

## INFLUÊNCIA DO PH NA EXTRAÇÃO DE GLICOSE OXIDASE POR SISTEMAS MICELARES REVERSOS E DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

**Luis Fernando Peffi Ferreira,<sup>1,2</sup> Adriana Celia Lucarini,<sup>2,3</sup> Michele Vitolo,<sup>3</sup> Adalberto Pessoa Jr.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Programa de pós graduação inter unidades USP/IPT/Butantan, e-mail: luis\_kent@hotmail.com.

<sup>2</sup> Dept. de Engenharia Química/FEI, Fax: (55)1141095994.

<sup>3</sup> Dept. de Tecnologia Bioquímica Farmacêutica/FCF/USP, Av. Lineu Prestes, 580 – cep: 05508-900 – São Paulo – SP – Brasil, Fone: (55)1138183862, Fax: (55)1138156386, e-mail: pessoajr@usp.br.

**Palavras-chave:** Parâmetros cinéticos; extração líquido-líquido; glicose oxidase; micelas reversas; Michaelis-Menten.

**Área do Conhecimento:** Engenharia

**RESUMO:** Este estudo avaliou, sob diferentes graus de purificação, os parâmetros cinéticos de Michaelis – Menten para a enzima glicose oxidase (EC 1.1.3.4.), uma oxidoreductase que tem muitas aplicações bioquímicas, principalmente em determinação de glicose, biossensores, indústria alimentícia e reatores enzimáticos para produção de ácido glicônico. Glicose oxidase, de *Aspergillus niger*, foi produzida por fermentação e extraída por sistemas micelares reversos do homogenato celular. Os parâmetros cinéticos ( $K_M$  e  $V_{máx}$ ) foram determinados antes e após a purificação da enzima. Os valores de  $K_M$  antes e após a extração foram,  $4,22 \cdot 10^2$  M e  $7,88 \cdot 10^2$ , respectivamente. Os valores de  $V_{máx}$  foram:  $5,23 \text{ U.mL}^{-1}$  e  $2,98 \text{ U.mL}^{-1}$ , respectivamente. Os efeitos do pH na extração da glicose oxidase foram também investigados usando o homogenato celular. As melhores recuperações de extração (92,70%) foram obtidas sob as seguintes condições: pH 7,0; 0,20 M CTAB; condutividade elétrica =  $5,0 \text{ mS.cm}^{-1}$ , relação entre isooctano/hexanol/butanol de 76/6/18. O objetivo deste trabalho foi reportar dados de extração e os parâmetros cinéticos da enzima glicose oxidase presente em homogenato celular e após purificação.

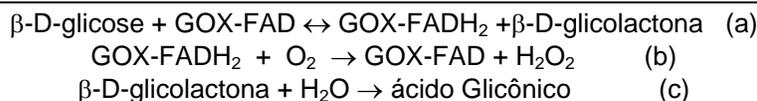
### INTRODUÇÃO

Em 1995 o mercado de enzimas movimentou em torno de U\$30 milhões, valores esses decorrentes de um mercado em expansão (1). Em 1997, depois de apenas dois anos, o mercado era estimado em U\$ 1,45 bilhões (2) o que confirma a expansão do mercado. A glicose oxidase (E.C.1.1.3.4; CAS nº: 9001-37-0), enzima pertencente a classe das oxirredutases, catalisa reações de óxido redução e seu nome sistemático é -D-

glicose: oxigênio 1-oxidoreductase. Pode ser obtida do cultivo de fungos como os *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp, além de *Phanerochaete chrysosporium*, *Bombyx mori*, *Talaromyces stipitatus* e é também encontrada no mel das flores do outono nordestino (2). Esta enzima catalisa a reação de oxidação da  $\beta$ -D-glicose a ácido glicônico e peróxido de hidrogênio (Figura 1) (3). Catalisa, também, reações com -D-glicose, L-sorbose, D-xilose e D-maltose e 2-deoxy-D-glicose, porém com menor afinidade (4, 5, 6,

7). This oxidoreductase has many biochemical applications, mainly in glucose determination, biosensors, food industry and enzymatic reactors to produce gluconic acid. O mercado de enzimas para kits de diagnóstico

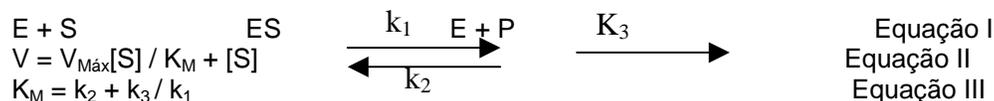
movimenta cerca de US\$ 61 milhões por ano e a glicose oxidase tem lugar de destaque entre as enzimas mais utilizadas, pois movimenta US\$ 5 milhões por ano (1).



**Figura 1 (a) reação catalisada pela glicose oxidase (GOX), (b) regeneração do grupo FAD e (c) hidratação da  $\beta$ -D-glicolactona em ácido glicônico.**

Os parâmetros cinéticos  $K_M$  (constante de Michaelis – Menten) e  $V_{Max}$  (velocidade máxima de reação) de enzimas mesmo não estando totalmente purificada, expressam características importantes e úteis, que são fundamentais não somente para a descrição matemática da cinética enzimática, mas também para a sua purificação e entendimento de mecanismos reguladores de sua atividade catalítica. O  $K_M$  pode ser interpretado como sendo a afinidade da enzima pelo substrato em determinadas

condições, segundo a simplificação feita por Michaelis–Menten (Equation I, II and III) onde  $k_3 \ll k_2$  e a constante torna-se  $K_M = k_2/k_1$  (8, 9, 10). Para reações com mais passos, muitas vezes muitos após a dissociação do complexo ES (Equation I), esta pode se tornar uma função complexa de muitas constantes e não significar afinidade da enzima com o substrato (8, 9). Para enzimas puras os valores de  $K_M$  e  $V_{Max}$  podem ser diferentes daqueles encontrados para a enzima parcialmente purificada.



O presente estudo apresenta a avaliação destes parâmetros para a enzima glicose oxidase presente no meio fermentado (antes da purificação) e após ser purificada por extração líquido-líquido em sistemas micelares reversos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Reagentes

Glicose oxidase e *o*-dianisidina foram obtidas de Sigma (St. Louis, MO). O tensoativo catiônico CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio) foi adquirido de Carlos Erba Reagenti (Milan, Italy), e os solventes isoctano, butanol e hexanol da Merck (Darmstadt, Germany)

### 2.2. Ensaio de atividade enzimática

A atividade enzimática da glicose-oxidase foi determinada pelo acréscimo de absorvância a 460 nm resultante da oxidação de *o*-dianisidina em um sistema acoplado a peroxidase. A unit of glucose-oxidase activity was defined as the amount of enzyme that increases in one the absorbance (Abs) at 460

nm per minute at pH 6.0, temperature of 25°C and glucose as the substrate. (11).

### 2.3. Rompimento celular

As células de *Aspergillus niger* foram rompidas em rompedor contendo esferas de vidro de diâmetro igual a 0,50 mm, a 4°C. Após rompimento os fragmentos celulares foram removidos por centrifugação at 4000 g /10 minutes.

### 2.4. Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido era realizada em diferentes valores de pH. A enzima, em meio celular rompido, era extraída da fase aquosa inicial pelas micelas reversas de CTAB em isoctano, hexanol e butanol, em duas etapas, de acordo com o método descrito por Pessoa e Vitolo (12). Na primeira

etapa (extração), 3,0mL da fase aquosa inicial (contendo a enzima glicose oxidase em diferentes valores de pH: 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0) era misturada a igual volume de fase micelar (CTAB em isooctano/hexanol/butanol). Essa mistura era agitada em vórtice por 1 minuto, a fim de se obter o equilíbrio das fases, e a separação em duas fases (fase aquosa I – WPI e fase micelar I – MPI) por centrifugação a 1,670g por 10 minutos (Hettich Zentrifugen model Universal 32R). Um mililitro e meio da fase micelar (contendo glicose oxidase) era misturada a 1,5mL de fase aquosa fresca (tampão acetato 1,0M em pH 5,5 adicionado de 1,0M NaCl), a fim de transferir a enzima de dentro da micela reversa para esta nova fase aquosa, chamada fase aquosa II (WPII - reextração), a qual era finalmente coletada após centrifugação (1,670g; 10min). Ambas fases aquosas (WPI e WPII) eram ensaiadas para determinar a sua atividade enzimática. Os resultados de extração eram reportados em termos de atividade total recuperada (%) na fase aquosa II usando a quantidade de glicose oxidase presente na fase aquosa inicial como referência.

## 2.5. Avaliação dos parâmetros cinéticos

As constantes cinéticas  $K_M$  e  $V_{Máx}$ , da enzima glicose oxidase pura, adquirida da

Sigma<sup>®</sup>, contida no meio inicial (homogenato celular) e após a extração na fase aquosa II ( $F_{All}$ ) foram calculadas através da linearização pelo método de Lineweaver-Burk do modelo de Michaelis-Menten para os ensaios antes e após a extração (9). Para tanto se variou a concentração de glicose de 0.006 a 0.111M. Mediui-se atividade enzimática para cada uma das concentrações e os valores foram colocados em um gráfico da velocidade de reação em função da concentração de substrato. Pela linearização de Lineweaver-Burk faz-se o inverso da velocidade de reação e o inverso da concentração de substrato para os pontos citados, esses pontos são colocados em um gráfico no qual deve-se obter uma reta da qual o coeficiente linear é o inverso da velocidade máxima e o coeficiente angular é  $K_M/V_{Máx}$ . Para realizar esse procedimento utilizaram-se os pontos contidos no intervalo de 0.006M até 0.056M de glicose.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Extração da glicose oxidase

A enzima foi extraída em valores de pH que vão de 4.5 a 8.0 (Tabela 1). Os estudos cinéticos foram realizados com amostras da melhor condição de extração (92,70% de rendimento), ou seja, em pH 7,0.

**Tabela 1 Resultados de extração da glicose oxidase por micelas reversas. Condições de extração: Temperatura: 25°C; relação (solvente/co-solvente): 76% isooctano (solvente): 6% hexanol: 18% butanol (co-solvente); [tensoativo]=0,20M. Condições de reextração: temperatura=25°C e pH = 5,5**

pH	Recuperação em Wp I %	Recuperação em Wp II %	Balanco de Atividade %
4.5	19,15	44,50	63,70
5.0	0,00	53,90	53,90
5.5	0,00	60,40	60,40
6.0	0,00	55,25	55,25
6.5	0,00	74,90	74,90
<b>7.0</b>	<b>1,40</b>	<b>92,70</b>	<b>94,10</b>
7.5	0,00	83,00	83,00
8.0	0,20	78,05	78,25

WpI = fase aquosa I; WpII = fase aquosa II

### 3.2 Avaliação dos parâmetros cinéticos

O modelo apresentado na Figura 2 foi proposto por DIXON (1955, apud 13) para glicose oxidase, tendo em vista que o modelo simplificado de Michaelis-Menten ( $K_M = (k_2 + k_3)/k_1$ ) não se aplica diretamente a

essa enzima, pois sua atividade é forte dependente da concentração de oxigênio dissolvido no meio. Isso faz com que a atividade enzimática seja de 1,5 a 2,0 vezes maior quando o meio é saturado com oxigênio puro do que quando saturado com ar atmosférico.

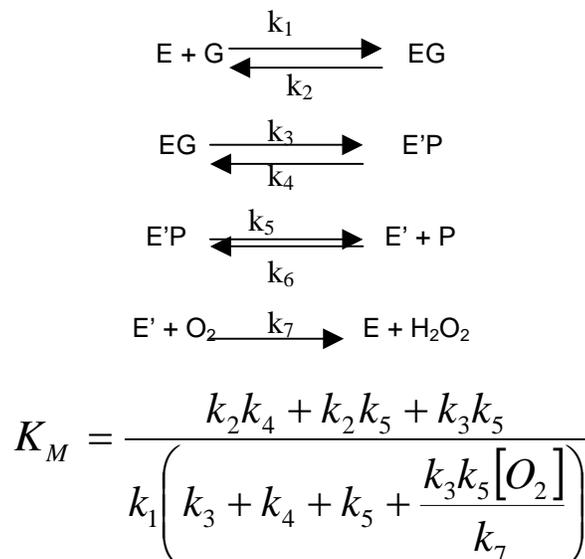


Figura 2 Modelo cinético proposto por DIXON (1955, apud 13) para a glicose oxidase

Esse fenômeno ocorre, utilizando-se ar atmosférico se consegue uma pressão parcial de oxigênio muito menor do que quando se usa mesmo puro. Assim sendo a quantidade de oxigênio dissolvido no meio é maior do que quando se usa este gás puro. Entretanto, uma vez que neste estudo a quantidade de oxigênio no meio não limitou a reação e o modelo pode ser aproximado pelo de Michaelis-Menten. Isso pode ser

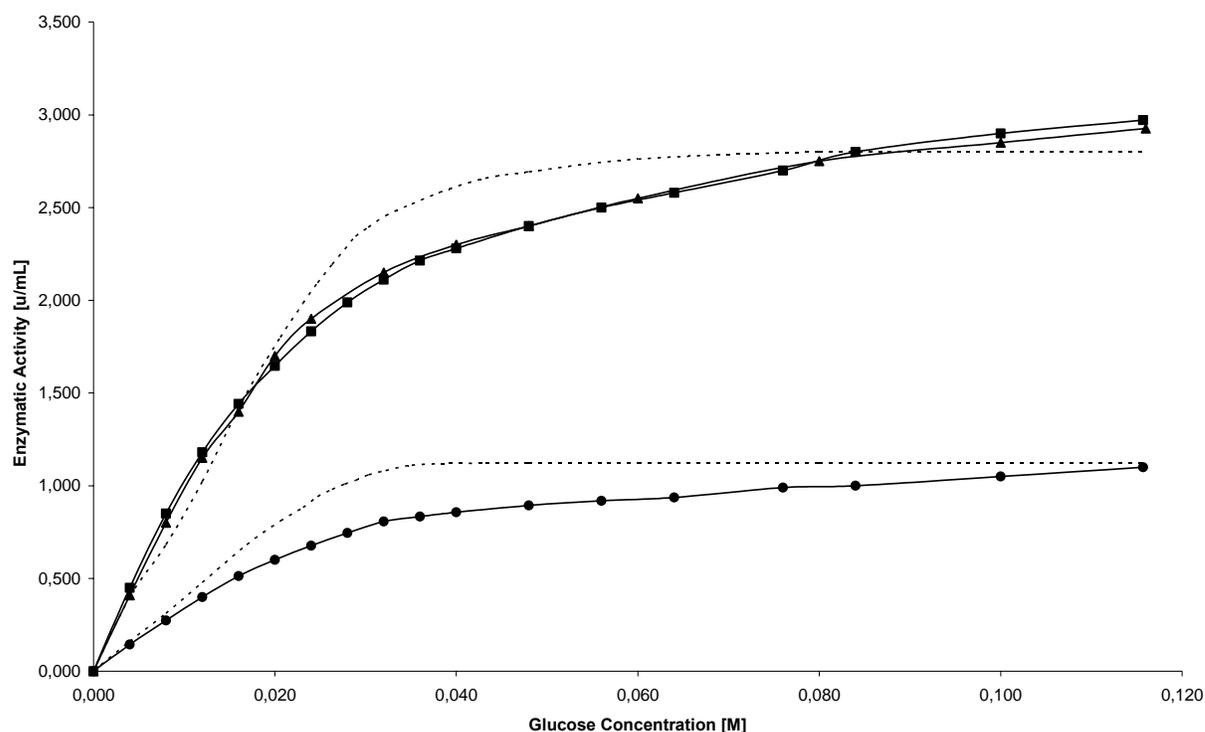
confirmado pelas curvas apresentadas na Figura 3 que mostra a variação da atividade enzimática em função da concentração do substrato (glicose), para a enzima pura, para enzima presente no homogeneizado celular e após ser purificada por extração líquido-líquido em sistemas micelares reversos. Como se pode observar, a glicose oxidase apresenta comportamento cinético semelhante ao modelo de Michaelis-Menten.

Tabela 2 Valores de  $K_M$  para a glicose oxidase.

Microorganismo	$K_M$ [M]	Substrato	pH	T [°C]	Saturação <sup>1</sup>	Referência
<i>A. niger</i> (Enzima pura da Sigma <sup>®</sup> )	$6,50 \cdot 10^{-2}$	Glicose	6,0	25	O <sub>2</sub> Puro (100% O <sub>2</sub> )	Este trabalho
<i>A. niger</i> (homogenato celular)	$4,22 \cdot 10^{-2}$	Glicose	6,0	25	O <sub>2</sub> Puro (100% O <sub>2</sub> )	Este trabalho <sup>2</sup>
<i>A. niger</i> (após extração)	$7,88 \cdot 10^{-2}$	Glicose	6,0	25	O <sub>2</sub> Puro (100% O <sub>2</sub> )	

<sup>1</sup> gas utilizado para saturação do meio reacional com O<sub>2</sub>;  
<sup>2</sup> homogeneizado celular contendo a enzima;  
<sup>3</sup> apud TREVISAN, 1993.

Para a estimativa dos valores de  $K_M$  e  $V_{M\acute{a}x}$  foi realizada a linearização, proposta por Lineweaver-Burk, para as curvas da Figura 3. Na Figura 4 encontram-se as linearizações das curvas das Figuras 3.



**Figura 3** Atividade enzimática da glicose oxidase em função da concentração de glicose para (—▲—) enzima pura; (—■—) homogenato celular; (—●—) homogenato celular; (----) modelo de Michaelis – Menten. Condições: i) Extração: pH 7,0; [CTAB] 0,20M; Temperatura: 25°C; relação (solvente/co-solvente): 76% isooctano (solvente): 6% hexanol: 18% butanol (co-solvente). Reextração: temperatura=25°C e pH = 5,5

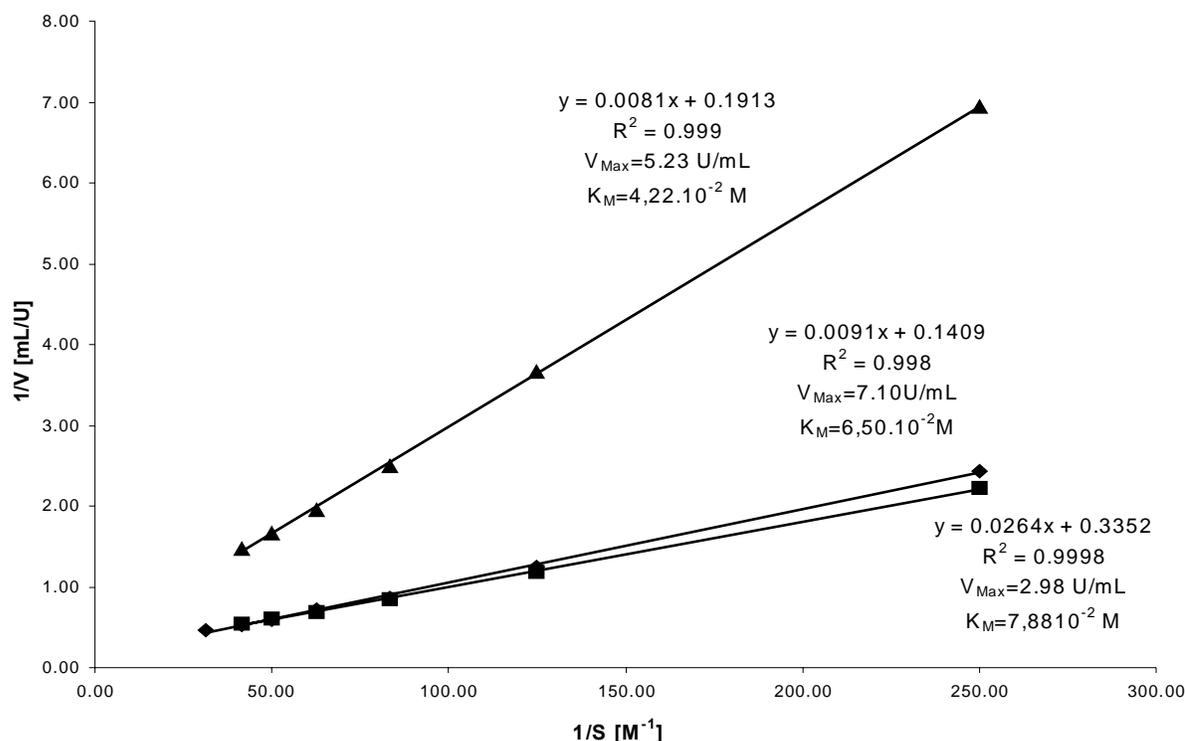
Os valores de  $K_M$  obtidos neste trabalho foram similares aos valores encontrados na literatura, como mostra a Tabela 2. A diferença observada entre os valores das constantes cinéticas obtidas neste trabalho, antes e após a extração, pode ser explicada pela presença de proteínas e outras moléculas contaminantes que modificam a cinética do sistema.

O principal contaminante da glicose oxidase que pode ser produzido pelo

*Aspergillus niger* é a catalase, isto porque a medida da atividade enzimática é feita através de um sistema acoplado a peroxidase, enzima esta que também degrada o peróxido de hidrogênio formado durante a segunda etapa da reação de oxidação da glicose (Figura 1). Durante essa reação a peroxidase transfere elétrons para a o-dianisidina oxidando-a. Ao ser oxidada a o-dianisidina torna-se de cor alaranjada tornando possível a determinação da

atividade por espectrofotometria. Como a catalase também atua sobre o peróxido de hidrogênio, pode ter ocorrido um aumento na medida da atividade da glicose oxidase, uma vez que a *o*-dianisidina foi mais rapidamente oxidada. Portanto o valor de  $K_M$  da enzima antes da extração ( $4,22 \cdot 10^{-2}$  M), foi inferior aos obtidos na enzima após a extração e na enzima pura ( $7,88 \cdot 10^{-2}$  e  $6,50 \cdot 10^{-2}$  M, respectivamente). GIBSON (1964, apud 3) encontrou um valor de  $K_M$  1,5 vez maior, usando enzima pura, que os valores encontrados para a enzima pura e para após a extração observados nesse trabalho

(Tabela 2). Isso pode ser explicado pelas condições utilizadas para a medição da atividade enzimática. Por exemplo, o gás utilizado por esse autor para saturar o meio reacional com  $O_2$  foi o ar. Portanto, só essa variável já poderia ocasionar diferenças da ordem de 1,5 a 2,0 vezes nos valores de  $K_M$ , quando comparado ao meio saturado com oxigênio puro. Também existe diferença no valor de pH utilizado nas reações do presente trabalho (pH=6.0) quando comparado com os experimentos conduzidos por GIBSON (1964, apud 3)(pH=5.6).



**Figura 4** Linearização dos dados referentes a glicose oxidase: pura (◆), em homogenato celular (▲) e após extração (■). Condições: i) Extração: pH 7,0; [CTAB] 0,20M; Temperatura: 25°C; relação (solvente/co-solvente): 76% isooctano (solvente): 6% hexanol: 18% butanol (co-solvente). Reextração: temperatura=25°C e pH = 5,5

#### 4. CONCLUSÃO

As melhores recuperações de extração (92,70%) foram obtidas sob as seguintes condições: pH 7,0; 0,20 M CTAB; condutividade elétrica =  $5,0 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ , relação entre isooctano/hexanol/butanol de

76/6/18. Este estudo mostrou valores de  $K_M$  diferentes dos que foram encontrados na literatura. Causado por uma diferença nas condições usadas na leitura da atividade (pH e gás para saturação em  $O_2$ ). A Catalase é o contaminante mais importante para glicose oxidase. Comparando os valores de  $K_M$  antes

( $4,22 \times 10^{-2}$  M) e após ( $7,88 \times 10^{-2}$  M) extração pode ser verificado que a enzima catalase foi eliminada ou consideravelmente reduzida pelo sistema. Este trabalho mostrou que a extração líquido-líquido por micelas reversas podem ser uma boa maneira de eliminar a catalase na produção de glicose oxidase.

#### Agradecimentos

Luis Fernando Peffi Ferreira agradece o apoio da FAPESP e do Centro universitário UniFEI pelo apoio institucional. Os autores agradecem também o suporte financeiro recebido da CAPES e do CNPq.

#### 5. Referências bibliográficas

1. GODFREY, T., WEST, S (1996), *Industrial Enzimology*, 2<sup>nd</sup> ed. Mac Millan Press, United Kingdom.
2. SWEDISH REPORT SERVICE (SRS) Internet (2000): <http://srs.cbi.ac.uk>.
3. TREVISAN, H.C (1993), PhD thesis. Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP-Campinas.
4. PAZUR, J.H. (1966), in *Methods in Enzymology*, v. IX, pp.82-7.
5. KELLEY, R.L., REDDY, C.A., (1988), *Methods Enzymol.*, 161, 307-316.
6. KELLEY, R.L., REDDY, C.A., (1986), *J. Bacteriol.*, 166, 269-274.
7. ROGALSKI, J., FIEDUREK, J., SZCZORDRAK, J., KAPUSTA, K., LEONOWICZ, A., (1988), *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 508-511.
8. SCRIBAN, R. (1984), *Biotechnologie*, 1<sup>st</sup> ed., Editora Manole, São Paulo, Brazil.
9. LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L. and COX, M. M. (1993), *Principles of Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> ed., Worth publishers, New York.
10. MARZZOCO, A. and TORRES, B. B. (1999), *Bioquímica Básica*, 2<sup>nd</sup> ed., editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brazil.
11. KUNST, A.; DRAEGER, B. and ZIEGENHORN, J., (1983) In *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. VI, 3<sup>rd</sup> ed., Ed. In Chief: Hans Ulrich Bergmeyer, Weinheim, Verlag Chemie, pp.163-85.
12. PESSOA JUNIOR, A., VITOLLO, M., (1998), *Process Biochemistry*, v. 33, n. 3, p. 291-297.
13. BENTLEY, R., (1963) in *The Enzymes*, 2<sup>nd</sup> Ed., K., 567-586.