

ESTUDO TERMODINÂMICO SOBRE A FORMAÇÃO DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE EM SACCHAROMYCES CEREVISIAE GENETICAMENTE MODIFICADO

Fernanda Guerreiro Rossi¹, Marcela Zanella Ribeiro¹, Attilio Converti^{*2}, Michele Vitolo¹, Adalberto Pessoa Jr¹, Sunao Sato¹

¹Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580/B16, 05508-900, São Paulo, SP

²Dipartimento di Ingegneria Chimica e di Processo "G.B. Bonino", via Opera Pia 15, I-16145 Gênova, Itália, converti@unige.it

ABSTRACT

A genetically-modified strain of *Saccharomyces cerevisiae* (W303-181), able to overexpress glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), has been cultivated batchwise at different temperatures ($20 < T < 43^{\circ}\text{C}$) and the experimental data of G6PDH activity and biomass concentration have been used to estimate the thermodynamic quantities of both activation and thermal inactivation of this system. A new thermodynamic approach, describing both enzyme synthesis and thermal inactivation as instantaneous equilibria, has been followed to justify the peculiar overall three-phase behaviour observed in this work for G6PDH activity.

1. INTRODUÇÃO

A Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) é uma enzima particularmente abundante em *Saccharomyces cerevisiae*, que se usa como marcador ou reagente em diversas análises enzimáticas (Bergmeyer, 1984). Por isso, a sua produção associada ao crescimento da levedura está suscitando crescente interesse.

A G6PDH tem sido recentemente superproduzida através de uma variedade modificada geneticamente de *S. cerevisiae* (Lojudice et al., 2001), obtida clonando a seqüência da G6PDH sob o controle dos promotores PGK1 e GAL1-PGK1 (GPF) desregulados mediante a fonte de carbono. Num trabalho anterior foi demonstrado que a temperatura ótima para a atividade da G6PDH na cepa selvagem é 35°C (Abrahão-Neto et al., 1997), enquanto não existe alguma indicação acerca da influência deste parâmetro sobre sua atividade na variedade modificada geneticamente.

Este microrganismo tem sido cultivado neste trabalho a temperaturas variáveis entre 20 e 43°C com o objetivo de executar um estudo cinético e termodinâmico sobre a atividade da G6PDH. Usou-se o modelo de equilíbrio termodinâmico proposto por Roels (1983) para descrever o padrão de inativação térmica e de biossíntese da G6PDH no *S. cerevisiae* W303-181.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os métodos de construção do plasmídeo, as técnicas de engenharia genética, o isolamento do RNA e a "northern hybridization" tem sido recentemente descritos por Lojudice et al. (2001). A variedade modificada geneticamente de *Saccharomyces cerevisiae* W303-181 foi gentilmente fornecida pelo Laboratório de Bioquímica da Universidade de São Paulo.

As células eram transferidas em tubos de ensaio inclinados contendo 15.0 g/l agar, 20.0 g/l glicose, 7.4 g/l Yeast Nitrogen Base, 20 mg/l adenina, 20 mg/l L-triptofano, 20 mg L-histidina, 20 mg/l uracila, e eram guardadas a 4°C . As células crescidas a 30°C durante 24 h eram transferidas em frascos de 250 ml contendo 50 ml do meio acima mencionado sem agar e precultivadas a 150 rpm e 30°C durante 24 h num agitador rotativo.

Os cultivos descontínuos foram conduzidos durante 27 h a diversas temperaturas ($20 < T < 43^{\circ}\text{C}$) nas condições ótimas de concentrações de glicose (20.0 g/l) e biomassa (0.1 g/l) previamente determinadas por este sistema. Neste propósito foram usados 100 ml do meio acima mencionado sem agar e contendo tampão acetato 0.1 M a pH 5.7 em frascos de Erlenmeyer de 500 ml agitados a 150 rpm. As amostras retiradas ao longo de cada ensaio eram usadas para a determinação das concentrações de glicose, etanol e biomassa assim como da atividade enzimática.

A concentração celular era determinada através da densidade ótica a 600 nm usando-se uma curva padrão. As concentrações de glicose e etanol eram determinadas respectivamente mediante um kit enzimático GOD/POD (Laborlab, Guarulhos) e o método de retrotitulação do dicromato (Joslyn, 1970). Para a atividade da G6PDH, as células, uma vez suspensas em 50 mM tampão Tris-HCl (pH 7.5) contendo 5.0 mM MgCl_2 , 10 mM b-mercaptoetanol, 2.0 mM ácido amino-capróico, 1.0 mM fenilmetilsulfonil fluoreto e 0.2 mM EDTA, eram rompidas em vortex em presença de bolinhas de vidro com diâmetro de 0.5 mm e a mistura era mantida a menos de 10°C . Após centrifugação a $8720 \times g$ por 30 min a 4°C , a atividade da G6PDH era determinada espectrofotometricamente ($\lambda = 340 \text{ nm}$) no sobre-nadante, através da redução contínua de NADP a 30°C (Bergmeyer, 1984).

3. MODELO TERMODINÂMICO

O incremento de velocidade de uma reação enzimática com a temperatura, descrito pela equação de Arrhenius, é contrastado por uma progressiva redução, chamada "inativação térmica", devida à distorção da enzima, induzida pela agitação térmica, em relação à conformação biologicamente ativa. Este comportamento foi modelado por Roels (1983) através da "aproximação termodinâmica" que supõe a ocorrência de um equilíbrio instantâneo de inativação reversível entre as formas ativa, E, e inativa, I, da enzima. Substituindo a expressão da constante deste equilíbrio, KD, em função de E na equação de Michaelis-Menten e considerando a teoria do complexo ativado e a equação de Gibbs, obtém-se a relação proposta por Roels (1983), que contém, além da entalpia de ativação (DH#) e da variação de entalpia do equilíbrio de inativação térmica (DH°i), também as relativas contribuições entrópicas A e B.

Em condições de controle termodinâmico devido à síntese enzimática, a concentração do biocatalizador depende fortemente de sua velocidade. Assumindo por simplicidade que a síntese enzimática possa ser descrita por um equilíbrio endotérmico, a sua contribuição positiva à concentração da enzima deve ser considerada, em particular a elevadas temperaturas, e, portanto, se obtém:

$$k_{eff} = \frac{A \exp(-\Delta H^{\#}_a / RT) [1 + C \exp(-\Delta H^{\circ}_{s,a} / RT)]}{1 + B \exp(-\Delta H^{\circ}_{i,a} / RT)} \quad (1)$$

onde C é a contribuição entrópica deste equilíbrio e DH°s,a sua variação padrão de entalpia.

A baixas temperaturas ($T < T_{opt}$), ambos os equilíbrios endotérmicos são fortemente orientados a esquerda e suas contribuições à atividade enzimática podem ser desprezadas, fornecendo um comportamento simples do tipo de Arrhenius:

$$k_{eff} \cong A \exp(-\Delta H^{\#}_a / RT) \quad (2)$$

A importância de ambos os equilíbrios aumenta com a temperatura com base às respectivas constantes de equilíbrio (KD e Ks). Supondo que a síntese enzimática prevaleça sobre a inativação térmica a temperaturas mais elevadas, o segundo equilíbrio torna-se significativo enquanto o primeiro permanece desprezível. Portanto, para $T_s < T < T_{opt}$, a equação (1) torna-se:

$$k_{eff} \cong \frac{A}{B} \exp\left(\frac{\Delta H^{\circ}_{i,a} - \Delta H^{\#}_a}{RT}\right) \quad (3)$$

Analogamente, nenhuma das duas contribuições pode ser desprezada para $T > T_s$, levando a

$$k_{eff} \cong \frac{AC}{B} \exp\left(\frac{\Delta H^{\circ}_{i,a} - \Delta H^{\#}_a - \Delta H^{\circ}_{s,a}}{RT}\right) \quad (4)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Figuras 1 e 2 mostram os resultados de cultivos aeróbicos descontínuos conduzidos a $20 < T < 43^{\circ}\text{C}$. Observa-se que a concentração celular e a atividade da G6PDH alcançaram valores máximos a 30°C e diminuíram acima deste patamar, seguindo até 37°C um comportamento parecido. Ao contrário, a T maiores, a levedura parou de crescer enquanto a atividade enzimática continuou a ser detectada somente até 6 h. Este comportamento sugere uma dependência da síntese da G6PDH da temperatura, que poderia ser responsável por uma progressiva redução da disponibilidade de ribose para o crescimento.

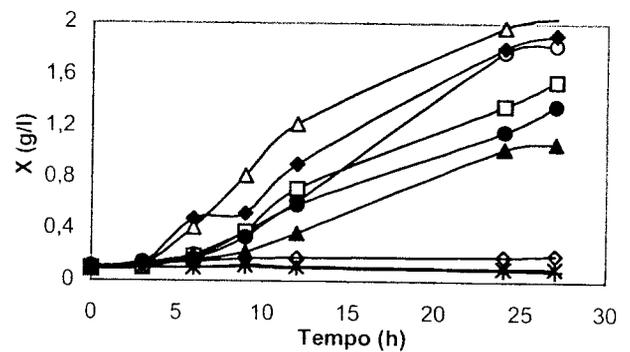


Figura 1. Resultados experimentais da concentração celular (g/l peso seco) obtidos ao longo de cultivos a diversas temperaturas. T (°C): (▲) 20; (○) 25; (◆) 28; (△) 30; (□) 33; (●) 35; (◇) 37; (×) 40; (+) 43.

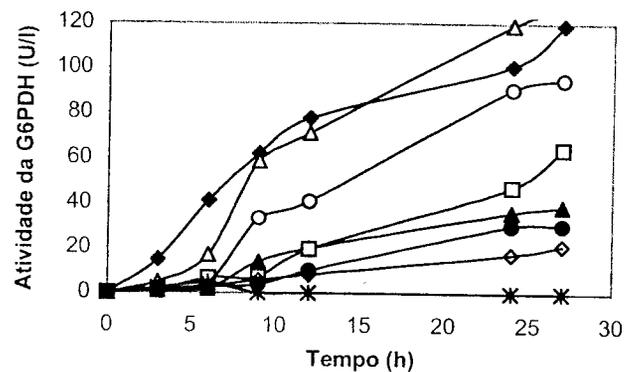


Figura 2. Resultados experimentais da atividade da G6PDH (U/l) obtidos ao longo de cultivos a diversas temperaturas. T (°C): (▲) 20; (○) 25; (◆) 28; (△) 30; (□) 33; (●) 35; (◇) 37; (×) 40; (+) 43.

Para entender melhor este comportamento, foi conduzido um estudo termodinâmico usando os valores

máximos da atividade enzimática específica e da velocidade específica de crescimento. A influência da temperatura sobre estes parâmetros cinéticos foi evidenciada por linhas retas descritas pelas formas logarítmicas das equações (2-4), das quais foram estimados os parâmetros termodinâmicos da ativação e da inativação térmica (Tabela 1). Foi também possível, em condições de controle termodinâmico exercido pela síntese enzimática ($T > 37^{\circ}\text{C}$), estimar as grandezas termodinâmicas do equilíbrio responsável pela superexpressão da G6PDH

Tabela 1. Grandezas termodinâmicas estimadas para o crescimento e a atividade da G6PDH. (A) Ativação, (TI)

Inativação térmica, (ES) Síntese enzimática.
Temperatura de referência: 25°C .

	A	TI	ES
Crescimento da biomassa			
ΔH (kJ mol ⁻¹)	72.2	220	-
ΔS (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	-0.083	0.724	-
ΔG (kJ mol ⁻¹)	96.9	4.12	-
Atividade enzimática			
ΔH (kJ mol ⁻¹)	135	408	380
ΔS (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	0.168	1.35	1.23
ΔG (kJ mol ⁻¹)	84.9	4.29	13.0

A entalpia de ativação do crescimento estimada neste estudo ($\Delta H_{\#x} = 72.2$ kJ mol⁻¹) é comparável com aquelas de diferentes sistemas enzimáticos (Sizer, 1944; Roels, 1983; Aiba et al., 1973; Al-Asheh e Duvniak, 1994) ou de fermentação (Converti e Domínguez, 2001). Além disto, embora sejam da mesma ordem de grandeza, as contribuições entálpicas do crescimento são sempre menores daquelas da atividade da G6PDH, sugerindo que o crescimento poderia ser controlado por outra atividade enzimática.

O valor negativo de $\Delta S_{\#x}$ concorda com aqueles mencionados na literatura para diversos sistemas enzimáticos (Aiba et al., 1973; Sizer et al., 1944) e implica um estado de transição mais rígido em relação aos componentes separados no sistema reagente. Essa situação estaria de acordo com um controle do crescimento exercido pela formação do complexo E-S. O valor muito pequeno deste parâmetro ($\Delta S_{\#x} = -0.083$ kJ mol⁻¹ K⁻¹) indica também que a ligação com o substrato tem mínima influência sobre a estrutura terciária da enzima limitante. De outro lado, o valor positivo e elevado da variação de entropia da inativação térmica do crescimento ($\Delta S^{\circ}_{i,x} = 0.724$ kJ mol⁻¹ K⁻¹) sugere um significativo aumento do número de graus de liberdade do sistema quando a enzima que controla o crescimento passa de sua estrutura terciária ativa para uma forma inativa menos organizada.

Os resultados relacionados à atividade da G6PDH na Tabela 1 mostram um comportamento completamente diferente. Ao contrário do crescimento, a entropia de ativação da atividade enzimática tem valor positivo ($\Delta S^{\circ}_{\#a} = 0.168$ kJ mol⁻¹ K⁻¹), sugerindo a formação de um estado de transição menos rígido do que o sistema reagente. Isso significa que, de acordo com a teoria de Michaelis-Menten, a etapa que limita a atividade da G6PDH é provavelmente a quebra do complexo E-S e não sua formação.

De outro lado, o quadro termodinâmico da inativação térmica da G6PDH é qualitativamente parecido com o da inativação do crescimento, conforme a hipótese acima mencionada acerca do crescimento limitado enzimaticamente. Em particular, o valor da entropia padrão da inativação térmica da enzima ($\Delta S^{\circ}_{i,a}$

= 1.35 kJ mol⁻¹ K⁻¹) é positivo e bastante elevado em relação àqueles de outros biosistemas (Converti e Domínguez, 2001), sugerindo que só uma pequena parte das ligações eletrostáticas responsáveis pela estabilização da forma ativa da enzima poderiam ainda permanecer na sua forma inativa.

Finalmente, a síntese enzimática (ES) demonstra ter uma variação padrão de entalpia menor do que a inativação térmica ($\Delta H^{\circ}_{s,a} < \Delta H^{\circ}_{i,a}$), o que somente em aparência discorda da hipótese segundo a qual ela poderia ser o fenômeno responsável pelo controle termodinâmico a temperaturas mais elevadas.

Na realidade, a síntese enzimática tem uma variação de energia de Gibbs maior do que a inativação térmica ($\Delta G^{\circ}_{s,a} > \Delta G^{\circ}_{i,a}$) por causa de uma menor contribuição entrópica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahão-Neto J, Infanti P, Vitolo M (1997) *Braz. J. Chem. Eng.* 14(1): 89-94.
- Aiba S, Humphrey AE, Millis NF (1973) **Biochemical Engineering**, 2nd edn., Academic Press, New York, pp. 92-127
- Al-Asheh S, Duvniak Z (1994) *Acta Biotechnol.* 14: 223-233.
- Bergmeyer HU (1984) in **Methods of Enzymatic Analysis**, vol. 2, 3rd edn., Bergmeyer HV, Bergmeyer J, Grassl M, eds., Verlag Chemie, Weinheim, Germany, pp. 222-223.
- Converti A, Domínguez JM (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 75: 39-45.
- Joslyn MA (1970) **Methods in Food Analysis**, 2nd edn., Academic, New York.
- Lojudice FH, Silva DP, Zanchin NIT, Oliveira CC, Pessoa Jr A (2001) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91-93: 161-169.

Roels, JA (1983) **Energetics and Kinetics in Biotechnology**, Elsevier Biomedical, Amsterdam, pp. 163-203.

Sizer, IW (1944) *J. Biol. Chem.* 154: 461-466.