



INMOVILIZACIÓN DE EXTRACTO ENZIMÁTICO DE TIROSINASA DE *AGARICUS BISPORUS* EN MEMBRANA DE NYLON

Vânia P. S. dos Santos, Carlos H. Mendonça, Rafael V.G dos Santos, Francisca S. C. S. Mihos, Alexandre G. Torres, Karen S. Pereira, Andréa M. Salgado
Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro – RJ – Brasil CEP: 21941-909 Email: paulassalviano@ufrj.br

Palabras clave: tirosinasa, membrana, covalente

Introducción. La tirosinasa es una enzima ampliamente utilizada en aplicaciones biotecnológicas, tales como en bio-remediación y bio-sensores. La inmovilización de enzimas es ventajosa para aplicaciones comerciales debido a su posibilidad de separación del medio de reacción y se reuso [1]. Entre los soportes descritos por la literatura las membranas de nylon se muestran atractivas por ser de bajo costo, no tóxicas y por sus propiedades químicas y mecánicas versátiles [2].

Este trabajo tiene como objetivo inmovilizar la enzima tirosinasa obtenida del extracto parcialmente purificado del macro hongo *Agaricus bisporus*, utilizando membranas de nylon 66 como soporte por medio de 3 abordajes de inmovilización.

Metodología. La extracción del extracto enzimático de la tirosinasa, purificación parcial y medición de actividad espectrofotométrica de la enzima libre e inmovilizada fueron realizadas según los procedimientos modificados descritos en [3]. Las membranas de nylon 66 fueron hidratadas durante 24h en agua des-ionizada. La carga enzimática inmovilizada fue de 5328 U/mL. El extracto fue inmovilizado según las metodologías [4] **I) Covalente 1:** hidrólisis de la membrana nylon 66 en HCl 3M por 2h, activación con glutaraldehído 2.5% por 2h, adición de 1mL de extracto enzimático durante 24h a 4°C; **Covalente 2:** hidrólisis de la membrana nylon 66 en HCl 3M por 2h, solución de metanol 50%/20min a 37°C, solución de glutaraldehído 2.5% por 1h, adición de 1mL de extracto enzimático durante 24h a 4°C; **II) Adsorción física/ ligación covalente cruzada:** hidrólisis de la membrana nylon 66 en HCl 3M por 2h, 1 mL del extracto enzimático en contacto con la membrana 2h a 4°C, reticulación con glutaraldehído 0.5% 30 min. En cada paso de los procedimientos las membranas fueron lavadas 3x con H₂O des-ionizada. La actividad de la enzima tirosinasa libre e inmovilizada fue medida según el procedimiento [5]. La eficiencia de las inmovilizaciones fue medida por medio de la ecuación $n(\%) = (U_s/U_v) \cdot 100$ donde, U_s = unidades de actividad enzimática total presente en el soporte e U_0 = unidades de actividad utilizadas na inmovilización.

Resultados. La tabla 1 presenta los resultados de las inmovilizaciones en relación a la actividad retenida por los soportes. Los inmovilizados covalentes presentaron porcentuales de actividad enzimática retenida con valores próximos y cerca de 50% menores que el inmovilizado por adsorción física/ligación covalente cruzada.

Tabla 1 – Porcentuales referentes a eficiencia de inmovilización de extracto enzimático de la tirosinasa en membrana de nylon 66:

| Método de inmovilización | Us | n(%) |
|------------------------------------|------------|-------|
| Covalente 1 | 1128 ±33,9 | 21,17 |
| Covalente 2 | 716 ±28,2 | 13,23 |
| Adsorción física/covalente cruzada | 2240 ±56,5 | 42,04 |

Conclusión: Comparando las eficiencias de la inmovilización por ligación covalente 1 y 2 de la enzima tirosinasa extracto de *Agaricus bisporus*, se verifica que en la segunda la actividad recuperada fue menor probablemente debido a menor tiempo de activación con glutaraldehído lo que resultó en un número menor de grupos aldehídos disponibles en el soporte. Ya lo inmovilizado por adsorción/ligación covalente cruzada, presentó casi el doble de la actividad retenida en relación a la inmovilización covalente 1. Sin embargo a ligación covalente promueva una ligación fuerte entre la enzima y el soporte, las ligaciones enzima-enzima resultantes de la reticulación con glutaraldehído hace que la desorción de la enzima sea menor y que la carga enzimática inmovilizada sea mayor.

Agradecimiento. Los autores agradecen al CNPq por el financiamiento de este trabajo y por las becas concedidas.

Bibliografía:

- [1] R. O. de Faria, V. R. Moure, M. A. L. Amazonas, N. Krieger, and D. A. Mitchell, *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 45, no. 3, pp. 287–294, 2007.
[2] F. H. Isgrove, R. J. H. Williams, G. W. Niven, and a. T. Andrews, *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 28, pp. 225–232, 2001.



XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería

21 al 26 de Junio de 2015 Guadalajara, Jalisco, México.

Guadalajara

[3] V. P. Santos, P. . R. Pereira, A. G. Torres, K. S. Pereira, and A. M. Salgado, XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química Florianópolis, 25499, 2014.

[4]N. Durán, M. a. Rosa, A. D'Annibale, and L. Gianfreda, *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 31, pp. 907–931, 2002.

[5] Campos, C.F.,Souza, P.E.A.,Coelho, J.V., Glória, M.B.A *J. Food Process. Preserv.*, vol. 20, no. 6, pp. 487–500, Dec. 1996.