

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

CAIO CASALE ARAGON

GLICEROL QUINASE DE LEVEDURA DE PANIFICAÇÃO

ARARAQUARA – SP

2008

CAIO CASALE ARAGON

GLICEROL QUINASE DE LEVEDURA DE PANIFICAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, *campus* Araraquara – UNESP, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição, área de Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maristela de Freitas Sanches Peres

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Edwil Aparecida de Lucca Gattás

ARARAQUARA – SP

2008

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

A659g Aragon, Caio Casale
 Glicerol quinase de levedura de panificação. / Caio Casale Aragon. –
 Araraquara, 2008.
 76 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Alimentos e Nutrição

Orientador: Maristela de Freitas Sanches Peres

Co-orientador: Edwil Aparecida de Lucca Gattás

1.Glicerol quinase. 2.Levedura de panificação. 3.Enzimologia. I.Peres,
Maristela de Freitas Sanches, orient.. II. Gattás, Edwil Aparecida de Lucca,
co-orient.. III. Título.

CAIO CASALE ARAGON

GLICEROL QUINASE DE LEVEDURA DE PANIFICAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, *campus* Araraquara – UNESP, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição, área de Ciência dos Alimentos.

Araraquara, _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Maristela de Freitas Sanches Peres (Orientadora)

Prof. Dr. Rubens Monti (Membro titular)

Prof. Dr. Luís Henrique Souza Guimarães (Membro titular)

Prof. Dr. Valdir Augusto Neves (Membro suplente)

Prof. Dr. Jonas Contiero (Membro suplente)

Seu jeitão não podia ser outro. Raphael era o genuíno espanhol.

O abraço forte e sincero mostrava seu outro lado: desajeitado, mas amoroso, dedicado.

Simples, demonstrava alegria nas pequenas coisas.

Sentia um orgulho nada discreto de ter sido grande músico.

Também de orgulho, seus olhos brilhavam. Desta vez, pelos filhos, netos, bisneta...

Não poderia desafinar justamente no fim da vida: meu vô Rafa se foi, claro, de modo simples.

Sem dores, tranquilo. Em paz.

Por causa deste trabalho de mestrado, o qual dedico a ele, minha despedida não existiu.

Infeliz ou felizmente.

Infelizmente, por não poder estar com ele até o fim, quando todos choravam.

Mas feliz, por ter estado com ele até o fim. Quando todos ríamos.

Feliz, por ter feito o que pude.

Em troca de um sorriso largo. E, por que não,

de outro daqueles incansáveis abraços.

Não faria mesmo sentido eu me despedir

de quem estará sempre vivo!

Com amor.

Agradeco

a Deus, pela vida. Pela sua constante presenca no meu dia-a-dia.

à Profª Drª Maristela de Freitas Sanches Peres, pelas orientações, sempre tão oportunas. Seus ensinamentos, certamente, nortearão minhas próximas pesquisas.

à amiga Stela, por tudo que significou para mim. Obrigado pelos conselhos e pelos bate-papos. Valeu pelo carinho!

à Profª Drª Edwil Aparecida de Lucca Gattás, pelo apoio profissional, pelos momentos de descontração e pela amizade.

aos Professores Rubens Monti e Luís Henrique Souza Guimarães, pelas valiosas sugestões no meu exame de qualificação. Obrigado pela confiança e amizade.

à Profª Drª Suzana Ferreira-Dias, pela colaboração, principalmente nas análises estatísticas.

E também às seguintes pessoas:

Pai, mãe, irmão, irmã, cunhado, cunhada, Luisinha, vó, vô, outra vó, outro vô, tio, outros tios, tia, outras tias, primos e primas, Cinthia, Ederlan, Fernando, Júlio, Valdir, Mara, Aureluce, Gilberto, Mariza, Chicão, Thiana, Olívia, Sônia, Zé Fernandes, Ademir, Sérgio, Roseli, Dri, Lica, Eliseu, Célia, Leonardo, Arnóbio, Alianda, Crusca, Juquinha, Guga, Juci, Cláudia, Laura, Sônia, Michellão, Jader, Alê, Mari, Lu, Vivi, Kátia, Ju, Luciana, Maria, Eliane, Ana Cláudia, Antônio, Dani, Izabella, Michelle, Pasqual, Saidera, Fernandinha, Eliriane, Fabiana, Cogú, Lilian, Supapo, Marcelinho, (a) Lê, (o) Lê, Mazi, Aline, Nascimento, Natália, Bruna, mais uma Lu, Kézia, Babi, Vitão, Werner, Marcelo, Adolfo, Pri, Priscila, Raquel, Nadi, Nádia, outra Dani, Juliana, Émerson, Rai e as tias da limpeza, Dorival, Giuliano, Taiana, Émerson, Volnei, Carol, Tamara, Irani, Moacir, Ana, Natalina, Lucas, Max, tia Rita, Maurício, Wéber, Layane, Fabão e a turma do futebol, Marisa, Tati, Iocca, Alexandra, Renato, Tião, Marlene, Zé, Bigode, Saulo, Messias, Joyce, Gabi, Amora, Camila, André, Nélon e o pessoal da manutenção, Rose e as meninas do RU. E, finalmente, claro, à FAPESP, pelo apoio financeiro (processo 06/52857-9).

RESUMO

No presente trabalho, a atividade da enzima glicerol quinase (GK; EC 2.7.1.30; ATP: glicerol 3-fosfotransferase), proveniente de extratos de levedura seca de panificação, foi otimizada. A melhor preparação enzimática da GK foi obtida por rompimento celular com esferas de vidro, durante sete minutos, com lise de 54,2% das células. O extrato celular foi parcialmente purificado com 1% de sulfato de estreptomicina, antes da precipitação com igual volume de solução a 30% (m/v) de polietilenoglicol 3350, e posteriormente dialisado. A atividade máxima da GK foi obtida em pH 10,0, a 60°C e 50mM de substrato, por metodologia clássica. A enzima apresentou alta estabilidade térmica — a atividade foi completamente mantida até 50°C, durante uma hora — e em pH entre 6,0 e 8,0. Além disso, manteve-se estável, por quatro meses, a 4°C, na presença de azida de sódio 0,05% e cloreto de cobalto 10mM, e, por até oito meses, com o extrato liofilizado. Calculados pelos métodos de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eadie-Hofstee, o valor da constante de Michaelis (K_m) da enzima variou entre 1,99mM e 3,11mM, e a V_{max} , entre 1,14U/mL e 1,19U/mL. Utilizou-se a metodologia de superfície de resposta (MSR) para melhor definição dos parâmetros da reação enzimática, observando-se valores ótimos de atividades a temperaturas entre 52°C e 56°C, pH entre 10,2 e 10,5 e concentração de substrato de 150mM a 170mM. A MSR mostrou-se adequada para modelar a reação e maximizar a atividade da glicerol quinase. Este método, de baixo custo, dosa a glicerol quinase em uma sequência de reações, sendo de grande importância para diversas indústrias, como a de alimentos, açúcar e álcool.

Palavras-chave: glicerol quinase; levedura de panificação; metodologia de superfície de resposta.

ABSTRACT

In the present study, the activity of the enzyme glycerol kinase (GK; EC 2.7.1.30; ATP: glycerol 3-phosphotransferase) from dry baker's yeast, was optimized. The best enzymatic preparation of GK was obtained by cell disruption with glass beads, for seven minutes, with 54.2% of lysed cells. Cell extract was partially purified with 1% of streptomycin sulphate, before the precipitation with equal volume of a 30% solution (m/v) of polyethylene glycol 3350, and then it was dialyzed. The maximum activity of GK was obtained with pH 10.0, at 60°C and 50mM of substrate, by the classic methodology. The enzyme presented high thermal stability — the activity was completely maintained up to 50°C, during one hour — and at pH between 6.0 and 8.0. Besides, it was stable, for four months, at 4°C, in the presence of sodium azide 0.05% and cobalt chloride 10mM, and, for up to eight months, with the lyophilized extract. The value of the Michaelis constant (K_m) of the enzyme was calculated by the methods of Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf and Eadie-Hofstee, and it varied between 1.99mM and 3.11mM, and V_{max} , between 1.14U/mL and 1.19U/mL. Response surface methodology (RSM) was used for better definition of the parameters of the enzymatic reaction, being observed higher activity values at temperatures between 52°C and 56°C, pH between 10.2 and 10.5 and substrate concentration from 150mM to 170mM. RSM showed to be an adequate approach for modeling the reaction and maximizing the glycerol kinase activity. This low cost method doses glycerol kinase in a sequence of reactions, being of great importance for many industries, like food, sugar and alcohol.

Keywords: glycerol kinase; baker's yeast; response surface methodology.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Ação da enzima glicerol quinase, com a formação de <i>sn</i> -glicerol-3-fosfato a partir de glicerol.	17
Figura 2 – Classificação da enzima glicerol quinase, segundo a IUBMB.	18
Figura 3 – Fluxograma de obtenção das enzimas glicerol quinase e glicerol-fosfato-oxidase, com precipitação protéica feita com polietilenoglicol (PEG) 3350 ou sulfato de amônio.	28
Figura 4 – Fluxograma de obtenção da peroxidase de rabanete.	31
Figura 5 – Seqüência de reações e atividades enzimáticas com formação de quinonimina.	34
Figura 6 – Curva de tempo de rompimento celular.	44
Figura 7 – Efeito da temperatura sobre a atividade da glicerol quinase.	49
Figura 8 – Gráfico de Arrhenius. Equação da reta tangente nos pontos em que há aumento da atividade: $y = -3468,93 \cdot x + 10,187$.	50
Figura 9 – Efeito da concentração de glicerol sobre a atividade da glicerol quinase.	51
Figura 10 – Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk. Equação da reta entre os pontos: $y = 1,734 \cdot x + 0,873$ ($R = 0,94$).	52
Figura 11 – Gráfico de Hanes-Woolf. Equação da reta entre os pontos: $y = 0,842 \cdot x + 2,6198$ ($R = 0,999$).	52
Figura 12 – Gráfico de Eadie-Hofstee. Equação da reta entre os pontos: $y = -2,052 \cdot x + 1,1519$ ($R = -0,932$).	53
Figura 13 – Valores teóricos e experimentais correlacionados.	54
Figura 14 – Efeito do pH sobre a atividade da glicerol quinase.	55
Figura 15 – Efeito da diluição do extrato enzimático sobre a atividade da glicerol quinase.	56

Figura 16 –	Efeito do tempo de reação sobre a atividade da glicerol quinase.	57
Figura 17 –	Efeito da concentração da peroxidase sobre a atividade da glicerol quinase.	58
Figura 18 –	Estabilidade da atividade da glicerol quinase, durante estocagem por uma hora, em diferentes temperaturas.	59
Figura 19 –	Estabilidade da atividade da glicerol quinase em diferentes valores de pH.	60
Figura 20 –	Efeito do uso de conservantes na estabilidade da glicerol quinase.	62
Figura 21 –	Relação linear entre valores experimentais e valores preditos correspondentes, pelo modelo polinomial de segundo grau.	65
Figura 22 –	Superfície de resposta ajustada aos pontos dos dados experimentais correspondentes à atividade da glicerol quinase, em função da temperatura e concentração de substrato inicial e em pH 9,5 (A) e em função de temperatura e pH e em concentração inicial de substrato de 105mM (B).	66
Figura 23 –	Gráficos de contorno das superfícies de resposta apresentadas na Figura 22, em função da temperatura e concentração de substrato inicial e em pH 9,5 (A) e em função de temperatura e pH e em concentração inicial de substrato de 105mM (B).	67

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Principais elementos presentes em 1kg de levedura seca de panificação	14
Tabela 2 – Valores de $V_{\max}$ e K_m de glicerol quinase obtida de diversas fontes, para o glicerol como substrato	21
Tabela 3 – Valores de temperatura e pH ótimos de glicerol quinase, proveniente de diferentes fontes de microrganismos	25
Tabela 4 – Modelos experimentais codificados e decodificados	41
Tabela 5 – Atividade da G3-PDH, em diferentes tempos de arrebatamento celular	43
Tabela 6 – Atividade da G3-PDH, em diferentes tempos de rompimento	43
Tabela 7 – Atividade da G3-PDH, em diferentes tempos de rompimento, com peça do <i>Bead Beater</i> adaptada	44
Tabela 8 – Valores de proteína e atividade, por etapa de obtenção do extrato celular	47
Tabela 9 – Valores de proteína e atividade dos extratos de peroxidase utilizados	48
Tabela 10 – Valores de K_m e $V_{\max}$, calculados pelos diferentes métodos	53
Tabela 11 – Efeitos estimados dos fatores temperatura (T), concentração de substrato (S) e pH, em níveis lineares (L) e quadráticos (Q), e as respectivas interações, na atividade da glicerol quinase	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ϵ	absortividade molar
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albumina de soro bovino
CTP	citidina trifosfato
Da; kDa	dalton; kilodalton
Ea	energia de ativação
EC	<i>Enzyme Comission</i> (Comissão de Enzimas)
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
G3-PDH	glicerol 3-fosfato desidrogenase
GK	glicerol quinase
GPO	glicerol fosfato oxidase
HCl	ácido clorídrico
IUBMB	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i> (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular)
K_m	constante de Michaelis
M	molaridade (mol/L)
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídio
NaF	fluoreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
PEG	polietilenoglicol
pH	potencial hidrogeniônico
PO	peroxidase
RSM (MSR)	<i>response surface methodology</i> (metodologia de superfície de resposta)
SDS	dodecilsulfato de sódio
Tris	tris hidroximetilaminometano
U	unidade de atividade
UTP	uridina trifosfato
V_{max}	velocidade máxima
g	força gravitacional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Características e parâmetros cinéticos da glicerol quinase.....	17
2.2. Fatores que influenciam a atividade enzimática.....	23
3. OBJETIVOS.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Microrganismo	28
4.2. Obtenção de glicerol quinase e glicerol-3-fosfato oxidase	28
4.2.1. Precipitação com sulfato de amônio	29
4.2.2. Precipitação com polietilenoglicol (PEG)	30
4.3. Obtenção de peroxidase (PO)	30
4.4. Ensaio de atividades	31
4.4.1. Glicerol-3-fosfato oxidase (GPO)	31
4.4.2. Peroxidase (PO)	32
4.4.3. Ensaio de atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3-PDH).....	32
4.5. Determinação protéica	33
4.6. Ensaio colorimétrico da glicerol quinase.....	34
4.7. Temperatura do ensaio.....	36
4.8. Concentração de substrato	36
4.9. Determinação do pH de reação.....	37
4.10. Diluição do extrato enzimático.....	37
4.11. Tempo de reação.....	37
4.12. Concentração de peroxidase (PO)	38
4.13. Estabilidade térmica.....	38
4.14. Estabilidade ao pH.....	38
4.15. Estabilidade com uso de conservantes.....	39
4.16. Estabilidade do extrato liofilizado com conservantes.....	39

4.17. Análise dos dados.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1. Otimização da extração da GK	42
5.1.1. Otimização das condições de rompimento celular.....	42
5.1.2. Teste com fermentos.....	45
5.1.3. Precipitação com sulfato de amônio e PEG, na obtenção do extrato enzimático.....	45
5.2. Obtenção de peroxidase do rabanete	47
5.3. Ensaio colorimétrico da glicerol quinase (GK).....	48
5.3.1. Temperatura do ensaio	48
5.3.2. Concentração de substrato	50
5.3.3. Determinação do pH de reação	54
5.3.4. Diluição do extrato enzimático.....	56
5.3.5. Tempo de reação.....	57
5.3.6. Concentração de peroxidase (PO).....	57
5.3.7. Estabilidade térmica	58
5.3.8. Estabilidade em diferentes valores de pH.....	60
5.3.9. Estabilidade na presença de conservantes	61
5.3.10. Estabilidade do extrato liofilizado com conservantes.....	62
5.4. Modelagem de superfície de resposta	62
6. CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

Na maior parte dos países, a levedura de panificação é a *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, a espécie *Saccharomyces rosei* e outras leveduras pertencentes aos gêneros *Zygosaccharomyces* e *Torulaspora* são bastante aceitas em panificação, quando se utilizam massas doces (BEUDEKER et al., 1990). Comercialmente, as leveduras provêm de diversas cepas, sendo fundamentais para o crescimento da massa, pela produção de dióxido de carbono, durante a fermentação alcoólica dos açúcares nela contidos (KRISTIANSEN, 1994).

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura unicelular pertencente ao reino dos fungos (GERSHON e GERSHON, 2000). Pode sobreviver tanto de forma aeróbica quanto anaeróbica, e a escolha entre o metabolismo aeróbico e anaeróbico depende da disponibilidade de oxigênio e da concentração de hidratos de carbono, no meio de cultivo (PASTERIS e STRASSER DE SAAD, 1998).

O fermento de panificação é vendido prensado ou em forma de ADY (levedura seca ativa) (BEUDEKER et al., 1990). A produção das células vivas de levedura é feita aerobicamente, em um meio contendo melaço, sais de amônio e outros sais, fosfatos, vitaminas e antiespumantes (KRISTIANSEN, 1994). A massa celular é tratada com aditivos, antes da secagem, usando-se agentes antioxidantes — propilgalato, hidroxianisole butilado (BHA), hidroxitolueno butilato (BHT) e ácido ascórbico — e agentes emulsificantes — ésteres de ácido cítrico, de monoglicerídeos e de poliglicerol —, que contribuem para a manutenção da coloração típica do fermento (BEUDEKER et al., 1990).

A levedura seca ativa é embalada em condições de ausência de oxigênio ou presença de gases inertes (nitrogênio). A ausência de oxigênio permite prolongar o período de armazenamento (de um a dois meses para um ano). A estabilidade da levedura seca é inversamente proporcional à temperatura de armazenamento, tanto na presença como

na ausência de ar nas embalagens. Sendo assim, é vantajoso o armazenamento do produto em condições de refrigeração (BEUDEKER et al., 1990).

A Tabela 1 fornece a lista dos elementos típicos encontrados em levedura seca de panificação, embora essa composição possa variar de acordo com o ambiente de produção e as cepas utilizadas (BEUDEKER et al., 1990).

Tabela 1 – Principais elementos presentes em 1kg de levedura seca de panificação

Elemento	Composição média
Carbono	480g
Oxigênio	310g
Nitrogênio	80g
Hidrogênio	70g
Potássio	20g
Fósforo	15g
Magnésio	3g
Cálcio	2g
Enxofre	2g
Outros	18g
Total	1000g

Fonte: Kristiansen, 1994

A *Saccharomyces cerevisiae* possui a capacidade de responder rápida e efetivamente às mudanças ambientais. Assim, as células, quando expostas a ambientes com alta osmolaridade, passam a acumular glicerol como osmólito (SIDERIUS et al., 2000). Esse acúmulo ajuda a manter o balanço de ATP da via glicolítica. O glicerol é, claramente, um instrumento de ajuste do potencial celular aquoso (BLOMBERG e ADLER, 1992). Além disso, a *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de utilizar o glicerol como a única fonte de carbono e energia. Para tanto, a primeira etapa é a conversão do glicerol em glicerol-3-fosfato, pela enzima citosólica glicerol quinase. O glicerol-3-fosfato atravessa a membrana externa mitocondrial, sendo oxidado, pela glicerol-3-fosfato desidrogenase (enzima localizada

na camada interna da organela), a dihidroxiacetona fosfato. Esta retorna ao citosol, onde é catabolizada na glicólise ou usada para síntese de glicose-6-fosfato, durante a gliconeogênese (PASTERIS e STRASSER DE SAAD, 1998; GRAUSLUND et al., 1999). O primeiro relato dessa rota metabólica foi estudado em *Pediococcus pentosaceus*, isolada de vinho argentino (PASTERIS e STRASSER DE SAAD, 1998).

Há, na literatura, uma infinidade de trabalhos envolvendo purificação e caracterização de enzimas provenientes de *Saccharomyces cerevisiae*, entre elas, a glicerol quinase (BRENDA, 2008). Um dos principais usos comerciais da GK está relacionado com a determinação de glicerol (FOSSATI e PRENCIPE, 1982).

Alguns métodos para análise de glicerol incluem oxidação, esterificação, formação de éter, reação de desidratação e procedimentos cromatográficos. Embora haja os métodos analíticos, as determinações enzimáticas são as que possuem maior sensibilidade e especificidade (WU e CHENG, 2005). A escolha da metodologia deve se basear no tipo de matriz onde se encontra o analito, na concentração desse composto na amostra e na complexidade dessa amostra (HAMANO, 1991).

Sistemas de injeção em fluxo, que utilizam enzimas imobilizadas, são seguidos de métodos de detecção, tais como: espectrofotométrico, eletroquímico, quimioluminométrico ou espectrofluorimétrico (RANGEL e TÓTH, 2000), infravermelho (PATZ et al., 2004; URTUBIA et al., 2004), fluorimétrico (FERNANDES et al., 2004) e ultravioleta (BOEHRINGER MANNHEIM, 1997). Outros métodos enzimáticos são combinados com biossensores e biorreatores (CAÑIZARES e LUQUE DE CASTRO, 1995; RANK et al., 1995; MERCHIE et al., 1992; COMPAGNONE et al., 1998; NICULESCU et al., 2003).

Métodos totalmente enzimáticos são, em geral, utilizados para determinações de glicerol e/ou triglicérides, uma vez que constituem procedimentos simples, amenos para automatização e com excelentes correlações de resultados com métodos químicos. Algumas metodologias, no entanto, não permitem medir o triglicéride sanguíneo em altas

concentrações, de maneira direta, sendo necessário realizar uma diluição prévia ao ensaio. Em outras, porém, a aplicação de pequenos volumes tem afetado a precisão dos resultados devido à menor absortividade relativa de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADH). Além disso, uma alta concentração de sabões de ácidos graxos insolúveis, formados após a hidrólise de triglicérides, pode ocasionar um desvio ascendente na curva de calibração. Desse modo, propôs-se a incorporação da enzima glicerol fosfato oxidase preferivelmente à glicerol-3-fosfato desidrogenase, no sistema reagente, por aquela facilitar o uso de uma reação indicativa colorimétrica e estável, até quatro vezes mais sensível que a redução de NAD^+ na região ultravioleta (MCGOWAN et al., 1983; MERCHIE et al., 1992; MURPHY e GALLEY, 1994).

Fossati e Prencipe (1982) descreveram uma reação enzimática-colorimétrica que possibilita a dosagem de triglicérides no soro humano, em 15 minutos, à temperatura ambiente. Realiza-se a hidrólise do triglicéride sangüíneo pela lipase, formando glicerol. Este, catalisado pelas enzimas glicerol quinase e, em seguida, pela L- α -glicerol-fosfato oxidase, gera peróxido de hidrogênio, que é monitorado a 510nm, mediante presença de peroxidase de rabanete e de um sistema cromogênico (ácido 3,5-dicloro-2-hidrobenzenosulfônico e 4-aminofenazona). Os dados obtidos são sensíveis, precisos e confiáveis, com amostra/reagente numa proporção equivalente a 1:150 e sem necessidade de amostra branco.

Muitos laboratórios (GOLDANALISA; SPINREACT; VALTEK DIAGNOSTICS) disponibilizam, no comércio, *kits* enzimáticos de dosagem de triglicérides. Tais produtos seguem uma metodologia semelhante àquela última descrita, utilizando p-clorofenol ou ácido 3,5-diclorobenzenosulfônico como reagente cromogênico, que, em presença de peróxido de hidrogênio e 4-aminoantipirina ou 4-aminofenazona, produz quinonimina, cuja absorbância, medida em espectrofotômetro ou fotolorímetro a 500nm, é diretamente proporcional à concentração de triglicérides.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características e parâmetros cinéticos da glicerol quinase

Transferases são enzimas que transferem grupos (não incluindo grupos H) do(s) substrato(s) aos aceptores (exceto água). O nome sistemático dessas enzimas é formado por "doador:aceptor grupo transferido – transferase". Os tipos de grupos transferidos são identificados pelo segundo dígito, na classificação das enzimas, pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) (WHITAKER et al., 2003).

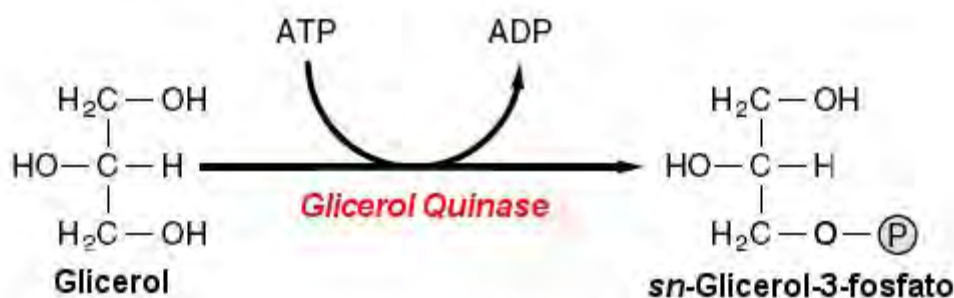


Figura 1 – Ação da enzima glicerol quinase, com a formação de *sn*-glicerol-3-fosfato a partir de glicerol.

A enzima glicerol quinase ou gliceroquinase (GK; EC 2.7.1.30; ATP: glicerol 3-fosfotransferase) catalisa a fosforilação do glicerol a glicerol-3-fosfato (JIM et al., 1982; CRANS e WHITESIDES, 1985; STEPANIAN et al., 2003; BRENDA, 2008), como ilustrado na Figura 1. O número de classificação, segundo a IUBMB (2008), determina as características básicas da enzima (Figura 2).

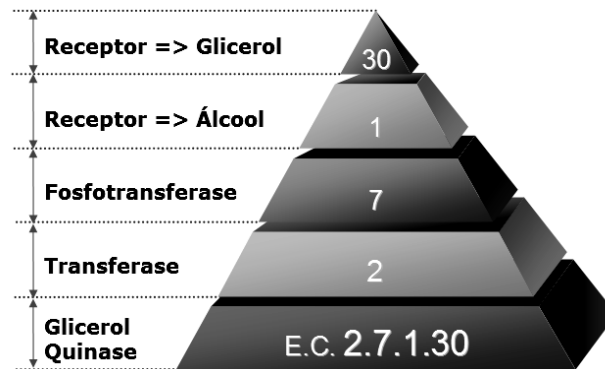


Figura 2 – Classificação da enzima glicerol quinase, segundo a IUBMB.

A GK é uma proteína tetramérica, composta por idênticas subunidades (KOGA et al., 1998), tendo sido isolada, pela primeira vez, de fígado de rato, por Bublitz e Kennedy (JANSON e CLELAND, 1974). É industrialmente importante e útil para a determinação clínica de triglicéride sanguíneo, em combinação com lipase, glicerol-3-fosfato oxidase e peroxidase, e para a de glicerol (FOSSATI e PRENCIPE, 1982).

Embora seja ativa principalmente com o glicerol, a GK atua também sobre a dihidroxiacetona e o gliceraldeído (YOSHIHARA, 1996; IUBMB, 2008). Com o glicerol, a reação é dependente de magnésio e de ATP. A enzima atua como fator limitante no metabolismo de glicerol de diversos microrganismos, como a *E. coli*, em que a reação é regulada por alguns metabólitos, como frutose 1,6-bifosfato, adenina e proteínas fosfocarreadoras III (SAKASEGAWA et al., 1998).

A glicerol quinase — principalmente a de *E. coli* — é bastante estudada, no entanto muitas questões permanecem sobre suas propriedades. Análises de GKs de diversos organismos fornecem uma grande ferramenta para elucidar o comportamento, a estrutura e as funções envolvidas nessa classe de enzimas. As GKs vêm sendo purificadas e caracterizadas de vários organismos: animais (fígados de ratos e pombas), fungos (*Candida mycoderma*), arqueobactérias (*Pyrococcus kodakaraensis*) e eubactérias (*Flavobacterium meningosepticum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus faecalis*, *Thermus aquaticus*, *Thermus aquaticus flavus*, *Bacillus stearothermophilus*

e *Bacillus subtilis*) (PAWLYK e PETTIGREW, 2001). Além disso, a atividade da GK tem sido demonstrada em demais fungos (*Neurospora*, *Aspergillus*, *Microsporum*, *Fusarium*), protozoários (*Tetrahymena*, *Leishmania*, *Trypanosoma*) e vírus Epstein-Barr (BRISSON et al., 2001).

Em mamíferos, a GK é mais encontrada no fígado, rim e, em menores quantidades, na mucosa intestinal, tecido adiposo e músculos. Ela possui, aproximadamente, 50% de similaridade de aminoácidos entre humanos e a *E. coli* (BRISSON et al., 2001). Genes que expressam a GK em humanos e também em *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus casseliflavus* já foram seqüenciados e clonados (KOGA et al., 1998). Em *S. cerevisiae*, o gene que codifica a glicerol quinase é chamado GUT1 (gut = *glycerol utilization*) (PAVLIK, 1993).

O estudo da cinética enzimática é fundamental para o acompanhamento da ação das enzimas e posterior comparação entre elas. O k_m é definido como a concentração de substrato necessária para que a velocidade da reação enzimática seja a metade da máxima (V_{max}). Em outras palavras, representa a concentração de substrato na qual metade dos sítios ativos das enzimas da reação se encontra saturada por moléculas de substrato, no estado de equilíbrio. O valor de k_m varia, consideravelmente, de uma enzima para outra e em uma enzima particular com diferentes substratos. Em alguns casos, mudanças nas condições de reação, como pH ou temperatura, podem ter influência no valor de k_m (COPELAND, 2000).

Diversos métodos são utilizados para a determinação gráfica do efeito da concentração do substrato sobre a velocidade de uma reação catalisada por enzima. Seguem os principais (CISTERNAS et al., 2005; COPELAND, 2000):

- I) Gráfico de velocidade inicial (v) versus concentração de substrato $[S]$, em que, partindo-se da equação de Henri-Michaelis-Menten, tem-se que, quando $v = V_{max}/2$, $[S] = K_m$.

- II) Gráfico $1/v$ versus $1/[S]$ (Lineweaver-Burk), em que uma reta de equação $y = mx + b$ é traçada, e a intersecção no eixo $1/[S]$ é o valor de $-1/K_m$ e, no eixo $1/v$, é o valor de $1/V_{max}$.
- III) Gráfico de $[S]/v$ versus $[S]$ (Hanes-Woolf), que fornece uma reta de equação $y = mx + b$, sendo m equivalente ao valor de $1/V_{max}$, e a inclinação da reta, K_m/V_{max} .
- IV) Gráfico de v versus $v/[S]$ (Eadie-Hofstee), em que a reta originada, com equação $y = mx + b$, fornece os valores de K_m ($-m$) e V_{max} (b).

Na prática comum de laboratório, o método mais amplamente usado é o Lineweaver-Burk, conhecido como gráfico do duplo recíproco; porém, análises estatísticas indicam que, em alguns casos, é também o método que fornece as piores estimativas (LESKOVAC, 2004).

No gráfico duplo recíproco, os baixos valores de $[S]$ correspondem aos maiores valores de $1/[S]$, e, devido aos detalhes da regressão linear, esses pontos são os que possuem maior peso na análise, resultando em estimativas pobres, até mesmo quando o erro experimental é pequeno (COPELAND, 2000; LESKOVAC, 2004). Já o de Eadie-Hofstee tem a desvantagem de, normalmente, considerar uma variável dependente que aparece em ambas as coordenadas; por outro lado, esse método revela melhor a presença de medidas excepcionalmente ruins, com erros experimentais grandes. No geral, o gráfico de Hanes-Woolf é o mais satisfatório dos três (LESKOVAC, 2004).

As características e propriedades da GK variam muito de acordo com sua fonte. A Tabela 2 mostra os valores de K_m e V_{max} da enzima glicerol quinase obtida de diversos microrganismos, para o glicerol como substrato.

Tabela 2 – Valores de $V_{\max}$ e K_m de glicerol quinase obtida de diversas fontes, para o glicerol como substrato

Autores	Ano	Microrganismo	K_m	$V_{\max}$
Grunnet e Lundquist	1967	<i>Candida mycoderma</i>	65 μ M	-
Hayashi e Lin	1967	<i>Escherichia coli</i>	1,3 μ M	-
Janson e Cleland	1974	<i>Candida mycoderma</i>	15 μ M	17U/mg
Deutscher e Sauerwald	1986	<i>Streptococcus faecalis</i>	0,9mM	-
Nilsson et al.	1989	<i>Debaryomyces hansenii</i>	5mM	-
Voegelé et al.	1993	<i>Escherichia coli</i> *	20-27 μ M	3,9-4,9U/mg
Pettigrew et al.	1996	<i>Escherichia coli</i>	5 μ M	15,7U/mg
Pettigrew et al.	1996	<i>Escherichia coli</i> *	126 μ M	12,7U/mg
Huang et al.	1997	<i>Thermus flavus</i>	38 μ M	-
Pasteris e Strasser de Saad	1998	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	0,11mM	108U/mg
Koga et al.	1998	<i>Pyrococcus kodakaraensis</i> **	111 μ M	-
Steinborn et al.	2000	<i>Trypanosoma brucei</i> **	0,169mM	206,6U/mg
Králová et al.	2000	<i>Trypanosoma brucei</i> *	0,14mM	226U/mg
Holtman et al.	2001	<i>Escherichia coli</i>	5 μ M	15U/mg
Holtman et al.	2001	<i>Escherichia coli</i> *	6 μ M	13U/mg
Sakasegawa et al.	2001	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	249 μ M	-
Sakasegawa et al.	2001	<i>Flavobacterium meningosepticum</i> *	521 μ M	-

* enzima mutante

** expressão genética em *Escherichia coli*.

Nilsson et al. (1989) caracterizaram a glicerol quinase purificada de leveduras *Debaryomyces hansenii*, constatando peso molecular de 236kDa. Krakow e Wang (1990), purificando a GK de *Trypanosoma brucei*, observaram um peso molecular de 53kDa.

Huang et al. (1997) purificaram e caracterizaram a GK de *Thermus flavus*, com utilização de sulfato de amônia. O processo rendeu um extrato com 79,9% de pureza. A atividade específica do extrato bruto foi de 0,71U/mg, contra 56,7U/mg do extrato final. Observou-se que, de modo geral, o K_m para a dihidroxiacetona é maior, demonstrando maior afinidade da enzima com o glicerol como substrato.

Janson e Cleland (1974) estudaram a GK de *Candida mycoderma* e verificaram valores de K_m de 15 μ M, 5mM e 3,7mM para glicerol, dihidroxiacetona e L-gliceraldeído, respectivamente. Králová et al. (2000) clonaram o gene da glicerol quinase em *Trypanosoma brucei* e também concluíram que os valores de K_m para os demais substratos costumam ser maiores do que aqueles para o glicerol.

Koga et al. (1998) clonaram o gene da GK de *Pyrococcus kodakaraensis* e expressaram-no em *E. coli*. Huang et al. (1998) realizaram o mesmo processo, clonando e expressando em *E. coli* o gene da GK de *Thermus flavus*. A nova enzima demonstrou uma atividade 23,8 vezes maior que a de *Thermus flavus*.

Pasteris e Strasser de Saad (1998) estudaram as propriedades da glicerol quinase obtida de bactérias lácticas *Pediococcus pentosaceus*. Os produtos finais da reação agiram como inibidores competitivos, enquanto a frutose-1,6-difosfato inibiu a enzima de forma não competitiva. Os autores, assim como Huang et al. (1997), concluíram que os íons Mg^{+2} são fundamentais para a máxima atividade da enzima. Concentrações entre 0,1 e 10mmol/l de Mg^{2+} e Ca^{2+} ativaram a enzima, enquanto Mn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} e Co^{2+} atuaram como inibidores.

Steinborn et al. (2000) clonaram o gene da glicerol quinase de *Trypanosoma brucei* e realizaram uma expressão heteróloga em *E. coli*. Curiosamente, o uso de CTP 2mM ou UTP 2mM tornou a enzima mais ativa, quando comparada com o ATP na mesma concentração.

2.2. Fatores que influenciam a atividade enzimática

Em uma reação catalisada por enzimas, é fundamental determinar a velocidade da reação e verificar como esta é alterada em resposta às mudanças dos diversos parâmetros experimentais (NELSON e COX, 2004). Os principais parâmetros que afetam a velocidade das reações enzimáticas são:

a) Concentração de substrato

A uma concentração muito baixa de substrato, a velocidade da reação aumenta em proporções diretas ao aumento da concentração de substrato. Na medida em que essa concentração vai aumentando, a relação passa a ser curvilínea, até atingir um valor máximo de atividade, podendo ocorrer queda em alguns casos (WHITAKER et al., 2003).

b) Concentração de enzimas

Em uma faixa finita, o gráfico de velocidade *versus* concentração de enzima ($[E]$) deve gerar uma reta. A faixa sobre a qual essa reta deverá se manter depende da habilidade de se medir a verdadeira velocidade inicial da reação, variando-se a concentração enzimática. Quando se adiciona mais enzima, a velocidade pode aumentar até o ponto em que quantidade significativa da concentração total de substrato está sendo depletada durante o ensaio. Como resultado, obtém-se um gráfico de v *versus* $[E]$, que é linear à baixa $[E]$, mas que inicia uma curva decrescente, quando passa a ocorrer uma saturação, à alta $[E]$. Uma terceira situação pode acontecer quando há um equilíbrio inadequado de temperatura ou, ainda, na presença de um inibidor ou ativador da enzima. Nesse caso, o gráfico de v *versus* $[E]$ também fornece uma curva, mas decrescente (COPELAND, 2000).

c) pH

O pH de uma solução enzimática pode afetar a atividade catalítica de diversas maneiras. Como todas as proteínas, as enzimas possuem uma estrutura terciária nativa que é sensível ao pH. Enquanto a maioria das enzimas é mais estável em valores de pH próximos ao fisiológico (7,4), outras podem apresentar a máxima atividade em pH muito alto ou baixo (COPELAND, 2000).

Genericamente, a conformação de uma proteína pode ser mantida por uma faixa de quatro a cinco unidades de pH. No entanto, dentro dessa faixa, a velocidade da reação varia com o pH (COPELAND, 2000).

d) Temperatura

Geralmente, a taxa de uma reação química dobra a cada aumento de 10°C da temperatura da reação. A maioria das catálises químicas apresenta aumento da atividade com o aumento da temperatura. No entanto, a atividade de uma enzima vai sofrer acréscimo até uma faixa finita de temperatura, quando passa a diminuir significativamente acima dessa faixa, o que é característico de uma desnaturação protéica (COPELAND, 2000).

Van't Hoff e Arrhenius buscaram descobrir uma relação quantitativa entre a temperatura e as constantes de velocidade, comparando as observações cinéticas com as propriedades conhecidas dessas constantes, o que resultou no gráfico de Arrhenius (logaritmo neperiano de k *versus* $1/T$), considerado o mais conveniente para esse tipo de estudo (LESKOVAC, 2004).

Uma vez que a temperatura da mistura da reação possui efeitos dramáticos nos parâmetros cinéticos, é fundamental manter-se o seu controle durante os ensaios. Para uma reação iniciada com a adição do substrato, a mistura da reação e a solução de substrato devem estar equilibradas na mesma temperatura, antes de se acrescentar o substrato. Já para uma reação iniciada com a adição da enzima, é desejável a maximização da estabilidade protéica, mantendo-se a solução estoque da enzima a 4°C, antes do ensaio (COPELAND, 2000).

Na Tabela 3, observam-se os valores de pH e temperatura ótimos da enzima glicerol quinase proveniente de diferentes fontes de microrganismos.

Tabela 3 - Valores de temperatura e pH ótimos de glicerol quinase proveniente de diferentes fontes de microrganismos

Autores	Ano	Microrganismo	Temperatura	pH
Grunnet e Lundquist	1967	<i>Candida mycoderma</i>	-	9,0
Hayashi e Lin	1967	<i>Escherichia coli</i>	-	9,8
Nilsson et al.	1989	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	7,0 – 8,0
Krakov e Wang	1990	<i>Trypanosoma brucei</i>	-	7,5 – 9,0
Huang et al.	1997	<i>Thermus flavus</i>	50 – 70°C	9,0 – 9,5
Koga et al.	1998	<i>Pyrococcus kodakaraensis*</i>	80°C	8,0
Pasteris e Strasser de Saad	1998	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	28°C	7,5
Steinborn et al.	2000	<i>Trypanosoma brucei*</i>	-	8,5
Králová et al.	2000	<i>Trypanosoma brucei</i>	-	8,0

* expressão genética em *Escherichia coli*.

Como todas as proteínas, as enzimas, em seus estados nativos, são estabilizadas em condições específicas de pH, força iônica, composição catiônica/aniônica, etc. As melhores condições para cada enzima devem ser determinadas de forma empírica. No entanto, as condições ótimas para a estabilidade da proteína não são, necessariamente, as mesmas para a atividade enzimática ótima (COPELAND, 2000).

Huang et al. (1997) purificaram e caracterizaram a GK de *Thermus flavus*. A enzima mostrou-se estável em pH entre 6,5 e 11,0, por seis horas, a 37°C. Cerca de 50% da atividade inicial da enzima manteve-se, após incubação a 68°C e em pH 7,5, por 30 minutos.

Crans e Whitesides (1985) estudaram a estabilidade da glicerol quinase obtida de *S. cerevisiae*, que foi menor em meios com ausência de glicerol. Menos de 20% da atividade dessa enzima foi observada, após 24 horas, em pH 7,5 e a 4°C. A imobilização da enzima fez com que não houvesse perda da atividade em estocagem a 4°C, por seis meses.

Sakasegawa et al. (2001) realizaram modificações genéticas em *Flavobacterium meningosepticum*, com a finalidade de obterem uma GK mais termoestável. A enzima mutante teve um acréscimo de 69°C para 72,1°C na T_{50} (temperatura em que a enzima perde 50% de sua atividade), em 30 minutos de incubação.

Koga et al. (2001) verificaram uma T_{50} (em 20 minutos de incubação), para a GK de *E. coli*, de 50°C a 55°C, enquanto que a de *Thermococcus kodakaraensis* esteve por volta de 95°C. Em 1998, os mesmos autores clonaram o gene da GK de *Pyrococcus kodakaraensis* e expressaram-no em *E. coli*. A T_{50} dessa enzima foi de 100°C.

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Otimizar a metodologia de obtenção de glicerol quinase proveniente de extrato celular bruto de levedura seca de panificação.
- Padronizar o ensaio de dosagem da glicerol quinase, para a determinação colorimétrica.
- Estudar alguns parâmetros cinéticos e as melhores condições de estabilidade da glicerol quinase, durante a estocagem.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismo

Como fonte de glicerol-3-fosfato oxidase e glicerol quinase, utilizou-se levedura seca de fermento de panificação, adquirida no comércio, de procedência da Mauri Brasil Indústria, Comércio e Importação Ltda., Pederneiras, São Paulo.

4.2. Obtenção de glicerol quinase e glicerol-3-fosfato oxidase

A obtenção das enzimas glicerol quinase e glicerol-3-fosfato oxidase foi baseada no fluxograma abaixo (Figura 3).

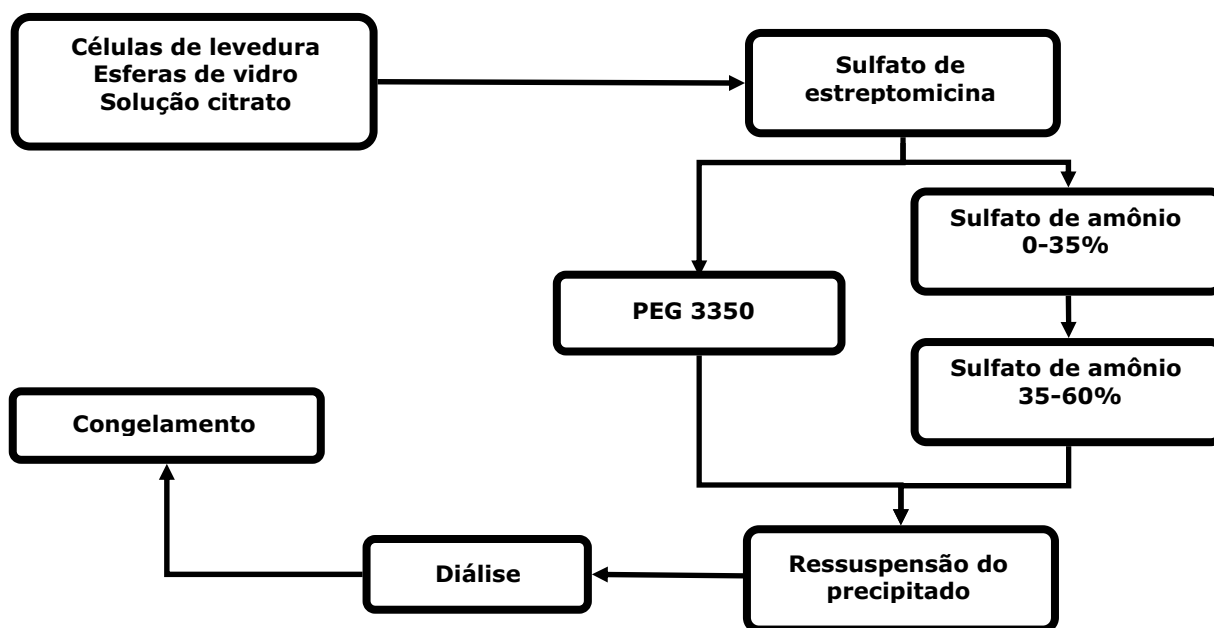


Figura 3 – Fluxograma de obtenção das enzimas glicerol quinase e glicerol-fosfato-oxidase, com precipitação protéica feita com polietilenoglicol (PEG) 3350 ou sulfato de amônio.

4.2.1. Precipitação com sulfato de amônio

O extrato celular bruto foi obtido por meio de técnica descrita por Tininis (2001), modificada no Laboratório de Fermentações para Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara: 10g de células de levedura seca de panificação, 100ml de solução tampão citrato 2mM, pH 6,2, contendo β -mercaptoetanol 2mM, e 100g de pérolas de vidro (425-600 micras, Sigma) foram rompidas, por trituração, em um homogeneizador tipo *Bead Beater* (Biospec Products Incorporation, modelo 1107900), em ciclos de 7x1 minutos (sete minutos intercalados por um minuto de descanso), em banho de gelo. O extrato celular bruto (sobrenadante) foi separado por centrifugação (centrífuga Sorvall Legend RT) a 8130g, por 10 minutos, a 0°C.

Em seguida, procedeu-se à purificação parcial das enzimas glicerol-fosfato oxidase e glicerol quinase, de acordo com Tininis (2001). Ao extrato celular bruto obtido acima, adicionou-se, sob agitação e banho de gelo, 1% de sulfato de estreptomicina; após repouso de 60 minutos, a 4°C, centrifugou-se por 20 minutos (16260g, 0°C). No sobrenadante, foi feito o fracionamento salino, sob agitação e banho de gelo, com sulfato de amônio (0-35%), seguido de repouso de 30 minutos, a 4°C, e centrifugação por 20 minutos (16260g, 0°C). Fez-se, então, nova adição de sulfato de amônio (35-60%), sob agitação e banho de gelo, e procedeu-se ao repouso a 4°C, por 12 horas. O extrato foi centrifugado por 20 minutos (16260g, 0°C), ressuspensando-se o precipitado em 1ml de tampão Tris-HCl 10mM, pH 7,2, contendo fluoreto de sódio (NaF) 10mM. Realizou-se a diálise, por 24 horas, contra solução de citrato 0,2M, pH 6,2, contendo sulfato de manganês 10mM e β -mercaptoetanol 2mM, em câmara fria, sob agitação. Por fim, o extrato clarificado foi centrifugado, por 10 minutos, a 11292g e 0°C, e submetido ao congelamento.

4.2.2. Precipitação com polietilenoglicol (PEG)

O procedimento de rompimento celular ocorreu como descrito no item anterior. No entanto, após adição de 1% de sulfato de estreptomicina ao extrato obtido, sob agitação e banho de gelo, repouso de 60 minutos, a 4°C, e centrifugação por 20 minutos (16260g, 0°C), procedeu-se à precipitação no sobrenadante, em banho de gelo e agitação, com igual volume de solução de PEG 3350 30%. Depois de 12 horas de repouso, a 4°C, continuou-se o procedimento de diálise, já descrito anteriormente.

4.3. Obtenção de peroxidase (PO)

A enzima peroxidase foi extraída de rabanete orgânico, conforme o fluxograma da Figura 4. O extrato bruto foi obtido pela metodologia descrita por Neves e Lourenço (1985), modificada: trituração de rabanete descascado (500g) e homogeneizado, em liquidificador, com 20mL de solução tampão acetato 0,1 M, pH 5,0. O homogenato foi filtrado em gaze e centrifugado, por 10 minutos, a 1807g, em centrífuga à 0°C, sendo o sobrenadante congelado e utilizado como fonte de peroxidase.

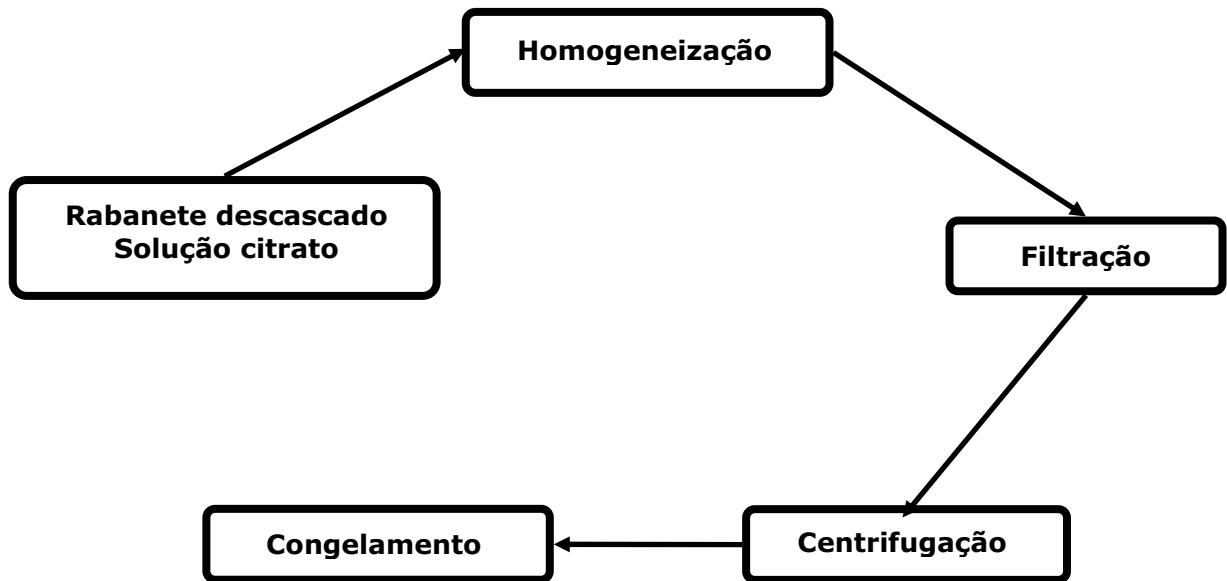


Figura 4 – Fluxograma de obtenção da peroxidase de rabanete.

4.4. Ensaio de atividades

4.4.1. Glicerol-3-fosfato oxidase (GPO)

O ensaio de atividade da glicerol-3-fosfato oxidase foi realizado com a seguinte mistura, de acordo com metodologia padronizada por Camargo (2007): glicerol-3-fosfato 250mM em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,0, contendo Triton X-100 0,1%; 0,0133% de 4-aminoantipirina; 0,0266% de fenol; aproximadamente 0,4U de peroxidase (PO); e água destilada para completar o volume de ensaio. A reação foi iniciada com a adição de 15µL de extrato enzimático diluído 10 vezes, seguida de incubação, por duas horas, a 60°C, e interrompida com adição de solução SDS 10%. A coloração desenvolvida foi medida ao comprimento de onda de 500nm. Esta etapa foi realizada no laboratório, previamente à elaboração deste trabalho.

4.4.2. Peroxidase (PO)

A atividade da peroxidase foi realizada com base no método de Neves e Lourenço (1985), modificado: 0,2mL de o-dianisidina 15mM (em etanol); 0,2mL de peróxido de hidrogênio 30mM; 5μL de extrato de rabanete; e 2,595mL de solução tampão citrato-fosfato 0,08M, pH 5,5, completando 3,0mL de ensaio em cubeta. Acompanhou-se, em espectrofotômetro (Amersham Biosciences – Ultrospec 2100pro), a variação de absorbância ao comprimento de onda de 460nm, no primeiro minuto. O ensaio branco continha todos os reagentes, exceto a peroxidase. A absorvidade molar da o-dianisidina é de $11300 \text{ M}^{-1}\text{L}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Uma unidade de atividade de peroxidase foi definida como a unidade de absorbância gerada, por minuto, nas condições de ensaio.

4.4.3. Ensaio de atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3-PDH)

Uma modificação do ensaio descrito por Wieland et al. (1962), que se baseia na conversão do glicerol-fosfato em dihidroxiacetona-fosfato, foi utilizada na otimização do rompimento celular. Embora a G3-PDH não seja a enzima estudada, trata-se de um método ultravioleta, rápido e de grande sensibilidade.

Nessa técnica de dosagem, a mistura foi composta por: 70μL de NAD^+ 20mM; 0,9mL de glicerol fosfato 50mM; 0,9mL de tampão glicina 0,4M, pH 9,8, contendo hidrato de hidrazina 3,7M; 0,33mL de cloreto de cálcio 100mM; 0,7mL de água destilada; e 0,4mL do extrato celular bruto diluído 20x em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,2, contendo NaF 10mM. A reação foi iniciada com a adição do extrato diluído, e a formação do NADH foi acompanhada espectroscopicamente ao comprimento de onda de

340nm. Preparou-se um tubo de reação (branco) contendo todos os reagentes do ensaio, exceto o substrato, e procedeu-se à leitura do aumento da absorbância ao comprimento de onda igual a 340nm, de 15 em 15 segundos, até 90 segundos. O coeficiente de absorbância utilizado para o NADH foi de $6200 \text{ M}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os valores do ensaio em branco foram subtraídos dos obtidos para o ensaio enzimático, e as diferenças serviram para a obtenção das curvas de tempo. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.5. Determinação protéica

O teor de proteína (Cp) foi determinado pelo método de Lowry (1951), modificado por Layne (1957), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Prepararam-se três soluções:

- a) 10mL de carbonato de sódio 20%, acrescido de 10mL de hidróxido de sódio 1M;
- b) 1mL de sulfato de cobre 5%, acrescido de 1mL de tartarato de sódio e potássio 10%;
- c) solução "a", acrescida de 2mL da solução "b" e água destilada, para completar um volume final de 100mL (preparada no momento do uso).

Os ensaios foram realizados em triplicata, colocando-se 1mL de amostra diluída e 6mL da solução "c". Aguardaram-se 10 minutos, acrescentando-se, em seguida, 0,58mL de reagente Folin-Ciocalteu (Imbralab®), diluído em água destilada em proporção 1:2, preparado no momento de uso. Após 30 minutos, fez-se a leitura, em espectrofotômetro, ao comprimento de onda de 600nm. Para o cálculo, utilizou-se o fator de 0,18, obtido pela multiplicação da concentração da proteína padrão ($0,6\text{mg} \times \text{mL}^{-1}$) pelo volume empregado em sua diluição (0,3mL).

$$\text{Conteúdo protéico (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância amostra} - \text{Absorbância branco}}{\text{Absorbância padrão} - \text{Absorbância branco}} \times \text{diluição} \times \text{fator}$$

A atividade específica foi calculada por meio do quociente da atividade (U/mL) pelo conteúdo protéico (mg/mL), sendo expressa em U/mg.

4.6. Ensaio colorimétrico da glicerol quinase

Esse ensaio foi realizado segundo o esquema de reações da Figura 5, com base na técnica descrita por Huang et al. (1997).

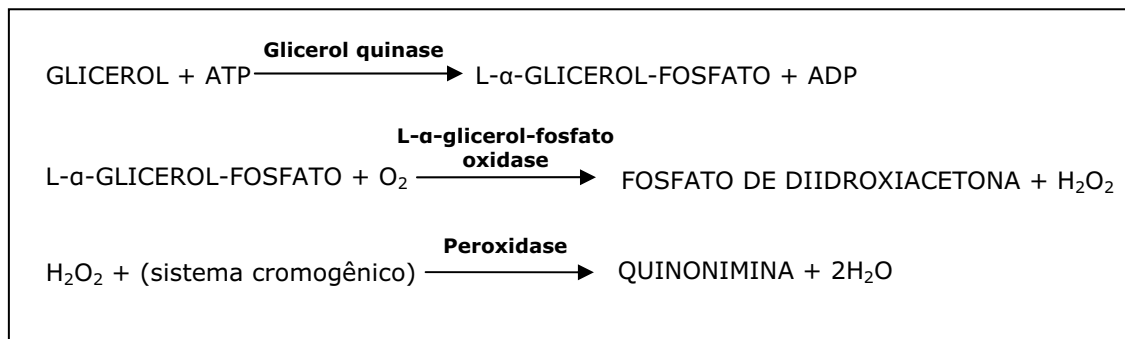


Figura 5 – Seqüência de reações e atividades enzimáticas com formação de quinonimina.

A mistura padronizada para esse ensaio, após a otimização, foi composta por: 70µL de ATP 50mM; 50µL de sulfato de magnésio 0,2M; 500µL de glicerol 0,05M em tampão glicina 0,4M, pH 10,0; 160µL do extrato enzimático diluído 60 vezes em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,2; 150µL de 4-aminoantipirina 0,1%; e 300µL de fenol 0,1%. Essa mistura foi incubada a 60°C, em banho-maria. A reação foi iniciada com a adição

de 100µL (10 unidades) de peroxidase e, após 15 minutos, interrompida com a adição de 300µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%. O volume final da reação foi de 1,63mL. A leitura do composto colorimétrico foi realizada, em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 500nm. Juntamente com a reação, foram feitos o branco enzima (com água destilada em vez de substrato) e o branco substrato (com água em vez das enzimas). Tendo em vista que a peroxidase ainda formava alguma cor com os demais reagentes, fez-se outro branco substrato, contendo a peroxidase, e substituindo-se o extrato com GPO e GK por água. Esse branco foi denominado branco substrato'. Assim, a variação final de absorbância foi feita da seguinte forma, após zerar-se o espectrofotômetro com o branco substrato:

$$\text{Variação da absorbância} = \text{Absorbância}_{\text{Reação}} - \text{Absorbância}_{\text{Branco Substrato}'} - \text{Absorbância}_{\text{Branco Enzima}}$$

Para o cálculo da atividade enzimática, utilizou-se a fórmula:

$$\text{Atividade (U/mL)} = \frac{\text{Variação da Absorbância} \times \text{Volume total da reação}}{\text{Caminho ótico (cm)} \times \text{Tempo (min)} \times \epsilon \times \text{Volume de extrato (mL)}} \times \text{diluição},$$

em que: volume total da reação = 1,63mL,

caminho ótico = 1cm,

tempo = tempo da reação, e

ϵ (absortividade molar da 4-aminoantipirina) = $6,65\text{M}^{-1} \text{L}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Uma unidade (U) de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para a formação de 1µmol de glicerol-3-fosfato, por minuto.

4.7. Temperatura do ensaio

A temperatura ótima foi obtida pela realização de ensaios, nas mesmas condições, variando-se apenas as temperaturas de cada banho-maria, que foram de 40°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C 70°C e 80°C.

Com esses dados, construiu-se o gráfico de Arrhenius, ou seja, $\ln V_{\max}$ em função do inverso da temperatura (em Kelvin). Em seguida, traçou-se a reta tangente nos pontos em que ocorreu acréscimo da atividade enzimática, podendo-se calcular o valor da energia de ativação:

$$\text{Inclinação da reta} = \frac{-E_a}{R},$$

em que: E_a = energia de ativação, e

R (constante universal dos gases) = $8,3145 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$.

4.8. Concentração de substrato

Para a realização desse ensaio, utilizaram-se valores de concentração de glicerol de 5mM, 10mM, 30mM, 50mM, 100mM e 200mM. A concentração final, na reação, variou de 1,5mM a 61mM.

O cálculo dos valores de K_m e $V_{\max}$ foi feito por três métodos, visando-se a uma comparação entre eles: Lineweaver-Burk ($1/v$ versus $1/[S]$), Hanes-Woolf ($[S]/v$ versus $[S]$) e Eadie-Hofstee (v versus $v/[S]$).

Calcularam-se, também, os valores de velocidade, em cada ponto de concentração, plotando-se os dados em um gráfico de regressão não linear, para posterior comparação entre o encontrado experimentalmente e a curva teórica esperada. O cálculo da velocidade, em cada ponto de concentração, foi feito pela fórmula:

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]},$$

em que: [S] é a concentração de substrato, e

$V_{\max}$ e K_m são valores obtidos, anteriormente, pelo método de Lineweaver-Burk.

4.9. Determinação do pH de reação

Para a determinação do pH ótimo de reação, foram realizados ensaios com diversos valores: pH 7,0, pH 8,0 e pH 9,0 (tampão Tris-HCl 0,4M); e pH 9,5, pH 9,8, pH 10,0, pH 10,5 e pH 11,0 (tampão glicina-NaOH 0,4M).

4.10. Diluição do extrato enzimático

O extrato enzimático contendo GPO e GK foi descongelado e diluído em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,2. As diluições foram de 20x, 40x, 60x, 80x, 100x, 125x e 200x.

4.11. Tempo de reação

O tempo de reação iniciou-se no momento em que a peroxidase foi adicionada à mistura de reagentes e terminou quando a reação foi

interrompida com SDS. Os valores de tempo testados foram de 2, 5, 10, 15, 20, 30 e 40 minutos.

4.12. Concentração de peroxidase (PO)

Para a padronização da concentração ideal de peroxidase, na reação, foram realizados ensaios contendo 5,4U, 8,6U, 10,8U, 14U, 16,2U, 18,4U, e 21,6U da enzima.

4.13. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da enzima foi verificada por sua atividade após incubação do extrato, por uma hora, em temperaturas de 30°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C e 60°C. Os valores foram comparados com um controle, em que a enzima se encontrava em temperatura de refrigeração (4°C). Após uma hora, nas diversas temperaturas, o extrato foi diluído, procedendo-se, então, à dosagem.

4.14. Estabilidade ao pH

Nessa etapa, o extrato celular foi armazenado a 30°C, em diferentes valores de pH, por 25 dias, sendo realizadas dosagens de atividade periódicas. Os tampões utilizados foram: tampão citrato 0,01M (pH 5,0 e pH 6,0), tampão Tris-HCl 0,01M (pH 7,0, pH 8,0 e pH 9,0) e tampão glicina-NaOH 0,01M (pH 10,0).

4.15. Estabilidade com uso de conservantes

O efeito de estabilizantes na atividade enzimática foi verificado com a associação do extrato a quatro compostos: azida sódica 0,05%, cloreto de cobalto 10mM, EDTA 0,1M e dextrina tipo I 5%. Os valores obtidos foram comparados com um controle, sem conservantes. O armazenamento dos extratos foi feito a 4°C. As dosagens foram periódicas e, no momento de cada uma, realizou-se a diluição do extrato em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,2.

4.16. Estabilidade do extrato liofilizado com conservantes

Alíquotas do extrato celular foram liofilizadas em associação aos compostos azida sódica 0,05%, cloreto de cobalto 10mM e dextrina tipo I 5% e armazenadas em temperatura de congelamento. O extrato liofilizado foi diluído em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,2, e os ensaios foram feitos, periodicamente, comparados a um controle (também liofilizado, sem adição de conservantes).

4.17. Análise dos dados

Em um primeiro momento, foram realizados experimentos com a finalidade de se determinarem as melhores condições isoladas de ação da enzima glicerol quinase. Nessa fase, os dados considerados neste trabalho apresentaram desvios de até 5%, e os gráficos foram plotados no software OriginPro[®] 7.5 (OriginLab Corporation).

Em uma segunda etapa, as melhores condições para a reação enzimática foram estabelecidas pela metodologia de superfície de resposta (MSR). Os experimentos foram feitos seguindo-se um modelo fatorial, com adição de pontos centrais, em função da temperatura de reação, concentração de substrato e pH do meio (Tabela 4). Realizaram-se 22 experimentos: 16 pontos fatoriais (níveis codificados como (+1) e (-1)) e seis pontos centrais (codificados como 0). A temperatura variou de 46°C a 64°C, a concentração de substrato, de 48 mM a 162 mM, e o pH, de 8,6 a 10,4. O estabelecimento dessas variações foi baseado nos resultados previamente obtidos.

A adição de seis pontos centrais (55°C, 105 mM de substrato e pH 9,5) permitiu observar a curvatura da superfície de resposta, ajustada aos pontos experimentais. Com esse modelo, três níveis de cada fator foram usados, o que possibilitou o ajuste de polinômios de segundo grau aos dados experimentais. Assim, superfícies puderam ser ajustadas a esses dados. Uma diferenciação parcial dessas equações polinomiais foi usada para obtenção dos pontos ótimos, isto é, dos pontos estacionários (CAGULA e SINGH, 1984). No entanto, para cada variável, a identificação das regiões correspondentes às respostas ótimas pôde ser diretamente alcançada por uma análise visual das superfícies de resposta e/ou dos gráficos de contorno.

Os resultados dos 22 experimentos foram analisados por meio do software "StatisticaTM", versão 6 (Statsoft®, Tulsa, EUA). Calcularam-se os efeitos linear e quadrático de cada uma das variáveis independentes sob estudo, assim como suas interações na atividade da glicerol quinase. A significância foi avaliada por análise de variância. A superfície, descrita por uma equação polinomial de segundo grau, foi ajustada aos dados experimentais, sendo o ajuste avaliado pelos coeficientes de determinação R^2 e R^2 ajustado (R_{adj}^2) (CAGULA e SINGH, 1984; HAALAND, 1989). Na prática, é desejável que R^2 seja igual ou superior a 0,75; valores superiores a 0,90 são considerados muito bons (HAALAND, 1989).

Tabela 4 - Modelos experimentais codificados e decodificados

Experimento nº	Réplicas	Matriz codificada			Matriz decodificada		
		Temperatura	[Substrato]	pH	Temperatura (°C)	[Substrato] (mM)	pH
1	1	-1	-1	-1	46	48	8,6
2	1	1	-1	-1	64	48	8,6
3	1	-1	1	-1	46	162	8,6
4	1	1	1	-1	64	162	8,6
5	1	-1	-1	1	46	48	10,4
6	1	1	-1	1	64	48	10,4
7	1	-1	1	1	46	162	10,4
8	1	1	1	1	64	162	10,4
9 (C)	1	0	0	0	55	105	9,5
10 (C)	1	0	0	0	55	105	9,5
11 (C)	1	0	0	0	55	105	9,5
12	2	-1	-1	-1	46	48	8,6
13	2	1	-1	-1	64	48	8,6
14	2	-1	1	-1	46	162	8,6
15	2	1	1	-1	64	162	8,6
16	2	-1	-1	1	46	48	10,4
17	2	1	-1	1	64	48	10,4
18	2	-1	1	1	46	162	10,4
19	2	1	1	1	64	162	10,4
20 (C)	2	0	0	0	55	105	9,5
21 (C)	2	0	0	0	55	105	9,5
22 (C)	2	0	0	0	55	105	9,5

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimização da extração da GK

5.1.1. Otimização das condições de rompimento celular

Microorganismos são fontes de enzimas. As enzimas comerciais são, em sua maioria, extracelulares, e a primeira etapa no seu isolamento é a separação das células da solução. Para enzimas intracelulares, como a estudada no presente trabalho, o primeiro passo envolve a ruptura das células, que liberam suas proteínas em uma solução denominada extrato bruto (GERHARTZ, 1990). Inúmeras técnicas são usadas para extração de enzimas de células e têm como principal objetivo a obtenção da enzima de interesse na maior quantidade possível, consistente com a retenção máxima de sua atividade catalítica. Células microbianas podem ser rompidas, por exemplo, por trituração com areia ou homogeneização com esferas de vidro, que envolve a agitação de uma suspensão de células com pequenas esferas de vidro. Esta última é, provavelmente, a mais utilizada para a obtenção de extratos de levedura, podendo romper até 95% das células, como demonstrado em contrastes de microscopia. Assim, diferentes extratos brutos de levedura seca foram obtidos no presente trabalho e comparados quanto à atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3-PDH), por meio de método ultravioleta. Verificou-se que o rompimento celular em *Bead Beater*, por 30 minutos, segundo padronização de Tininis (2001), foi inadequado, pois apresentou aquecimento exagerado, durante o rompimento das células, promovendo a inativação da enzima. Os resultados obtidos com diferentes tempos de rompimento celular, na faixa de dois a 30 minutos, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Atividade da G3-PDH, em diferentes tempos de arrebetamento celular

Tempo de rompimento (minutos)	Atividade da G3-PDH (U/mL)
2	0,238
5	0,557
10	0,080
20	0,006
30	0,000

Uma grande queda na atividade foi observada com apenas dois minutos de rompimento, em comparação com os dados obtidos por Tininis (2001), utilizando o mesmo procedimento. Decidiu-se, então, intercalar os tempos de rompimento com um minuto de repouso da amostra em banho de gelo, conforme recomendação dos fabricantes do *Bead Beater*, em que o tempo máximo de funcionamento do aparelho é de três minutos. Assim, as células foram rompidas com o tempo recomendado e com o dobro desse tempo, para se ter a certeza do valor da atividade. Os dados obtidos com esse experimento estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Atividade da G3-PDH, em diferentes tempos de rompimento

Tempo de rompimento (minutos)	Atividade da G3-PDH (U/mL)
3 x 1	1,11
6 x 1	0,80

Conforme se observa, a atividade permaneceu baixa, comparada com os dados de 2,0-2,5U/mL, obtidos por Tininis (2001), motivo que levou a uma adaptação de uma peça do *Bead Beater*, realizando-se, em seguida, um novo teste de tempo de rompimento (Tabela 7).

Tabela 7 – Atividade da G3-PDH, em diferentes tempos de rompimento, com peça do *Bead Beater* adaptada

Tempo de rompimento (minutos)	Atividade da G3-PDH (U/mL)	% de rompimento ^(a)
3 x 1	1,110	15
4 x 1	1,110	29
5 x 1	1,75	38,9
7 x 1	1,91	52,4

^(a) Número de células rompidas em relação ao número total de células contadas (intactas + rompidas).

De acordo com os dados, optou-se por utilizar, na seqüência do trabalho, o tempo de sete minutos, intercalados por um minuto de repouso, em banho de gelo. Não foram realizados testes com tempos superiores a esse, uma vez que a curva atingiu a fase estacionária (Figura 6) com uma atividade da G3-PDH satisfatória (1,91 U/mL), evitando-se, assim, o desgaste do *Bead Beater* pelo uso prolongado.

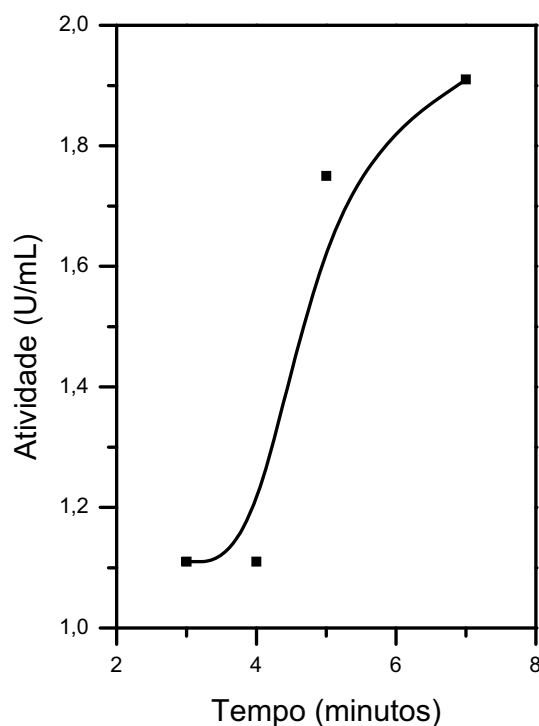


Figura 6 – Curva de tempo de rompimento celular.

5.1.2. Teste com fermentos

Dosou-se a atividade da G3-PDH de fermentos biológicos instantâneos (Mauri[®]) para massas salgada e doce. O valor da atividade foi de 1,03U/mL, em fermento para massa doce, e, para massa salgada, de 1,75U/mL. Dessa forma, optou-se por utilizar este último para os procedimentos de extração da GK.

5.1.3. Precipitação com sulfato de amônio e PEG, na obtenção do extrato enzimático

Após as etapas preliminares, a preparação enzimática, de modo geral, é ainda relativamente impura. Comumente, o extrato é submetido a tratamentos que separam as proteínas em diferentes frações, de acordo uma de suas propriedades, tais como tamanho ou carga. Etapas iniciais dessa separação, em uma purificação, baseiam-se, principalmente, em diferenças na solubilidade das proteínas, no pH, temperatura e concentração salina (WHITAKER, 1972; NELSON e COX, 2004). De acordo com dados da literatura (GERHARTZ, 1990), a precipitação pode ser promovida por:

- Sais ⇒ altas concentrações de sais atuam sobre as moléculas de água (água de hidratação) ao redor da proteína, removendo-as e alterando a força eletrostática responsável pela solubilidade, que é, então, diminuída (*salting-out*). A adição de um sal, na quantidade correta, pode, seletivamente, precipitar algumas proteínas, enquanto outras permanecem em solução. O fracionamento salino de enzimas ocorre numa faixa limitada, pelo uso de diferentes concentrações de sais: baixas concentrações precipitam algumas proteínas não desejadas, que são

descartadas, e a adição de altas concentrações precipita a proteína desejada. Ex.: sulfato de amônio.

- Polímeros $\Rightarrow$ apresentam mecanismo de atuação similar ao dos solventes orgânicos, com alteração no efeito de solvatação das moléculas de água ao redor das proteínas (água de hidratação). A maioria das enzimas é precipitada em concentrações de polímeros entre 15% e 20%. Ex.: polietilenoglicol de diferentes massas moleculares.

No entanto, apenas a purificação não é um procedimento suficiente para a retirada de todo e qualquer interferente existente no extrato. Por exemplo, por meio da diálise, podem-se separar as proteínas dos solventes, com beneficiamento do tamanho maior das proteínas. Nesse caso, o extrato parcialmente purificado é colocado em um saco de membrana semipermeável, que, ao ser suspensa em solução tampão de força iônica apropriada, permite troca (difusão) de solutos de baixo peso molecular e tampão, mas não das proteínas (retidas no interior do saco). Isso permite que a concentração desses solutos, na preparação da proteína, se altere até que se atinja o equilíbrio com a solução fora da membrana (NELSON e COX, 2004).

Assim, neste trabalho, realizaram-se tentativas de purificação de glicerol quinase a partir de extrato celular bruto de levedura de panificação (fermento seco), com precipitação com sulfato de amônio e polietilenoglicol, após o rompimento celular com esferas de vidro e precipitação com sulfato de estreptomicina. Os resultados estão demonstrados na Tabela 8. Os tratamentos foram comparados quanto à atividade e proteína, sendo o melhor deles aquele obtido com emprego de solução de PEG 3350.

De acordo com Torres (2001), a atividade específica é uma medida habitualmente utilizada como parâmetro de comparação com outras preparações e com etapas posteriores do processo de purificação.

Tabela 8 – Valores de proteína e atividade, por etapa de obtenção do extrato celular

Etapa	Atividade (U/mL)	Atividade Total (U)	Proteína (mg/mL)	Proteína Total (mg)	A.E.** ($\times 10^{-3}$ U/mg)	A.E.** Relativa
Extrato Bruto	0,003	0,18	13,17	790,2	0,2	1
Estreptomicina	0,009	0,48	14,41	763,73	0,6	3
Sulfato de Amônio 0-35%*	0,005	0,28	11,45	641,2	0,4	2
Sulfato de Amônio 35-60%*	0,034	1,77	9,43	490,36	3,6	18
Precipitado	0,744	2,81	28,7	108,486	25,9	129,5
Extrato Bruto	0,003	0,17	12,82	743,56	0,2	1
Estreptomicina	0,008	0,40	13,95	697,5	0,5	2,5
PEG*	0,015	1,38	4,85	446,2	3,2	16
Precipitado	0,698	4,00	15,7	90,118	44,4	222

* Dosagem do sobrenadante.

**A.E. = Atividade Específica.

A atividade específica relativa demonstra a eficácia do processo de purificação. Nota-se que a precipitação com PEG foi escolhida como a melhor condição de precipitação, pois apresentou um fator de purificação de 222 vezes em relação ao extrato bruto, contra, aproximadamente, 130 vezes quando o mesmo foi precipitado com sulfato de amônio.

5.2. Obtenção de peroxidase do rabanete

As peroxidases de origem vegetal têm sido citadas na literatura, principalmente em estudos de purificação e cinética, bem como suas diferentes propriedades, conforme a fonte enzimática (NEVES e LOURENÇO, 1985; VALDERRAMA et al., 2001). Neste trabalho, a fonte de peroxidase foi o extrato de rabanete.

Os substratos mais utilizados para os ensaios das peroxidases são os compostos fenólicos — p-cresol, guaiacol, resorcinol, etc. — ou aminas aromáticas — anilina, o-dianisidina, o-fenilediamina, etc. Nesta pesquisa, a o-dianisidina foi o substrato usado para medidas de atividade da

peroxidase. Foram feitas duas extrações de peroxidase, com suas respectivas dosagens, como pode ser observado na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores de proteína e atividade dos extratos de peroxidase utilizados

	Extrato 1	Extrato 2
Atividade (U/mL)	122	108,3
Proteína (mg/mL)	2,7	2,5
A.E.* (U/mg)	45,185	43,32

*A.E. = Atividade Específica.

5.3. Ensaio colorimétrico da glicerol quinase (GK)

A atividade da glicerol quinase foi realizada num sistema de tripla reação enzimática, envolvendo, além dessa enzima, a glicerol fosfato-oxidase e a peroxidase. Essas reações podem sofrer interferências associadas a fatores, como concentração de enzimas, inibição enzimática pelos reagentes de coloração e parâmetros ambientais (temperatura, pH, etc.).

Estudaram-se as condições do ensaio de dosagem de glicerol quinase com o intuito de otimizar a dosagem enzimática, com base em adaptações de técnica colorimétrica descrita por Huang et al. (1997). As curvas e os valores ótimos de cada parâmetro estão apresentados a seguir.

5.3.1. Temperatura do ensaio

As velocidades das reações enzimáticas aumentam com a elevação da temperatura, até atingir a maior velocidade. Temperaturas elevadas

aumentam a velocidade da reação enzimática, por intensificar a energia cinética das moléculas componentes do sistema e a probabilidade de choques efetivos entre elas. No entanto, temperaturas mais altas levam à desnaturação da enzima, ou seja, à perda de sua atividade catalítica, por alterarem as ligações químicas que mantêm sua estrutura tridimensional (TORRES, 2001).

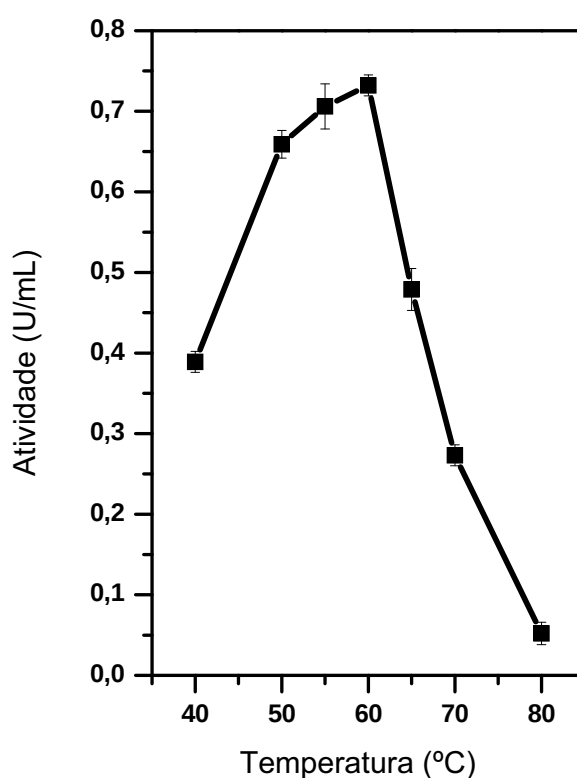


Figura 7 – Efeito da temperatura sobre a atividade da glicerol quinase.

Na Figura 7, observa-se que a temperatura ótima para o ensaio da GK foi de 60°C. A partir desse ponto, nota-se clara diminuição da atividade, por possível desnaturação da enzima. A temperatura ótima encontra-se dentro da faixa ótima estudada por Huang et al. (1997), em GK de *Thermus flavus*, que foi entre 50°C e 70°C.

A reta tangente foi traçada no gráfico de Arrhenius (Figura 8), apenas nos pontos crescentes de atividade enzimática (40°C a 60°C),

possibilitando o cálculo da energia de ativação, que foi de 28,84KJ mol⁻¹ (6,89Kcal mol⁻¹).

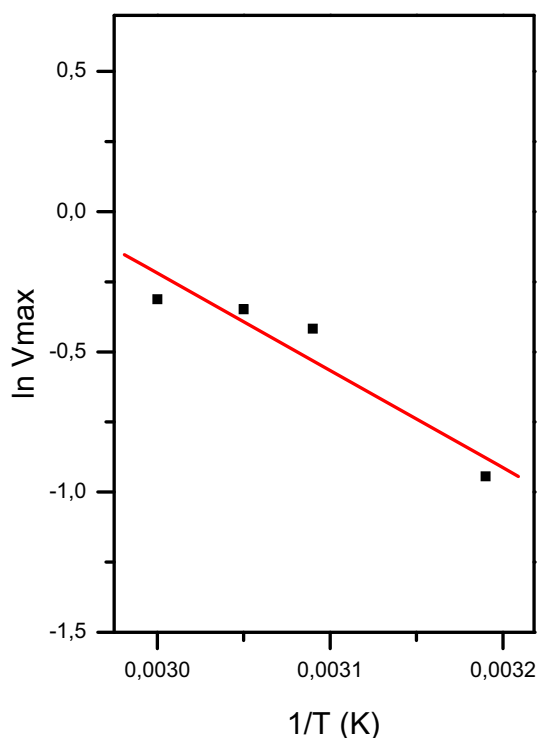


Figura 8 – Gráfico de Arrhenius. Equação da reta tangente nos pontos em que há aumento da atividade: $y = -3468,93 \cdot x + 10,187$.

5.3.2. Concentração de substrato

O substrato utilizado para a reação de dosagem da glicerol quinase foi o glicerol. A Figura 9 mostra a atividade da GK em relação à concentração de substrato. O aumento inicial da atividade deve-se, provavelmente, à maior interação entre substrato e enzima. Essa interação vai diminuindo devido à redução da concentração de enzima livre no meio de reação, na formação do complexo enzima-substrato e do subsequente produto.

A atividade demonstra linearidade até a concentração de 50mM de glicerol, com coeficiente de correlação linear de 0,97, ponto considerado ótimo para o ensaio. Observando-se o comportamento da atividade enzimática em relação ao aumento da concentração do substrato, pode-se afirmar que a glicerol quinase obedece à cinética michaeliana.

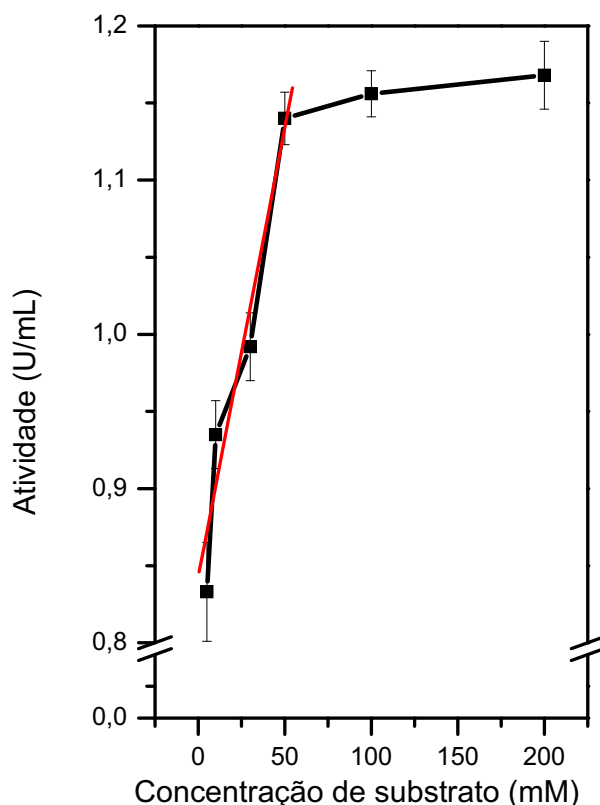


Figura 9 – Efeito da concentração de glicerol sobre a atividade da glicerol quinase.

A constante K_m , ou constante de Michaelis, é a concentração de substrato à qual corresponde uma velocidade igual à metade da máxima (TORRES, 2001). A partir dos métodos de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eadie-Hofstee (Figuras 10-12), calcularam-se os valores da constante de Michaelis (K_m) e da velocidade máxima da reação (V_{max}), com o glicerol como substrato da GK. Tais valores estão mostrados na Tabela 10.

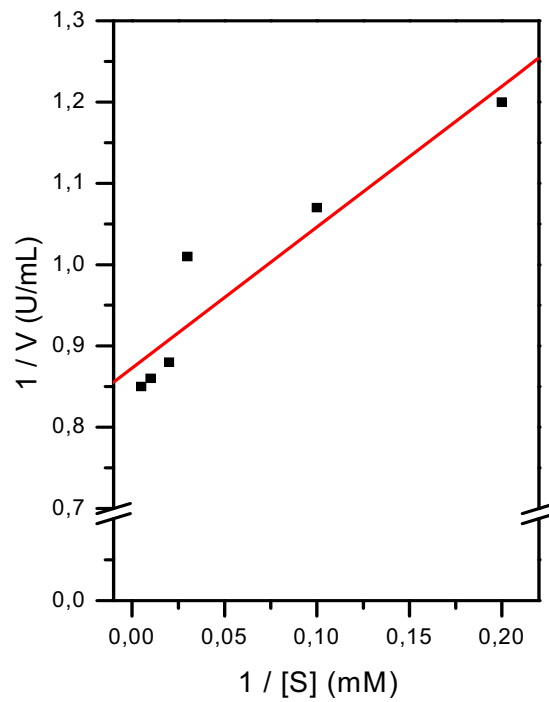


Figura 10 – Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk. Equação da reta entre os pontos: $y = 1,734 \cdot x + 0,873$ ($R = 0,94$).

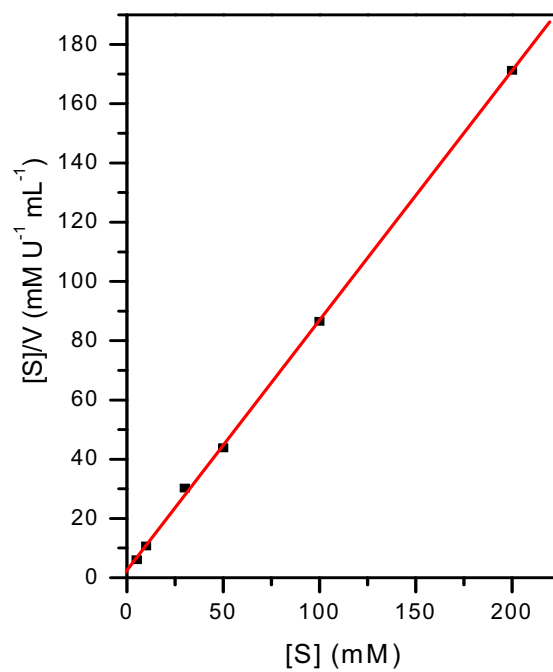


Figura 11 – Gráfico de Hanes-Woolf. Equação da reta entre os pontos: $y = 0,842 \cdot x + 2,6198$ ($R = 0,999$).

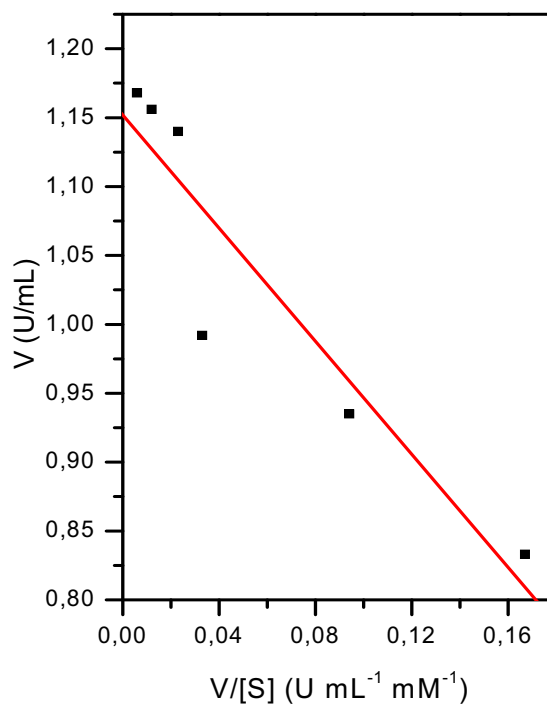


Figura 12 – Gráfico de Eadie-Hofstee. Equação da reta entre os pontos: $y = -2,052 \cdot x + 1,1519$ ($R = -0,932$).

Nota-se que os valores de K_m e $V_{\max}$ foram muito próximos, principalmente entre os métodos de Lineweaver-Burk e de Eadie-Hofstee. Por Hanes-Woolf, os valores foram pouco superiores, comparados aos outros cálculos.

Esse comportamento é normalmente observado quando os erros experimentais que afetam a velocidade são pequenos (LESKOVAC, 2004).

Tabela 10 – Valores de K_m e $V_{\max}$, calculados pelos diferentes métodos

	Lineweaver-Burk	Hanes-Woolf	Eadie-Hofstee
K_m	1,99 mM	3,11 mM	2,05 mM
$V_{\max}$	1,14 U/mL	1,19 U/mL	1,15 U/mL

Na literatura, não há dados de GK em *S. cerevisiae* que permitam comparações dos resultados obtidos. No entanto, o valor de K_m encontrado, embora seja alto quando comparado a diversos estudos, esteve abaixo daqueles observados por Nilsson et al. (1989), em *Debaryomyces hansenii*, em que o K_m foi próximo de 5mM. Janson e Cleland (1974) verificaram, em *Candida mycoderma*, outra levedura, um K_m igual a 15 μ M.

Na Figura 13, em que os dados experimentais e os esperados (teóricos) se correlacionam, observa-se alta fidelidade.

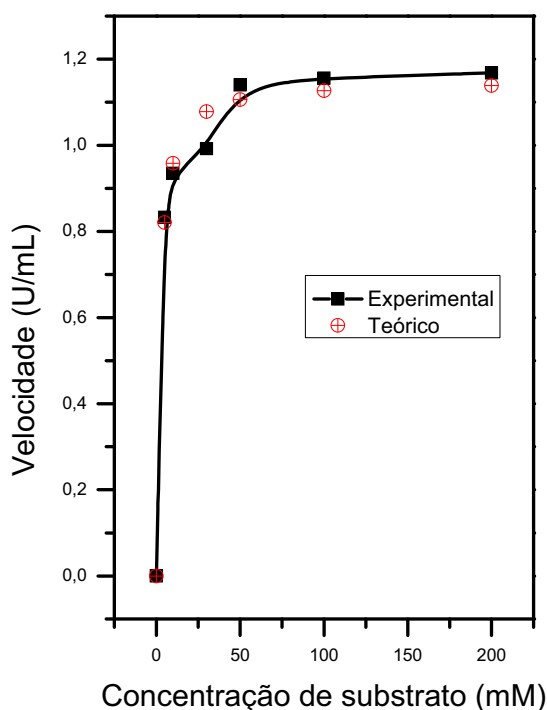


Figura 13 – Valores teóricos e experimentais correlacionados.

5.3.3. Determinação do pH de reação

A maioria das enzimas apresenta um valor de pH para o qual a sua atividade é máxima. Assim, a velocidade da reação diminui à medida que

o pH se afasta desse valor ótimo. A influência do pH sobre a catálise enzimática é exercida sobre os grupos dissociáveis de vários aminoácidos. Alguns desses grupos podem fazer parte do sítio ativo ou ser importantes na manutenção da estrutura espacial da molécula (TORRES, 2001).

A Figura 14 mostra o pH ótimo da GK igual a 10,0. Os valores nos pontos de pH igual a 7 e 8 não foram mostrados por serem negativos, em decorrência do cálculo, em que o branco enzima e o branco substrato são subtraídos da reação.

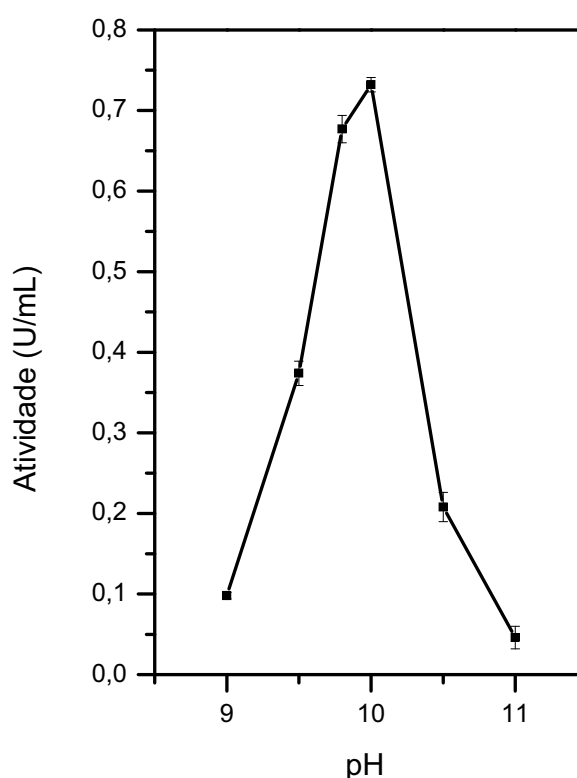


Figura 14 – Efeito do pH sobre a atividade da glicerol quinase.

O valor obtido para GK de *S. cerevisiae* é próximo daqueles encontrados por Huang et al. (1997) para a GK de *Thermus flavus*, que foi entre 9,0 e 9,5, e por Hayashi e Lin (1967), de pH 9,8 em *E. coli*.

No entanto, o pH ótimo foi superior ao da GK de *Debaryomyces hansenii* — que esteve entre 7,0 e 8,0 (NILSSON et al., 1989) — e de

Trypanosoma brucei — de pH 8,5 (STEINBORN et al., 2000) e 8,0 (KRÁLOVÁ et al., 2000) —, além da GK de bactérias lácticas *Pediococcus pentosaceus*, cujo pH ótimo foi 7,0 (PASTERIS e STRASSER DE SAAD, 1998).

5.3.4. Diluição do extrato enzimático

Na Figura 15, observa-se que o melhor valor de diluição do extrato enzimático foi de 60x, com um coeficiente de correlação linear igual a 0,98.

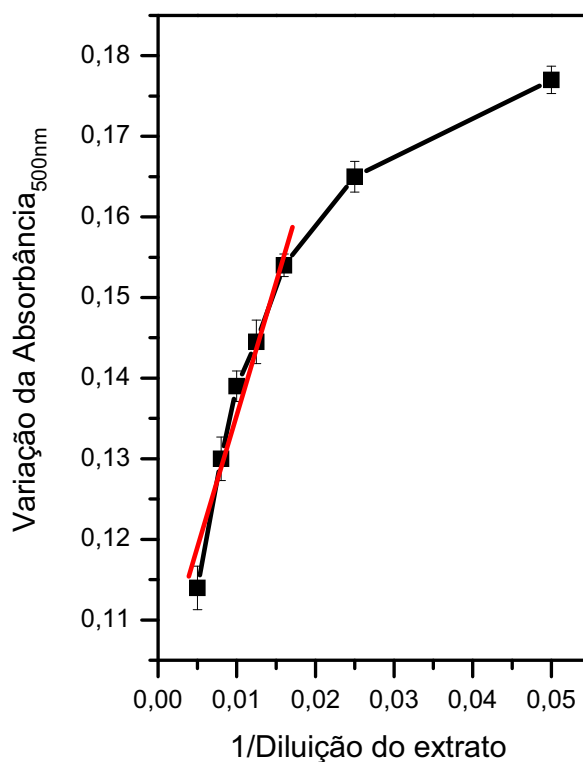


Figura 15 – Efeito da diluição do extrato enzimático sobre a atividade da glicerol quinase.

5.3.5. Tempo de reação

A faixa linear do ensaio não deve ser maior que 15 minutos, pois, a partir desse ponto, não existe uma correlação linear (0,96) entre as variações de absorbância e tempo de reação (Figura 16).

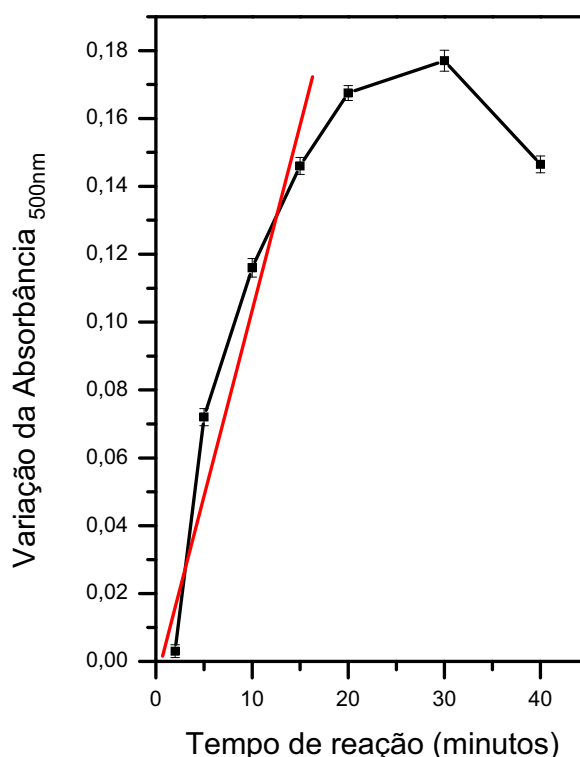


Figura 16 – Efeito do tempo de reação sobre a atividade da glicerol quinase.

5.3.6. Concentração de peroxidase (PO)

A atividade da GK mostrou-se linear até uma concentração de peroxidase igual a 10,8U, em um volume de 100μL de extrato, com um coeficiente de correlação linear igual a 0,99 (Figura 17).

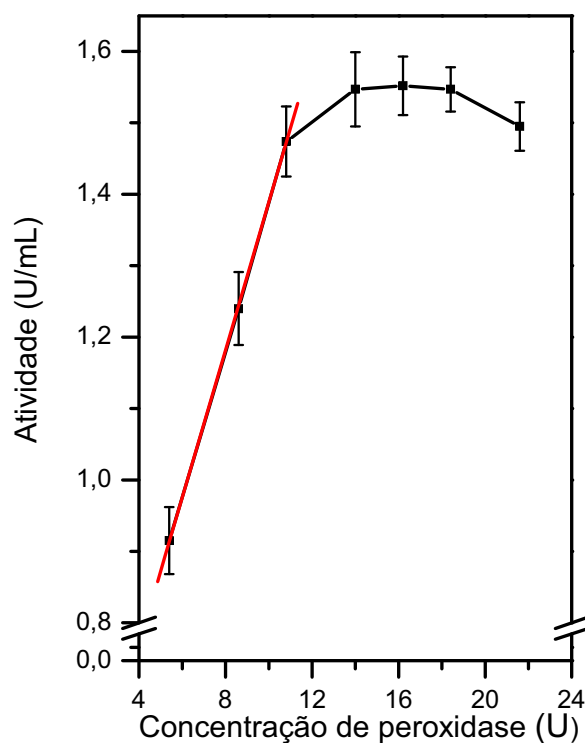


Figura 17 – Efeito da concentração da peroxidase sobre a atividade da glicerol quinase.

5.3.7. Estabilidade térmica

Extratos enzimáticos foram submetidos à elevação da temperatura (de 0°C a 60°C), por 60 minutos. A Figura 18 contém o gráfico de estabilidade térmica da GK. Observa-se que a atividade da enzima é favorecida pelo aumento da temperatura até 50°C, passando a sofrer queda da atividade já com 55°C.

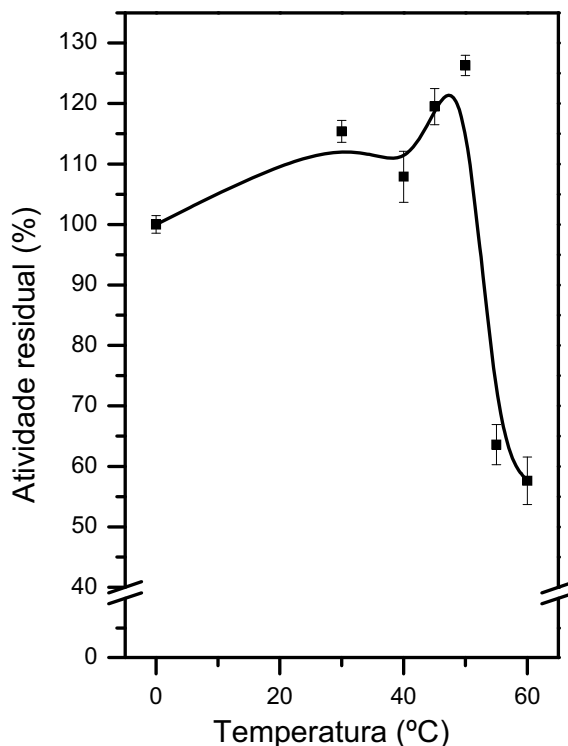


Figura 18 – Estabilidade da atividade da glicerol quinase, durante estocagem por uma hora, em diferentes temperaturas.

Observando-se a tendência de queda da atividade residual, a T_{50} (temperatura em que a enzima perde metade de sua atividade), em 60 minutos de incubação, seria acima de 60°C. Esse valor é superior ao intervalo de 50°C a 55°C, encontrado por Koga et al. (2001), em GK de *E. coli*, em 20 minutos de incubação.

Em *Pyrococcus kodakaraensis*, Koga et al. (1998) clonaram o gene da GK e expressaram-no em *E. coli*, verificando uma T_{50} de 100°C para a enzima. Os mesmos autores, em 2001, observaram valor de T_{50} por volta de 95°C, em GK de *Thermococcus kodakaraensis*. Sakasegawa et al. (2001), estudando a GK de *Flavobacterium meningosepticum*, obtiveram a T_{50} de 69°C.

5.3.8. Estabilidade em diferentes valores de pH

Ensaio de estabilidade da GK foram realizados em diferentes valores do pH (5-10), demonstrando ser ela uma enzima de alta estabilidade (Figura 19). No entanto, no período analisado, vê-se que a GK é mais estável em valores próximos da neutralidade (pH 7,0). À medida que o pH se afasta desse valor, nota-se uma diminuição da atividade enzimática.

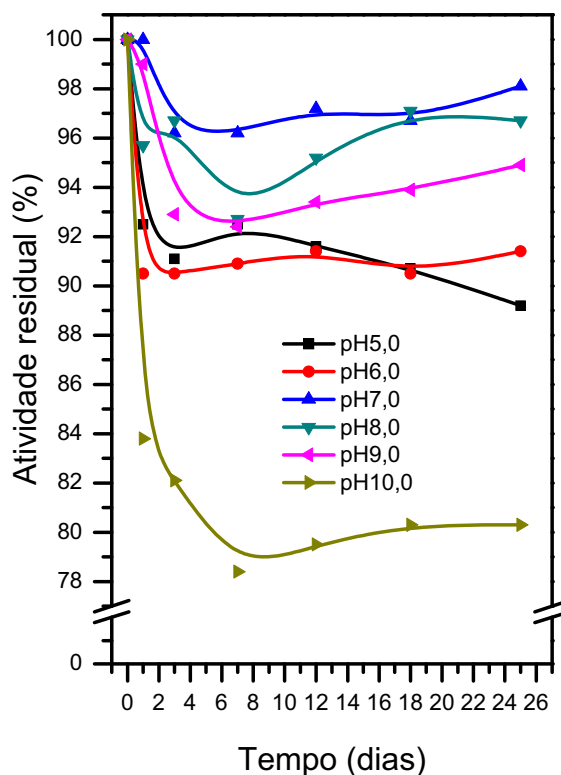


Figura 19 – Estabilidade da atividade da glicerol quinase em diferentes valores de pH.

Crans e Whitesides (1985) observaram que a GK obtida de *S. cerevisiae* preservou menos de 20% da atividade da enzima, após 24 horas em pH 7,5 e a 4°C, sendo que apenas a imobilização da mesma fez com que não houvesse perda da atividade, por seis meses, a 4°C. Os

dados obtidos neste trabalho contrariam os encontrados pelos autores, mostrando que a enzima é muito estável nesse pH e a essa temperatura, por até 25 dias. Isso pode ser decorrente de diferenças nos procedimentos utilizados para a obtenção do extrato celular.

5.3.9. Estabilidade na presença de conservantes

Alguns estabilizantes de atividade enzimática são citados na literatura. Segundo Leskovac (1998), a azida de sódio, adicionada sobre o extrato enzimático, atua na preservação de atividade de diversas enzimas.

A influência que os conservantes empregados possuem sobre a GK pode ser observada na Figura 20. Nota-se grande queda da atividade enzimática quando se empregou o EDTA, especialmente após o vigésimo dia a 4°C.

O cloreto de cobalto e azida sódica mostraram-se os mais eficientes meios para conservação da atividade da GK.

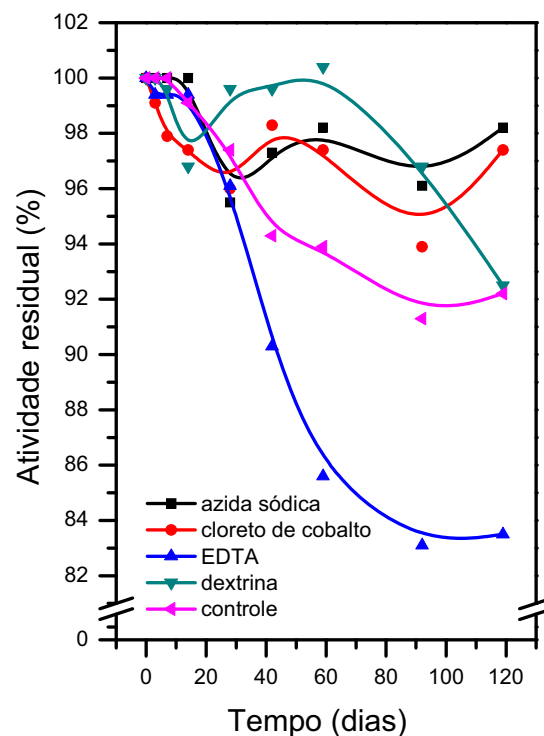


Figura 20 – Efeito do uso de conservantes na estabilidade da glicerol quinase.

5.3.10. Estabilidade do extrato liofilizado com conservantes

Não houve perda significativa da atividade da glicerol quinase contida nos extratos liofilizados (com ou sem conservantes), por até oito meses de estocagem, em temperatura de congelamento.

5.4. Modelagem de superfície de resposta

A metodologia de superfície de resposta (MSR) consiste em um conjunto de modelos matemáticos e estatísticos, desenvolvidos para

explicar fenômenos e encontrar combinações de um número de fatores (variáveis) experimentais que levam a uma otimização das respostas. Com a MSR, diversas variáveis são testadas, simultaneamente, com um número mínimo de tentativas, de acordo com modelos experimentais especiais, o que permite encontrar interações entre as variáveis (CAGULA e SINGH, 1984; MONTGOMERY, 1991).

Os efeitos significantes da temperatura (T), concentração inicial de substrato (S), valores de pH e interações (T x pH) e (S x pH), na atividade da glicerol quinase, são mostrados na Tabela 11.

A temperatura mostrou efeitos significantes na atividade enzimática, tanto em nível linear quanto quadrático. Um efeito quadrático negativo indicou que a ação da temperatura, na atividade da GK, pode ser descrita por uma superfície convexa. Além disso, o aumento da concentração de substrato e do pH da reação foi acompanhado de um aumento linear na atividade da GK (efeitos lineares positivos). Não foram observados efeitos significantes de S ou pH, em níveis quadráticos.

Tabela 11 - Efeitos estimados dos fatores temperatura (T), concentração de substrato (S) e pH, em níveis lineares (L) e quadráticos (Q), e as respectivas interações, na atividade da glicerol quinase

Fator/Interação	Efeito	p valor
Temperatura (L)	-0,1734	0,0000
Temperatura (Q)	-0,7773	0,0000
Substrato (L)	0,0646	0,0006
pH (L)	0,4386	0,0000
T x pH	-0,2516	0,0000
S x pH	0,0279	0,0802

Interações significantes — negativa, entre T e pH (T x pH), e positiva, entre S e pH (S x pH) — foram observadas. O aumento simultâneo da temperatura e do pH leva a uma diminuição da atividade

enzimática. Reciprocamente, um aumento simultâneo em S e pH é acompanhado por aumento da atividade da enzima. Porém, nenhuma interação significativa entre T e S (T x S) foi verificada.

Os dados experimentais podem ser descritos pelo seguinte modelo polinomial de segundo grau:

$$\text{Atividade} = -23,6088 + 0,6665 T - 0,0048 T^2 - 0,0020 S + 1,0754 \text{ pH} - 0,0156 (T \times \text{pH}) + 0,0003 (S \times \text{pH}),$$

em que: a atividade é expressa em U/mL,

T é a temperatura (°C), e

S é a concentração de substrato (mM).

Nessa equação, foram considerados apenas fatores e interações mostrando efeitos significantes de $p \leq 0,5$, ou possuindo um intervalo de confiança menor que o valor do efeito ou menor que o desvio padrão (dados não mostrados). De fato, esses efeitos possuem uma baixa probabilidade de ocorrência, mas seus valores não são baixos o suficiente para serem negligenciados (HAALAND, 1989).

Este modelo apresentou altos valores de R^2 (0,9928) e R^2_{adj} (0,9899), indicando que ele explica mais de 99% da variabilidade dos dados experimentais. Espera-se, assim, uma relação próxima entre os resultados experimentais e os valores teóricos preditos (HAALAND, 1989; WEISBERG, 1985). Essa correlação é ilustrada na Figura 21.

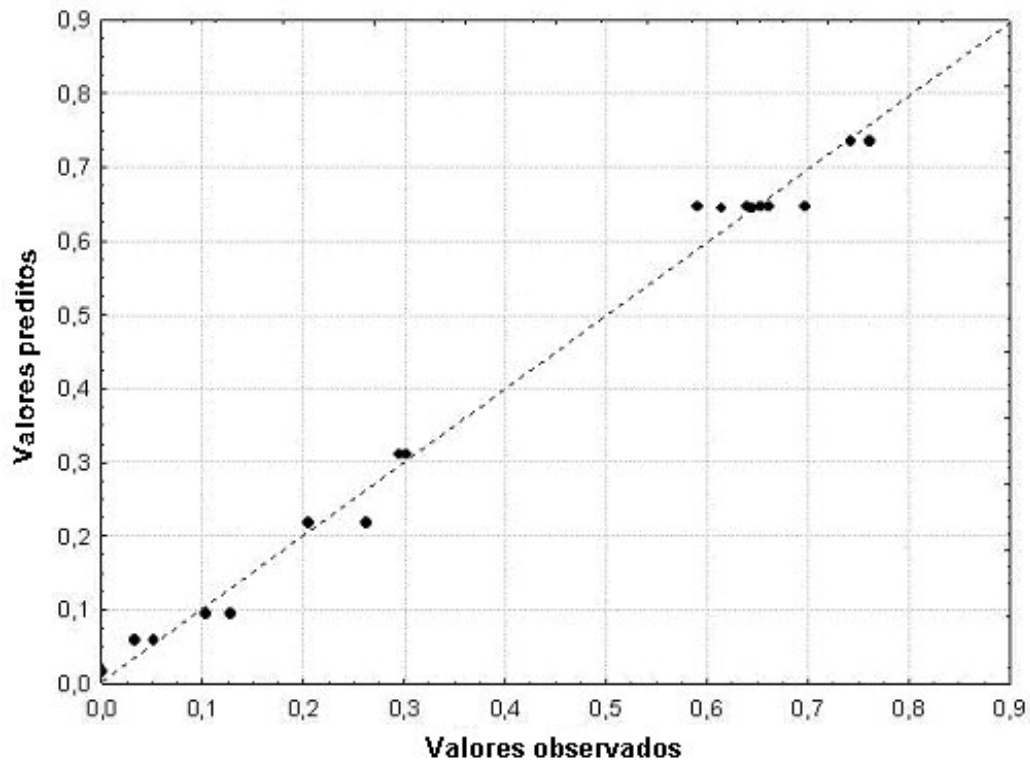
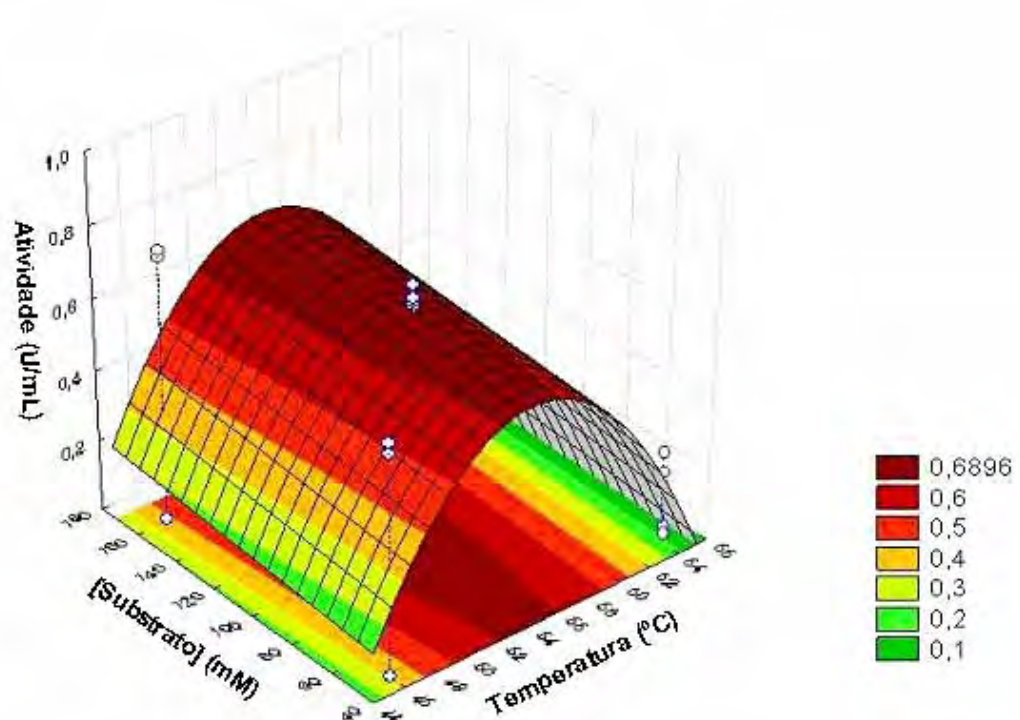


Figura 21 - Relação linear entre valores experimentais e valores preditos correspondentes, pelo modelo polinomial de segundo grau.

Este modelo é descrito por uma superfície do tipo sela (*saddle-like surface*). Uma vez que três variáveis (fatores) foram consideradas, a resposta situa-se em uma quarta dimensão, representada por duas superfícies de três dimensões, em função de duas das três variáveis, mantendo-se a terceira variável constante e igual ao seu valor de ponto central (Figura 22). Superfícies do tipo sela não possuem um único ponto estacionário (máximo), mas, sim, são caracterizadas por possuírem um conjunto de pontos que maximizam a resposta. Nesse caso, a análise dos gráficos de contorno foi útil para se encontrarem as melhores regiões no domínio experimental (Figura 23). Os valores máximos de atividade são obtidos em temperatura entre 52°C e 56°C, pH por volta de 10,2-10,5 e concentração de substrato de 150 a 170 mM.

A



B

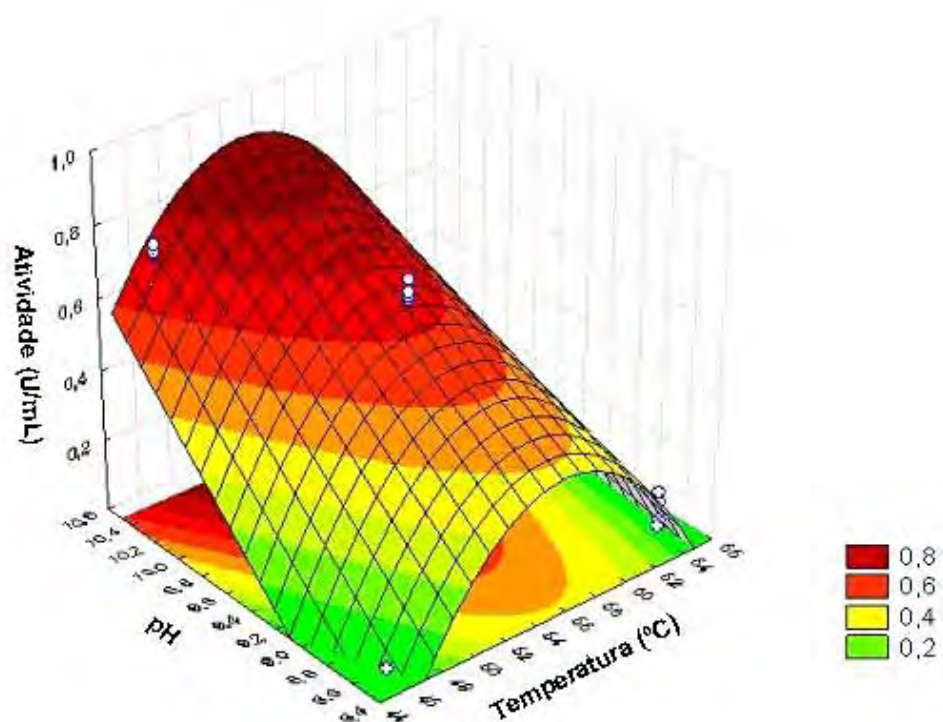


Figura 22 – Superfície de resposta ajustada aos pontos dos dados experimentais correspondentes à atividade da glicerol quinase, em função da temperatura e concentração de substrato inicial e em pH 9,5 (A) e em função de temperatura e pH e em concentração inicial de substrato de 105mM (B).

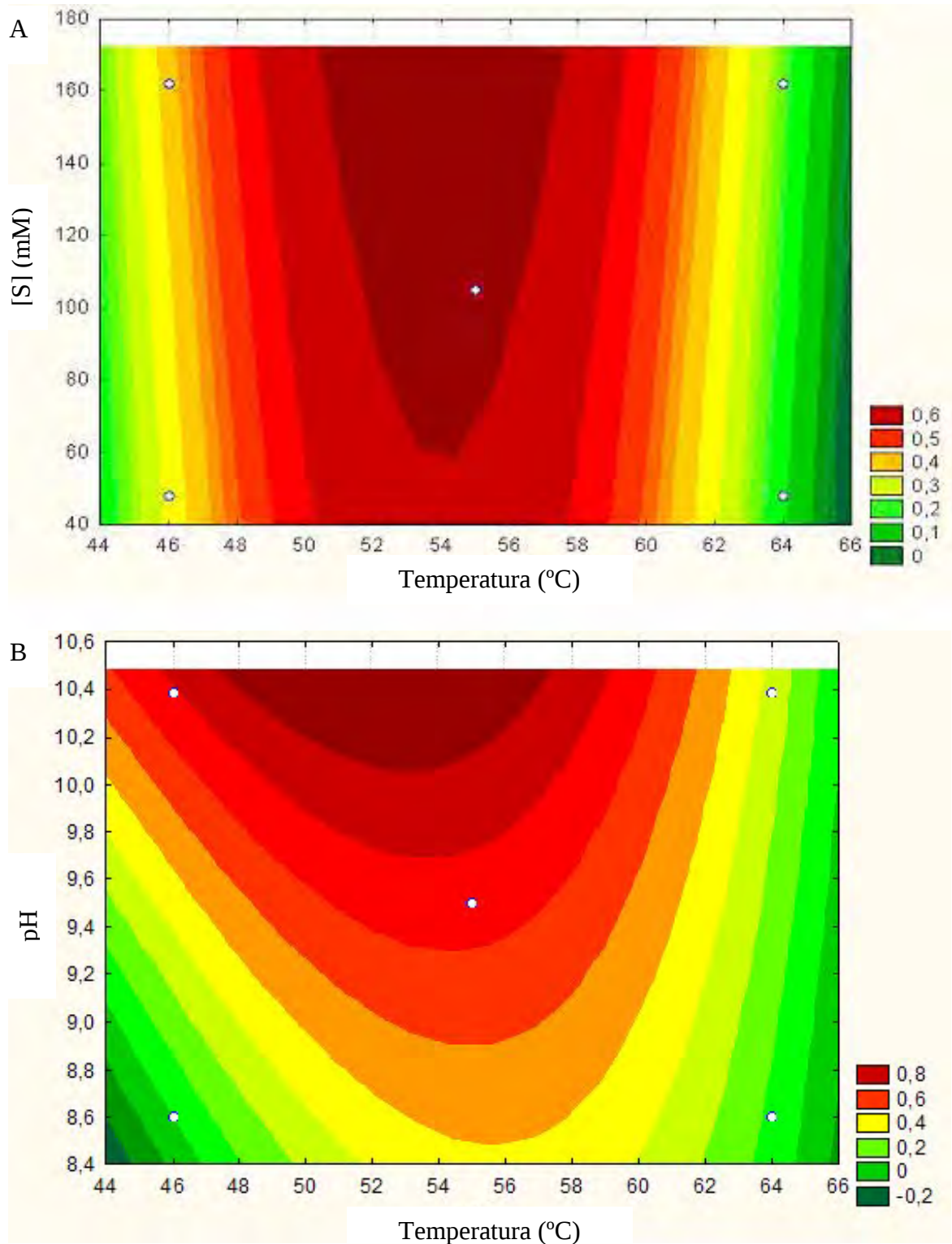


Figura 23 - Gráficos de contorno das superfícies de resposta apresentadas na Figura 22, em função da temperatura e concentração de substrato inicial e em pH 9,5 (A) e em função de temperatura e pH e em concentração inicial de substrato de 105mM (B).

6. CONCLUSÕES

O método proposto, que utiliza o fermento de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) como fonte enzimática da GK e da GPO, mostrou-se satisfatório para a dosagem da glicerol quinase. Essa enzima apresentou melhor atividade, quando precipitada com uso de polietilenoglicol 3350, e ótima estabilidade, principalmente quando o extrato foi liofilizado.

No entanto, na tentativa de dosagem de glicerol, em amostras, esse método sofreu interferência de diversos fatores, que vão desde a impureza dos extratos utilizados até os compostos presentes naturalmente nessas amostras. Assim, fazem-se necessários estudos envolvendo a purificação dessas enzimas, para uma seguinte etapa de dosagem colorimétrica de glicerol, em diferentes amostras, com baixo custo e ampla aplicação industrial.

A metodologia de superfície de resposta mostrou-se um adequado meio para modelagem e otimização das condições da reação, maximizando a atividade da enzima glicerol quinase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEUDEKER, R. F.; VAN DAM, H. W.; VAN DER PLAAT, J. B.; VELLENGA, K. Developments in baker's yeast production. In: VERACHTERT, H.; DEMOT, R. **Yeast biotechnology and biocatalysis**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 103-146.

BLOMBERG, A.; ADLER, L. Physiology of osmotolerance in fungi. **Adv. Microbiol. Physiol.**, v.33, p.145-212, 1992.

BOEHRINGER MANNHEIM. Biochemica. Methods of enzymatic bioanalysis and food analysis: using test-combinations. In:_____. **Glycerol**. Mannheim: Boehringer Mannheim GmbH, 1997. p.62-66.

BRENDA. **Enzyme database**. Disponível em: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>. Acesso em: 21 maio 2008.

BRISSON, D.; VOHL, M.C.; ST-PIERRE, J.; HUDSON, T.J.; GAUDET, D. Glycerol: a neglected variable in metabolic processes? **BioEssays**, v.23, p.534-542, 2001.

CAMARGO, L. A. **Glicerol-3-fosfato oxidase em levedura de panificação**. 2007. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2007.

CAÑIZARES, P.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Flow-through spectrofluorimetric sensor for the determination of glycerol in wine. **Analyst**, v.120, p.2837-2840, 1995.

CISTERNAS, J.R.; VARGA, J.; MONTE, O. **Fundamentos de bioquímica experimental**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p.160-166.

COMPAGNONE, D.; ESTI, M.; MESSIA, M.C.; PELUSO, E.; PALLESCHI, G. Development of a biosensor for monitoring of glycerol during alcoholic fermentation. **Biosens. Bioelectron.**, v.13, p.875-880, 1998.

COPELAND, R. A. **Enzymes:** a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 2000. 397p.

CRANS, D.C.; WHITESIDES, G.M. Glycerol kinase: synthesis of dihydroxyacetone phosphate, *sn*-glycerol-3-phosphate, and chiral analogues. **J. Am. Chem. Soc.**, v.107, n.24, p.7019-7027, 1985.

DEUTSCHER, J.; SAUERWALD, H. Stimulation of dihydroxyacetone kinase and glycerol activity in *Streptococcus faecalis* by Phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation catalyzed by Enzyme I and HPr of the phosphotransferase system. **J. Bacteriol.**, v.166, n.3, p.829-836, 1986.

FERNANDES, E.N.; MOURA, M.N.C.; LIMA, J.L.F.C.; REIS, B.F. Automatic flow procedure for the determination of glycerol in wine using enzymatic reaction and spectrophotometry. **Microchem. J.**, v.77, p.107-112, 2004.

FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clin. Chem.**, v.28, n.10, p.2077-2080, 1982.

GACULA JR., M.C.; SINGH, J. Response surface designs and analysis. In:_____. **Statistical methods in food and consumer research:** Food Science and Technology. New York: Academic Press, 1984. p. 214.

GERHARTZ, W. General production methods. In:_____. **Enzymes in industry:** production and applications. Weinheim: VCH, 1990. cap. 3. p. 43-53.

GERSHON, H.; GERSHON, D. The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for aging research: a critical review. **Mech. Ageing Dev.**, v.120, p.1-22, 2000.

GOLD ANALISA DIAGNÓSTICA. Kit para determinação dos triglicérides por metodologia enzimática-colorimétrica. Disponível em: <http://www.goldanalisa.com.br/produtos>. Acesso em: 20 mar. 2008.

GRAUSLUND, M.; LOPES, J.M.; RONNOW, B. Expression of GUT1, which encodes glycerol kinase in *Saccharomyces cerevisiae*, is controlled by the positive regulators Adr1p, Ino2p and Ino4p and the negative regulator

Opi1p in a carbon source-dependent fashion. **Nucleic Acids Res.**, v.27, n.22, p.4391-4398, 1999.

GRUNNET, N.; LUNDQUIST, F. Kinetics of glycerol kinases from mammalian liver and *Candida mycoderma*. **Eur. J. Biochem.**, v.3, p.78-84, 1967.

HAALAND, P.D. **Experimental design in biotechnology**: Statistics: textbooks and monographs. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 258.

HAMANO, T.; MITSUHASHI, Y.; AOKI, N.; YAMAMOTO, S.; TSUJI, S.; ITO, Y.; OJI, Y. Determination of glycerol in foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Chromatogr.**, v.541, p.265-272, 1991.

HAYASHI, S.; LIN, E.C.C. Purification and properties of glycerol kinase from *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v.242, n.5, p.1030-1035, 1967.

HOLTMAN, C.K.; PAWLYK, A.C.; MEADOW, N.D.; PETTIGREW, D.W. Reverse genetics of *Escherichia coli* glycerol kinase allosteric regulation and glucose control of glycerol kinase utilization in vivo. **J. Bacteriol.**, v.183, n.11, p.3336-3344, 2001.

HUANG, H.-S.; KABASHIMA, T.; ITO, K.; YIN, C.-H.; NISHIYA, Y.; KAWAMURA, Y.; YOSHIMOTO, T. Thermostable glycerol kinase from *Thermus flavus*: cloning, sequencing, and expression of the enzyme gene. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1382, p.186-190, 1998.

HUANG, H.-S.; YOSHIDA, T.; MENG, Y.; KABASHIMA, T.; ITO, K.; NISHIYA, Y.; KAWAMURA, Y.; YOSHIMOTO, T. Purification and characterization of thermostable glycerol kinase from *Thermus flavus*. **J. Ferment. Bioeng.**, v.83, n.4, p.328-332, 1997.

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. **Enzyme nomenclature**. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>. Acesso em: 21 jan. 2008.

JANSON, C.A.; CLELAND, W.W. The kinetic mechanism of glycerokinase. **J. Biol. Chem.**, v.249, n.8, p.2562-2566, 1974.

JIN, R.Z.; FORAGE, R.G.; LIN, E.C.C. Glycerol kinase as a substitute for dihidroxyacetone kinase in a mutant of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v.152, n.3, p.1303-1307, 1982.

KOGA, Y.; HARUKI, M.; MORIKAWA, M.; KANAYA, S. Stabilities of chimeras of hyperthermophilic and mesophilic glycerol kinases constructed by DNA shuffling. **J. Biosci. Bioeng.**, v.91, n.6, p.551-556, 2001.

KOGA, Y.; MORIKAWA, M.; HARUKI, M.; NAKAMURA, H.; IMANAKA, T.; KANAYA, S. Thermostable glycerol kinase from a hyperthermophilic archaeon: gene cloning and characterization of the recombinant enzyme. **Protein Eng.**, v.11, n.12, p.1219-1227, 1998.

KRAKOW, J.L.; WANG, C.C. Purification and characterization of glycerol kinase from *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.43, n.1, p.17-25, 1990.

KRÁLOVÁ, I.; RIGDEN, D.J.; OPPERDOES, F.R.; MICHELS, P.A.M. Glycerol kinase of *Trypanosoma brucei*: cloning, molecular characterization and mutagenesis. **Eur. J. Biochem.**, v.267, p.2323-2333, 2000.

KRISTIANSEN, B. **Integrated design of a fermentation plant**: the production of baker's yeast. Weinheim: VCH, 1994. 86p.

LAYNE, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: COLOWICH, S.P.; KAPLAN, N. C. **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1957. v. 3, p. 447-454.

LESKOVAC, V. **Comprehensive enzyme kinetics**. New York: Kluwer Academic Publ., 2004. 438p.

LESKOVAC, V.; TRIVIC, S.; ANDERSON, B. M. Use of competitive dead-end inhibitors to determine the chemical mechanism of action of yeast alcohol dehydrogenase. **Mol. Cell. Biochem.**, v.178, p.219-227, 1998.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, n.1, p.265-275, 1951.

MCGOWAN, M.W.; ARTISS, J.D.; STRANDBERGH, D.R.; ZAK, B. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. **Clin. Chem.**, v.29, n.3, p.538-542, 1983.

MERCHIE, B.; GIRARD, A.; MAISTERRENA, B.; MICHALON, P.; COUTURIER, R. Reliable amperometric determination of glycerol and glycerol-3-phosphate with a bienzymatic nylon membrane electrode. **Anal. Chim. Acta**, v.263, p.85-91, 1992.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. New York: John Wiley and Sons, 1991. p.649.

MURPHY, L.J.; GALLEY, P.T. Measurement in vitro of human plasma glycerol with a hydrogen peroxide detecting microdialysis enzyme electrode. **Anal. Chem.**, v.66, p.4345-4353, 1994.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: principles of biochemistry**. 4th ed. New York: W. H. Freeman, 2004. p.190-237.

NEVES, V. A.; LOURENÇO, E.J. Extração e atividade da peroxidase e polifenoloxidase de batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam.) **Rev. Ciênc. Farm.**, v.7, p.101-107, 1985.

NICULESCU, M.; MIELIAUSKIENE, K.; LAURINAVICIUS, V.; CSÖREGI, E. Simultaneous detection of ethanol, glucose and glycerol in wines using pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenases based biosensors. **Food Chem.**, v.82, p.481-489, 2003.

NILSSON, A.; THOMSON, K.S.; ADLER, L. Purification and characterization of glycerol kinase in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. **Biochim. Biophys. Acta**, v.991, n.2, p.296-302, 1989.

PASTERIS, S.E.; STRASSER DE SAAD, A.M. Characterization of glycerol kinase and NAD-independent glycerol-3-phosphate dehydrogenase from

Pediococcus pentosaceus N5p. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.27, p.93-97, 1998.

PATZ, C.D.; BLIEKE, A.; RISTOW, R.; DIETRICH, H. Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis. **Anal. Chim. Acta**, v.513, p.81-89, 2004.

PAVLIK, P.; SIMON, M.; SCHUSTER, T.; RUIS, H. The glycerol kinase (GUT1) gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. **Curr. Genet.**, v.24, p.21-25, 1993.

PAWLYK, A.C.; PETTIGREW, D.W. Subcloning, expression, purification, and characterization of *Haemophilus influenzae* glycerol kinase. **Protein Express. Purif.**, v.22, p.52-59, 2001.

PETTIGREW, D.W.; LIU, W.Z.; HOLMES, C.; MEADOW, N.D.; ROSEMAN, S. A single amino acid change in *Escherichia coli* glycerol kinase abolishes glucose control of glycerol utilization in vivo. **J. Bacteriol.**, v.178, n.10, p.2846-2852, 1996.

RANGEL, A.O.S.S.; TÓTH, I.V. Enzymatic determination of ethanol and glycerol by flow injection parallel multi-site detection. **Anal. Chim. Acta**, v.416, p.205-210, 2000.

RANK, M.; GRAM, J.; NIELSEN, K.S.; DANIELSSON, B. On-line monitoring of ethanol acetaldehyde and glycerol during industrial fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.42, p.813-817, 1995.

SAKASEGAWA, S.; YOSHIOKA, I.; KOGA, S.; TAKAHASHI, M.; MATSUMOTO, K.; MISAKI, H.; OHSHIMA, T. A novel glycerol kinase from *Flavobacterium meningosepticum*: characterization, gene cloning and primary structure. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.62, n.12, p.2388-2395, 1998.

SAKASEGAWA, S.; TAKEHARA, H.; YOSHIOKA, I.; TAKAHASHI, M.; KAGIMOTO, Y.; MISAKI, H.; SAKURABA, H.; OHSHIMA, T. Increasing the thermostability of *Flavobacterium meningosepticum* glycerol kinase by changing Ser329 to Asp in the subunit interface region. **Protein Eng.**, v.14, n.9, p.663-667, 2001.

SIDERIUS, M.; WUYTSWINKEL, O.V.; REIJENGA, K.A.; KELDERS, M.; MAGER, W.H. The control of intracellular glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* influences osmotic stress response and resistance to increased temperature. **Mol. Microbiol.**, v.36, n.6, p.1381-1390, 2000.

SPINREACT. **Triglycerides-LQ**. Disponível em: <http://www.spinreact.com.mx>. Acesso em: 20 mar. 2008.

STEINBORN, K.; SZALLIES, A.; MECKE, D.; DUSZENKO, M. Cloning, heterologous expression and kinetic analysis of glycerol kinase (TbGLK1) from *Trypanosoma brucei*. **Biol. Chem.**, v.381, p.1071-1077, 2000.

STEPANIAN, S.V.; HUYN, S.T.; MCCABE, E.R.B.; DIPPLE, K.M. Characterization of the human glycerol kinase promoter: identification of a functional HNF-4 α binding site and evidence for transcriptional activation. **Mol. Genet. Metab.**, v.80, p.412-418, 2003.

TININIS, C.R.C.S. **Ensaio enzimático para dosagem do glicerol**. 2001. 136f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2001.

TORRES, B. B. Elementos de enzimologia. In: BORZANI, W. et al. **Biotecnologia industrial: fundamentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 1, cap. 5, p. 151-176.

URTUBIA, A.; PÉREZ-CORREA, J.R.; MEURENS, M.; AGOSIN, E. Monitoring large scale wine fermentations with infrared spectroscopy. **Talanta**, v.74, p.778-784, 2004.

VALDERRAMA, P.; MARANGONI, F.; CLEMENTE, E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v.21, p.321-325, 2001.

VALTEK DIAGNÓSTICOS. **Trigliceridos GPO-PAP**. Disponível em: <http://www.valtek.cl/insertos>. Acesso em: 20 mar. 2006.

VOEGELE, R.T.; SWEET, G.D.; BOOS, W. Glycerol kinase of *Escherichia coli* is activated by interaction with the glycerol facilitator. **J. Bacteriol.**, v.175, n.4, p.1087-1094, 1993.

YOSHIHARA, K.; SHIMADA, Y.; KARITA, S.; KIMURA, T.; SAKKA, K.; OHMIYA, K. Purification and characterization of two dihydroxyacetone kinases from *Schizosaccharomyces pombe* IFO 0354. **Environ. Microbiol.**, v.62, n.12., p.4663-4665, 1996.

WEISBERG, S. **Applied linear regression**. New York: John Wiley & Sons, 1985. p. 217.

WHITAKER. Enzyme purification. In:_____. **Principles of enzymology for the food sciences**. New York: Dekker, 1972. cap. 3, p. 65-129.

WHITAKER, J.R.; VORAGEN, A.G.J.; WONG, D.W.S. **Handbook of food enzymology**. New York: Marcel Dekker, 2003. 1108p.

WIELAND, O. Glycerol, UV-Method. In: BERGMEYER, H.U. **Methods of enzymatic analysis**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1974. v. 3, p. 1404-1409.

WU, L.; CHENG, C.-M. Flow-injection enzymatic analysis for glycerol and triacylglycerol. **Anal. Biochem.**, v.346, p.234-240, 2005.