

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA TIROSINASE DE *AGARICUS BISPORUS*

V.P.S dos SANTOS¹, C. MENDONÇA², P.R. PEREIRA³, M.L.E. GUTARRA⁴, A.G. TORRES⁵,
K.S. PEREIRA⁶, A.M. SALGADO⁷

^{1,2} Universidade Federal do Rio de Janeiro - EQ, Laboratório de Sensores Biológicos E-122

³ Universidade Federal do Rio de Janeiro-IQ, Laboratório de Análises Avançadas em Bioquímica e Biologia Molecular

⁵ Universidade Federal do Rio de Janeiro – IQ, Laboratório de Ciências de Alimentos

^{4,6,7} Universidade Federal do Rio de Janeiro - EQ, Departamento de Engenharia Bioquímica
E-mail para contato: paulassalviano@ufrj.br

RESUMO – Visando a obtenção da tirosinase a partir do macrofungo *Agaricus bisporus*, foram testados os métodos de extração de rompimento celular: químico e físico combinados (permeabilização celular empregando o solventes acetona e álcool etílico e congelamento e descongelamento utilizando refrigerador doméstico) e físico (congelamento/descongelamento com emprego de nitrogênio líquido). Os extratos foram caracterizados quanto à atividade enzimática, teor de proteínas e, então, submetidos a precipitação sequencial com sulfato de amônio nos intervalos de saturação de 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e de 80-100%. Os precipitados dialisados foram caracterizados por eletroforese em gel de poliacrilamida. Foram determinadas as condições ótimas de temperatura, pH e concentração de substrato da enzima e a estabilidade de armazenamento. A permeabilização celular com acetona se mostrou o método mais eficiente de extração. A melhor faixa de precipitação com maior recuperação da atividade enzimática foi de 40-60%. A enzima apresentou melhor desempenho nas faixas de temperatura de 25-35°C e pH 6-8. A tirosinase dos extratos bruto e precipitados apresentou massa molecular de aproximadamente 125 kDa.

1. INTRODUÇÃO

A enzima tirosinase [EC 1.14.18.1], também conhecida como polifenol oxidase, é uma enzima que, utilizando oxigênio molecular, catalisa diferentes reações: a orto-hidroxilação de monofenóis e a subsequente oxidação do orto-difenol resultando em orto-quinonas. (Haghteen e Wuetan, 2003).

As reações de oxidação sequenciais catalizadas pela tirosinase são utilizadas como base para diversas aplicações biotecnológicas, tais como: biocomponente em biossensores,

biorremediação, entre outras. *Agaricus Bisporus* é um fungo de grande potencial por ser uma fonte barata da enzima tirosinase (Kameda *et al*, 2006; Silva *et al.*, 2013).

Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi comparar diferentes métodos de extração da enzima tirosinase a partir do macrofungo *Agaricus bisporus* e sua caracterização após a purificação parcial com sulfato de amônio.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Extração da Enzima Tirosinase

Extração por permeabilização celular com solventes + congelamento/descongelamento em refrigerador doméstico: O procedimento descrito a seguir, utilizado para a extração com álcool etílico e acetona, foi adaptado do procedimento de Kameda *et al*, (2006). Em um liquidificador industrial, foram triturados 500 g de corpos de frutificação de *Agaricus bisporus* com 1 L de solvente gelado. A mistura foi então, filtrada à vácuo. O resíduo de cogumelo retido no filtro foi levado ao congelador por 24 horas. Este foi então ressuspensão com 80 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 6 e levado ao congelador por mais 24 horas. O resíduo foi centrifugado a 4000 rpm por um tempo de 10 minutos, duas vezes consecutivas. O sobrenadante obtido consistiu no extrato enzimático. Os extratos foram armazenados em frascos escuros em congelador de refrigerador doméstico, à temperatura abaixo de - 6 °C.

Extração utilizando por congelamento/descongelamento com nitrogênio líquido: Em uma caixa de isopor de 10 L foram colocados 500 g de cogumelos e nitrogênio líquido em quantidade suficiente para cobrir os cogumelos. Os cogumelos foram descongelados a temperatura ambiente. A massa de cogumelos foi homogeneizada empregando um liquidificador industrial e o homogeneizado obtido, submetido a centrifugação refrigerada a 4 °C a 4000 rpm durante 10 minutos. O extrato foi armazenado em frasco escuro em congelador doméstico a temperatura abaixo de -6°C.

2.2 Purificação parcial dos extratos com sulfato de amônio com intervalos de de 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e de 80-100% de saturação

Uma amostra de 50 mL de extrato enzimático proveniente das extrações com solvente acetona, foi submetida a precipitação sequencial com sulfato de amônio nos intervalos de 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e de 80-100%, segundo Scopes, (1994). Durante a precipitação as amostras permaneceram em banho de gelo, a 0 °C, pelo período de 60-90 minutos. Depois, foram centrifugadas a 10000 rpm, sob refrigeração de 4 °C, durante 20 minutos. Os precipitados de cada intervalo foram ressuspensos em 5 mL e armazenados em congelador de refrigerador a temperatura de -6°C.

2.3 Caracterização dos extratos enzimáticos

Determinação da atividade enzimática total e específica: A medida da atividade enzimática da tirosinase foi realizada segundo o procedimento descrito em Santos *et al*, (2013).

Determinação da concentração de proteínas totais: A concentração de proteínas totais dos extratos foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE): A eletroforese dos extratos enzimáticos em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, utilizando o dodecil sulfato de sódio como desnaturante (SDS-PAGE 12,5%), foi realizada segundo a metodologia descrita por (Laemmli, 1970).

2.4 Determinação das melhores condições de desempenho da enzima tirosinase

Efeito do pH na atividade enzimática: A atividade enzimática foi medida em pH 5, 6, 7, 8 e 9 em tampão fosfato de sódio 0,1M à temperatura de 25 °C.

Efeito da temperatura na atividade enzimática: A atividade enzimática foi medida nas seguintes temperaturas: 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C e 45 °C, em tampão fosfato de sódio 0,1 M em pH 6.

Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática e cálculos dos parâmetros cinéticos k_m e v_{max} : A atividade enzimática foi medida em tampão fosfato de sódio 0,1 M em pH 6 a temperatura de 25 °C, em diferentes concentrações do substrato L-tirosina, em mesmo tampão, nas concentrações: 0.2 mM, 0.4 mM, 0.6 mM, 0.8 mM, 1 mM, 1.2 mM, 1.4 mM e 1.6 mM. Os parâmetros cinéticos da reação enzimática: velocidade máxima, v_{max} e a constante de Michaelis-Menten k_m , foram determinados utilizando o método de linearização de Lineweaver e Burk, (1934).

Estabilidade de estocagem dos extratos enzimáticos: A estabilidade de estocagem dos extratos enzimáticos foi avaliada mensalmente medindo a atividade destes, por um período de 4 meses.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Medidas das Atividades Enzimáticas e Teor de Proteínas dos Extratos

Na tabela 1, estão contidos as atividades enzimáticas totais (U/mL) e específicas (U/mg) e os teores de proteínas dos extratos (mg), resultantes das extrações utilizando os métodos de rompimento celular, químico com solventes acetona (PA) e etanol (PE) + congelamento/descongelamento em refrigerador doméstico (C/D/R) e físico, com congelamento/descongelamento utilizando nitrogênio líquido (C/D/N).

Tabela 1 - Atividades enzimáticas e teor de proteínas dos extratos.

Método de extração	LOTE DE COGUMELOS 1		
	Atividade total (U/mL)	Teor de proteínas (mg)	Atividade específica (U/mg)
PA + C/D/R	2124,70 ± 6,27	2,04 ± 0,01	1041,52
PE + C/D/R	n.d.	n.d.	n.d.
C/D/N	446,85 ± 8,91	4,63 ± 0,02	96,51
Método de extração	LOTE DE COGUMELOS 2		
	Atividade total (U/mL)	Teor de proteínas (mg)	Atividade específica (U/mg)
PA + C/D/R	1489,08 ± 9,89	2,41 ± 0,01	617,51
PE + C/D/R	n.d.	n.d.	n.d.
C/D/N	426,31	4,78 ± 0,03	153,23
Método de extração	LOTE DE COGUMELOS 3		
	Atividade total (U/mL)	Teor de proteínas (mg)	Atividade específica (U/mg)
PA + C/DR	2063,31 ± 6,4	1,09 ± 0,02	1910,47
PE + C/DR	n.d.	n.d.	n.d.
C/D/N	587,04 ± 6,53	2,54 ± 0,03	231,11

n.d.: não detectado

A permeabilização com etanol resultou em extratos que não exibiram atividade enzimática detectável (n.d.). A extração com PA + C/D/R, produziu os extratos com maiores atividades enzimáticas quando comparados à extração com C/D/N, nos 3 lotes de cogumelos utilizados nas extrações. A extração com acetona se mostrou mais vantajosa, devido a produção de extratos com menores teores de proteínas e, portanto, concentrações menores de fragmentos celulares em função de um rompimento celular parcial e mais seletivo.

3.2 Purificação Parcial com Sulfato de Amônio

Os resultados da precipitação sequencial com sulfato de amônio das amostras de extratos da permeabilização com acetona, estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2: Precipitação sequencial com sulfato de amônio

	Extrato enzimático				
	U _T (U/mL)	P _T (mg)	U _E (U/mg)	FR (%)	FP
EB	1489,08 ± 9,89	2,41 ± 0,01	617,51	100	1
0-20 %	n.d.	5,06 ± 0,01	n.r.	n.r.	n.r.
20-40 %	n.d.	4,81 ± 0,1	n.r.	n.r.	n.r.
40-60 %	12798,07 ± 5,63	2,24 ± 0,01	5720,35	85,9	0,92
60-80 %	1258,58 ± 4,95	2,06 ± 0,01	613,74	8,4	0,1
80-100 %	n.d.	0,66 ± 0,03	n.r.	n.r.	n.r.
S	n.d.	0,61 ± 0,02	n.r.	n.r.	n.r.

(EB) extrato bruto, (S) sobrenadante, (n.d.) não detectado, (n.r) não realizado, (U_T) atividade total, (P_T) teor de proteínas, (U_E) atividade específica, (FR) fator de recuperação, (FP) fator de purificação.

Os melhores resultados para a concentração da enzima tirosinase do extrato enzimático, a partir do macrofungo *Agaricus bisporus*, foram obtidos nos intervalos de saturação de 40-60%. A recuperação da atividade total foi de 85,9% da atividade total do extrato bruto. O método de precipitação foi eficiente para aumentar a concentração enzimática dos extratos testados e ao mesmo tempo prover uma recuperação de maior parte da atividade enzimática dos extratos.

3.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE

Pela análise do gel de poliacrilamida, nos poços 3 (extrato bruto), 6 (precipitado 40%-60%) e 7 (precipitado 60%-80%), foram observadas bandas de 12,58 kDa (referentes às 2 subunidades L) e 50,11 kDa (referentes às duas subunidades H), que comparadas ao padrão da enzima comercial no poço 2 onde foram observadas bandas de 12,88 kDa (referentes às 2 subunidades L) e 51,28 kDa (referentes às duas subunidades H), podem estar relacionadas à estrutura quaternária da enzima tirosinase (Figura 1).

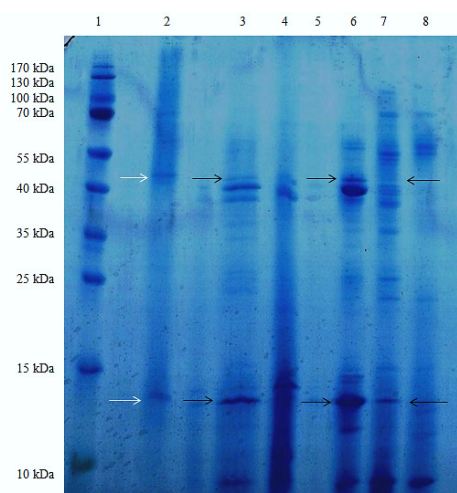


Figura 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). (1) Padrões de massa moleculares (kDa), (2) Tirosinase de *Agaricus bisporus* comercial Sigma, (3) Extrato bruto do *Agaricus bisporus*, (4) precipitado da fração 0-20%, (5) precipitado da fração 20-40%, (6) precipitado da fração 40-60%, (7) precipitado da fração 60-80%, (8) precipitado da fração 80-100%.

As massas molares encontradas para o padrão da enzima comercial SIGMA e para os extratos bruto e parcialmente purificados foram respectivamente, 128,32 e 125,38. Estes resultados estão condizentes com os dados encontrados na literatura (Wichers; Gerritsen; Chapelon, 1996).

3.4 Resultados das Melhores Condições de Desempenho da Enzima Tirosinase

Influência do pH na atividade de enzima: A enzima tirosinase exibiu maiores atividades enzimáticas na faixa de pH de 6 a 8 (Figura 2).

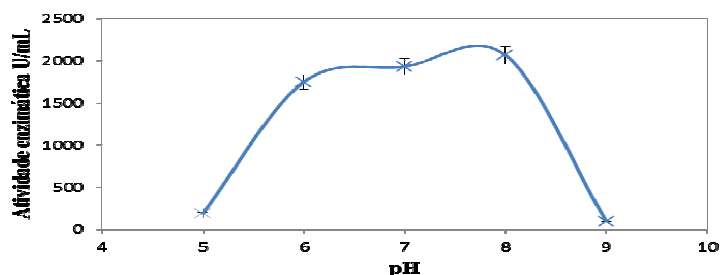


Figura 21 - Influência do pH na atividade enzimática da tirosinase.

Influência da temperatura na atividade de enzima: A atividade da enzima tirosinase aumentou de 25 °C até 35°C quando atingiu o valor máximo, seguido do decréscimo até 45°C o que pode ser observado na Figura 3.

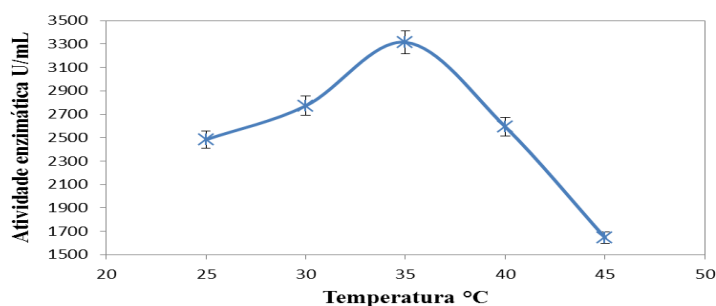


Figura 3 - Influência da temperatura na atividade enzimática do extrato.

A influência da concentração do substrato e parâmetros cinéticos (k_m e v_m): A atividade enzimática da tirosinase, que aumenta com o aumento da concentração do substrato pode ser vista na Figura 4.

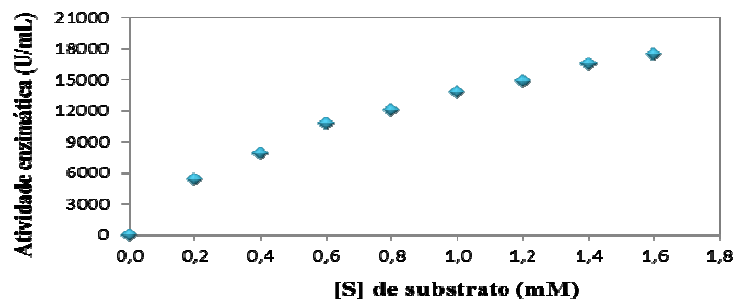


Figura 4 - Influência da concentração do substrato L-tirosina na atividade enzimática

Foram encontrados os valores de k_m equivalente a 0,68 mM e de v_{max} 0,29 mM/min/mL de enzima. No trabalho de Espín *et al.*, (2000), onde a enzima comercial purificada da SIGMA-ALDRICH ($k_m = 0,5$), passou por processo de purificação adicional, o valor de k_m para o mesmo substrato foi de 0,2 mM e a v_m 1,8 μ Mol/min. A partir desses dados, pode-se concluir que quanto maior for o fator de purificação de uma enzima, menor será o seu valor de k_m e consequentemente, maior será a afinidade entre a enzima e o substrato.

Estabilidade de armazenamento dos extratos enzimáticos: A Figura 5, exibe os resultados da estabilidade dos extratos enzimáticos brutos e parcialmente purificados da extração com acetona, pelo período de 4 meses (Figura 5).

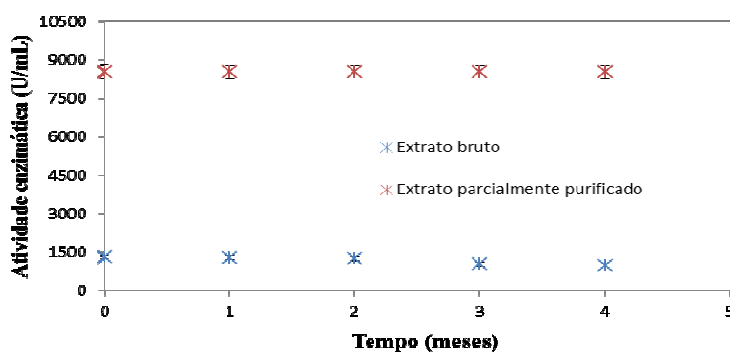


Figura 52 - Estabilidade do extrato bruto e parcialmente purificado.

O extrato bruto perdeu cerca de 25% da sua atividade inicial, ao final de 4 meses de armazenamento. O extrato parcialmente purificado manteve sua atividade praticamente inalterada durante o mesmo período, fato que se deve à estabilização proporcionada pela precipitação com sulfato de amônio, que previne a proteólise de proteínas e a ação bacteriana, segundo Scopes, (1994).

4 CONCLUSÕES

Dentre os métodos de extração da enzima tirosinase a partir do macrofungo *Agaricus bisporus*, testados, a permeabilização com acetona foi o mais eficiente, resultando em extratos com as maiores atividades enzimáticas, com menor volume de extrato, o que confere melhor relação custo benefício para a precipitação com sulfato de amônio. O método de precipitação utilizando sulfato de amônio apresentou resultados satisfatórios em relação à recuperação enzimática da atividade total da tirosinase, podendo ser utilizado para a concentração dos extratos enzimáticos, além de conferir estabilidade a enzima tirosinase dos extratos.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo financiamento deste trabalho e pelas bolsas concedidas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, p. 248–54, 7 maio 1976.
- ESPÍN, J. C. et al. Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *European Journal of Biochemistry*, v. 267, n. 5, p. 1270–1279, 21 mar. 2000.
- HAGHBEEN, K.; WUE TAN, E. Direct spectrophotometric assay of monooxygenase and oxidase activities of mushroom tyrosinase in the presence of synthetic and natural substrates. *Analytical biochemistry*, v. 312, n. 1, p. 23–32, 1 jan. 2003.
- KAMEDA, E.; LANGONE, M. A. P.; COELHO, M. A. Z. Tyrosinase extract from *Agaricus bisporus* mushroom and its in natura tissue for specific phenol removal. *Environmental technology*, v. 27, n. 11, p. 1209–15, nov. 2006.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.
- LINEWEAVER, H.; BURK, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society*, v. 56, n. 3, p. 658–666, mar. 1934.
- SANTOS, V. DOS; SILVA, L. Application of *Agaricus bisporus* Extract for Benzoate Sodium Detection Based on Tyrosinase Inhibition for Biosensor Development. *Chemical Engineering Transactions*, v. 32, p. 1831–1836, 2013.
- SCOPES, R. K. *Protein Purification: Principles and Practice*. [s.l.] Springer, 1994. p. 380
- SIGMA-ALDRICH. *Technical bulletin*, 2013.
- SILVA, L. et al. Biosensors for Contaminants Monitoring in Food and Environment for Human and Environmental Health. p. 1–18, 2013.
- WICHERS, H. J.; GERRITSEN, Y. A. M.; CHAPELON, C. G. J. Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry*, v. 43, n. 2, p. 333–337, 1996.