

## 1. INTRODUÇÃO

O Laboratório de Enzimologia Industrial do Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica da Universidade de São Paulo vêm desenvolvendo nos últimos anos processos fermentativos para a obtenção da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH) a partir do cultivo, em fermentadores, de *S. cerevisiae* isolada de fermento comercial de padaria (ABRAHÃO-NETO *et al.*, 1996; 1997; SILVA *et al.*, 2001).

Neste trabalho, também desenvolvido pelo Laboratório de Enzimologia Industrial, introduzimos uma nova proposta de obtenção de G6PDH, a partir de uma cepa de *S. cerevisiae* geneticamente modificada, contendo o plasmídeo YEpPGK-G6P sob o controle do promotor PGK1 (fosfogliceratoquinase 1) de modo a acentuar a expressão desta enzima.

Em estudo anterior, LOJUDICE *et al.* (2001) observaram que esta levedura modificada apresentava atividade específica de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase cerca de 30 vezes maior do que a levedura original. Os resultados obtidos por este trabalho, a partir da investigação das condições de cultivo deste microrganismo, são de grande importância para a continuidade da pesquisa com esta cepa e tem por objetivo final trazer maiores rendimentos e economia no processo de obtenção da enzima, o que conduz a um produto final com custo reduzido e, conseqüentemente, mais competitivo e viável comercialmente.

A enzima glicose-6-Fosfato Desidrogenase é de grande importância em estudos bioquímicos e médicos (LEITE, 1989; SEVERO, 1979). Esta enzima apresenta grande interesse como reagente analítico para medidas de teores de glicose, frutose, manose, ATP (BOROSS *et al.*, 1987; AGUERO, 1998) e medidas de atividade enzimática de hexoquinase e creatina-quinase (ABRAHÃO-NETO *et al.*, 1997).

Segundo GODFREY and WEST (1996), o mercado mundial de enzimas para fins de diagnóstico gira em torno de milhões de dólares, como mostra a Tabela 1.1 a seguir:

**Tabela 1.1.** Mercado mundial das enzimas de diagnóstico mais utilizadas

| <b>ENZIMA</b>                   | <b>MERCADO MUNDIAL<br/>(MILHÕES DÓLARES)</b> |
|---------------------------------|--|
| Fosfatase alcalina              | 15   |
| Peroxidase                      | 15   |
| Enzimas do colesterol           | 8  |
| Glicose-6-fosfato desidrogenase | 7  |
| Glicose Oxidase                 | 5  |
| Enzimas de trigliceraldeído     | 3  |
| Glutamato desidrogenase         | 2  |
| Lactato desidrogenase           | 2  |
| Malato desidrogenase            | 2  |
| Piruvatoquinase                 | 2  |
| <b>TOTAL</b>                    | <b>61</b>                                    |

A possibilidade de uso da G6PDH para determinação de glicose na presença de frutose constitui uma importante ferramenta na detecção da adição de açúcar ilegal nos produtos finais das indústrias de vinho e suco de frutas (WHYTAKER,1991). Ela pode ser usada de forma eficiente e precisa para identificar e quantificar moléculas de glicose liberadas após hidrólise do amido em sucos, mesmo na presença de pedaços de frutas, compostos coloridos, elevadas concentrações de sacarose e outros tipos de polissacarídeos (CHATEL *et al.* 1996). Além disso, a G6PDH pode ser empregada para a determinação de glicose em sistema de reator em fluxo contínuo, pois o NADPH formado pela reação enzimática pode ser facilmente detectado espectrofotometricamente ou fluorometricamente (MORI *et al.*, 1999; FREY *et al.*, 1999). Essa enzima pode, ainda, detectar baixíssimos níveis de estreptavidina e biotina por ensaios de bioluminescência em reações de hibridização de DNA, sem perda da atividade enzimática (TEROUANNE *et al.* 1989; BALAGUER *et al.*, 1989). Como biossensor, a G6PDH pode monitorar rapidamente a concentração de G6P no sangue com menor custo e consumo de tempo do que os métodos tradicionais como cromatografia e espectroscopia. Esse monitoramento é importante porque ele pode refletir diretamente a atividade relativa da G6PDH na via metabólica e tem sido utilizado para possibilitar o controle de

---

G6PDH em eritrócitos humanos e em células de fígado de ratos (BASSI *et al*, 1999). Deve ser lembrado, também, que a G6PDH é usada para marcar anticorpos na técnica de diagnóstico clínico chamada enzimaímunoensaio (GODFREY and WEST, 1996).