



Consiglio Nazionale delle Ricerche
Istituto di *B*iologia *A*gro-ambientale e *F*orestale
UNITÀ OPERATIVA STACCATA (U.O.S.) DI NAPOLI



PROGRAMMA SHORT TERM MOBILITY 2016
Relazione scientifica

**Sviluppo di un biosensore a base di laccasi per la rilevazione
di composti fenolici**

—

**Development of a laccase biosensor for detection
of phenolic compounds**

PERIODO DI RICERCA:
07/11/2016 – 26/11/2016

FRUITORE: GIUSEPPE SQUILLACI

Via Pietro Castellino, 111 - 80131 – Napoli (Italia)
R.U.O.S. tel. +39 81 6132323 - fax +39 81 /6132701 – francesco.lacara@ibaf.cnr.it
Segreteria tel. +39 81 6132320 - fax +39 81 /6132701 – segreteria.na@ibaf.cnr.it



Consiglio Nazionale delle Ricerche

Istituto di **Biologia Agro-ambientale e Forestale**

UNITÀ OPERATIVA STACCATA (U.O.S.) DI NAPOLI



Introduzione

Obiettivo del programma di ricerca della Short Term Mobility di cui sono il fruitore è stato l'inizio di una collaborazione con il gruppo coordinato dalla dott.ssa Ana Viana, presso il Centro di chimica e biochimica dell'Università di Lisbona, avente come fine lo studio della realizzabilità di un biosensore, a base di laccasi immobilizzate, per la rilevazione di composti fenolici.

Si definisce “*biosensore*” uno strumento analitico che combina un elemento biologico, deputato al riconoscimento ed al legame della molecola oggetto (analita), ed un trasduttore in grado di convertire le modificazioni delle proprietà chimiche o fisiche dell'elemento biologico in un segnale elettrico o in un altro tipo di segnale, la cui ampiezza è funzione della concentrazione dell'analita in soluzione (Dzyadevych et al. 2008).

Fino ad oggi, la misurazione di composti fenolici in soluzione è stata affidata a metodi spettrofotometrici (Folin – Ciocalteu) di per sé poco specifici, od a metodi cromatografici (HPLC a fase inversa) costosi e dispendiosi in termini di tempo. Per questi motivi, considerando l'enorme impatto ambientale che i composti fenolici possono avere quando accumulati nell'ambiente e considerata la grande quantità di questi ultimi annualmente impiegata in vari settori industriali, molti lavori di ricerca recentemente si sono prefissati l'obiettivo di individuare metodi alternativi, efficaci e poco costosi per la rilevazione e la quantificazione di queste sostanze. Uno di questi potrebbe essere rappresentato dalla realizzazione di biosensori nei quali gli elementi “*bio*” finora testati sono rappresentati da microrganismi, enzimi, anticorpi, o acidi nucleici (Karim e Fakhrudin 2012).

Tra gli enzimi utilizzabili, molta attenzione è stata riservata in questi ultimi anni alle laccasi, multi-rame ossidasi, in grado di ossidare una grande quantità di composti organici riducendo l'ossigeno molecolare ad acqua.

Scelta dell'enzima

Avendo a disposizione presso il laboratorio della dott.ssa Alessandra Morana (IBAF-CNR Napoli) due miscele a base di laccasi industriali, gentilmente forniteci dalla Novozymes (NS51003) e dalla Metgen (Metzyme SUNO 001), abbiamo pensato di utilizzarle quali possibili candidati alla realizzazione di un biosensore per la rilevazione di fenoli.

In via preliminare è stata misurata l'attività di tali miscele enzimatiche verso l'ABTS (acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico), in diverse condizioni di temperatura e di pH (T = 25, 40 e 60 °C; pH = 5, 7, 8,5) tramite saggio spettrofotometrico. L'ABTS è stato impiegato alla concentrazione finale nel saggio di 0,5 mM.

Il saggio è stato condotto in spettrofotometro per 2 minuti, al termine dei quali si sono estrapolati i valori di pendenza della retta che indicava la variazione dell'assorbanza (a 420

Via Pietro Castellino, 111 - 80131 – Napoli (Italia)

R.U.O.S. tel. +39 81 6132323 - fax +39 81 /6132701 – francesco.lacara@ibaf.cnr.it

Segreteria tel. +39 81 6132320 - fax +39 81 /6132701 – segreteria.na@ibaf.cnr.it



nm) all'aumentare del tempo di saggio. Essi, applicati alla seguente formula, sono stati convertiti in valori di Unità enzimatiche/ml:

$$U/ml = \frac{P \times FD}{\epsilon \times Ve}$$

Dove:

P = pendenza;

FD = fattore di diluizione;

ϵ = coefficiente di estinzione molare dell'ABTS nelle condizioni del saggio, in questo caso $3,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;

Ve = volume di soluzione enzimatica impiegata (ml).

Miscela enzimatica	pH	25 °C (U/ml)	40 °C (U/ml)	60 °C (U/ml)
NS51003	5.0	345.5	469.7	2512.5
NS51003	7.0	251.3	288.2	1604.2
NS51003	8.5	2.76	6.77	7.19
SUNO 001	5.0	0.199	0.409	0.770
SUNO 001	7.0	-	-	-
SUNO 001	8.5	-	-	-

È apparso chiaro, che la soluzione enzimatica più adatta (avente maggiore attività) era la NS51003, funzionante in modo ottimale in ambiente acido (pH 5) ed a temperatura di 60 °C. Tale preparato, che è stato sottoposto ad analisi elettroforetica in gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti, è risultato essere pressoché omogeneo. La banda principale, probabilmente riconducibile all'enzima, mostrava un peso molecolare compreso tra i 66.200 ed i 97.400 Da.

Per gli esperimenti riguardanti l'immobilizzazione sull'elettrodo, si è quindi scelta la miscela Novozyme.

Preparazione del biosensore

Il materiale scelto per l'elettrodo, vista la sua economicità, è la grafite. Sezioni in grafite della superficie di 2 cm² ciascuna, sono state pulite accuratamente passandole dapprima su carta vetrata fine, poi su panni imbevuti di una pasta a base di alluminio, con granulometrie via via più piccole, fino al raggiungimento della granulometria di 1 µm. Tra i vari cicli di pulizia, le sezioni di grafite sono state immerse in una miscela acqua/etanolo (1:1) e sonicate per 5 minuti.

Le sezioni di grafite così pulite sono state rivestite di polidopamina, immergendole per 1 h in una soluzione di dopamina idrocloruro 10 mM, in tampone Tris-HCl 50 mM, pH 8,5. Come noto, le condizioni alcaline della soluzione inducono la polimerizzazione della dopamina in polidopamina che va a rivestire qualsiasi superficie con la quale viene a contatto.

Terminato il periodo di polimerizzazione, le sezioni di grafite (elettrodi) sono state sciacquate con H₂O ultrapura e lasciate asciugare a temperatura ambiente.

Una volta asciutti, gli elettrodi sono stati immersi a temperatura ambiente, per 3 h in 500 µl della soluzione enzimatica, precedentemente saggiata per determinarne le unità enzimatiche (370,61 U/ml a 25°C e pH 5,0) (**Figura 1**).



Figura 1 - Da sinistra verso destra: sezioni di grafite scelte per l'esperimento, rivestimento delle sezioni di grafite con polidopamina, immobilizzazione dell'enzima sugli elettrodi rivestiti.

Misura dell'attività

Una volta terminato il periodo di incubazione nella soluzione enzimatica, i biosensori così ottenuti, sono stati estensivamente lavati con tampone citrato fosfato (20 mM acido citrico, 40 mM idrogeno fosfato di sodio, pH 5). La fase di lavaggio è durata 96 h, durante le quali, periodicamente, è stata saggiata allo spettrofotometro l'attività presente sui biosensori.

Il saggio spettrofotometrico è stato condotto, come durante la scelta della soluzione enzimatica, utilizzando come substrato l'ABTS alla concentrazione finale nel saggio di 0,5 mM. Questa volta sono state utilizzate cuvette da 2 ml e sono stati raddoppiati i volumi delle soluzioni impiegate. Le condizioni di pH e temperatura scelte sono state: pH 5

(tampone citrato fosfato: 20 mM acido citrico, 40 mM idrogeno fosfato di sodio) e temperatura ambiente (25°C) a causa dell'impossibilità di controllare la temperatura. Come mostrato in **Figura 2**, due biosensori, dalla superficie totale di 4,06 cm², sono stati uniti assieme ed immersi nella cuvetta, contenente la soluzione per il saggio enzimatico, per 1 minuto.



Figura 2 - Biosensori durante l'immersione in cuvetta contenente la soluzione per il saggio enzimatico spettrofotometrico.

Al termine del minuto in incubazione è stata letta l'assorbanza allo spettrofotometro, alla lunghezza d'onda di 420 nm.

Il valore di assorbanza ottenuto è stato applicato alla seguente formula per calcolare le Unità enzimatiche presenti per cm² di biosensore:

$$U/cm^2 = \frac{DO \times FD}{\varepsilon \times t \times s}$$

Dove:

DO = densità ottica;

FD = fattore di diluizione;

ε = coefficiente di estinzione molare dell'ABTS nelle condizioni del saggio, in questo caso 3,6·10⁴ M⁻¹ · cm⁻¹;

t = tempo in incubazione (min.)

s = superficie dei biosensori impiegati (cm²).

Durante queste misure è apparso chiaro che l'elettrodo rilascia attività enzimatica in soluzione, segno del fatto che buona parte dell'attività presente sul biosensore è attività solamente "adsorbita" ma non covalentemente legata.

Dopo 96 h di lavaggio l'attività residua stabile, era 1,693 mU/cm². Nonostante il basso livello di attività, l'assorbanza è stata chiaramente registrata (OD = 0,110), segno che le "poche" molecole di enzima rimaste legate o intrappolate lavorano con un'altissima efficienza, in queste condizioni.

Cronoamperometria

Uno dei due biosensori disponibili è stato utilizzato, inoltre, per un esperimento elettrochimico in cronoamperometria. Obiettivo dell'esperimento era confermare la presenza di attività enzimatica tramite la misurazione della diminuzione di corrente sul biosensore, causata dalla riduzione delle molecole di ABTS, precedentemente ossidate dalla laccasi. Si è allestita quindi una camera elettrochimica contenente 25 ml di tampone citrato fosfato (20 mM acido citrico, 40 mM idrogeno fosfato di sodio) pH 5 a temperatura ambiente, nei quali erano immersi un elettrodo di riferimento al calomelano, un controelettrodo in platino e l'elettrodo di lavoro, rappresentato dal biosensore (**Figura 3**). Si è applicato un potenziale elettrico di 0,41 mV, potenziale di riduzione dell'ABTS precedentemente individuato in voltammetria ciclica. Tale potenziale è necessario per indurre la riduzione delle molecole di ABTS ossidate dalla laccasi. Al raggiungimento di un valore stabile del flusso di corrente (mA) si è quindi proceduto all'iniezione in camera di quantità crescenti di ABTS, in modo tale da avere concentrazioni finali di ABTS pari a 1, 3, 7, 15, 25, 50, 100 µM. Si è monitorata la variazione del flusso di corrente (mA) in seguito a queste aggiunte (**Figura 4**).



Figura 3 – Cella elettrochimica per cronoamperometria sul biosensore.

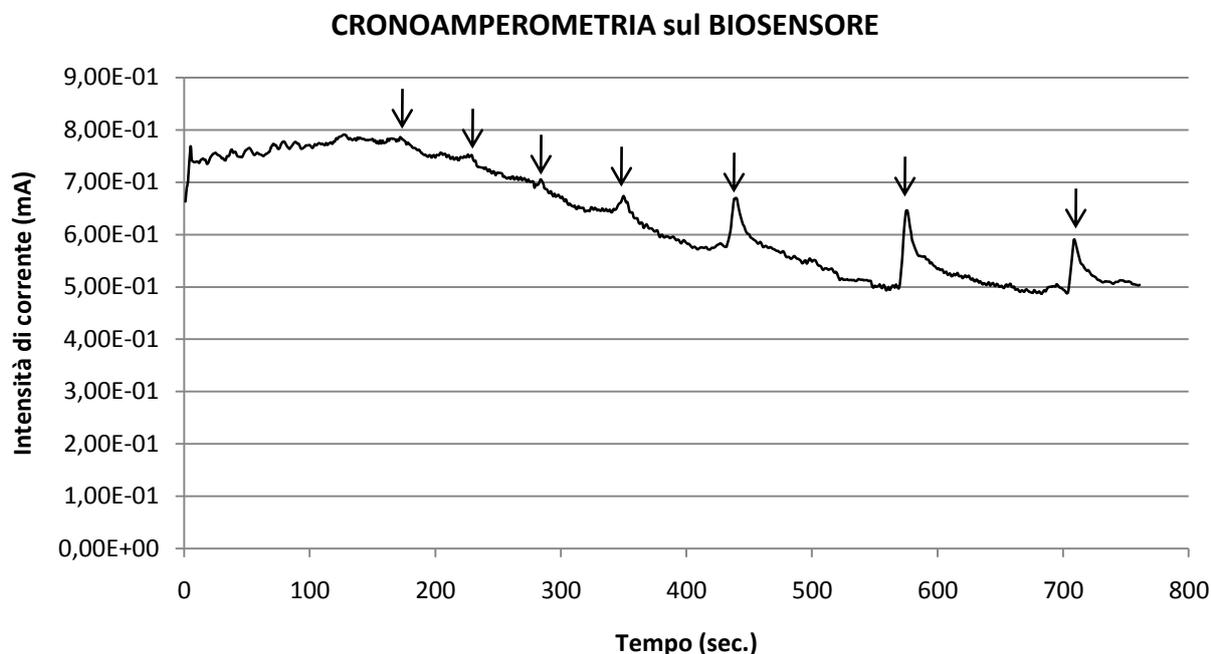


Figura 4 - Cronoamperometria sul biosensore. Le frecce indicano le aggiunte di ABTS tali da avere concentrazione in camera elettrochimica pari a (da sinistra verso destra): 1, 3, 7, 15, 25, 50, 100 μM .

Come si evince dal cronoamperogramma, le aggiunte di ABTS in camera causano una diminuzione dell'intensità di corrente nel sistema (i picchi sono artefatti dovuti alle perturbazioni causate dall'aggiunta della soluzione contenente l'ABTS), evidente fino alla concentrazione di 25 μM . Ciò conferma la presenza di attività enzimatica sul biosensore. Le ulteriori aggiunte (50 e 100 μM) non hanno mostrato alcun ulteriore decremento dell'intensità di corrente, segno che l'enzima era saturo.

Conclusioni:

La serie di esperimenti da me condotti durante il periodo di Short Term Mobility in collaborazione con il gruppo coordinato dalla dott.ssa Ana Viana, presso il Centro di chimica e biochimica dell'Università di Lisbona ha permesso di appurare **la fattibilità** della realizzazione di un biosensore a base di laccasi commerciali per il rilevamento di composti fenolici. Il prototipo realizzato si è dimostrato funzionante nelle condizioni testate, e l'attività enzimatica è risultata chiaramente osservabile, sia se seguita con saggio spettrofotometrico, sia se seguita con metodiche elettrochimiche.



Tuttavia, considerata la bassa resa di enzima legato allo strato di polidopamina, miglioramenti in tal senso sono auspicabili, al fine di ottenere un biosensore avente un *range* di sensibilità più ampio nei confronti dei composti fenolici. Inoltre, non meno importante, sarà l'accertamento della specificità dell'attività enzimatica per queste molecole, fattore che ad oggi affligge le comuni tecniche impiegate nella misurazione dei fenoli.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N (2008) Amperometric enzyme biosensors: past, present and future. *IRBM* 29:171–180

Karim F, Fakhruddin ANM (2012) Recent advances in the development of biosensor for phenol: a review *Rev Environ Sci Biotechnol* 11:261–274

Napoli, li 07/12/2016

(FIRMA)