic depuse pe electrod de aur. Liniaritatea între curentul de oxidare și concentrația gaiacolului a fost obținută în intervalul de concentrație 0,1-500  $\mu\text{M}$  cu o limită de detecție de 0,05  $\mu\text{M}$  și sensibilitate  $0,71 \mu\text{A} \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-2}$  [6].

Polimerii au fost de asemenea folosiți pentru imobilizarea lacazei. Biosenzorul a fost preparat in situ prin electrofilare dintr-un amestec de alcool polivinilic (PVA), lacază (Lac), aditiv de stabilizare enzimatic (F108) și nanoparticule de aur (Au PN). În condițiile optime, limita inferioară de detecție a fost 0,04  $\mu\text{M}$  pentru 2,4-dicloro- fenol și cea mai mare limită de detecție a fost 12,10  $\mu\text{M}$  pentru 4-clorofenol.

Sensibilitatea mare de detecție pentru clorofenoli a fost atribuită interfeței electrochimice adecvate PVA/F108/AuNP/Lac, rezultată din biocompatibilitate ridicată, un raport suprafață-volum mare și proprietăților mecanice superioare ale nanofibrelor electrofilate [18].

### Concluzie

Tirosinaza și lacaza sunt metaloenzime prezente în bacterii, fungi, plante și animale. Acestea sunt fenol-oxidaze având ca substrat fenolii. Aplicabilitatea acestor enzime, în vederea obținerii de biosenzori și bioreactoare enzimatică, este de mare importanță în domeniul cercetării medicale și în special în biotehnologii, datorită combinării unor materiale la dimensiuni micrometrice sau nanometrice cu unele biomolecule.

În concluzie biosenzorii electrochimici cu tirozinaza și lacaza, constituie o tehnologie promițătoare pentru monitorizarea în situ a compușilor fenolici, din cauza avantajelor lor, cum ar fi o selectivitate ridicată, costuri de producție reduse, viteză de răspuns mare, potențial de miniaturizare și instrumentație simplă.

### Bibliografie

1. Algieri C., Donato L., Bonacci P., Giorno L., Tyrosinase immobilised on polyamide tubular membrane for the l-DOPA production: Total recycle and continuous reactor study, Biochemical Engineering Journal 2012, 66, 14-19.

2. Bilitewski, U., Jager, A., Ruger, P., Weise, W., Enzyme electrodes for the determination of carbohydrates in food. In: *Sensors and Actuators B*, 113, 1993, p. 15-16.
3. Bourgeois, W., Burgess, J.E., Stultz, R.M., On-line monitoring of wastewater quality: a review, In: *Journal of Chem.Techn.and Biotechn.*, 76, 2001, p: 337.
4. Casero E., Petit-Domínguez M.D. , Vázquez L., Ramírez-Asperilla I., Parra-Alfambra A.M., Pariente F., Lorenzo E. Laccase biosensors based on different enzyme immobilization strategies for phenolic compounds determination, *Talanta*, 2013, 115, 401-408.
5. Cernat A, Le Goff A, Holzinger M, Sandulescu R, Cosnier S., Micro- to nanostructured poly(pyrrole-nitrilotriacetic acid) films via nanosphere templates: applications to 3D enzyme attachment by affinity interactions, *Anal Bioanal Chem.* 2013 [Epub ahead of print].
6. Chawla S, Rawal R, Kumar D, Pundir CS., Amperometric determination of total phenolic content in wine by laccase immobilized onto silver nanoparticles/zinc oxide nanoparticles modified gold electrode, *Anal Biochem.* 2012, 430(1), 16-23.
7. Coman, Gh., Badea, M., Draghici, C., Ciurea, C., Virtosu, A., 2009, *Biochimie Descriptivă*, Editura Transilvania din Braşov.
8. Coman, Gh., Badea, M., Draghici, C., Dumitrescu L., Tiut, M, 2003, *Biochimie*, Ermetic Ed., Brasov.
9. Dimcheva, N., Horozova, E., Jordanova, Z., A glucose oxidase immobilized electrode based on modified electrode. In: *Z. Naturforsch.* 57c, 2002, p: 705.
10. Faccio G, Kruus K., Saloheimo M., Thöny-Meyer L., Bacterial tyrosinases and their applications, *Process Biochemistry* 2012, 47, 1749-1760
11. Fernández-Fernández M., Ángeles Sanromán M., Moldes D., Recent developments and applications of immobilized laccase, *Biotechnology Advances* 2013, 31, 1808-1825
12. Florescu, M., Brett, C.M.A., Development of electrochemical enzyme biosensors based on carbon film electrodes and application to wine analysis, *Talanta*, 65 (2005) 306-312.
13. Fu Y, Li P, Bu L, Wang T, Xie Q, Chen J, Yao S., Exploiting metal-organic coordination polymers as highly efficient immobilization matrixes of enzymes for sensitive electrochemical biosensing, *Anal Chem.* 2011, 83(17), 6511-7.
14. Gavrilov, A. B., Zueva, A.F, Efimov, O: N, V. Bogdanovskaya, A, Tarasevitch, M. R, New enzyme biosensor for determination of glucose. In: *Synthetic metals*, 60, 1993, p: 159.
15. Habermüller, K., Mosbach, M., oSchuhmann, W., Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors, In: *Fresenius J Anal Chem* (2000) 366, p.560-568.
16. Jeon J-R. and Chang Y-S., Laccase-mediated oxidation of small organics: bifunctional roles for versatile applications, *Trends in Biotechnology* June 2013, No. 6., Vol. 31.
17. Kyoungseon M., Young Je Y, Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase-SWNTs-Ppy composite electrode, *Talanta* 2009 80, 1007-1011.
18. Liu J, Niu J, Yin L, Jiang F., In situ encapsulation of laccase in nanofibers by electrospinning for development of enzyme biosensors for chlorophenol monitoring, *Analyst.* 2011, 136(22), 4802-8.
19. Luong, J.H.T., Groom, C.A., Male, K.B., Potential role of biosensors in the food and drink industries, In: *Biosensors and Bioelectronics*, 6, 1991, p. 547.
20. Lupu S, Lete C, Balaure PC, Caval DI, Mihailciuc C, Lakard B, Hihn JY, Javier del Campo F., Development of amperometric biosensors based on nanostructured tyrosinase-conducting polymer composite electrodes, *Sensors (Basel).* 2013, 13(5), 6759-74.
21. Maciejewska J., Pisarek K., Bartosiewicz I., Kryszynski P., Jackowska K., Bieganski A. T., Selective detection of dopamine on poly (indole-5carboxylic acid)/ tyrosinase electrode, *ElectrochimicaActa* 2011, 56, 3700-3706.
22. Martorana A., Sorace L., Harry Boer H., Vazquez-Duhalt R., Basosi R., Baratto M. C., A spectroscopic characterization of a phenolic natural mediator in the laccase biocatalytic reaction, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2013, 97 , 203- 208.
23. McCreery, R.L. In A.J.bard ed, *Electroanalytical Chemistry*, Marcell Dekker, New York, 17, 1991, p: 1.
24. Rawal R, Chawla S, Devender, Pundir CS., An amperometric biosensor based on laccase immobilized onto Fe<sup>2+</sup>O<sub>3</sub>NPs/cMWCNT/PANI/Au electrode for determination of phenolic content in tea leaves extract. *Enzyme Microb Technol.* 2012, 51(4), 179-85.
25. Sapelnikova S, Dock E, Ruzgas T, Emnéus J. Amperometric sensors based on tyrosinase-modified screen-printed arrays, *Talanta.* 2003, 61(4), 473-83.

26. Selinheimo E., NiEidhin D., Steffensen C., Nielsen J., Lomascolo A., Halaoui S., Record E., O'Beirne D., J. Buchert J., Kruus K., Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases, *Journal of Biotechnology* 2007, 130, 471-480.
27. Shiraishi T., Sannami Y., Kamitakahara H., Takano T. Comparison of a series of laccase mediators in the electro-oxidation reactions of non-phenolic lignin model compounds, *Electrochimica Acta* 2013, 106, 440- 446.
28. Sidy Ba, Haroune L, Cruz-Morató C., Jacquet C., Touahar Imad E, Bellenger J-P., C.Y. Legault C.Y., Jones J. P., Cabana H., Synthesis and characterization of combined cross-linked laccase and tyrosinase aggregates transforming acetaminophen as a model phenolic compound in wastewaters, *Science of the Total Environment* 2013, xxx, xxx-xxx (In Press).
29. Singh RP., A catechol biosensor based on a gold nanoparticles encapsulated-dendrimer. *Analyst*. 2011, 136(6), 1216-21.
30. Thevenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., Wilson, G. S., Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, In: *Biosensors and Bioelectronics*, 16, 2001, p: 121-131.
31. Vernekar M. and Lele S., Laccase: properties and applications, *Bio Resources* 2009, 4(4) , 1694-1717
32. Wagner, G., Guibalt, G.G., Food biosensors analysis, Marcell Dekker, New York.
33. Wu L., Deng D., Jin J., Lu X., Chen J. Nanographene-based tyrosinase biosensor for rapid detection of bisphenol A, *Biosensors and Bioelectronics* 2012, 35, 193- 199.
34. Young-Jin Kim, James A. Nicell, Impact of reaction conditions on the laccase-catalyzed conversion of bisphenol A, *Bioresource Technology* 2006, 97, 1431-1442
35. Yue-Xiu Si, Sunyoung Ji, Wei Wanga, Nai-Yun Fang, Qing-Xin Jin, Yong-Doo Park, Guo-Ying Qian, Jinhyuk Lee, Hong-Yan Han, Shang-Jun Yin, Effects of boldine on tyrosinase: Inhibition kinetics and computational simulation, *Process Biochemistry* 2012, xxx, xxx-xxx xxx (In Press).