



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

**INACTIVACIÓN TÉRMICA DE LA GLUCOSA OXIDASA  
DE *Aspergillus niger* Y SU ESTABILIZACIÓN  
POR TREHALOSA**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**LICENCIADA EN NUTRICIÓN**  
P R E S E N T A  
**KARINA JAZMÍN PAZ ALFARO**



**BAJO LA DIRECCIÓN DE:  
DR. JOSÉ G. SAMPEDRO PÉREZ**

**PACHUCA HIDALGO, JULIO DE 2009**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN



De acuerdo con el artículo 134 del Reglamento de Control Escolar vigente, el jurado de examen recepcional designado, autoriza para su impresión la Tesis titulada

**"Inactivación Térmica de la Glucosa Oxidasa de *Aspergillus niger* y su Estabilización por Trehalosa"**

Que para obtener el Título de Licenciado de Nutrición sustenta la Pasante

**C. Karina Jazmín Paz Alfaro**

**ATENTAMENTE**  
**Pachuca, Hidalgo, 19 de Junio del 2009**  
**"Amor, Orden y Progreso"**

PRESIDENTE	DR. GABRIEL BETANZOS CABRERA
SECRETARIO	IBQ. ARACELI ORTIZ POLO
PRIMER VOCAL	DRA. MARÍA TERESA SUMAYA MARTÍNEZ
SEGUNDO VOCAL	M. EN C. MARIZA OLVERA NÁJERA
TERCER VOCAL	DR. ERNESTO ALANÍS GARCÍA
PRIMER SUPLENTE	M. EN C. TEODORO SUÁREZ DIEGUEZ
SEGUNDO SUPLENTE	I.Q.P. ALEJANDRA ISLAS ORTEGA

*La investigación experimental para la  
elaboración de la presente tesis se realizó  
en el Laboratorio de Nutrición Molecular  
del Instituto de Ciencias de la Salud  
de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo,  
con la asesoría del Dr. José G. Sampedro Pérez  
y bajo el financiamiento de los proyectos:  
CONACYT (SEP-2004-c01-46537)  
y SEP-PROMEP (UAEHGO-PTC- 192)*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A la Universidad Autónoma del Estado de  
Hidalgo*

*Gracias por haberme dado la oportunidad de  
ser parte de ésta, nuestra máxima casa de  
estudios, y llevar a cabo mi formación  
profesional. Por siempre mi Universidad.*

*Al Área Académica de Nutrición y en especial  
a todos mis maestros*

*Quienes contribuyeron a mi formación durante  
los 4 años de mi carrera profesional y que me  
adentraron en este interesante e importante  
mundo de la nutrición.*

*A mi director de tesis el Dr. José G. Sampedro*

*Por su enseñanza y consejos. Gracias por  
confiar en mí y darme la oportunidad de  
realizar este proyecto bajo su asesoría.*

## **DEDICATORIAS**

### *A mi padre*

*Quien me enseñó que a pesar de las dificultades, la persistencia y la lucha por lo que quieres es la llave para lograr tus objetivos en la vida. Se que a pesar de que ya no estás con nosotros, donde quiera que te encuentres estarás orgulloso por este triunfo en mi vida y algún día nos volveremos a ver.*

### *A mi madre*

*Por estar siempre a mi lado en los momentos importantes de mi vida. Gracias por darme tu apoyo incondicional y por ser una madre ejemplar.*

### *A mi hijo Ángel Gabriel*

*Quien ha dado alegría a mi vida. Por ser el ángel que Dios me mandó para amarlo, protegerlo y darle lo mejor de mí.*

### *A Dios*

*Por su sabiduría infinita, por guiar el camino de mi vida y darme la bendición de ser madre.*

*A mis grandes amigos: Isabel, Yadíra, Ale y  
Javier*

*Por compartir grandes momentos en mi vida, por  
acompañarme en las alegrías y tristezas y saber  
que cuento con su apoyo. Los quiero mucho y  
siempre los tendré en mi corazón.*

*A Gabriel*

*Por alentarme a terminar esta tesis, por su  
apoyo y sobre todo por los momentos felices que  
hemos vivido juntos. Por siempre compartiremos  
la dicha de ser padres y el amor por ese ser tan  
hermoso que Dios nos mandó.*

*A mis hermanos: Juan Gabriel,  
Omar y Nico*

*Por acompañarme en los momentos buenos y  
malos, y seguir compartiendo los momentos  
agradables en familia.*

*A mi madrina Delia*

*Con quien compartí tiempos gratos en mi  
infancia. Gracias por tu apoyo y cariño que por  
siempre agradeceré.*

*A mis buenos compañeros de carrera*

*Que me brindaron su amistad y compartieron  
conmigo tiempos agradables a lo largo de  
nuestra formación académica.*

## INDICE

	<i>Pag.</i>
Abreviaturas -----	1
Resumen -----	2
Abstract -----	3
1. Marco Teórico -----	4
1.1 PROTEÍNAS: estructura y función -----	4
1.1.1 Niveles estructurales de las proteínas -----	4
1.1.1.1 Estructura primaria -----	4
1.1.1.2 Estructura secundaria -----	5
1.1.1.3 Estructura terciaria -----	6
1.1.1.4 Estructura cuaternaria -----	6
1.1.2 Función de las proteínas -----	7
1.1.2.1 Función enzimática -----	8
1.1.3 Desnaturalización de las proteínas y agentes desnaturalizantes -----	9
1.2 Glucosa Oxidasa (GOx) de <i>Aspergillus niger</i> -----	11
1.2.1 Uso industrial de la GOx -----	12
1.3 Solutos compatibles -----	14
1.4 Trehalosa -----	15
1.4.1 Características estructurales y propiedades fisicoquímicas de la trehalosa -----	15
1.4.2 Protección de proteínas por la trehalosa bajo condiciones de estrés -----	16
1.4.3 Uso biotecnológico de la trehalosa -----	19
1.4.3.1 Protector de la actividad enzimática -----	19
1.4.3.2 Estabilizador y protector de moléculas complejas -	19
1.4.3.3 Preservador de células, tejidos y órganos -----	20
1.4.3.4 Usos médicos y nutracéuticos -----	20
1.4.3.5 Aditivo de diversos alimentos y bebidas -----	20

1.4.3.6	Uso en la industria de cosméticos -----	21
2.	Trabajos previos -----	22
2.1	Estabilidad de la GOx -----	22
3.	Problema de investigación -----	24
4.	Justificación -----	25
5.	Objetivos -----	26
6.	Metodología -----	27
6.1	Materiales y reactivos -----	27
6.2	Métodos -----	28
6.2.1	Purificación de la GOx de <i>A. niger</i> por cromatografía de exclusión por tamaño -----	28
6.2.1.1	Cromatografía de exclusión por tamaño -----	28
6.2.2	Determinación de la concentración de proteína por el método de Lowry -----	29
6.2.2.1	El método de Lowry -----	29
6.2.3	Evaluación de la pureza de la GOx mediante electroforesis en gel de poliacrilamida -----	30
6.2.3.1	Electroforesis en gel de poliacrilamida -----	30
6.2.3.2	Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) -----	31
6.2.3.3	Tinción del gel de SDS-PAGE (Tinción con Azul de Coomassie) -----	33
6.2.4	Cinética de saturación de la GOx en ausencia y presencia de trehalosa -----	33
6.2.5	Cinética de la inactivación térmica de la GOx en ausencia y presencia de trehalosa -----	34
6.2.6	Cinética del cambio en el centro de masa espectral (CME) de la GOx durante la inactivación térmica en ausencia y presencia de trehalosa -----	34
6.2.7	Fluorescencia del FAD de la GOx en ausencia y presencia de trehalosa con el aumento gradual de temperatura -----	35



6.2.8	Análisis de datos -----	35
7.	Resultados -----	36
7.1	Purificación de la GOx -----	36
7.2	Efecto de la presencia de trehalosa en la cinética de la GOx -----	37
7.3	Cinética de la inactivación térmica de la GOx y el efecto de la trehalosa -----	39
7.3.1	Efecto de la trehalosa en la energía de activación durante la inactivación térmica de la GOx -----	40
7.4	Efecto de la trehalosa en la cinética del cambio en el CME de la GOx durante la inactivación térmica -----	41
7.4.1	Efecto de la presencia de trehalosa en la energía de activación del cambio en el CME de la GOx durante la inactivación térmica -----	43
7.5	Efecto de la trehalosa en la liberación del FAD de la GOx por el aumento de la temperatura -----	44
8.	Discusión -----	46
9.	Conclusiones -----	50
10.	Referencias bibliográficas -----	51
11.	Anexos -----	60

## INDICE DE FIGURAS

	<i>Pag.</i>
<b>Figura 1.</b> Niveles estructurales de las proteínas (estructura de la hemoglobina) -----	7
<b>Figura 2.</b> Reacción enzimática de la GOx -----	11
<b>Figura 3.</b> Modelo estructural de la GOx -----	12
<b>Figura 4.</b> Estructura química de la trehalosa -----	16
<b>Figura 5.</b> Cromatografía de exclusión molecular de la GOx de <i>A. niger</i> ----	36
<b>Figura 6.</b> SDS-PAGE de la GOx de <i>A. niger</i> de las fracciones correspondientes al pico máximo de absorbancia -----	37
<b>Figura 7.</b> Cinética de saturación de la GOx a 25°C en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de trehalosa -----	38
<b>Figura 8.</b> Cinética de inactivación térmica de la GOx en ausencia y presencia de trehalosa -----	39
<b>Figura 9.</b> Gráfico de Arrhenius de la cinética de inactivación térmica de la GOx -----	41
<b>Figura 10.</b> CME de la GOx en ausencia y presencia de trehalosa a diferentes temperaturas de incubación -----	42
<b>Figura 11.</b> Modelo de inactivación térmica de la GOx -----	43
<b>Figura 12.</b> Gráfico de Arrhenius del cambio en el CME de la GOx durante la inactivación térmica -----	44
<b>Figura 13.</b> Disociación del FAD de la GOx inducido por el aumento de la temperatura en ausencia y presencia de trehalosa -----	45

## INDICE DE TABLAS

	<i>Pag.</i>
<b>Tabla 1.</b> Preparación del gel de SDS-PAGE -----	32
<b>Tabla 2.</b> Efecto de la presencia de trehalosa sobre los parámetros cinéticos de la GOx -----	38
<b>Tabla 3.</b> Efecto de la trehalosa sobre la constante de velocidad de inactivación ( $k_i$ ) de la GOx -----	40
<b>Tabla 4.</b> Efecto de la trehalosa en la constante de velocidad del cambio en el CME de la GOx durante la inactivación térmica -----	43

## ANEXOS

	<i>Pag.</i>
<b>Anexo 1.</b> Artículo internacional publicado en la revista " <i>The Journal of Biotechnology</i> " sobre el tema de tesis -----	60
<b>Anexo 2.</b> Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. Del 13 al 18 de noviembre de 2005; Oaxaca, Oaxaca. -----	69
<b>Anexo 3.</b> Preparación de las soluciones empleadas en el desarrollo experimental -----	77
3.1 Soluciones para la cromatografía de exclusión por tamaño de la GOx-	78
3.2 Soluciones para el método de Lowry -----	78
3.3 Soluciones para SDS-PAGE -----	79
3.4 Soluciones para tinción del gel con azul de Coomassie -----	80
3.5 Soluciones para la cinética de saturación e inactivación térmica de la GOx -----	81
3.6 Solución para los experimentos de fluorescencia -----	82

## ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BSA	Albúmina sérica bovina
CME	Centro de masa espectral
$E_a$	Energía de activación
EGTA	Etilén glicol tetracético
FAD	Flavín adenín dinucleótido
GOx	Glucosa Oxidasa
HSPs	Proteínas de choque térmico (Heat-shock proteins)
$K_{cat}$	Número de recambio
kDa	Kilodaltones
kJ	Kilojoules
$K_i$	Constante de velocidad de inactivación
$K_m$	Constante de Michaelis
M	Moles
mA	Miliamperes
mM	Milimoles
$\mu$ M	Micromoles
$M_r$	Masa molecular
nm	Nanómetros
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)
TEMED	Tetrametiletiléndiamina
$T_m$	Temperatura de transición
V	Volts
$V_{max}$	Velocidad máxima

## RESUMEN

La Glucosa oxidasa (GOx) de *Aspergillus niger*, es una proteína homodimérica que cataliza la oxidación de  $\beta$ -D-glucosa a D-glucono- $\delta$ -lactona produciendo peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); la D-glucono- $\delta$ -lactona se convierte posteriormente a ácido glucónico y el  $H_2O_2$  en agua y oxígeno molecular. Tiene dos moléculas de flavín adenín dinucleótido (FAD) como cofactor y una fracción de carbohidratos unidos covalentemente en su superficie. La trehalosa, un disacárido no reductor tiene características fisicoquímicas y estructurales particulares que la hacen el soluto compatible con mejor efecto estabilizante en enzimas. El objetivo de esta investigación experimental fue determinar los cambios en la actividad y estructura de la GOx y su estabilización por trehalosa sometida a estrés térmico. Los ensayos se hicieron en ausencia y presencia de 0.6 M de trehalosa. Se midió la actividad de la enzima a diferentes concentraciones de trehalosa y la cinética de inactivación térmica, además de los cambios en su estructura analizando el centro de masa espectral (CME) y la disociación del FAD durante la inactivación térmica. En la cinética enzimática de la GOx, la  $K_m$  disminuyó hasta valores de 11.34 mM de glucosa comparada con la enzima sin trehalosa ( $K_m = 18.76$  mM), ésto demostró que a concentraciones crecientes del disacárido aumentan la afinidad de la enzima por su sustrato. No hubo efecto en la  $V_{max}$  lo que indicó que los cambios conformacionales de la enzima durante la catálisis son de baja magnitud. En la cinética de inactivación térmica en presencia de trehalosa, la  $k_i$  disminuyó a la mitad a todas las temperaturas probadas. El cambio del CME por temperatura tuvo una cinética bifásica, lo que indicó dos pasos en el proceso de inactivación térmica de la enzima, sin embargo, en presencia de trehalosa, la cinética fue monoexponencial. En la fluorescencia del FAD la trehalosa desplazó su disociación a mayores temperaturas (la  $T_m$  paso de 61.3 en ausencia de trehalosa a 64.3°C en presencia de ésta). En conclusión, la trehalosa mejoró la actividad catalítica de la GOx, además se observó que durante su inactivación térmica existe un paso previo a la salida del FAD (posiblemente la formación de un glóbulo fundido) y que la presencia del disacárido impide este primer paso, evitando la exposición del interior de la enzima, la disociación del FAD y su consecuente desnaturalización, por lo que la trehalosa contribuye significativamente a la estabilización térmica de la GOx y optimiza su actividad.

**Palabras clave:** Glucosa oxidasa, trehalosa, inactivación térmica, disociación del FAD, estabilización.

## ABSTRACT

Glucose oxidase (GOx) from *Aspergillus niger* is a homodimeric protein that catalyzes the oxidation of  $\beta$ -D-glucose to D-glucono- $\delta$ -lactone, which later is hydrolyzed to gluconic acid and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ); it contains two FAD molecules as cofactor and a fraction of carbohydrates covalently linked to the surface. Trehalose is a non-reducing disaccharide, its physico-chemical and structural features provide it as the compatible solute with the best stabilizing effect on enzymes. The aim of this study was to determine changes in both the activity and structure of the GOx and its stabilization by trehalose when subjected to thermal inactivation. The assays were performed in absence and presence of 0.6 M of trehalose. The enzyme activity and the thermal inactivation kinetics were studied at different concentrations of trehalose. Changes in GOx structure during thermal inactivation were analyzed by CSM variations and also by monitoring the dissociation of FAD. In GOx enzyme kinetics, the  $K_m$  values in the presence of trehalose decreased to 11.34 mM of glucose compared with the enzyme without trehalose ( $K_m=18.76$  mM), the above showed that increasing concentrations of the disaccharide increase the enzyme affinity for its substrate. In regard to  $V_{max}$ , there was no effect by trehalose presence thus indicating that conformational changes of the enzyme during catalysis are of low magnitude. Thermal inactivation kinetics in the presence of trehalose resulted in a half decrease for  $k_i$  at all temperatures tested, as compared to the values without trehalose. The change of the CSM induced by temperature displayed biphasic kinetics, indicating a two-step process for the GOx thermal denaturation. However, in the presence of trehalose, the denaturation kinetics was monoexponential. Trehalose displaced FAD dissociation at higher temperatures (the  $T_m$  increased from 61.3 in absence of trehalose to 64.3°C in presence of the latter). Trehalose improved the catalytic activity of GOx, besides it was observed that during its thermal inactivation there is a previous step to FAD dissociation that may be the formation of a molten globule structure and that the presence of trehalose displace its formation to higher temperatures, by avoiding the exposure of the protein core leading to FAD dissociation and unfolding. Therefore, trehalose contributed significantly to the thermal stability of the GOx and activity improvement.

**Key words:** Glucose oxidase, trehalose, thermal inactivation, FAD dissociation, stabilization.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 PROTEINAS: Estructura y función

El término proteína se deriva de la palabra griega *protos*, que significa “primero” o “primario”. Las proteínas son polímeros de  $\alpha$ -aminoácidos. Hay 20 aminoácidos comunes que son codificados genéticamente y que sirven como precursores para la biosíntesis de las proteínas, que se lleva a cabo en los ribosomas (Roskoski, 1998).

Las proteínas constituyen uno de los grupos de moléculas de mayor importancia en los seres vivos. Todas las proteínas son polipéptidos de peso molecular elevado. Estas macromoléculas son extremadamente complejas con el fin de mantener la multiplicidad de sus funciones (Mathews *et al.* 2002). Así, la estructura de las proteínas se considera en cuatro niveles jerárquicos: primario, secundario, terciario y cuaternario.

### 1.1.1 Niveles estructurales de las proteínas

#### 1.1.1.1 Estructura primaria

La estructura primaria incluye todos los enlaces covalentes entre aminoácidos y está definida por la secuencia de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y la localización de los puentes disulfuro. En este nivel no se especifica la disposición espacial de los aminoácidos unidos (Lehninger *et al.*, 2001).

Un  $\alpha$  aminoácido consiste en un átomo de carbono central, llamado carbono  $\alpha$ , ligado a un grupo amino ( $-\text{NH}_3^+$ ), un grupo ácido carboxílico ( $-\text{COOH}$ ), un átomo de hidrógeno, y un grupo distintivo R. El grupo R se refiere a menudo como la cadena lateral. Sólo los L- $\alpha$ -aminoácidos son componentes de las proteínas y de

éstos existen 20 aminoácidos diferentes de los cuales se construyen las proteínas (Rodwell, 1997).

Los aminoácidos forman cadenas de polipéptidos, construidas por la unión del grupo  $\alpha$ -carboxilo de un aminoácido al grupo  $\alpha$ -amino de otro aminoácido mediante un enlace peptídico (también llamado enlace amida). La formación de un dipéptido a partir de dos aminoácidos es acompañada por la pérdida de una molécula de agua. Cada unidad del aminoácido en un polipéptido se llama residuo. Una cadena polipeptídica tiene polaridad porque sus terminaciones son diferentes, con un grupo  $\alpha$ -amino en un extremo y un grupo  $\alpha$ -carboxilo en el otro (Boyer, 2000).

#### **1.1.1.2 Estructura secundaria**

La estructura secundaria se refiere a las disposiciones regulares y repetitivas en el espacio de residuos aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica (Lehninger *et al.*, 2001).

Cuando una proteína se pliega generalmente oculta en su interior los residuos hidrófobos de los aminoácidos, también envuelve parte del esqueleto polipeptídico polar hacia un ambiente no polar. Las unidades N-H y C=O polares del interior de la cadena proteica se “neutralizan” mediante la formación de enlaces débiles llamados puentes de hidrógeno. Estas uniones débiles son la base de la estructura secundaria: interacciones regulares, repetidas, entre residuos de aminoácidos “muy cercanos” en la secuencia lineal de la proteína (Boyer, 2000).

Existen 2 clases básicas de estructura secundaria, la hélice  $\alpha$  y la lámina  $\beta$ . En la hélice  $\alpha$ , la cadena polipeptídica se enrosca en un cilindro muy empaquetado dentro de la hélice, el grupo CO de cada aminoácido se une por puente de hidrógeno al grupo NH del aminoácido situado cuatro residuos más lejos en la cadena polipeptídica. En la lámina  $\beta$ , la cadena polipeptídica está prácticamente de forma



totalmente extendida. Dos o más láminas  $\beta$  conectadas por puentes de hidrógeno entre NH y CO se juntan para formar hojas  $\beta$  (Stryer *et al.*, 2003).

#### **1.1.1.3 Estructura terciaria**

La estructura terciaria de una proteína se refiere al orden tridimensional de los átomos de la molécula en el espacio, es la estructura compacta y asimétrica que forman las proteínas (Roskoski, 1998).

Las estructuras terciarias de las proteínas solubles en agua tienen características comunes: (1) un interior formado por aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas y (2) una superficie formada principalmente por aminoácidos hidrofílicos que interaccionan con el entorno acuoso. La fuerza que provoca la formación de la estructura terciaria de las proteínas solubles en agua reside en las interacciones hidrofóbicas entre los residuos interiores (Stryer *et al.*, 2003).

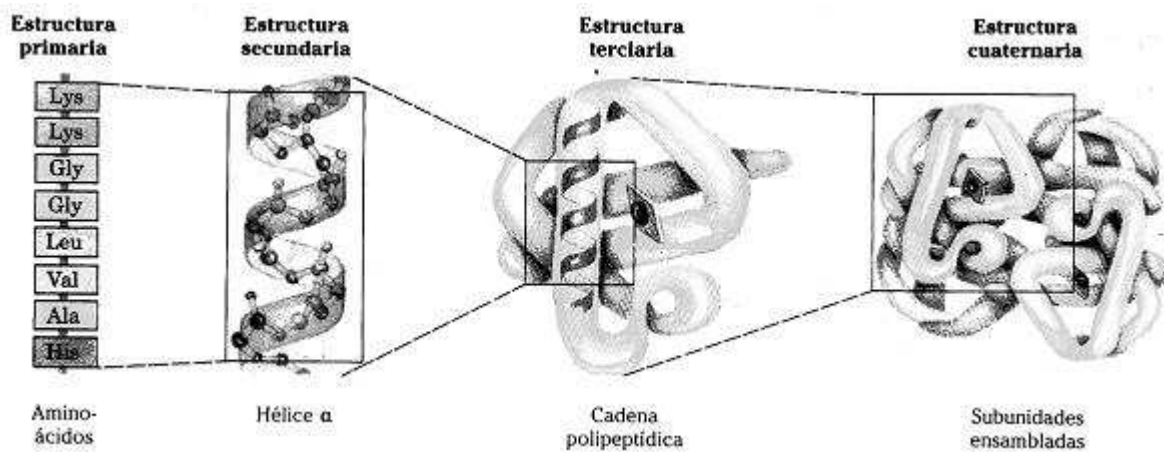
#### **1.1.1.4 Estructura cuaternaria**

Las proteínas que poseen varias cadenas polipeptídicas (proteínas oligoméricas) tienen un nivel adicional de estructura, la estructura cuaternaria, que se refiere a la relación espacial de los polipéptidos o subunidades en la proteína global (Lehninger *et al.*, 2001).

Esta estructura define el arreglo y posición de cada subunidad en la molécula proteica intacta, y especifica los contactos moleculares que existen entre todas las subunidades (Rodwell, 1997). Las interacciones entre las cadenas polipeptídicas plegadas en las proteínas con múltiples subunidades son de los mismos tipos de las que estabilizan la estructura terciaria: puentes salinos, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofílicas y, en ocasiones, enlaces disulfuro. Estas interacciones proporcionan la energía necesaria para estabilizar la estructura de

múltiples subunidades (Mathews *et al*, 2002).

Esta estructura puede ser tan simple como dos subunidades idénticas o tan compleja como docenas de subunidades diferentes (Stryer *et al*, 2003). Así, la glucosa oxidasa, enzima que lleva a cabo la oxidación enzimática de la glucosa, es un dímero de subunidades idénticas; la hemoglobina esta formada de cuatro sububidades (tetramero), dos de tipo  $\alpha$  y dos de tipo  $\beta$  (Figura 1) (Boyer, 2000).



**Figura 1.** Niveles estructurales de las proteínas (estructura de la hemoglobina). (Tomado de Lehninger *et al.*, 2001).

### 1.1.2 Función de las proteínas

Las proteínas son las macromoléculas más versátiles de los sistemas vivos y sirven en funciones cruciales en esencialmente todos los procesos biológicos. Funcionan como catalizadores, transportan y almacenan otras moléculas como oxígeno, proporcionan la ayuda (soporte) mecánica y protección inmune (anticuerpos), generan el movimiento, transmiten los impulsos nerviosos, y controlan el crecimiento y diferenciación (Rodwell, 1997). Son macromoléculas informativas, donde la información se define como una secuencia de aminoácidos; dicha

secuencia en una proteína es análoga a la secuencia de las letras del alfabeto, que forman palabras y oraciones. La secuencia de aminoácidos de las proteínas es determinada por la secuencia nucleotídica del ADN (Roskoski, 1998).

La función de las proteínas depende de su estructura tridimensional, determinada mayoritariamente por el agua. Si el agua es eliminada, se pierde la función (Allison *et al.*, 1999).

### **1.1.2.1 Función enzimática**

De las funciones dinámicas que realizan las proteínas, una de las más importantes es la función catalítica, la mayor parte de las reacciones químicas celulares son catalizadas por enzimas, todas ellas de naturaleza proteica (Boyer, 2000).

Las enzimas son catalizadores biológicos que aumentan las velocidades de los procesos bioquímicos mientras se mantienen inalteradas (Mathews *et al.*, 2002). Las enzimas corresponden a dos clases generales. Algunas son proteínas simples que solo contienen residuos de aminoácidos. Otras son proteínas complejas que contienen residuos de aminoácidos y un cofactor no aminoácido. La enzima activa completa se llama Holoenzima y esta formada por la porción proteínica (apoenzima) y el cofactor. La apoenzima es inactiva. Las moléculas sobre las cuales actúan las enzimas se llaman sustratos y las moléculas resultantes son productos (Roskoski, 1998).

En la catálisis enzimática, uno o mas sustratos se unen al lugar activo de una enzima con lo que se elimina el agua, para formar un complejo enzima-sustrato; tras ello se liberan los productos. La hipótesis del ajuste inducido establece que las enzimas inducen en los sustratos unidos la adopción de unas conformaciones próximas al estado de transición (la forma de mayor energía). La mayoría de las

reacciones enzimáticas sencillas pueden describirse mediante la ecuación de Michaelis-Menten, con tres parámetros, la  $V_{\max}$  (velocidad máxima), que es la velocidad cuando la enzima está completamente saturada de sustrato, la  $K_m$  (constante de Michaelis) que es la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la máxima y la  $K_{\text{cat}}$ , llamada número de recambio, es el número de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo en un solo centro catalítico, cuando la enzima está completamente saturada de sustrato (Mathews *et al.*, 2002).

Las enzimas actúan como catalizadores mediante la reducción de la energía libre de activación de las reacciones químicas. Las enzimas aceleran reacciones ya que proporcionan nuevas vías de reacción en las que el estado de transición tiene menor energía libre y por tanto se forma más rápidamente que en las reacciones no catalizadas. La especificidad de las interacciones enzima-sustrato proviene fundamentalmente de los puentes de hidrógeno formados, que son direccionales, y de la configuración del centro activo, que rechaza las moléculas que no presentan una forma suficientemente complementaria (Stryer *et al.*, 2003).

### **1.1.3 Desnaturalización de las proteínas y agentes desnaturalizantes**

La actividad biológica de una proteína depende del ordenamiento tridimensional apropiado de sus grupos funcionales. De este modo las proteínas sólo funcionan cuando están plegadas en su estructura original o conformación nativa. La alteración de una proteína que modifique su conformación nativa se denomina desnaturalización; este cambio provoca la alteración o desaparición de sus funciones (Lehninger *et al.*, 2001).

La desnaturalización de una proteína implica la alteración de su estructura secundaria, terciaria y cuaternaria. Estos niveles de estructuración superior de la conformación nativa se encuentran al azar, pero la estructura primaria permanece

inalterada de manera que los enlaces amida quedan intactos, sin embargo la presencia de enlaces disulfuro en una proteína aumenta su resistencia a la desnaturalización (Boyer, 2000).

El proceso de degradación de las proteínas tiene lugar en dos etapas, la primera reversible, corresponde al proceso de desplegamiento (desnaturalización) y la segunda irreversible, conduce a un estado final (degradación), que implica la pérdida total de actividad de la proteína. Este comportamiento lo describe el modelo de Lumry y Eyring (1954):



Donde “N” representa la enzima nativa, “U” el estado desplegado y “F” el estado final.

Los agentes que se utilizan para la desnaturalización reversible de las proteínas incluyen los solventes orgánicos (etanol o acetato), urea, detergentes y los ácidos y bases. Estos agentes alteran únicamente las interacciones no covalentes, pero no los enlaces covalentes de la estructura primaria. El calor puede actuar como agente desnaturizante de muchas proteínas; sin embargo, este proceso comúnmente es irreversible; es decir, la proteína desnaturizada no puede volver a su forma biológica nativa (Boyer, 2000).

En este sentido, la transición desde el estado nativo hasta el estado desnaturizado ha sido estudiada en numerosas proteínas utilizando como agentes desnaturizantes urea, cloruro de guanidina, altas temperaturas, cambios en el pH y en la fuerza iónica, entre otros (Gekko e Ito, 1990; Charman *et al.*, 1993; Funahashi *et al.*, 1996).

## 1.2 Glucosa Oxidasa (GOx) de *Aspergillus niger*

La GOx de *A. niger*, es una proteína homodimérica de peso molecular de 160 kDa (Akhtar *et al.*, 2002), que cataliza la oxidación de  $\beta$ -D-glucosa a  $\beta$ -D-gluconolactona, este último se hidroliza espontáneamente a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (Figura 2) (Pazur y Kleppe, 1964; Ahmad *et al.*, 2001; Zoldák *et al.*, 2004).

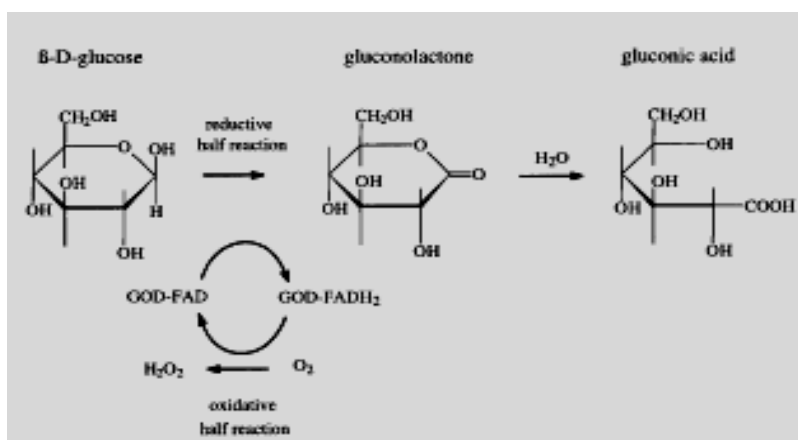


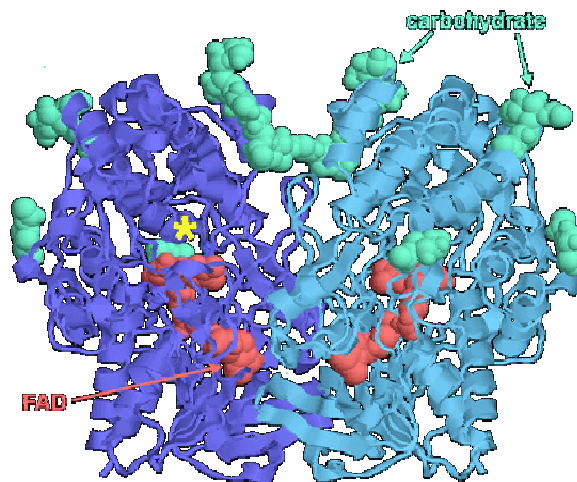
Figura 2. Reacción enzimática de la GOx. (Tomado de Witt *et al.*, 2000)

La GOx tiene en su estructura dos puentes disulfuro, dos grupos sulfhidrilo libres y dos moléculas de flavín adenín dinucleótido (FAD) fuertemente unidas pero no enlazadas covalentemente a la proteína (Haouz *et al.*, 2001; Gouda *et al.*, 2003). La enzima está altamente glicosilada, su contenido de carbohidratos corresponde entre 10 y 16% de su peso molecular (Figura 3) (Pazur *et al.*, 1965; Hayashi y Nakamura, 1981; Ahmad *et al.*, 2001; Leskovac *et al.*, 2005).

La estructura primaria de la GOx de *A. niger* fue determinada de la secuencia de ADN en forma independiente por Kriechbaum *et al.*, (1989) y Frederick *et al.*, (1990), la cual consiste en una cadena polipeptídica simple que contiene 583 residuos de aminoácidos (Leskovac *et al.*, 2005). La enzima es altamente específica para la  $\beta$ -D-glucosa, ya que con otros monosacáridos es oxidada a muy bajo porcentaje (Adams *et al.*, 1960).

La actividad de la enzima fue reportada por primera vez por Müller en 1928 en extractos de *A. niger* y desde entonces, ha sido purificada de este microorganismo (Leskovac *et al.*, 2005). Su actividad catalítica está relacionada a los dos cofactores de FAD contenidos en la molécula de proteína (Cioci y Lavecchia, 1994), el cual es el responsable de la reacción de oxidación-reducción que lleva a cabo la enzima (Haouz *et al.*, 2001; Gouda *et al.*, 2003).

El sitio activo de la enzima contiene, junto con la molécula de FAD, tres aminoácidos en la cadena lateral que están involucrados en la catálisis: His516 con un  $pK_a$  de 6.9 y Glu412 con un  $pK_a$  de 3.4 el cual tiene un puente de hidrógeno e His559 con un  $pK_a$  mayor a 8 (Leskovac, *et al.*, 2005).



**Figura 3.** Modelo estructural de la GOx. (Tomado de ©RCSB Protein Data Bank: [http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=education\\_discussion/molecule\\_of\\_the\\_month/pdb77\\_3.html](http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=education_discussion/molecule_of_the_month/pdb77_3.html)).

### 1.2.1 Uso industrial de la GOx

La enzima es producida naturalmente en varios hongos e insectos, pero la base de muchas aplicaciones industriales es la GOx de *A. niger*:

- La reacción catalizada por la GOx remueve oxígeno y genera peróxido de hidrógeno, y este último actúa como un agente antibacteriano y antifúngico,

una característica utilizada en la conservación de alimentos (Crueger y Crueger, 1990; Ahmad *et al.*, 2001).

- Además, el peróxido de hidrógeno producido por la GOx de *A. niger*, se utiliza como componente de algunos detergentes para el blanqueamiento de los tejidos ya que a diferencia de los productos químicos, éste es un producto biodegradable y se obtiene a un bajo costo (Tzanov *et al.*, 2002).
- La enzima ha sido usada en la industria de panificación, en la producción de polvo de huevo deshidratado, en la producción de vino, entre otros (Wong *et al.*, 2008).
- La GOx también se utiliza en la producción de ácido glucónico (Crueger y Crueger, 1990); el cual se emplea como acidulante para alimentos; uno de sus derivados, el gluconato de calcio, es ampliamente usado para el tratamiento de enfermedades que producen déficit de calcio o para suplir este mineral durante el embarazo; otro de sus derivados, el gluconato de hierro II, es utilizado para suministrar este metal en casos de anemia (Wong *et al.*, 2008).
- La actividad electroquímica de la enzima la hace un importante componente en biosensores para la determinación cuantitativa de D-glucosa en muestras como fluidos corporales, productos alimenticios, bebidas y fermentación de productos (Ahmad *et al.*, 2001; Zoldák *et al.*, 2004). El amplio uso que ha tenido como una enzima modelo en el desarrollo de biosensores es principalmente debido a su alta selectividad por la glucosa sobre otros azúcares, su estabilidad, su mecanismo bien establecido de actividad y por su disponibilidad comercial y bajo costo (Moschou *et al.*, 2004).
- Asimismo, se ha estudiado la aplicación potencial de la enzima como biocombustible en celdas eléctricas (Wong *et al.*, 2008).



### 1.3 Solutos compatibles

Los solutos compatibles, llamados así porque su presencia en altas concentraciones no afecta la estructura y función de las enzimas, son moléculas pequeñas que estabilizan las estructuras celulares (principalmente proteínas) sin interferir en su función (catálisis en enzimas). Estas moléculas contienen un gran número de grupos hidrofílicos, no poseen cargas o bien son zwitteriones a pH fisiológico, son de bajo peso molecular y altamente solubles en agua (González y Peña, 2002). Se ha observado que estas sustancias son sintetizadas rápidamente y acumuladas en el citoplasma en respuesta a la agresión del medio y se eliminan en cuanto desaparece el estrés (Welsh, 2000; Sleator y Hill, 2002).

Algunas moléculas polihidroxiladas son consideradas solutos compatibles, tal es el caso de la trehalosa, glicina betaína, sacarosa, rafinosa, manosil-glicerato, glucosil-glicerato y el glicerol (Puhlev *et al.*, 2001; Gacto *et al.*, 2003; Schade *et al.*, 2004). Se ha demostrado *in vitro* que algunas de estas moléculas orgánicas estabilizan a la proteína nativa a altas temperaturas manteniendo la funcionalidad de las proteínas bajo un medio ambiente extremo (Singer y Lindquist, 1998<sub>a</sub>; Arora *et al.*, 2004). Estos osmoprotectores se acumulan en organismos tales como bacterias, levaduras, plantas y crustáceos (Gacto *et al.*, 2003). Al respecto, se sabe que algunos organismos sobreviven a condiciones adversas del medio como la desecación, a los que se les ha denominado anhidrobiontes, los cuales para sobrevivir necesitan preservar la actividad y estructura de sus membranas y proteínas. Cuando estos organismos están sometidos a diversas condiciones de estrés acumulan solutos compatibles para proteger sus estructuras (Allison *et al.*, 1999).

Se sabe que estos solutos preservan la estructura proteica a través de la formación de una estructura vítrea amorfa (Gekko y Morikawa, 1981; Crowe *et al.*, 1983; Kamiyana *et al.*, 1999), por medio de la protección de los puentes de

hidrógeno (Crowe *et al.*, 2001), o mediante la regulación de propiedades del medio como la viscosidad (Sampedro y Uribe, 2004). Además, se ha visto que la interacción de estos carbohidratos con su entorno en soluciones acuosas es influenciada por las propiedades de los grupos hidroxilo presentes en su estructura (Fabri *et al.*, 2005) y que la estabilización proteica de estos azúcares depende de la concentración y es efectiva solo a concentraciones relativamente altas (Bellocco *et al.*, 2005).

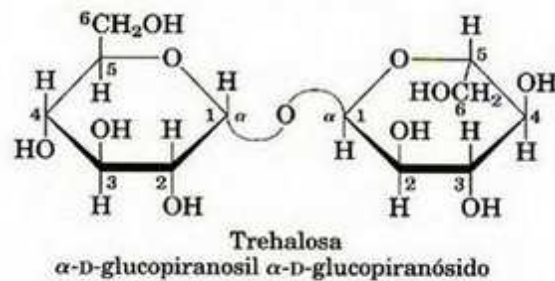
## **1.4 Trehalosa**

La trehalosa fue primero descrita por Wiggers en 1832, quien detectó este disacárido en un hongo que infecta las semillas de maíz en las mazorcas y lo llamó *mutterkornzucker*, posteriormente, Mitscherlich, en 1858 sintetizó este azúcar en el laboratorio y lo llamó *micoso*, del griego hongo (Sampedro, 2002). Ese mismo año, Berthelot encontró este disacárido en los capullos o pupas del escarabajo *Larinus maculata* denominado comúnmente “trehala” por lo que lo llamó trehalosa (Singer y Lindquist, 1998b; Sampedro, 2002).

Este azúcar ha sido aislado de algas, bacterias, hongos, insectos, invertebrados, levaduras y de plantas del desierto, entre otros (Hino *et al.*, 1990; Watanabe *et al.*, 2003; Oku *et al.*, 2005).

### **1.4.1 Características estructurales y propiedades fisicoquímicas de la trehalosa**

La trehalosa ( $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1,1)- $\alpha$ -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de D-glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ - $\alpha$ ,1-1 (Figura 4) (Oku *et al.*, 2005), este enlace conecta los dos extremos reductores de los residuos de glucosa evitando su poder reductor (Paiva y Panek, 1996).



**Figura 4.** Estructura química de la trehalosa. (Tomado de <http://carbohidratosdaniel.blogspot.com/>).

La trehalosa tiene características estructurales muy particulares en comparación con otros carbohidratos, además de ser un azúcar no reductor, está entre los azúcares menos reactivos, tiene alta estabilidad hidrofílica y estabilidad química, la formación de cristales no higroscópicos y ausencia de la formación interna del enlace de hidrógeno; su estabilidad es el resultado de la baja energía de su unión glucosídica  $\alpha,\alpha$  1,1 (Melo *et al.*, 2003), el cual tiene una energía de  $4.184 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , en comparación con la sacarosa, donde su enlace glucosídico posee una energía de  $113 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Schiraldi *et al.*, 2002). Estas características explican el papel principal de la producción de trehalosa como metabolito bajo condiciones de estrés.

Se han propuesto una variedad de funciones para la trehalosa, éstas dependen del sistema biológico analizado. Así, en organismos procarióticos, el carbohidrato se puede utilizar como fuente externa de carbono, y es almacenado como soluto compatible en las bacterias fotosintéticas (Strom y Kaasen, 1993).

#### 1.4.2 Protección de proteínas por la trehalosa bajo condiciones de estrés

Los organismos están sujetos a una variedad de cambios drásticos en el medio ambiente como variaciones en la disponibilidad de nutrientes y agua, acidez, alta osmolaridad (presencia de sales), alta temperatura, así como exposición a metales pesados y radicales libres; y bajo estas condiciones de estrés, la protección

de la función y estructura de las proteínas y otras moléculas es vital para la supervivencia (Schade *et al.*, 2004).

La muerte celular por estrés está relacionada con la desnaturalización de las proteínas; éstas tienen una gran variedad de funciones que le permiten a un organismo llevar a cabo su metabolismo y de esta manera sobrevivir y reproducirse. Ante estas condiciones las células han desarrollado una respuesta al estrés dirigida a proteger la estructura y función de las biomoléculas, dicha respuesta incluye principalmente la síntesis de proteínas de choque térmico (HSPs) y de altas cantidades de solutos compatibles (Schade *et al.*, 2004). Las HSPs se sabe que funcionan como “proteínas chaperonas” que se unen a diversas proteínas y de esta manera las estabilizan o bien reactivan a las proteínas desnaturalizadas (Sampedro y Uribe, 2004).

La trehalosa originalmente se pensó que servía como una reserva de carbohidratos (Elbein, 1974; Lillie y Pringle, 1980) pero más recientemente, se le encontró un papel alternativo, como protector durante el estrés.

Las células acumulan este disacárido en respuesta a diferentes condiciones de estrés como el que se produce por la falta de sustratos, deshidratación, estrés oxidativo (Wiemken, 1990), estrés térmico y otros agentes que inducen la tolerancia al estrés (Singer y Lindquist, 1998<sub>a</sub>).

Varias hipótesis han sido sugeridas para explicar la superior efectividad de la trehalosa. Así Crowe *et al.*, (1984) proponen que la capacidad de la trehalosa de proteger a las membranas durante la deshidratación radica en que interactúa con éstas favoreciendo la permanencia del estado fluido de los lípidos, evitando así la fusión, la separación de fases y el rompimiento de las membranas. Mas adelante, Crowe *et al* (1994) plantean la “teoría del reemplazamiento del agua”, donde observan que los carbohidratos forman puentes de hidrógeno con las proteínas

durante la deshidratación o congelamiento actuando como sustitutos de las moléculas de agua mediante las uniones polares de sus residuos, previniendo así la desnaturalización de las proteínas y la fusión de membranas.

En este sentido, las evidencias sugieren que la trehalosa retarda la transición de líquido a gel mediante el reemplazo de las moléculas de agua por las de trehalosa, manteniendo a las membranas en forma de cristal líquido (Weisburd, 1988; Crowe *et al.*, 2001; Caliskan *et al.*, 2004), además de observarse que este disacárido reemplaza más moléculas de agua que otros carbohidratos (Lerbret *et al.*, 2005; Köper *et al.*, 2005; Oku *et al.*, 2005), incluso mucho mejor que la sacarosa ya que encaja entre los grupos polares de las cabezas de los fosfolípidos con los que interactúa mediante sus hidroxilos (Weisburd, 1988; Crowe *et al.*, 2001), por lo que, menos trehalosa es necesaria para envolver la capa de solvatación de las proteínas, formando una especie de cápsula alrededor de las mismas y de esta forma las estabiliza protegiendo su estructura terciaria y su actividad (Lins *et al.*, 2004; Bellocco *et al.*, 2005). La trehalosa además, forma cristales en estado seco, un proceso que puede ser necesario para la estabilización de las moléculas en estado deshidratado (Crowe *et al.*, 1998).

Se ha observado que en los organismos que son capaces de sobrevivir en deshidratación completa (un fenómeno conocido como anhidrobiosis) su función biológica se “congela” y la trehalosa estabiliza en este estado a las bioestructuras (Lins *et al.*, 2004 y köper *et al.*, 2005). El metabolismo celular se restaura inmediatamente después de que las condiciones de hidratación regresan a la normalidad (Lins *et al.*, 2004).

Adicionalmente, el hecho de que la trehalosa sea un azúcar no reductor, a diferencia de la sacarosa, previene la reacción de Maillard en la cual los grupos aldehído de los azúcares reducen a los grupos amino de los residuos de las

proteínas, produciendo el color café asociado a la degradación proteica, reacción que se acelera a altas temperaturas (Paiva y Panek, 1996; Elbein *et al.*, 2003).

### **1.4.3 Uso biotecnológico de la trehalosa**

Las propiedades particulares que se han descubierto en la trehalosa la han hecho un apreciado producto biotecnológico, y han llevado a este disacárido a diversas aplicaciones, algunas de las cuales se han desarrollado hasta el nivel comercial (Paiva y Panek, 1996; Richards *et al.*, 2002; Schiraldi *et al.*, 2002).

Dentro de las aplicaciones que se han encontrado a este disacárido, algunas de ellas prometedoras debido a que aun siguen en investigación, están:

#### **1.4.3.1 Protector de la actividad enzimática**

Se puede utilizar para mantener a temperatura ambiente enzimas termolábiles (Melo *et al.*, 2003) tales como la polimerasa de ADN, enzimas de restricción y ligasa de ADN (Colaco *et al.*, 1992).

#### **1.4.3.2 Estabilizador y protector de moléculas complejas**

Algunas moléculas biológicas inestables como los anticuerpos pueden desecarse a temperatura ambiente o a 37°C, manteniendo su actividad después de varios años de almacenaje (Roser y Colaco, 1993); además sustitutos de sangre y hemoglobina se han conservado como liposomas y desecado en frío manteniendo gran parte de su actividad aún después de años de almacenaje a temperatura ambiente, lo cual promete abaratar en mucho los costos de almacenaje en nitrógeno líquido y su traslado (Weisburd, 1988; Brumfiel, 2004).

#### **1.4.3.3 *Preservador de células, tejidos y órganos***

Células, tejidos e incluso órganos se pueden mantener desecados o congelados en presencia de trehalosa, lo cual mejora su viabilidad en comparación con otras sustancias (Eroglu *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2000; Melo, *et al.*, 2003). El principal obstáculo para ampliar su uso con estos fines ha sido el de lograr introducir con mayor eficiencia al disacárido dentro de las células y tejidos (Crowe *et al.*, 2001).

#### **1.4.3.4 *Usos médicos y nutracéuticos***

Se está explorando el papel de la trehalosa en la disminución de los síntomas de enfermedades como la Corea de Huntington (Katsuno *et al.*, 2004) y en la osteoporosis (Higashiyama, 2002). En la primera, la administración de trehalosa por vía oral evitaría la formación de agregados proteínicos poliglutamínicos en el cerebro evitando así, el daño y muerte de las neuronas (Katsuno *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2005) y en el caso de la osteoporosis se ha observado que el consumo de trehalosa redujo la degeneración de los huesos en modelos de ratones hembra en los que se eliminaron los ovarios, aunque aún no se conoce con detalle el mecanismo implicado (Higashiyama, 2002).

#### **1.4.3.5 *Aditivo de diversos alimentos y bebidas***

Se utiliza con éxito como un agente protector en condiciones de baja temperatura, como un eficiente preservativo de muchos alimentos (Colaco *et al.*, 1992). Así, se puede emplear en alimentos desecados o procesados como frutos y legumbres que mantienen mucho mejor sus aromas y propiedades organolépticas (Kidd y Devorak, 1994); en panadería y confitería se puede emplear como sustituto de azúcar en combinación con la sacarosa, compensando la reducción en dulzor con la mejor conservación de las propiedades de la masa horneada, sobre todo en repostería que debe mantenerse en congelación, al respecto se sabe que el grado de

dulzura de la trehalosa es de 45 comparado en una escala en la que la sacarosa tiene 100 puntos, la fructuosa 173 y la glucosa 74 (Richards *et al.*, 2002). En cuanto a bebidas, diversas líneas de investigación se han dedicado al estudio del metabolismo de la trehalosa en las levaduras para la fabricación de cerveza y vino, para mejorar así su producción y calidad (Guldfeldt y Arneborg, 1998).

#### **1.4.3.6 *Uso en la industria de cosméticos***

La trehalosa atrapa y reduce la liberación de malos olores de la piel en humanos hasta en un 70 %, lo cual hace que sea factible adicionarla en cremas faciales o corporales y en desodorantes (Colaco *et al.*, 1992; Higashiyama, 2002).



## **2. TRABAJOS PREVIOS**

### **2.1 Estabilidad de la GOx**

La disociación de las subunidades de la GOx o la pérdida de la coenzima FAD, solo es posible bajo condiciones desnaturalizantes (Jones *et al.*, 1982; Ahmad *et al.*, 2001). Algunos estudios reportan que en presencia de desnaturalizantes como el cloruro de guanidino (Ahmad *et al.*, 2001) sulfato de amonio en medio ácido o por calentamiento hay pérdida de la actividad de la enzima (Cioci y Lavecchia, 1994; Leskovac *et al.*, 2005). Sin embargo se ha observado que presenta una relativa alta resistencia a la desnaturalización térmica (Gouda *et al.*, 2003), ya que solo arriba de los 60°C ocurre la disociación de la molécula de FAD con la consecuente inactivación de la enzima (Cioci y Lavecchia, 1994).

En cuanto a la porción de carbohidratos de la GOx, se han realizado diversos estudios donde se proponen varias funciones para estos azúcares, entre los que se incluyen: la correcta función de las proteínas, transporte a través de membranas, función biológica, respuesta inmune y estabilización de la estructura tridimensional de la proteína (Kalisz *et al.*, 1991); sin embargo, algunos autores difieren en el papel que desempeñan estos carbohidratos en la estructura, estabilidad y actividad de la GOx.

De acuerdo con Nakamura y Hayashi (1974) quienes realizaron estudios con la forma nativa y oxidada de la GOx las cuales sometieron a calentamiento en presencia de SDS como desnaturalizante, observaron que la enzima oxidada es mucho más susceptible al tratamiento por calor que la enzima nativa ambos casos en presencia de SDS, por lo que concluyeron que la porción de carbohidratos de la proteína contribuye a incrementar la estabilidad de la enzima contra el calentamiento.

En otros estudios utilizando ácido tricloroacético y sulfato de amonio, se observó que, con la reducción de la porción de carbohidratos, la GOx fue más rápidamente precipitada que la enzima nativa. Estos resultados mostraron que los azúcares unidos a la proteína contribuyen a su alta solubilidad en agua (Takegawa *et al.*, 1989).

No obstante, más recientemente Kalisz *et al.*, (1991) al realizar estudios con la enzima deglicosilada, observaron que la reducción de la porción de carbohidratos de la proteína, la cual fue del 95% mediante incubación de la GOx con endoglicosidasa H y alfa-manosidasa, no afectó significativamente la estabilidad de la enzima.

### **3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

El mecanismo de inactivación de la GOx es un proceso complejo que aún no ha sido resuelto con claridad. Se han presentado algunos modelos que solo estudian una parte del mismo, por ejemplo: el estado desnaturalizado o la liberación del FAD. Además, hasta el momento solo se ha estudiado la estabilización de la enzima por iones inorgánicos monovalentes ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Li^+$ ) y divalentes ( $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ ) y por la presencia de polioles y azúcares como el glicerol, fructuosa, sacarosa y sorbitol. Sin embargo, con la trehalosa que ha demostrado ser uno de los solutos compatibles con mayor efecto protector para las enzimas, aun no se han realizado investigaciones al respecto.

Por otra parte, una de las aplicaciones comerciales más importantes y novedosas de la GOx se encuentra en el desarrollo de biosensores para la determinación y/o monitoreo de la glucosa presente en la sangre y en diversos productos alimentarios. Estos se han realizado gracias a la inmovilización de la enzima en matrices amorfas fabricadas a base de silicio y dextran aldehído (McShane, 2002; Sarath-Babu *et al.*, 2004); sin embargo, el principal problema para estos desarrollos se encuentra en la inactivación/desestabilización de la enzima. En este sentido, la investigación realizada sobre el efecto de la trehalosa, de la cual se han demostrado sus propiedades fisicoquímicas superiores a las de otros azúcares, en la estabilidad de la GOx puede servir como base científica para llevarlo a la aplicación en estos sistemas cuyo principal problema es precisamente su inestabilidad, además de servir para los usos que tiene la enzima en la industria alimentaria en los cuales su estabilidad térmica es de gran importancia y que hasta el momento no se han resuelto efectivamente.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

La GOx de *A. niger* es una enzima de considerable importancia comercial al ser en la actualidad ampliamente usada en la industria para la eliminación de glucosa u oxígeno de productos alimentarios, para la producción de ácido glucónico y como herramienta de diagnóstico molecular, en biosensores para la determinación cuantitativa de D-glucosa en muestras como fluidos corporales, productos alimentarios, bebidas y fermentación de productos, que es actualmente la aplicación más importante de la enzima.

En el caso de la trehalosa, sus propiedades fisicoquímicas particulares explican por si solas las amplias posibilidades de aplicación biotecnológica. Se ha demostrado que es capaz de proteger y estabilizar la estructura y la función de las enzimas y la integridad de las membranas biológicas bajo condiciones de estrés abiótico extremo como desecación, altas temperaturas, congelación, alta salinidad y oxidación, entre otras. En especial, la estabilización (y aún activación) de enzimas termolábiles a temperaturas elevadas en soluciones de trehalosa ya han encontrado aplicaciones en biotecnología.

Al conocer la importancia que han alcanzado, actualmente la trehalosa y la GOx, se considera relevante conocer el mecanismo de inactivación térmica de la enzima y su estabilización por trehalosa, utilizada como una matriz vítrea que impide los movimientos específicos de las proteínas involucrados en la catálisis, y de este modo ampliar el conocimiento sobre la acción de este agente protector en las enzimas, en particular en la estabilidad térmica de la GOx y así tener las bases científicas que sustenten el empleo de este disacárido en las aplicaciones biotecnológicas de la enzima, que requieren de su estabilidad térmica para su óptima función, como es el caso de la industria alimentaria, y el empleo de ésta en biosensores.

## **5. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Conocer el efecto de la trehalosa en la estructura y actividad de la Glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* sometida a inactivación térmica.

### **Objetivos específicos**

1. Purificar la GOx de *A. niger* comercial.
2. Determinar la cinética de saturación del sustrato de la GOx en ausencia y presencia de trehalosa.
3. Obtener la cinética de inactivación térmica de la GOx en ausencia y presencia de trehalosa.
4. Analizar la estructura de la GOx y el efecto de la trehalosa durante la inactivación térmica mediante la obtención del cambio en el CME de la enzima.
5. Determinar el efecto de la trehalosa en la liberación del FAD de la GOx durante la inactivación térmica.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Materiales y reactivos

- La GOx de *A. niger* comercial (suspendida en una solución 0.1 M de amortiguador de acetato de sodio con una concentración de proteína de 4.9 mg/mL); y la trehalosa ( $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1,1)- $\alpha$ -D-glucopiranosido) de *Saccharomyces cerevisiae* se adquirieron de Sigma Chemical Co (Alemania).
- En la cromatografía de exclusión molecular se utilizó un gel de Sephacryl S-200HR (High Resolution) de la marca Amersham Biosciences con un rango de fraccionamiento de  $5 \times 10^3$ - $2.5 \times 10^5 M_r$ .
- Para la preparación del amortiguador de fosfatos: fosfato de potasio monobásico (cristales) de J.T. Baker (México) e Hidróxido de potasio (lentejas) para ajuste de pH de Productos Químicos Monterrey (México).
- Los reactivos para la determinación de la concentración de proteína como son sulfato de cobre pentahidratado, citrato de sodio dihidratado, carbonato de sodio e hidróxido de sodio se adquirieron de J.T. Baker (México), el folin ciocalteau de Sigma Chemical Co (Alemania).
- Para la determinación de actividad enzimática de la GOx como son o-dianisidina (3,3` Dimetoxibenzidina), peroxidasa y glucosa (D (+) glucosa) se usaron reactivos de Sigma Chemical Co (Alemania).
- Para la electroforesis en gel como son acrilamida y bis-acrilamida (N,N'-metilenbisacrilamida), duodecil sulfato de sodio (SDS), glicina, tris base (2-hidroximetil-2-metil-1,3-propanodiol), persulfato de amonio y N,N,N',N'-tetrametilen-etilendamina (TEMED) se utilizaron reactivos de BIO-RAD laboratories.
- El azul de coomassie para la preparación de la solución teñidora de geles se adquirió de BIO-RAD laboratories.
- Para la solución desteñidora de geles de SDS-PAGE se utilizó metanol y ácido acético glacial de Fermont Productos Químicos Monterrey (México).

## 6.2 Métodos

### 6.2.1 Purificación de la GOx de *A. niger* por cromatografía de exclusión por tamaño

#### 6.2.1.1 Cromatografía de exclusión por tamaño

La cromatografía es una técnica de separación de solutos de una mezcla. En la cromatografía de exclusión por tamaño, también llamada de cromatografía de filtración en gel o cromatografía de tamiz molecular la base de la separación es el tamaño molecular y es un método adecuado para separar las macromoléculas de tamaño diferente o para eliminar los contaminantes de peso molecular bajo de las disoluciones de moléculas grandes (Mathews *et al.*, 2002).

Esta técnica se basa en la diferente velocidad con que se mueve cada uno de los solutos a través de un medio poroso, arrastrados por un disolvente en movimiento. A este disolvente se le llama fase móvil y el medio poroso es la fase estacionaria, la cual está constituida por gránulos de un material esponjoso hidratado, que contiene poros que comprenden un intervalo de tamaños, relativamente reducido, de dimensiones moleculares (Williams y Wilson, 1981). La fase móvil se llama eluyente, cuando emerge por la salida de la columna se llama eluato y al proceso que consiste en hacer pasar un líquido o un gas a lo largo de la columna de cromatografía se llama elución (Wilson y Walker, 1994).

La GOx de *A. niger* se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño de acuerdo al método utilizado por Gouda *et al* (2003). Se inyectaron 5 mL de la enzima comercial (concentración de proteína de 4.9 mg/mL suspendida en una solución 0.1 M de amortiguador de acetato de sodio) en una columna de Sephacryl S-200HR (rango de fraccionamiento de  $5 \times 10^3$ – $2.5 \times 10^5$   $M_r$ ). Se eluyó con una solución de ácido etilen glicol tetracético (EGTA) 1 mM en amortiguador de fosfatos

20 mM pH 7.0 a una velocidad de flujo de 10 mL/h. Se colectaron fracciones de 1 mL y se midió la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Shimadzu 1601. De los datos obtenidos se determinó el perfil de elución de las muestras.

## **6.2.2 Determinación de la concentración de proteína por el método de Lowry**

### **6.2.2.1 El método de Lowry**

El método de Lowry *et al* (1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer.

Este método consta de dos etapas: en la primera los iones  $\text{Cu}^{2+}$ , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos  $\text{Cu}^{2+}$ — proteína tienen un color azul claro, además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción, el  $\text{Cu}^{2+}$  se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato. La segunda etapa es la reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

A las fracciones del pico máximo de absorbancia del perfil de elución obtenido de la cromatografía se les determinó la concentración de proteína por el método de Lowry. Se construyó una curva estándar a partir de una solución patrón de albúmina sérica bovina (BSA) (1 mg/mL) a diferentes cantidades (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50,



60 y 80  $\mu\text{L}$ ) y a partir de ésta se determinó la concentración de proteína en 20  $\mu\text{L}$  de las fracciones seleccionadas. A las muestras se agregó 2.5 mL de Solución C, se agitó y se dejó en reposo durante 10 minutos, después se agregó 0.25 mL de Solución D y la mezcla se dejó reposar durante 30 minutos; se leyó la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Shimadzu 1601. Los datos obtenidos se analizaron por regresión lineal y se obtuvo la concentración de proteína expresada en mg/mL de las fracciones seleccionadas.

### **6.2.3 Evaluación de la pureza de la GOx mediante electroforesis en gel de poliacrilamida**

#### **6.2.3.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida.**

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional (Bollag *et al.*, 1996).

En los geles de poliacrilamida, la poliacrilamida se forma por copolimerización de dos compuestos, la acrilamida y la bis-acrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida), en una reacción iniciada por la tetrametiletiléndiamina (TEMED) y el persulfato de amonio. El radical persulfato activa al TEMED, el cual a su vez activa al monómero de acrilamida para que polimerice. Las cadenas de poliacrilamida son entrecruzadas al azar por la bisacrilamida, formándose así una red de porosidad uniforme (Jung *et al.*, 1998; Lomonte, 2007).

### **6.2.3.2 Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

La electroforesis con SDS es un excelente método para identificar y monitorear las proteínas durante un proceso de purificación; también se emplea para la determinación del peso molecular de las subunidades de proteínas (Jeannot *et al.*, 1999). En esta técnica, se mezclan las proteínas con el detergente aniónico SDS para formar complejos desnaturizados, cargados negativamente. La cantidad de SDS unido a las proteínas es proporcional a su tamaño: el SDS se une en una proporción aproximada de 1,4 g SDS/g proteína (Lomonte, 2007). La técnica de SDS-PAGE posee un alto poder de resolución. Lo anterior se deriva del uso de un sistema electroforético discontinuo, formado de dos geles de distinta porosidad y pH, que primero compactan las muestras (gel superior o compactador) y luego las separan (gel inferior o separador) (Laemmli, 1970; Lomonte, 2007).

La pureza de la enzima se evaluó mediante un gel de SDS-PAGE, para lo cual se seleccionaron las fracciones del pico máximo de absorbancia del perfil de elución obtenido de la cromatografía.

Para la preparación del SDS-PAGE se utilizó una cámara de electroforesis Mini Protean II en donde se agregó primero la solución del gel separador y una vez que polimerizó se agregó la solución del gel concentrador colocando al final un peine de 5 pozos. Las soluciones usadas para la preparación del gel separador y concentrador así como las concentraciones y volúmenes utilizados se muestran en la Tabla 1. Las soluciones se agitaron levemente para evitar la formación de burbujas, debido a que el O<sub>2</sub> inhibe la polimerización de la poliacrilamida. El TEMED y el persulfato de amonio se agregaron al final ya que son activadores de la polimerización de la acrilamida.

En los pozos del gel se cargaron las muestras de las fracciones que contenían una concentración de proteína de 20 µg para lo cual se calculó el volumen necesario para obtener esta concentración en cada fracción y se agregó el mismo volumen de amortiguador de muestra. Antes de ser colocadas en el gel, las muestras se incubaron a 30 °C durante 10 minutos.

**Tabla 1. Preparación del gel de SDS-PAGE.**

	<i>Gel separador</i> (10 %)	<i>Gel concentrador</i> (3.8 %)
H <sub>2</sub> O	3.9 mL	1.8 mL
30 % acrilamida/ bisacrilamida	2.5 mL	0.4 mL
Amortiguador tris-base 3 M pH 8.8	0.95 mL	-
Amortiguador tris-base 0.5 M pH 6.8	-	0.75 mL
SDS 10 %	200 µL	200 µL
Persulfato de amonio al 10 %	50 µL	30 µL
TEMED	5 µL	5 µL

En la cámara de electroforesis se colocó, previo a la inyección de las muestras, 250 mL de la solución amortiguadora 10 X tris glicina pH 8.3 a una dilución 1:10 para la cámara grande y para la cámara pequeña 150 mL de la misma solución amortiguadora mas SDS al 0.1 % (1.5 mL).

Al final, se corrieron las muestras de la enzima a 50 V durante 40 minutos y después a 100 V 15 mA por dos horas o hasta que se observó que las muestras llegaron al final del gel.

### **6.2.3.3 Tinción del gel de SDS- PAGE (Tinción con Azul de Coomassie)**

Para la tinción del gel se utilizó la tinción de Coomassie, este método es sencillo, rápido y puede detectar hasta 0.1  $\mu\text{g}$  de proteína por banda (Stryer *et al.*, 2003).

El gel se sumergió en la solución de azul de Coomassie durante 30 minutos como mínimo con agitación suave y posteriormente se enjuagó con agua destilada, para después sumergirlo en la solución desteñidora, la cual se cambió hasta que se observaron las diferentes bandas con claridad. Durante la tinción se utilizaron guantes evitando así huellas dactilares sobre el gel.

### **6.2.4 Cinética de saturación de la GOx en ausencia y presencia de trehalosa**

Para medir la cinética de saturación de la enzima se utilizó un método colorimétrico que consiste en un sistema acoplado peroxidasa/*o*-dianisidina. Una unidad de actividad de GOx causa la oxidación de 1  $\mu\text{mol}$  de *o*-dianisidina por minuto a temperatura ambiente (25 °C) (Ottonello *et al.*, 1999).

La cinética de saturación de la GOx se realizó en un espectrofotómetro UV/Vis Shimadzu 1601 con control de temperatura empleando el método colorimétrico modificado por Ahmad *et al.*, (2001) y Gouda *et al.*, (2003) a 25 °C : 3 mL volumen final conteniendo *o*-dianisidina (0.1 mL de *o*-dianisidina al 1 % en 12 mL de amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M pH 6.0, saturado con oxígeno) peroxidasa (6.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y diferentes concentraciones de glucosa (0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 mM). La mezcla de reacción se preincubó por 10 minutos a 30 °C, posteriormente la reacción se inició agregando 20  $\mu\text{L}$  de GOx (1.57  $\mu\text{g}$  de proteína). El aumento de la absorbancia a 460 nm se siguió por 4 minutos y de la pendiente de la línea formada se calculó la velocidad de catálisis. El efecto de la trehalosa sobre la actividad de la enzima se determinó incluyendo

diferentes concentraciones de trehalosa (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 M) en la mezcla de reacción.

### **6.2.5 Cinética de la inactivación térmica de la GOx en ausencia y presencia de trehalosa**

La cinética de la inactivación térmica en presencia y ausencia de trehalosa se analizó a diferentes temperaturas (50, 55, 60, 65, 70 y 75 °C) en un espectrofotómetro UV/Vis Shimadzu 1601 con control de temperatura.

Se utilizó el sistema acoplado peroxidasa/*o*-dianisidina a 25 °C, referido anteriormente, y una concentración de glucosa de 50 mM como mezcla de reacción (3 mL volumen final). La incubación de la GOx (1.57 µg de proteína en 20 µL) a la temperatura de ensayo se realizó en amortiguador de fosfatos 20 mM pH 6.0 en ausencia y presencia de 0.6 M de trehalosa. La actividad residual se determinó agregando alícuotas de 5 µL de la enzima a la mezcla de reacción a diferentes intervalos de tiempo (cada 2 minutos aproximadamente) durante 40 minutos.

### **6.2.6 Cinética del cambio en el centro de masa espectral (CME) de la GOx durante la inactivación térmica en ausencia y presencia de trehalosa**

La determinación de la fluorescencia de la enzima se llevó a cabo en un espectrofluorómetro Shimadzu RF 5301 con una celda de 10 mm de paso de luz con control de temperatura. Los espectros de fluorescencia se obtuvieron incubando la enzima (1.57 µg de proteína en 20 µL) en amortiguador Pipes 10 mM pH 7.0 a diferentes temperaturas (45, 50, 55, 60, 62.5, 65, 70 y 75 °C), Se midieron los espectros de fluorescencia cada minuto durante 30 minutos a una longitud de onda de excitación de 285 nm (emisión de 300-400 nm) en ausencia y presencia de trehalosa 0.6 M.

Para el análisis del cambio en el CME se calculó de los datos de intensidad a cada longitud de onda ( $I_\lambda$ ) obtenidos a diferentes longitudes de onda ( $\lambda$ ) usando la siguiente ecuación:  $CME = \frac{\sum \lambda I_\lambda}{\sum I_\lambda}$

### **6.2.7 Fluorescencia del FAD de la GOx en ausencia y presencia de trehalosa con el aumento gradual de temperatura**

La enzima (1.57  $\mu\text{g}$  de proteína en 20  $\mu\text{L}$ ) suspendida en amortiguador pipes 10 mM pH 7.0 se sometió a un aumento gradual de la temperatura (de 5 a 85°C) en ausencia y presencia de trehalosa 0.6 M, excitando la proteína a 450 nm (emisión de 475-600 nm). Se registraron espectros de fluorescencia cada 30 segundos durante 40 minutos. Para el análisis de la liberación del FAD se determinó de los datos del pico máximo de emisión de fluorescencia.

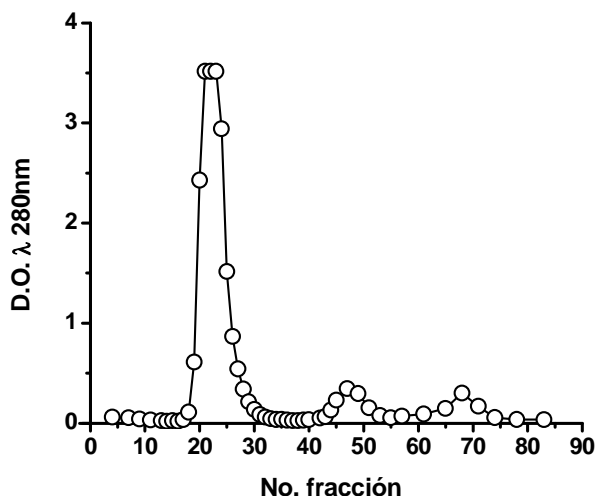
### **6.2.8 Análisis de datos**

Para el análisis de los datos por regresión no lineal se utilizó el software Microcal™ Origin 6.0® (Northampton, MA) con el que se obtuvieron las diferentes gráficas y tablas mostradas en la parte de resultados.

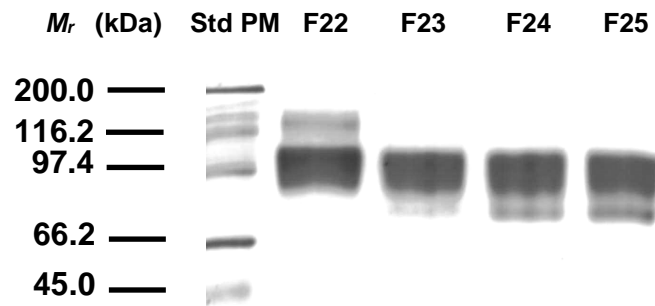
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Purificación de la GOx

De la cromatografía en columna se obtuvo un perfil de elución de la enzima en el cual se encontró un pico máximo de absorbancia a 280 nm entre las fracciones 19 a 30 (Figura 5). De estas fracciones se determinó la concentración de proteína y su pureza se evaluó en un gel de SDS-PAGE, la que presentó mayor pureza fue la fracción 23 (Figura 6). En las otras fracciones se observó una pequeña banda inferior que corresponde probablemente a la enzima no glicosilada. De acuerdo con Nakamura y Hayashi (1974), la enzima glicosilada presenta una mayor resistencia a la desnaturalización debido precisamente a la presencia de los residuos de carbohidratos. Por todo esto se usó la fracción 23 para realizar los experimentos de desnaturalización térmica.



**Figura 5.** Cromatografía de exclusión molecular de la GOx de *A. niger*. La figura muestra el perfil de elución de las fracciones obtenidas de la purificación de la enzima, para lo cual se utilizó una columna de Sephacryl 200HR como se describe en la metodología. Se observa un pico máximo de elución a 280 nm que corresponde a las fracciones 20 a 30.

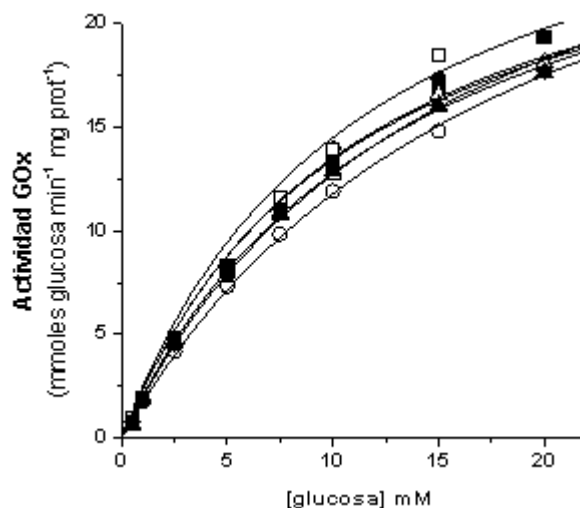


**Figura 6.** SDS-PAGE de la GOx de *A. niger* de las fracciones correspondientes al pico máximo de absorbancia. En la figura se muestran los estándares de peso molecular utilizados ( $M_r$ ): miosina (200,00),  $\beta$ -galactosidasa (116,250), fosforilasa B (97,400), albúmina sérica (66,200) y ovoalbúmina (45,000), así como las fracciones 22 a la 25, de las cuales la fracción 23 mostró mayor pureza al observarse una banda inferior más tenue que en las demás fracciones. Se utilizó la tinción de Coomassie para la tinción del gel.

## 7.2 Efecto de la presencia de trehalosa en la cinética de la GOx

La GOx presentó una cinética de saturación hiperbólica a 25°C. Los datos de velocidad obtenidos se ajustaron por regresión no-lineal a la ecuación de Michaelis-Menten; los parámetros cinéticos calculados ( $K_m = 18.76$  mM y  $V_{max} = 33.97$   $\mu$ moles glucosa  $\text{min}^{-1}$   $\text{mg prot}^{-1}$ ) fueron similares a los reportados en la literatura (Akhtar *et al*, 2002). La presencia de concentraciones crecientes de trehalosa aumentó la afinidad de la enzima por el sustrato; la  $K_m$  disminuyó hasta valores de 11.34 mM de glucosa (Figura 7 y Tabla 2). Lo cual sugiere un efecto de la trehalosa sobre la estructura del sitio activo y que la presencia de concentraciones crecientes de trehalosa aumenta la afinidad de la enzima por su sustrato. En contraste, la falta de efecto sobre la  $V_{max}$  indica que los cambios conformacionales de la GOx durante el ciclo catalítico son de baja magnitud, ya que se ha demostrado que en enzimas con movimientos de dominios de gran magnitud son inhibidas por la viscosidad generada por la trehalosa (Uribe y Sampedro, 2003).





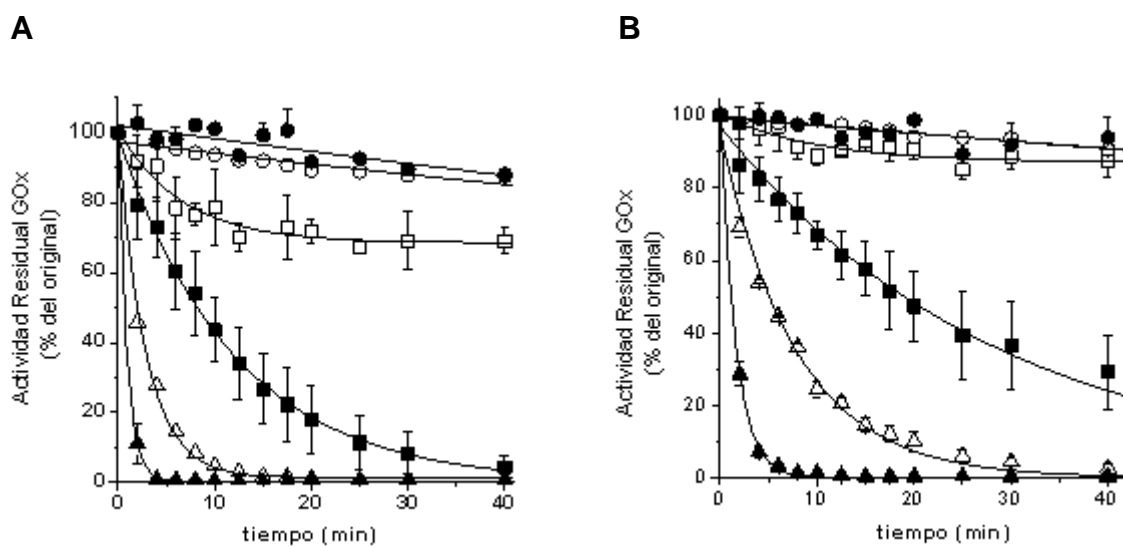
**Figura 7.** Cinética de saturación de la GOx a 25 °C en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de trehalosa (M): ○ 0, ● 0.1, □ 0.2, ■ 0.4, △ 0.6 y ▲ 0.8. La cinética de la enzima se siguió empleando el sistema acoplado peroxidasa *o*-dianisidina como se describe en la metodología. Los datos de velocidad obtenidos se ajustaron por regresión no-lineal a la ecuación de Michaelis-Menten.

**Tabla 2. Efecto de la presencia de trehalosa sobre los parámetros cinéticos de la GOx a 25 °C**

Trehalosa (M)	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ )
0.0	18.76	33.97
0.1	11.34	28.87
0.2	11.34	31.00
0.4	11.12	28.40
0.6	15.42	32.39
0.8	13.60	30.24

### 7.3 Cinética de la inactivación térmica de la GOx y el efecto de la trehalosa

La cinética de inactivación térmica de la GOx fue monofásica (Figura 8A). Las constantes de velocidad de inactivación ( $k_i$ ) se obtuvieron ajustando los datos a la siguiente ecuación  $A_R = A \cdot e^{-(k_i \cdot t)}$  por regresión no-lineal (Figura 8A y Tabla 3). A partir de 60 °C, la GOx presentó una rápida inactivación. En este sentido, se sabe que la termoinactivación de la GOx se debe a la disociación del FAD del sitio activo (Gouda *et al*, 2003). La presencia de trehalosa (0.6 M) disminuyó a la mitad el valor de la  $k_i$  a todas las temperaturas probadas (Figura 8B y Tabla 3), por ejemplo a 65 °C la  $k_i$  disminuyó de  $8.4 \times 10^{-2}$  a  $3.5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  (Tabla 3). Por lo tanto, la trehalosa estabiliza a la GOx evitando la disociación del FAD del sitio activo.



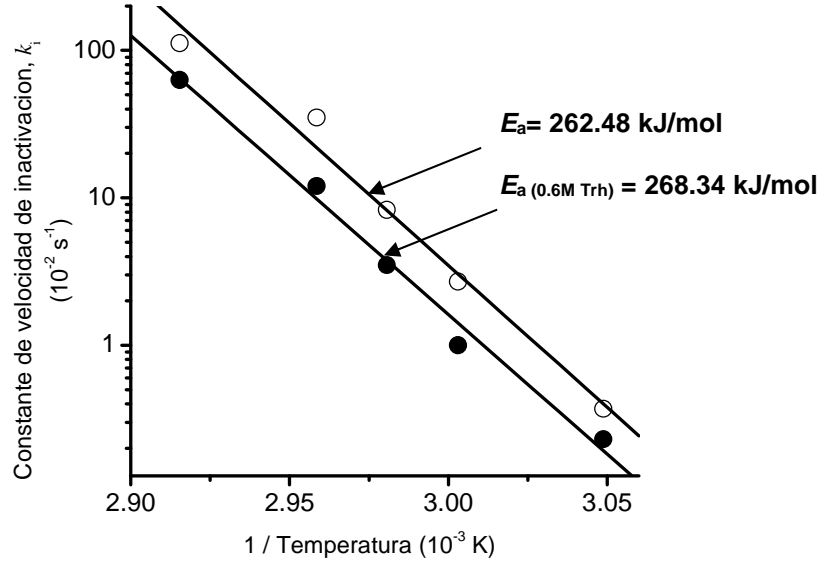
**Figura 8.** Cinética de inactivación térmica de la GOx en ausencia (figura A) y presencia de trehalosa 0.6 M (figura B). Se muestra la cinética de inactivación de la enzima a diferentes temperaturas de incubación (°C): ○ 50, ● 55, □ 60, ■ 65, △ 70 y ▲ 75 durante 40 minutos. Las constantes de velocidad de inactivación ( $k_i$ ) se obtuvieron ajustando los datos a la siguiente ecuación  $A_R = A \cdot e^{-(k_i \cdot t)}$  por regresión no-lineal.

**Tabla 3. Efecto de la trehalosa sobre la constante de velocidad de inactivación ( $k_i$ ) de la GOX.**

Temp (°C)	Trehalosa (0.6M)	
	$k_i \times 10^{-2} \text{min}^{-1}$	$k_i \times 10^{-2} \text{min}^{-1}$
50	0.3	0.2
55	0.4	0.2
60	2.7	0.9
65	8.4	3.5
70	35.0	12.8
75	111.8	62.9

### **7.3.1 Efecto de la trehalosa en la energía de activación durante la inactivación térmica de la GOx**

Durante la inactivación térmica de la enzima, los resultados demostraron que en presencia de trehalosa 0.6 M existe un incremento en la energía de activación ( $E_a$ ) de alrededor de 6 kJ/mol como lo muestra el gráfico de Arrhenius (Figura 9), lo que sugiere que en presencia de trehalosa se requiere de mayor cantidad de energía para que ocurra la desnaturalización de la enzima.



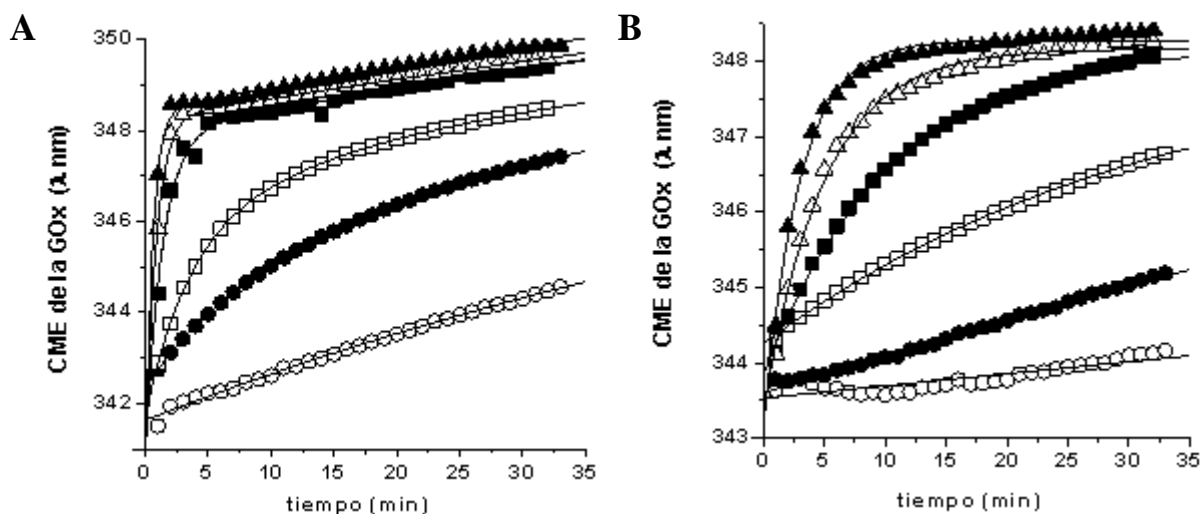
**Figura 9.** Gráfico de Arrhenius de la cinética de inactivación térmica de la GOx. El gráfico muestra el efecto de la trehalosa en la  $E_a$  durante la inactivación térmica de la enzima. En presencia de trehalosa 0.6 M la  $E_a$  aumentó 6 kJ/mol comparado con la enzima sin trehalosa.

#### 7.4 Efecto de la trehalosa en la cinética del cambio en el CME de la GOx durante la inactivación térmica

El efecto de la trehalosa en la estructura de la GOx se evaluó por fluorescencia intrínseca analizando los cambios en el CME a diferentes temperaturas. El cambio en el CME de la GOx se siguió en ausencia y en presencia de trehalosa 0.6 M. En contraste con el estudio de inactivación térmica, el CME presentó un cambio hacia el rojo a partir de 45 °C; lo que indica que existe un paso previo a la pérdida del FAD; posiblemente la formación de un glóbulo fundido. El cambio del CME por temperatura siguió una cinética bifásica ya que los datos se ajustaron a una ecuación biexponencial ( $CME_t = CME_0 + A_1 \cdot [1 - e^{(-k_1 \cdot t)}] + A_2 \cdot [1 - e^{(-k_2 \cdot t)}]$ ) por regresión no-lineal (Figura 10<sup>a</sup> y Tabla 4). La cinética bifásica describe dos pasos en el cambio del CME, el primer paso (de mayor amplitud) podría deberse a la formación del glóbulo fundido y el segundo a la disociación del FAD (Figura 11). Sin

embargo, en presencia de trehalosa se observó que, la cinética de cambio del CME fue monoexponencial ya que los datos se ajustaron a la siguiente ecuación ( $CME_t = CME_0 + A \cdot [1 - e^{(-k \cdot t)}]$ ) (Figura 10B y Tabla 4). La trehalosa disminuye la constante de velocidad de la primera fase e inhibe totalmente el segundo paso; que correspondería a la liberación del FAD.

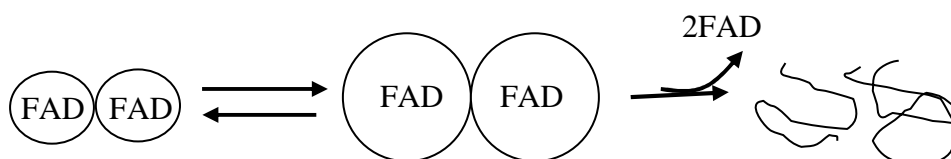
A 60 °C el cambio del CME se observa tanto en presencia como en ausencia de trehalosa (Figura 10A y 10B). En contraste, a esta misma temperatura la actividad de la GOx es totalmente estable en presencia de trehalosa (Figura 10B). Los resultados sugieren que la trehalosa inhibe la disociación del FAD por temperatura así como la formación del glóbulo fundido en cada uno de los monómeros en la GOx.



**Figura 10.** CME de la GOx en ausencia (A) y presencia de trehalosa 0.6 M (B) a diferentes temperaturas de incubación (°C): ○ 50, ● 55, □ 60, ■ 62.5, △ 65 y ▲ 70. Los espectros de fluorescencia de la enzima se midieron entre 300-400 nm a una longitud de onda de excitación de 285 nm. Los datos del CME en ausencia de trehalosa se ajustaron por regresión no lineal a una ecuación biexponencial ( $CME_t = CME_0 + A_1 \cdot [1 - e^{(-k_1 \cdot t)}] + A_2 \cdot [1 - e^{(-k_2 \cdot t)}]$ ); mientras que en presencia de trehalosa se ajustaron por regresión no lineal a una ecuación monoexponencial ( $CME_t = CME_0 + A \cdot [1 - e^{(-k \cdot t)}]$ ).

**Tabla 4. Efecto de la trehalosa en la constante de velocidad del cambio en el CME de la GOx durante la inactivación térmica**

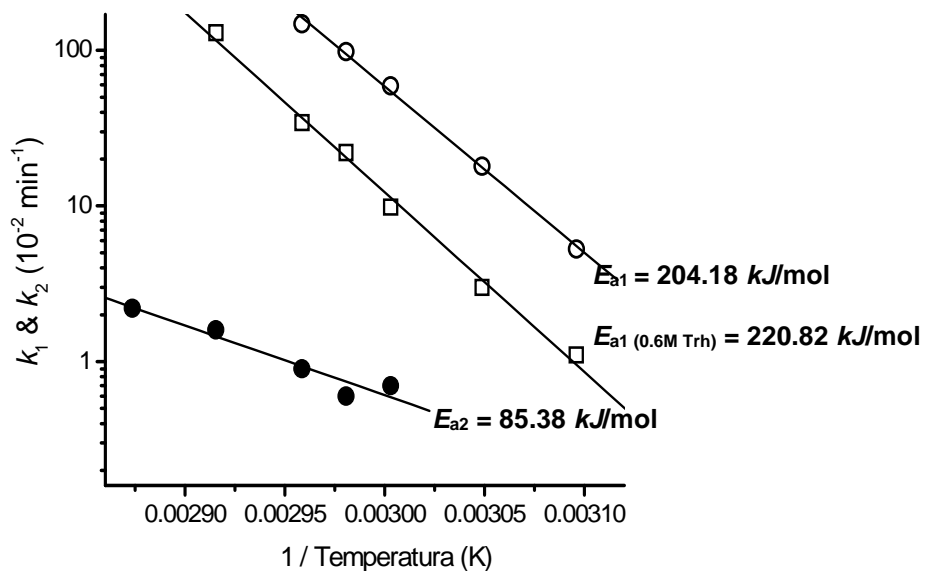
trehalosa 0.6 M				
Temp (°C)	$k_1$ $10^{-2} \text{ min}^{-1}$	$k_2$ $10^{-2} \text{ min}^{-1}$	$k_1$ $10^{-2} \text{ min}^{-1}$	$k_2$ $10^{-2} \text{ min}^{-1}$
50	$5.3 \pm 0.1$	ND	$1.1 \pm 0.04$	ND
55	$18.0 \pm 3.8$	$0.7 \pm 5.8$	$3.0 \pm 0.01$	ND
60	$59.0 \pm 5.5$	$0.7 \pm 3.1$	$9.8 \pm 0.02$	ND
62.5	$98.0 \pm 6.1$	$0.6 \pm 1.7$	$22.0 \pm 2.90$	ND
65	$148.0 \pm 6.9$	$0.9 \pm 0.1$	$34.2 \pm 2.80$	ND
70	ND	$1.6 \pm 0.2$	$129.8 \pm 3.60$	ND



**Figura 11. Modelo de inactivación térmica de la GOx**

#### **7.4.1 Efecto de la presencia de trehalosa en la energía de activación del cambio en el CME de la GOx durante la inactivación térmica**

Los datos obtenidos durante el cambio en el CME de la GOx muestran que en presencia de trehalosa 0.6 M hay un aumento en la energía de activación en la primera fase de alrededor de 15 kJ/mol en comparación con la enzima sin trehalosa sometida a las mismas condiciones (Figura 12), lo que indica que la trehalosa evita la segunda fase la cual podría ser la completa desnaturalización de la proteína.



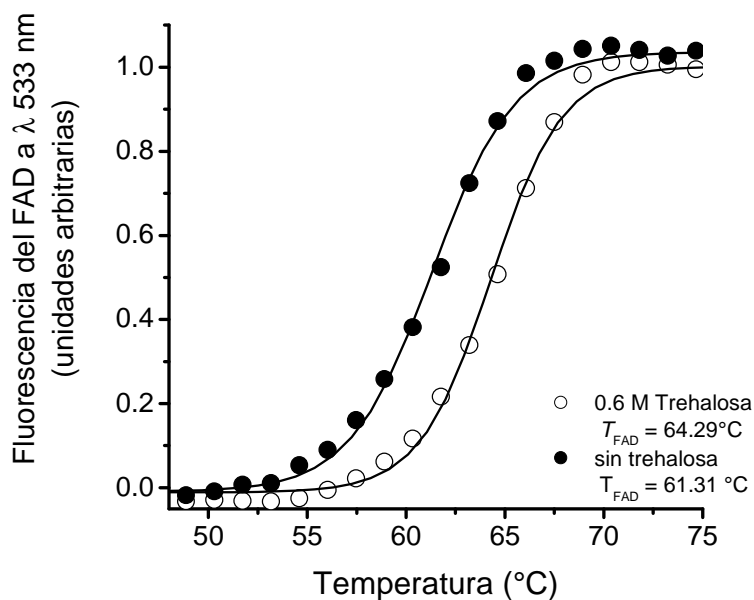
**Figura 12.** Gráfico de Arrhenius del cambio en el CME de la GOx durante la inactivación térmica. El gráfico muestra el efecto de la trehalosa en la energía de activación ( $E_a$ ) del cambio en el CME durante la inactivación térmica de la enzima.  $k_1$  ○, □ + 0.6 M Trh.  $k_2$  ●. En presencia de trehalosa 0.6 M la  $E_{a1}$  aumentó 15 kJ/mol en comparación con la enzima sin trehalosa.

## 7.5 Efecto de la trehalosa en la liberación de FAD de la GOx por el aumento de la temperatura

La posibilidad de que la trehalosa evita la disociación del FAD de la GOx se probó de la siguiente manera: la enzima fue suspendida en 2 mL de amortiguador Pipes 10 mM, pH 7.0, en ausencia y presencia de trehalosa 0.6 M. La temperatura fue incrementada de 5 a 85 °C a una velocidad de calentamiento de 2.86 °C  $\text{min}^{-1}$ . Las medidas de los espectros de fluorescencia del FAD (475-600 nm) fueron obtenidas excitando la proteína a 450 nm. Se observó una intensidad de fluorescencia máxima a 533 nm la cual fue usada para el análisis de datos.

Del análisis de datos obtenidos se observó que la trehalosa fue capaz de desplazar la disociación del FAD a mayores temperaturas, la temperatura de

transición ( $T_m$ ) paso de 61.3 a 64.3 °C en ausencia y presencia de trehalosa, respectivamente (Figura 13). Lo cual indica que la estabilización de la GOx por trehalosa se debe al impedimento de la liberación del FAD posiblemente como resultado de la compactación de la estructura de la proteína por el disacárido.



**Figura 13.** Disociación del FAD de la GOx inducido por el aumento de la temperatura en ausencia y presencia de trehalosa. Los espectros de fluorescencia (476-600 nm) del FAD se obtuvieron excitando a 450 nm y los valores del pico máximo de emisión a 533 nm se utilizaron para obtener el gráfico en ausencia (●) y presencia (○) de 0.6 M de trehalosa. Se realizaron tres experimentos y solo se muestra uno representativo.



## 8. DISCUSIÓN

En la purificación de la GOx de *A. niger* comercial para eliminar las trazas de catalasa que se presentan en las preparaciones comerciales de la enzima (Gouda *et al.*, 2003), se utilizó en principio un gel de Sephacryl S-300HR (rango de fraccionamiento de  $1 \times 10^4$ - $1.5 \times 10^6$   $M_r$ ). Al analizar las fracciones en el gel de SDS-PAGE se observó una banda inferior en todas las fracciones seleccionadas de la cromatografía, por lo que se decidió utilizar un gel de Sephacryl S-200HR con un tamaño de poro más pequeño (rango de fraccionamiento de  $5 \times 10^3$ - $2.5 \times 10^5$   $M_r$ ); al evaluar nuevamente la pureza de las fracciones, éstas volvieron a presentar una banda inferior pero mas ligera, sin embargo la fracción 23 mostró una banda inferior más tenue en comparación con las otras fracciones (Figura 6), por lo que se decidió tomar esta fracción para la realización de los diferentes experimentos. La presencia de esta banda inferior se puede deber a la enzima no glicosilada.

En el efecto de la trehalosa en la cinética de la GOx la  $K_m$  de la enzima disminuyó lo que demuestra que la trehalosa mejora la afinidad de la enzima por su sustrato, sin embargo no se observaron cambios en la  $V_{max}$  lo que indica que la GOx no sufre cambios conformacionales importantes durante su ciclo catalítico, ya que se ha demostrado que la trehalosa es capaz de inhibir en las enzimas los movimientos (fluctuaciones térmicas) de dominios que las llevan a la desnaturalización como lo demostraron Butler y Falke (1996), y posteriormente lo confirmaron Uribe y Sampedro (2003) al encontrar que la viscosidad generada por la trehalosa inhibe en las enzimas los movimientos de dominios de gran magnitud. En este sentido se sabe que la trehalosa forma una especie de cápsula alrededor de las proteínas y de esta manera las estabiliza protegiendo su estructura terciara y su actividad (Lins *et al.*, 2004; Bellocco *et al.*, 2005), lo que lleva a la estabilidad de la enzima en condiciones de estrés.

En la cinética de inactivación térmica de la GOx se observó una clara protección de la trehalosa al disminuir a la mitad la  $k_i$  en comparación con la enzima sin trehalosa lo cual se puede deber a la viscosidad generada por este disacárido, lo que confirma lo observado por Sampedro y Uribe (2004), quienes demostraron que la constante de velocidad de inactivación es inversamente proporcional a la viscosidad del medio; probándose con esto que el proceso de termoinactivación de algunas enzimas es dependiente de la difusión de los dominios en el medio. Por lo tanto, se puede inhibir la desnaturalización de las proteínas aumentando la viscosidad del medio; lo cual se logra por la presencia de trehalosa entre otros solutos compatibles (Sampedro *et al.*, 2002). En comparación, estudios hechos con la enzima RNasa A al someterla a estrés térmico se observó que la trehalosa la estabiliza mediante un aumento en la tensión superficial del medio, que conduce a la hidratación preferencial de la proteína (Kaushik y Bhat, 2003), lo que aumentó su resistencia ante el choque térmico.

Adicionalmente, diversos estudios han demostrado que la trehalosa actúa directamente durante el choque térmico para estabilizar a las proteínas en su estado nativo y se ha encontrado que, además reduce la agregación de las proteínas que ya están desnaturalizadas, una función que se pensaba era llevada a cabo exclusivamente por las HSPs. Sin embargo, se ha observado que a altas concentraciones de trehalosa se inhibe la reactivación de la proteína desnaturalizada por moléculas chaperonas. Esto puede explicar porque la degradación de la trehalosa por la enzima trehalasa es necesaria para la recuperación del choque térmico y de otros tipos de estrés, para que las estructuras celulares sean liberadas del carbohidrato unido (Singer y Lindquist, 1998a). Esto haría accesibles a las proteínas y así promover la renaturalización correcta. La energía necesaria para la renaturalización se podría obtener de la hidrólisis de la trehalosa (Dawes y Senior, 1973).

En los estudios de actividad y cambios estructurales realizados en la GOx al someterla a estrés térmico y los efectos de la presencia de trehalosa en el medio, se observó que este disacárido proporciona una importante protección a la enzima al demostrarse que en presencia de trehalosa se evita la formación del glóbulo fundido en los monómeros y la consecuente pérdida del FAD; lo que llevaría a la enzima a la pérdida de actividad (Jones *et al.*, 1982; Ahmad *et al.*, 2001). Esto además demuestra que a pesar de que la enzima presenta una alta resistencia al estrés térmico, ya que solo arriba de los 60°C se observa la salida de la molécula de FAD de la proteína (Cioci y Lavecchia, 1994), en presencia de trehalosa se incrementó la temperatura de disociación del FAD. Al respecto, el efecto estabilizante de la trehalosa se interpreta como consecuencia del fenómeno de “exclusión preferencial” sobre las proteínas (Lin y Timasheff, 1996), ya que ésta no se une a la enzima sino que es excluida preferentemente de la capa de hidratación y ocasiona un estado más compacto de la proteína (Sampedro *et al.*, 2002).

Es importante destacar que la enzima es una glicoproteína, al respecto se sabe que, entre otras funciones importantes de esta porción de carbohidratos, éstos proporcionan una significativa estabilidad a la estructura tridimensional de la proteína (Kalisz *et al.*, 1991), por lo que se utilizó la fracción de la enzima que presentó mayor pureza ya que las otras fracciones mostraron una banda inferior que probablemente corresponde a la forma deglicosilada de la GOx.

En este sentido, se ha observado que la fracción de carbohidratos de la GOx contribuye de forma importante a su estabilidad, como lo demostraron Nakamura y Hayashi (1974) y posteriormente Takegawa *et al.* (1989). Nakamura y Hayashi comprobaron que la enzima nativa es más resistente a la desnaturalización térmica que la forma oxidada de ésta al someterlas ambas a calentamiento en presencia de SDS como desnaturalizante con lo que concluyeron que la enzima deglicosilada es más susceptible a la desnaturalización; así mismo Takegawa *et al.* demostraron que los glúcidos unidos a la enzima ayudan a que ésta presente una alta solubilidad en

agua, esto lo comprobaron al realizar estudios con ácido tricloroacético y sulfato de amonio como desnaturalizantes, observando que con la reducción de los carbohidratos de la GOx, la enzima precipita más rápido que en su forma nativa. Sin embargo esto no es concluyente ya que en otro estudio realizado con la enzima, al reducir en un 95% la porción de carbohidratos mediante su incubación con endoglicosidasa H y alfa-manosidasa, no se afectó la estabilidad de la enzima en forma importante (Kalisz *et al.*, 1991).

## **9. CONCLUSIONES**

- La presencia de trehalosa en el medio mejora la actividad catalítica de la GOx, además de que, durante su ciclo catalítico no sufre cambios conformacionales de gran magnitud.
- La trehalosa aumenta la estabilidad de la GOx contra la inactivación térmica.
- En los cambios conformacionales que sufre la GOx durante su termoinactivación, la presencia de trehalosa inhibe el paso previo a la salida del FAD del sitio activo (probablemente la formación de un glóbulo fundido) lo que desplaza la salida del FAD a mayores temperaturas y la consecuente inactivación de la enzima.
- La presencia de trehalosa evita la exposición del interior de la proteína y en consecuencia la liberación del FAD.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, E.C. Jr., Mast, R.L., Free, A.H. (1960). Specificity of glucose oxidase. *Arch Biochem Biophys.* 91: 230-234.
- Ahmad, A., Akhtar, M.S., Bhakuni, V. (2001). Monovalent Cation-Induced conformational Change in Glucose Oxidase Leading to Stabilization of the Enzyme. *Biochemistry.* 40:1945-1955.
- Akhtar, M.S., Ahmad, A., Bhakuni, V. (2002). Divalent Cation Induced changes in Structural Properties of Dimeric Enzyme Glucose Oxidase: Dual Effect of Dimer Stabilization and Dissociation with Loss of cooperative Interactions in Enzyme Monomer. *Biochemistry.* 41:7141-7149.
- Allison, S.D., Chang, B., Randolph, T.W., Carpenter, J.F. (1999). Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. *Arch Biochem Biophys.* 365:289-298.
- Arora, A., Ha, C., Park, C.B. (2004). Inhibition of insulin amyloid formation by small stress molecules. *FEBS Letters.* 564:121-125.
- Bellocco, E., Laganà, G., Barreca, D., Ficarra, S., Tellone, E., Magazù, S., Branca, C., Kotyk, A., Galtieri, A., Leuzzi, U. (2005). Role of Polyols in Thermal Inactivation of Shark Ornithine Transcarbamoylase. *Physiol Res.* 54:395-402.
- Bollag, M.D., Rozycki M.D., Edelstein S.J. (1996). *Protein Methods.*, 2<sup>nd</sup> Edition. (ed) Wiley-Liss, New York, NY, USA. pp:107-172.
- Boyer, R. (2000). En: *Conceptos de Bioquímica.* (ed) Sánchez, N.O, Internacional Thomson Editores, México, D.F. pp: 111-140.
- Brumfiel, G. (2004). Just add water. *Nature.* 428: 14-15.
- Butler, S.L., Falke, J.J. (1996). Effects of protein stabilizing agents on thermal backbone motions: a disulfide trapping study. *Biochemistry.* 35:10595-10600.
- Caliskan, G., Mechtani, D., Roh, J.H., Kisliuk, A., Sokolov, A.P., Asma, S., Cicerone, M.T., Lin-Gibson, S., Peral, I. (2004). Protein and solvent dynamics: How strongly are they coupled?. *J Chem Phys.* 121:1978-1983.

- Charman, S.A., Mason, K.L., Charman, W.N. (1993). Techniques for assessing the effects of pharmaceutical excipients on the aggregation of porcine growth hormone. *Pharm Res.* 10:954-962.
- Cioci, F., Lavecchia, R. (1994). Effect of polyols and sugars on heat-induced flavin dissociation in glucose oxidase. *Biochem Mol Biol Int.* 34:705-12.
- Colaco, C., Sen, S., Thangavelu, M., Pinder, S., Roser, B. (1992). Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Biotechnology (N Y).* 10:1007-1011.
- Crowe, J.H, Crowe, L.M, Chapman, D. (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organism. The role of trehalose. *Science.* 223:701-703.
- Crowe, J.H; Crowe, L.M., Mouradian, R. (1983). Stabilization of biological membranes at low water activities. *Cryobiology.* 20:346-356.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Oliver, A.E., Tsvetkova, N., Wolkers, W., Tablin, F. (2001). The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology.* 43:89-105.
- Crowe, J.H., Carpenter, J.F., Crowe L.M., (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol.* 60:73-103.
- Crowe, J.H., Leslie, S.B., Crowe L.M. (1994). Is vitrification sufficient to preserve liposomes during freeze-drying?. *Cryobiology.* 31:355-366.
- Crueger, A., Crueger, W. (1990). Glucose-transforming enzymes. En: *Microbial Enzymes and Biotechnology.* 2<sup>nd</sup> Edition. (ed) Fogarty, W.M. y Kelly, C.T., Elsevier applied Science. London and New York, N.Y. USA. pp: 177-227.
- Dawes, E.A., Senior, P.J. (1973). The role and regulation of energy reserve polymers in micro-organisms. *Adv Microb Physiol.* 10:135-266.
- Elbein A.D. (1974). The metabolism of alpha, alpha-trehalose. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 30:227-56.
- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I., Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology.* 13:17R-27R.

- Eroglu, A., Russo, M.J., Bieganski, R., Fowler, A., Cheley, S., Bayley, H., Toner, M. (2000). Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 18:163-167.
- Fabri, D., Williams, M., Halstead, T.K. (2005). Water T2 relaxation in sugar solutions. *Carbohydr Res.* 340: 889-905.
- Frederick, K.R., Tung, J., Emerick, R.S., Masiarz, F.R., Chamberlain, S.H., Vasavada, A., Rosenberg, S., Chakraborty, S., Schopfer, L.M., Massey, V. (1990). Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. *J Biol Chem.* 265: 3793-3802.
- Funahashi, J., Takano, K., Ogasahara, K., Yamagata, Y., Yutani, K. (1996). The structure, stability, and folding process of amyloidogenic mutant human lysozyme. *J Biochem (Tokyo).* 120:1216-1223.
- Gacto, M., Soto, T., Vicente-Soler, J., Villa, T.G., Cansado, J. (2003). Learning from yeasts: intracellular sensing of stress conditions. *Int Microbiol.* 6:211-219.
- Gekko, K., Ito, H. (1990). Competing solvent effects of polyols and guanidine hydrochloride on protein stability. *J Biochem (Tokyo).* 107:572-577.
- Gekko, K., Morikawa, T. (1981). Thermodynamics of polyol-induced thermal stabilization of chymotrypsinogen. *J Biochem (Tokyo).* 90:51-60.
- González-Hernández, J.C., Peña, A. (2002). Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). *Rev Latinoam Microbiol.* 44:137-156.
- Gouda, M.D., Singh, S.A., Rao, A.G., Thakur, M.S., Karanth, N.G. (2003). Thermal inactivation of glucose oxidase. Mechanism and stabilization using Additives. *J Biol Chem.* 278:24324-24333.
- Guldfeldt, L. U., Arneborg, N. (1998). The effect of yeast trehalose content at pitching on fermentation performance during brewing fermentations. *J Inst Brew.* 104:37-39.



- Guo, N., Puhlev, I., Brown, D.R., Mansbridge, J., Levine, F. (2000). Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nat Biotechnol.* 18:168- 171.
- Haouz, A., Glandières, J.M., Alpert, B. (2001). Involvement of protein dynamics in enzyme stability: The case of glucose oxidase. *FEBS Letters.* 506:216-220.
- Hayashi, S., Nakamura, S. (1981). Multiple forms of glucose oxidase with different carbohydrate compositions. *Biochem Biophys Acta.* 657: 40-51.
- Higashiyama, T. (2002). Novel functions and applications of trehalose. *Pure Appl Chem.* 74:1263-1269.
- Hino, A., Mihara, K., Nakashima, K., Takano, H. (1990). Trehalose Levels and Survival Ratio of Freeze-Tolerant versus Freeze-Sensitive Yeasts. *Appl Environ Microbiol.* 56:1386-1391.
- Jeannot, M.A., Zheng, J., Li, L. (1999). Observation of sodium gel-induced protein modifications in dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis and its implications for accurate molecular weight determination of gel-separated proteins by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *J Am Mas Spectrum.* 10: 512-520.
- Jones, M.N.; Manley, P., Wilkinson, A. (1982). The dissociation of glucose oxidase by sodium n-dodecyl sulphate. *J Biochem.* 203: 285-291.
- Jung, D.W, Tack, G.H., Lim, J.W., Bae, C.J., Kim, G.Y., Yoo, G.S., Choi, J.K. (1998). Detection of proteins in poliacrilamida gels using eriochrome black T rhodamina B. *Anal Biochem.* 263: 118-120.
- Kalisz, H.M., Hecht, H.J., Schomburg, D., Schmid, R.D. (1991). Effects of carbohydrate depletion on the structure, stability and activity of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochim Biophys Acta.* 1080:138-42.
- Kamiyana, T., Sadahide, Y., Nogusa, Y., Gekko, K. (1999). Polyol-induced molten globule of cytochrome c: an evidence for stabilization by hydrophobic interaction. *Biochem Biophys Acta.* 1434:44-57.
- Katsuno, M., Adachi, H., Sobue, G. (2004). Sweet relief for Huntington disease. *Nat Med.* 10:123-124.

- Kaushik, J.K., Bhat, R. (2003). Why Is Trehalose an Exceptional Protein Stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. *J Biol Chem.* 278:26458–26465.
- Kidd, G., Devorak, J. (1994). Trehalose is a sweet target for agbiotech. *Biotechnol.* 12: 1328-1329.
- Köper, I., Bellissent-Funel, M.C., Petry, W. (2005). Dynamics from picoseconds to nanoseconds of trehalose in aqueous solutions as seen by quasielastic neutron scattering. *J Chem Phys.* 122:14514.
- Kriechbaum, M., Heilmann, H.J., Wientjes, F.J., Hahn, M., Jany, K.D., Gassen, H.G., Sharif, F., Alaeddinoglu, G. (1989). Cloning and DNA sequence analysis of the glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* NRRL-3. *FEBS Lett.* 255: 63-66.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (2001). En: *Lehninger, Principios de Bioquímica*, 3<sup>ra</sup> Edición. (ed) Ediciones Omega, Barcelona, España. pp: 159-202.
- Lerbret, A., Bordat, P., Affouard, F., Guinet, Y., Hédoux, A., Paccou, L., Prévost, D., Descamps, M. (2005). Influence of homologous disaccharides on the hydrogen-bond network of water: complementary Raman scattering experiments and molecular dynamics simulations. *Carbohydr Res.* 340:881-887.
- Leskovac, V., Trivic, S., Wohlfahrt, G., Kandrac, J., Pericin, D. (2005). Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *Int J Biochem Cell Biol.* 37:731-750.
- Lillie, S.H., Pringle, J.R. (1980). Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J Bacteriol.* 143:1384-1394.
- Lin, T.Y., Timasheff, S.N. (1996). On the role of surface tension in the stabilization of globular proteins. *Protein Sci.* 52:372-381.

- Lins, R., Pereira, C., Hünenberger, P. (2004). Trehalose–Protein Interaction in Aqueous Solution. *Proteins*. 55:177-186.
- Lomonte, B. (2007). Electroforesis en Gel de Poliacrilamida. En: *Inmunología General: Manual de Métodos Inmunológicos*. (ed) Lara, Segura y Asociados, San José, Costa Rica. pp: 92-101.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr A.L, Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193:265-275.
- Lumry, R., Eyring, H. (1954). Conformation changes of proteins. *J Phys Chem*. 58: 110.
- Mathews, C.K., Van-Holde, K.E., Ahern, K.G. (2002). En: *Bioquímica*, 3ª edición. (ed) Pearson Educación, S.A., Madrid, España. pp:169, 181-235.
- McShane, M.J. (2002). Potential for glucose monitoring with nanoengineered fluorescent biosensors. *Diabetes Technol Ther*. 4:533-538.
- Melo, E.P., Chen, L., Cabral, J.M., Fojan, P., Petersen, S.B., Otzen, D.E. (2003). Trehalose favors a cutinase compact intermediate off-folding pathway. *Biochemistry*. 42:7611-7617.
- Moschou, E.A., Sharma, B.V., Deo, S.K., Daunert, S. (2004). Fluorescence glucose detection: advances toward the ideal in vivo biosensor. *J Fluoresc*. 14:535-47.
- Nakamura, S., Hayashi, S. (1974). A role of the carbohydrate moiety of glucose oxidase: kinetic evidence for protection of the enzyme from thermal inactivation in the presence of sodium dodecyl sulfate. *FEBS Lett*. 41:327-30.
- Oku, K., Kurose, M., Kubota M., Fukuda, S., Kurimoto, M., Tujisaka, Y., Sakura, M. (2005). Interaction between trehalose and Alkaline-earth Metal ions. *Biosci Biotechnol Biochem*. 69:7-12.
- Ottonello, L., Tortolina, G., Amelotti, M., Dallegri, F. (1999). Soluble Fas ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol*. 162: 3601-3606.
- Paiva, C.L., Panek, A.D. (1996). Biotechnological applications of the disaccharide trehalose. *Biotechnol Annu Rev*. 2:293-314.

- Pazur, J.H., Kleppe, K. (1964). The oxidation of glucose and related compounds by glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochemistry*. 3: 578-583.
- Pazur, J.H., Kleppe, K., Cepure, A. (1965). A glycoprotein structure for glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Arch Biochem Biophys*. 111: 351-357.
- Puhlev, I., Guo, N., Brown, D.R., Levine, F. (2001). Desiccation tolerance in human cells. *Cryobiology*. 42:207-217.
- Richards, A.B., Krakowka, S., Dexter, L.B., Schmid, H., Wolterbeek, A.P., Waalkens-Berendsen, D.H., Shigoyuki, A., Kurimoto, M. (2002). Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chem Toxicol*. 40: 871-898.
- Rodwell, W.V. (1997). En: *Bioquímica de Harper*, 24<sup>a</sup> Edición. (ed) Lemus, G.A. El Manual Moderno, México, D.F. pp: 51-63.
- Roser, B., Colaco, C. (1993). A sweeter way to fresher food. *New Scientist*. 138: 25-28.
- Roskoski, R. (1998). En: *Bioquímica*. (ed) McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V., México, D.F. pp:39-54, 55-68.
- Sampedro, J.G. (2002). La levadura acumula trehalosa para proteger proteínas y membranas durante el estrés. *REB*. 21: 258-265.
- Sampedro, J.G, Munoz-Clares, R.A., Uribe, S. (2002). Trehalose-mediated inhibition of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from *Kluyveromyces lactis*: dependence on viscosity and temperature. *J Bacteriol*. 184:4384-4391.
- Sampedro, J.G., Uribe, S. (2004). Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. *Mol Cell Biochem*. 256/257:319-327.
- Sarath-Babu, V.R., Kumar, M.A., Karanth, N.G, Thakur, M.S. (2004). Stabilization of immobilized glucose oxidase against thermal inactivation by silanization for biosensor applications. *Biosens Bioelectron*. 19:1337-41.
- Schade, B., Jansen, G., Whiteway, M., Entian, K.D., Thomas, D.Y. (2004). Cold Adaptation in Budding Yeast. *Mol Biol Cell*.15: 5492-5502.

- Schiraldi, C., Di Lernia, I., De Rosa, M. (2002). Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trends Biotechnol.* 20:420-425.
- Singer, M.A., Lindquist, S. (1998a). Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Mol Cell.* 1:639-648.
- Singer, M.A., Lindquist, S. (1998b). Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* 16:460-468.
- Sleator, R.D., Hill, C. (2002). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol Rev.* 26: 49-71.
- Strom, A.R., Kaasen, I. (1993). Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Mol Microbiol.* 8: 205–210.
- Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L. (2003). En: *Bioquímica*, 5ª edición. (ed) Editorial Reverté, S.A., Barcelona, España. pp: 41-76, 85, 189-225.
- Takegawa, K., Fujiwara, K., Iwahara, S., Yamamoto, K., Tochikura, T. (1989). Effect of deglycosylation of *N*-linked sugar chains on glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochem Cell Biol.* 67: 460-464.
- Tanaka, M., Machida, Y., Nukina, N. (2005). A novel therapeutic strategy for polyglutamine diseases stabilizing aggregation-prone proteins with small molecules. *J Mol Med.* 83:343-52.
- Tzanov, T., Costa, S.A., Gübitz, G.M., Cavaco-Paulo, A. (2002). Hydrogen peroxide generation with immobilized glucose oxidase for textile bleaching. *J Biotechnol.* 93:87-94.
- Uribe, S., Sampedro, J.G. (2003). Measuring Solution Viscosity and its Effect on Enzyme Activity. *Biol Proced Online.* 5:108-115.
- Watanabe, M., Kikawada, T., Okuda, T. (2003). Increase of internal ion concentration triggers trehalose synthesis associated with cryptobiosis in larvae of *Polypedilum vanderplanki*. *J Exp Biol.* 206:2281-2286.
- Weisburd, S. (1988). Death-defying dehydration: sugars sweeten survival for dried-out animals, membranes and cells. *Science News.* 133: 107-110.

- Welsh, D.T. (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiology Rev.* 24:263-290.
- Wiemken, A. (1990). Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 58:209-217.
- Williams, L.B., Wilson, K. (1981). En: *Principios y Técnicas de Bioquímica Experimental.* (ed) Omega S.A, Barcelona, España. pp: 84-90.
- Wilson, K., Walker, J. (1994). En: *Principles and Techniques of Practical Biochemistry.* 4ª Edition. (ed) Cambridge University Press, Somerset, Great Britain. pp: 504-508.
- Witt, S., Wohlfahrt, G., Schomburg, D., Hecht, H.J., Kalisz, H.M. (2000). Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of beta-D-glucose. *Biochem J.* 347:553-559.
- Wong, C.M., Wong, K.H., Chen, X.D. (2008). Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 78:927-38.
- Zoldák, G., Zubrik, A., Musatov, A., Stupák, M., Sedlák, E. (2004). Irreversible Thermal Denaturation of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* Is the Transition to the Denatured State with Residual Structure. *J Biol Chem.* 279: 47601-47609.

Carbohidratos por Rios A. Daniel.

Dirección: <http://carbohidratosdaniel.blogspot.com/>. Publicación: 23/02/2009; Acceso: 01/07/2009.

RCSB PDB (protein data bank). An Information Portal to Biological Macromolecular Structures.

Dirección: [http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=education\\_discussion/molecule\\_of\\_the\\_month/pdb77\\_3.html](http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=education_discussion/molecule_of_the_month/pdb77_3.html). Publicación: 02/12/2008; Actualización: 17/03/2009; Acceso: 01/07/2009.

## **11. ANEXOS**

### **Anexo 1**

**Artículo internacional publicado en la revista “*The Journal of Biotechnology*” sobre el tema de tesis**

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Biotechnology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jbiotec](http://www.elsevier.com/locate/jbiotec)

## Trehalose-mediated thermal stabilization of glucose oxidase from *Aspergillus niger*

Karina J. Paz-Alfaro<sup>a</sup>, Yadira G. Ruiz-Granados<sup>b</sup>, Salvador Uribe-Carvajal<sup>b</sup>, José G. Sampedro<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Área Académica de Nutrición, Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Aposole 600, Colonia Centro, C.P. 42000, Pachuca, Hidalgo, Mexico

<sup>b</sup>Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), A.P. 70-242, C.P. 04510, Ciudad Universitaria, Mexico

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 27 August 2008  
Received in revised form 11 March 2009  
Accepted 16 March 2009

**Keywords:**  
Glucose oxidase  
Thermal inactivation  
FAD dissociation  
Trehalose  
Fluorescence

### ABSTRACT

Thermal inactivation and enzyme kinetics of glucose oxidase (a FAD dependent enzyme) were studied in the absence and presence of trehalose. The inactivation rate constant decreased by up to 50% at temperatures between 50 and 70 °C in the presence of 0.6 M trehalose; as a consequence the glucose oxidase half-life increased. Intrinsic fluorescence spectra showed a maximum center of spectral mass (CSM) red shift of 6.5 nm. Therefore, major structural changes seem to be related to glucose oxidase thermal inactivation. Trehalose decreased the rate constant for unfolding as monitored by CSM red shift kinetics indicating that this disaccharide favors the most compact folded state. The  $E_a$  for unfolding was increased from 204 to 221 kJ mol<sup>-1</sup>. It is proposed that FAD dissociation is preceded by the exposition of hydrophobic regions, while the presence of trehalose was able to hinder the release of FAD. Enzyme kinetics analysis showed that trehalose does not affect  $V_{max}$  but instead decreases  $K_m$ ; as a result enzyme efficiency was increased. The stabilizing effect of trehalose in a cofactor-dependent enzyme has not been tested to date. In addition, glucose oxidase has an enormous commercial importance and therefore, the use of trehalose to stabilize glucose oxidase in its multiple applications seems to be promising.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Glucose oxidase (EC 1.1.3.4) from *Aspergillus niger* catalyzes the oxidation of β-D-glucose by molecular oxygen to β-D-gluconolactone, which spontaneously hydrolyzes to gluconic acid and hydrogen peroxide (Frederick et al., 1990). Glucose oxidase is a dimer of 160 kDa molecular weight; each monomer contains a non-covalently bound FAD molecule. The protein is glycosylated, containing between 11% and 30% carbohydrates; mostly amino- and neutral-sugars (Nakamura and Koga, 1976; Kalish et al., 1991). Glucose oxidase is of considerable commercial importance (Bourdillon et al., 1988; Tzanov et al., 2002; Moschou et al., 2007), however new applications are limited by its structural instability. In this regard, some researchers have tried to increase the stability of glucose oxidase, e.g. by attaching long polyethylene glycol molecules to the protein surface (Seymour and Klinman, 2002), by immobilizing the enzyme to matrices and/or crosslinking to membranes

and liposomes (Rao et al., 1981; Wang et al., 2003; Rubio-Retama et al., 2005; Rauf et al., 2006), and by adding polyalcohols (glycerol and sorbitol), mono- and divalent salts or other proteins (Ahmad et al., 2001; Akhtar et al., 2002; Gulla et al., 2004). However, not all these efforts have lead to a proper balance between structural stability and enzyme activity (Ahmad et al., 2001; Akhtar et al., 2002; Betancor et al., 2006; Rauf et al., 2006).

Through evolution, several molecules named compatible solutes have been selected by their ability to stabilize cellular structures without affecting function (Singer and Lindquist, 1998; Jain and Roy, 2008). The disaccharide trehalose (α-D-glucopyranosyl-α-D-glucopyranoside) seems to be one of the best protein stabilizing compatible solutes found in nature (Sampedro et al., 2001; Jain and Roy, 2008), its stabilizing property is explained by the preferential hydration theory (Shimizu and Smith, 2004; Auton et al., 2008); the ability of trehalose to be excluded from the protein surface and thus, facilitating the interaction between the protein and water molecules. In addition, it has been proposed that trehalose increases the stability of proteins by favoring the most compact folded state, while high viscosity hinders protein domain motions leading to unfolding (Sampedro and Uribe, 2004; Pradeep and Udgaonkar, 2007). In the case of glucose oxidase, high structural stability is required in its many commercial presentations; however it is also desirable to avoid any deleterious effect on its catalytic activity. In this regard, the protective ability of trehalose against the

\* Corresponding author. Present address: Department of Molecular Cellular and Developmental Biology, The University of Michigan, 830 North University, Ann Arbor, MI 48109, United States. Tel.: +1 734 647 7964/+52 77 1717 2000x5114; fax: +1 734 647 0884/+52 77 1717 2000x5111.  
E-mail addresses: [jg.sampedro@gmail.com](mailto:jg.sampedro@gmail.com), [sampedro@umich.edu](mailto:sampedro@umich.edu) (J.G. Sampedro).

oxidative damage mediated by hydrogen peroxide (Benaroudj et al., 2001) would be an additional property to consider during glucose oxidase stabilization.

In this work, the thermal inactivation of glucose oxidase was studied in the absence and in the presence of physiological concentrations of trehalose. At each temperature tested, it was found that trehalose stabilizes glucose oxidase by decreasing the inactivation rate constant by up to 50%. Furthermore, heat stabilization of glucose oxidase was related to a decrease in the rate constant for the red shift of the center of spectral mass (CSM), suggesting that trehalose favors the most compact folded state of the protein. Interestingly, enzyme kinetics analysis showed that high trehalose concentrations in the reaction media increases enzyme efficiency; enzyme affinity was increased while  $V_{max}$  was not affected. It is suggested that FAD dissociation takes place after exposition of hydrophobic regions and trehalose presence would inhibit this process.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Glucose oxidase type X-S from *A. niger*, *o*-dianisidine, trehalose, glucose and horseradish peroxidase were from Sigma Chemical Co (St Louis, MO), Sephacryl 200HR was from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). All other reagents were of the highest quality available commercially.

### 2.2. Glucose oxidase purification

The enzyme was purified from the commercial suspension essentially as described by Gouda et al. (2003) using size exclusion chromatography in a Sephacryl 200HR column. Protein (5 mg) was loaded in a pre-equilibrated column with 20 mM phosphate buffer, pH 7.0. Elution was performed with 20 mM phosphate buffer, pH 7.0, 1 mM EGTA, and a flow rate of 10 ml/h. To obtain the elution profile, fractions (1 ml) were collected and analyzed for absorbance at 280 nm. Highly absorbing fractions were analyzed for protein content and purity. Protein concentration measurements were performed by the method of Lowry et al. (1951) using BSA as standard. Protein purity was determined by SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue. Fractions containing a highly pure protein were used for spectroscopic and enzyme kinetics experiments.

### 2.3. Enzyme kinetics

Glucose oxidase saturation kinetics were performed at 25 °C using a peroxidase coupled assay. Briefly, glucose oxidase (1.57 µg protein in 20 µl) was added to 2.5 ml 100 mM phosphate buffer, pH 6.5, dianisidine (0.1 ml *o*-dianisidine 1% in 12 ml phosphate buffer, pH 6.5), 6.6 µg ml<sup>-1</sup> oxygen saturated peroxidase and increasing concentrations of glucose mutarotated by at least 6 h. Trehalose was added at the indicated concentration from a 1 M stock solution. The reaction mixture was preincubated for 10 min at the assay temperature before adding the enzyme. The absorbance increase at 460 nm was followed by 4 min in a UV/vis Shimadzu 1601 spectrophotometer equipped with a thermostated cell. Reaction velocity was calculated from the slope of the line formed.

### 2.4. Thermal inactivation kinetics

The effect of trehalose on glucose oxidase inactivation was tested at different temperatures ranging from 50 to 70 °C. Briefly, the enzyme was incubated in 20 mM phosphate buffer, pH 6.0. Trehalose (0.6 M) was added from a 1 M stock solution prepared in the same phosphate buffer. After adding the enzyme, the suspension

was gently mixed and an aliquot (5 µl) was removed each minute and immediately assayed for activity using the enzyme coupled assay described above in the presence of 50 mM glucose.

### 2.5. Center of spectral mass red shift kinetics

The kinetics of center of spectral mass red shift (CSM, the average emission wave number) for glucose oxidase at different temperatures ranging from 50 to 70 °C were obtained in the absence and presence of 0.6 M trehalose. Briefly, glucose oxidase was suspended in 2 ml of 10 mM pipes, pH 7.0, and 0.6 M trehalose was added when indicated from a 1 M stock solution. Intrinsic fluorescence spectra (300–400 nm) were recorded each minute after exciting the protein at 285 nm. A Shimadzu RF5301 spectrofluorophotometer equipped with a thermostated cell chamber and constant stirring was used for all fluorescence assays.

### 2.6. Thermal inactivation kinetics

Glucose oxidase thermal inactivation kinetics at a given temperature and in the absence and presence of trehalose were analyzed using the two-state mechanism (N ↔ U). Residual activity was plotted versus incubation time and fitted to Eq. (1) by nonlinear regression using the iterative software Microcal Origin<sup>®</sup> (Northampton, MA) (Henley and Sadana, 1986).

$$A_R = A \times \exp(-k_i \times t) \quad (1)$$

where  $A_R$  is the residual activity at time ( $t$ ),  $A$  is the amplitude of the inactivation process and  $k_i$  is the apparent rate constant for enzyme inactivation.

### 2.7. Thermal unfolding kinetics

The CSM red shift kinetics was analyzed as follows; the fluorescence spectra were quantified using Eq. (2) to obtain the CSM (Ruan et al., 2000).

$$CSM = \frac{\sum \lambda_i F_i}{\sum F_i} \quad (2)$$

where  $\lambda_i$  is the wavelength and  $F_i$  is the fluorescence intensity at a given wavelength. The CSM red shift kinetics at a given incubation temperature and in the absence and presence of trehalose was studied by fitting the data to Eq. (3) by nonlinear regression.

$$CSM = CSM_0 + A \times \exp(-k_{CSM} \times t) \quad (3)$$

where  $CSM_0$  is the CSM of glucose oxidase at time zero,  $t$  is the incubation time,  $A$  is the amplitude of the process and  $k_{CSM}$  is the rate constant for CSM red shift.

### 2.8. Enzyme kinetics

Initial velocities for glucose oxidation versus substrate concentration were plotted and fitted to the Michaelis–Menten equation (Eq. (4)) by nonlinear regression.

$$v_0 = \frac{V_{max} \times S}{K_m + S} \quad (4)$$

where  $v_0$  is the initial velocity at a given substrate concentration,  $V_{max}$  is the maximum velocity of the enzyme catalyzed reaction,  $K_m$  is the substrate concentration when  $v_0 = 1/2V_{max}$ . The enzyme efficiency was defined as the ratio of  $V_{max}/K_m$ .

The energy of inactivation ( $E_a$ ) for glucose oxidase thermal inactivation and CSM change in the absence and presence of trehalose was obtained by linear regression of the data using the Arrhenius equation (Eq. (5)).

$$k = A_0 \times \exp(-E_a/RT) \quad (5)$$

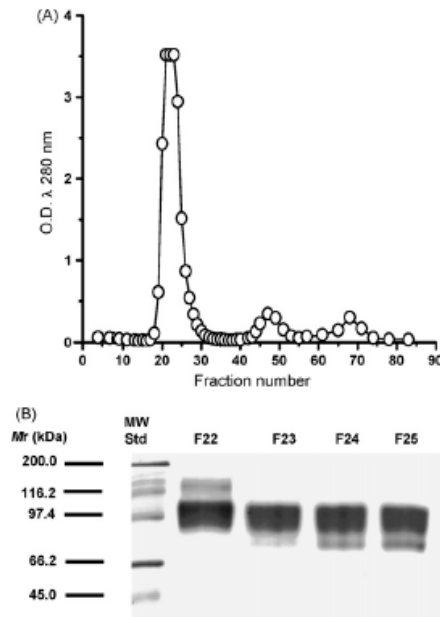


Fig. 1. Purification of commercial glucose oxidase from *Aspergillus niger*. (A) Elution profile of glucose oxidase on a Sephacryl 200HR column. The enzyme (5 mg protein) was loaded and eluted with 20 mM phosphate buffer, pH 7.0, 1 mM EGTA, and 10 ml/h flow rate. Fractions (1 ml) were collected and analyzed for absorbance at 280 nm. (B) Highly absorbing fractions were analyzed for protein content and purity in SDS-PAGE.

where  $k$  is the inactivation rate constant ( $k_i$ ) or the rate constant for the CSM change ( $k_{CSM}$ ),  $R$  is the gas constant ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),  $T$  is the absolute temperature and  $A_0$  is a constant.

### 3. Results and discussion

Glucose oxidase was purified using a Sephacryl 200HR chromatographic column (Fig. 1A) and enzyme purity was evaluated by SDS-PAGE (Fig. 1B). In the protein elution profile a single main peak absorbing at 280 nm was observed (Fig. 1A). However, it was found that most of the fractions composing the peak showed a slightly contaminated enzyme and only one fraction (F23) was constituted of pure glucose oxidase (Fig. 1B). The calculated kinetics parameters for F23 at 25 °C were  $V_{max} = 33.97 \pm 0.43 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$  and  $K_m = 18.76 \pm 0.63 \text{ mM}$ . In this regard,  $K_m$  was similar to that reported for pure glucose oxidase, while  $V_{max}$  was 2–3 times higher (Zhu et al., 2006). Further, the UV/vis absorption spectrum for F23 was obtained and the calculated absorption ratio 280 nm/450 nm was 10.28, in good agreement with the stated value of 10.3 for a pure glucose oxidase (Johnson et al., 1989). In addition, in a 10  $\mu\text{M}$  glucose oxidase solution ( $1.6 \text{ mg ml}^{-1}$ ) prepared from F23, the FAD concentration was 21.6  $\mu\text{M}$  as quantified by using a molar extinction coefficient ( $\epsilon$ ) of  $14,100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 450 nm (the  $\epsilon$  value for a FAD bound glucose oxidase; Swodoba and Macey, 1965); thus, the relationship FAD:glucose oxidase in F23 was 2:1 (or one FAD per monomer). Therefore, F23 was used to perform both thermal stability and enzyme kinetics studies.

Glucose oxidase thermal inactivation kinetics was studied at different temperatures (50–70 °C). Thermal inactivation displayed a

single exponential decay at all tested temperatures (Fig. 2). Inactivation data fitted well to Eq. (1) by nonlinear regression and kinetic parameters were obtained. The observed one-step inactivation process was in agreement to the proposal that thermal inactivation occurs upon FAD dissociation (Gouda et al., 2003). In this regard, the inactivation rate constant ( $k_i$ ) was increased from  $0.33 \pm 0.04 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  at 50 °C to  $111.81 \pm 0.97 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  at 70 °C (Fig. 2A, Table 1). Remarkably, the half-life ( $t_{1/2}$ ) was diminished from 210 min at 50 °C to 0.61 min at 70 °C (Table 1). These results illustrate the extreme thermal structural instability characterizing glucose oxidase.

The disaccharide trehalose is accumulated in yeast and other organisms in response to high environmental temperatures (Jain and Roy, 2008). Some authors have showed that trehalose is able to stabilize enzymes from heat induced inactivation (Sampedro et al., 2001). Therefore, glucose oxidase thermal inactivation kinetics was studied in the presence of 0.6 M trehalose; this is the concentration in yeast cytoplasm during stress (Hottiger et al., 1994). Glucose

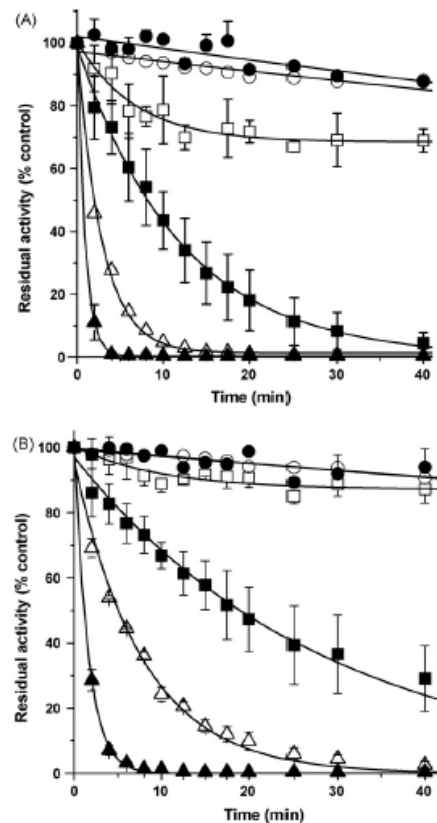


Fig. 2. Thermal inactivation of glucose oxidase. Thermal inactivation kinetics was performed at different temperatures by suspending the enzyme in 20 mM phosphate buffer, pH 6.0, in the absence (A) and presence (B) of 0.6 M trehalose. An aliquot (5  $\mu\text{l}$ ) was removed each minute and immediately assayed for activity at 25 °C using the peroxidase coupled assay containing 50 mM glucose as substrate. Incubation temperatures (°C) were: (○) 50; (●) 55; (□) 60; (■) 62.5; (△) 65 and (▲) 70. Inactivation data were fitted to Eq. (1) by nonlinear regression to obtain the  $k_i$  (Table 1).

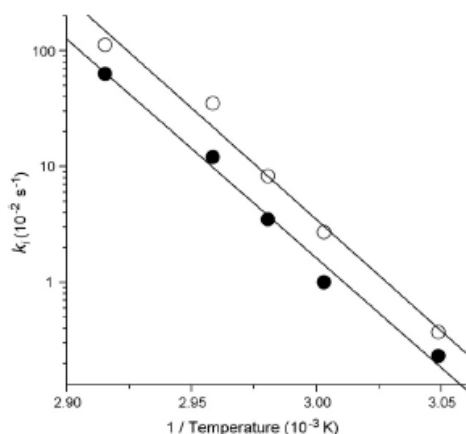
**Table 1**  
Effect of trehalose on thermal inactivation of glucose oxidase from *Aspergillus niger*<sup>a</sup>.

Temperature (°C)	$k_i$ ( $10^{-2} \text{ min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)	Trehalose (0.6 M)	
			$k_i$ ( $10^{-2} \text{ min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)
50	0.33 ± 0.04	210.00	0.22 ± 0.01	315.00
55	0.37 ± 0.07	187.29	0.23 ± 0.06	301.30
60	2.70 ± 0.25	25.66	1.00 ± 0.03	69.30
62.5	8.28 ± 0.48	8.36	3.49 ± 0.09	19.85
65	35.03 ± 1.31	1.97	12.76 ± 0.53	5.43
70	111.81 ± 0.97	0.61	62.92 ± 1.04	1.10

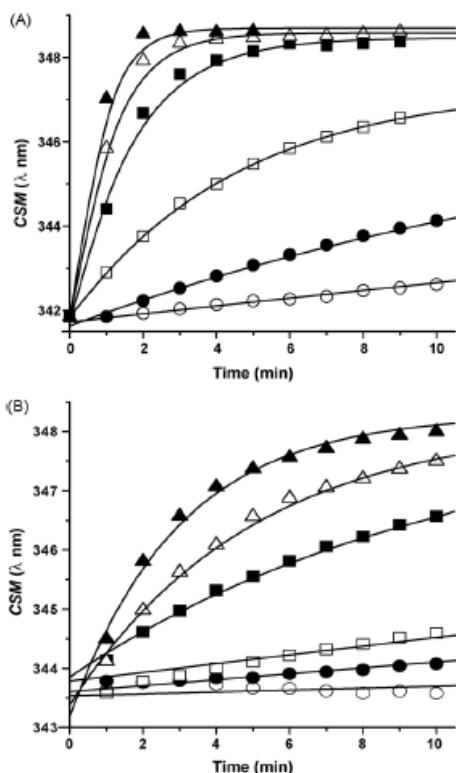
<sup>a</sup> Eq. (1) was used to calculate the inactivation rate constant ( $k_i$ ) and half-life ( $t_{1/2}$ ).

oxidase thermal stability was increased by the presence of physiological concentrations of trehalose in the incubation media (Fig. 2B). Thermal inactivation data were analyzed by nonlinear regression and it was found that the  $k_i$  was largely decreased to half the values observed in the absence of trehalose (Fig. 2B and Table 1), i.e. at 70 °C it was  $62.92 \pm 1.04 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ . The increase in thermal stability mediated by trehalose was also observed as a twofold increase in the  $t_{1/2}$  (Table 1), e.g. at 60 °C,  $t_{1/2}$  was increased from 25.66 to 69.30 min in the absence and presence of 0.6 M trehalose respectively. This result is of considerable importance as a long shelf life is highly desirable for commercial preparations of enzymes. The activation energy ( $E_a$ ) of the deactivation process was also calculated and it showed a slight increase in the presence of trehalose;  $E_a = 262 \text{ kJ mol}^{-1}$  and  $E_{a(0.6M \text{ trehalose})} = 268 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Fig. 3). The  $E_a$  value was in agreement with those obtained in other independent studies (Zoldák et al., 2004).

Large fluctuations on glucose oxidase structure were also studied at high temperature. It is known that when proteins unfold they usually show a CSM red shift that is related to an increased polarity in the surroundings of tryptophan residues (Dumoulin et al., 1999). Therefore, the CSM red shift kinetics for glucose oxidase at different incubation temperatures was analyzed. Interestingly, glucose oxidase displayed a CSM red shift at the same temperatures where thermal inactivation take place (Fig. 4) thus suggesting that major structural changes are related to glucose oxidase inactivation. The kinetics for CSM red shift was analyzed by fitting the data by nonlinear regression to the single exponential Eq. (3). CSM red shift



**Fig. 3.** Arrhenius plot for thermal inactivation of glucose oxidase. The  $E_a$  was calculated from the slope of the line obtained by linear regression of the data using Eq. (5). Inactivation rate constant  $k_i$  (○) in the absence and (●) presence of 0.6 M trehalose. The calculated  $E_a$  for glucose oxidase thermal inactivation was 262 and 268 kJ mol<sup>-1</sup> in the absence and presence of 0.6 M trehalose, respectively.



**Fig. 4.** Center of spectral mass (CSM) red shift kinetics. The glucose oxidase CSM red shift kinetics was obtained at different temperatures in the absence (A) and presence (B) of 0.6 M trehalose. Glucose oxidase was suspended in 2 ml of 10 mM pipes, pH 7.0, and 0.6 M trehalose was added when indicated from 1 M stock solution. Intrinsic fluorescence spectra (300–400 nm) were recorded each minute upon exciting the protein at 285 nm. Incubation temperature (°C): (○) 50; (●) 55; (□) 60; (■) 62.5; (△) 65 and (▲) 70. CSM red shift data were fitted to Eq. (3) by nonlinear regression to obtain the  $k_{CSM}$  value at each incubation temperature.

kinetics data fitted well to Eq. (3) (Fig. 4A) and the rate constant for CSM red shift ( $k_{CSM}$ ) was calculated at each temperature. The maximum CSM red shift amplitude observed was 6.5 nm (Fig. 4) and the  $k_{CSM}$  was dramatically increased from  $5.3 \pm 0.1 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  at 50 °C to  $148.6 \pm 5.60 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  at 65 °C (Table 2). The possibility that glucose oxidase thermal inactivation could be due to dimer dissociation is ruled out as it has been observed that the thermally

**Table 2**  
Effect of trehalose on thermal unfolding of glucose oxidase from *Aspergillus niger*.

Temperature (°C)	$k_{CSM}$ ( $10^{-2} \text{ min}^{-1}$ ) <sup>a,b</sup>	Trehalose 0.6 M
		$k_{CSM}$ ( $10^{-2} \text{ min}^{-1}$ )
50	5.3 ± 0.1	1.1 ± 0.04
55	18.0 ± 3.8	3.0 ± 0.01
60	59.0 ± 5.5	9.8 ± 0.02
62.5	98.0 ± 6.10	22.0 ± 2.90
65	148.6 ± 5.60	34.2 ± 2.80
70	ND	129.8 ± 3.60

<sup>a</sup> CSM was calculated using Eq. (2).

<sup>b</sup> Red shift rate constant was calculated using Eq. (3).

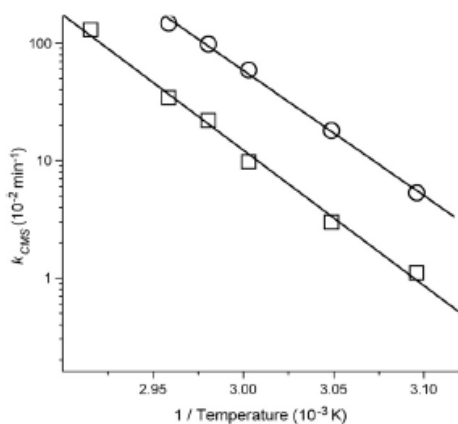
**Table 3**  
Effect of trehalose on the kinetic parameters of glucose oxidase from *Aspergillus niger* at 25 °C<sup>a</sup>.

Trehalose (M)	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ )	$V_{max}/K_m$ ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1} \text{mM}^{-1}$ )
0.0	18.76 $\pm$ 0.63	33.97 $\pm$ 0.43	1.81
0.1	11.34 $\pm$ 0.96	28.87 $\pm$ 0.71	2.54
0.2	12.87 $\pm$ 0.82	32.38 $\pm$ 0.65	2.51
0.4	11.12 $\pm$ 0.79	28.40 $\pm$ 0.60	2.55
0.6	12.42 $\pm$ 0.28	32.39 $\pm$ 0.61	2.60
0.8	13.60 $\pm$ 0.64	30.24 $\pm$ 0.26	2.22

<sup>a</sup> Eq. (4) was used to calculate the kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$ .

inactivated enzyme is a homodimer and therefore independent of protein concentration (Result not shown, Zoldák et al., 2004).

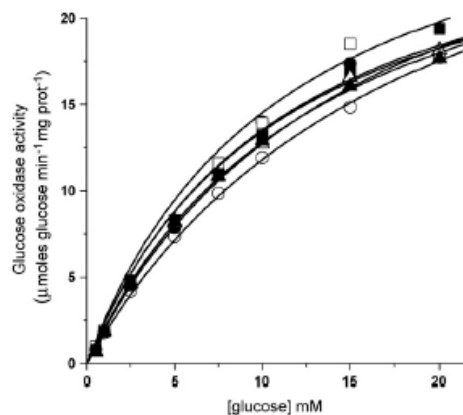
In solution, trehalose inhibits protein domain motions (Pradeep and Udgaonkar, 2007) and this effect has been related to its protein stabilizing property (Sampedro et al., 2001). In this regard, protein unfolding is a process where large structural changes usually take place (Jaenicke, 2000). Therefore, it was hypothesized that the presence of trehalose would have an effect on the rate of CSM red shift in glucose oxidase that would be related to the increased thermal stabilization observed in Fig. 2B. Interestingly, in the presence of 0.6 M trehalose the  $k_{CSM}$  was diminished at all temperatures tested (Table 2), i.e. at 65 °C and 0.6 M trehalose,  $k_{CSM}$  was  $34.2 \pm 2.80 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ . Notably, the sole presence of trehalose in the media induced a slight CSM red shift in the native glucose oxidase; CSM changed from 341.5 to 343.5 nm in the presence of 0.6 M trehalose (Fig. 4). Therefore, trehalose *per se* has an effect on glucose oxidase structure as revealed by the change in its overall spectral absorbance property; this result was in agreement with the observed effects of compatible solutes on protein structure (Coelho-Sampaio et al., 1994; Dashnau et al., 2005). The  $E_a$  for glucose oxidase unfolding was increased from 204 to 221 kJ mol<sup>-1</sup> by including trehalose in the incubation media (Fig. 5). Interestingly, the  $E_a$  for thermal unfolding in the absence of trehalose was 42 kJ mol<sup>-1</sup> lower than that obtained for the thermal inactivation. Overall, our result suggests that in the glucose oxidase thermal inactivation process the protein core is first exposed, probably forming a molten globule-like structure as described by some authors (Zoldák et al., 2004) and then FAD dissociates from active site. Therefore,



**Fig. 5.** Arrhenius plot of the CSM red shift reaction for glucose oxidase. The  $E_a$  was calculated from the line slope obtained by linear regression of the data using Eq. (5).  $k_{CSM}$  (○) in the absence and (□) presence of 0.6 M trehalose. The calculated  $E_a$  for glucose oxidase CSM red shift reaction was 204 and 221 kJ mol<sup>-1</sup> in the absence and presence of 0.6 M trehalose, respectively.

trehalose seems to inhibit major structural motions preventing core exposition and thus FAD release and enzyme inactivation. Nonetheless, the effectiveness of three-dimensional structure stabilization may depend also on some characteristics of proteins, e.g. the hydrophobic/hydrophilic and surface electrostatic character, and the mechanism of interaction with compatible solutes (Pace et al., 2004).

Hampering of protein structural fluctuations by trehalose has been related to enzyme inhibition and prevention of ligand release in domain-motion dependent enzymes (Sampedro and Uribe, 2004; Cordone et al., 2005). For glucose oxidase, it was found that enzyme activity was not inhibited by increasing trehalose concentration in the reaction media (up to 0.8 M) (Fig. 6) as  $V_{max}$  remained nearly constant (Table 3). This result suggests that large domain motions are probably absent during catalysis in glucose oxidase (Haouz et al., 2001). In contrast, it was observed a slight increase in the enzyme affinity for substrate, i.e. the  $K_m$  decreased from  $18.76 \pm 0.63$  to  $13.60 \pm 0.64$  mM in the presence of 0.8 M trehalose. Thus, the effect of trehalose on  $K_m$  resulted in increased catalytic efficiency (Table 3) from 1.81 to 2.22  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1} \text{mM}^{-1}$  in the presence of 0.8 M trehalose. Therefore, trehalose favors the interaction with substrate in the glucose oxidase binding site or stabilizes the enzyme–substrate complex. This proposal is in agreement with the observation that under native conditions



**Fig. 6.** Glucose oxidase kinetics in the presence of different concentration of trehalose. Enzyme kinetics was performed by using a peroxidase coupled assay: glucose oxidase (1.57  $\mu\text{g}$  protein in 20  $\mu\text{l}$ ) was added to 2.5 ml 100 mM phosphate buffer, pH 6.5, *o*-dianisidine (0.1 ml *o*-dianisidine 1% in 12 ml phosphate buffer, pH 6.5), 6.6  $\mu\text{g}$  ml<sup>-1</sup> peroxidase, oxygen saturated, and increasing concentrations of glucose mutarotated by at least 6 h, trehalose was included at the indicated concentration. The increase in absorbance at 460 nm was followed in spectrophotometer equipped with a thermostated cell. Temperature was maintained at 25 °C. Reaction velocity was calculated from the slope of the line formed. Trehalose concentration (M): (○) 0; (●) 0.1; (□) 0.2; (▲) 0.4; (△) 0.6 and (▲) 0.8. The mean of three experiments is showed, SD were less than 5%. Data were fitted to Eq. (4) by nonlinear regression.

trehalose and sucrose induce a compactness of the ribosomal protein S6 (Chen et al., 2006). In contrast to our results other stabilizing solutes tested, such as mono- and divalent salts and proteins, inhibit glucose oxidase activity or promote unfolding when used at high concentrations (Ahmad et al., 2001; Akhtar et al., 2002). These effects are due to the intrinsic property of mono- and divalent cations to bind tightly to the protein surface (Akhtar et al., 2002). Therefore, a proper stabilizing additive would be required in order to avoid both an undesirable effect on both protein structure and function (Jaenicke, 2000). Trehalose seems to fulfill these requirements, thus explaining why this disaccharide was selected by nature to stabilize cellular structures (Jain and Roy, 2008).

Glucose oxidase is mainly intended to be used in solid supports. In this regard, multipoint covalent attachment has been proved to be the most effective immobilization method for stabilizing glucose oxidase (Betancor et al., 2006; Rauf et al., 2006). This system acts by preventing subunit dissociation and decreasing inactivation by intrasubunit crosslinking (Iyer and Ananthanarayan, 2008). However, it has been found that glucose oxidase may be largely affected upon linking, i.e. a loss of up to 50% activity or a negative effect on the kinetics parameters ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) may be observed after the entrapment procedure (Betancor et al., 2006; Rauf et al., 2006). In this regard, it would be interesting to test the use of trehalose in combination with some of the most successful entrapment methods, e.g. the synthesis of trehalose-based polymers, where the trehalose molecules are covalently linked to the matrix to provide to the entrapped enzyme the stability required for its use under harsh conditions and/or during long term storage (Teramoto et al., 2008).

Glucose oxidase has an enormous commercial importance, applications are found in textile industry as fiber bleaching, in food industry as a preservative, in fermentation industry in the production of gluconic acid, in medical diagnostics as analytical tool in glucose detection kits, and in environmental monitoring (Bourdillon et al., 1988; Tzanov et al., 2002; Moschou et al., 2007; Wong et al., 2008). Irreversible thermal inactivation of glucose oxidase seems to occur by a loosening of the protein core preceding FAD release. Trehalose increased the thermal stability of glucose oxidase by decreasing both the rate constant for inactivation and unfolding; as monitored by CSM red shift. Trehalose seems to be an appropriate stabilizing additive for glucose oxidase as no undesirable effects were observed on either protein structure or function, indeed trehalose increased enzyme affinity for substrate and thus catalytic efficiency. Further, the protective ability of trehalose against oxidative damage mediated by hydrogen peroxide (Benaroudj et al., 2001) would be an additional reason to opt for trehalose as a potential stabilizer for glucose oxidase. Although, the use of trehalose has been limited primarily to the laboratory handling and/or purification of labile enzymes (Sampedro et al., 2007), the stabilization of glucose oxidase by trehalose in its multiple applications seems to be promising.

#### Acknowledgements

Dr. Antonio Peña (Instituto de Fisiología Celular, UNAM Mexico) gently provided us with equipment and reagents to perform some experiments. This work was partially supported by a grant from CONACYT SEP-2004-C01-46537.

#### References

Ahmad, A., Akhtar, M.S., Bhakuni, V., 2001. Monovalent cation-induced conformational change in glucose oxidase leading to stabilization of the enzyme. *Biochemistry* 40, 1945–1955.

Akhtar, M.S., Ahmad, A., Bhakuni, V., 2002. Divalent cation induced changes in structural properties of the dimeric enzyme glucose oxidase: dual effect of dimer stabilization and dissociation with loss of cooperative interactions in enzyme monomer. *Biochemistry* 41, 7142–7149.

Auton, M., Bolen, D.W., Rösger, J., 2008. Structural thermodynamics of protein preferential solvation: osmolyte solvation of proteins, aminoacids, and peptides. *Proteins* 73, 802–813.

Benaroudj, N., Lee, D.H., Goldberg, A.L., 2001. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* 276, 24261–24267.

Betancor, L., López-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Dellamora-Ortiz, G., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R., 2006. Preparation of a very stable immobilized biocatalyst of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J. Biotech.* 121, 284–289.

Bourdillon, C., Lortie, R., Laval, J.M., 1988. Gluconic acid production by an immobilized glucose oxidase reactor with electrochemical regeneration of an artificial electron acceptor. *Biotechnol. Bioeng.* 31, 553–558.

Chen, L.Y., Ferreira, J.A.B., Costa, S.M.B., Cabrita, G.J.M., Otzen, D.E., Melo, E.P., 2006. Compaction of ribosomal protein in S6 by sucrose occurs only under native conditions. *Biochemistry* 45, 2189–2199.

Coelho-Sampaio, T., Ferreira, S.T., Castro, E.J., Viera, A., 1994. Betaine counteracts urea-induced conformational changes and uncoupling of the human erythrocyte  $Ca^{2+}$  pump. *Eur. J. Biochem.* 221, 1103–1110.

Cordone, L., Cottone, G., Giuffrida, S., Palazzo, G., Venturoli, G., Viappiani, C., 2005. Internal dynamics and protein-matrix coupling in trehalose-coated proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1749, 252–281.

Dashnau, J.L., Zelen, B., Vanderkooi, J.M., 2005. Tryptophan interactions with glycerol/water and trehalose/sucrose cryosolvents: infrared and fluorescence spectroscopy and ab initio calculations. *Biophys. Chem.* 114, 71–83.

Dumoulin, M., Ueno, H., Hayashi, R., Balny, C., 1999. Contribution of the carbohydrate moiety to conformational stability of the carboxypeptidase Y. High pressure study. *Eur. J. Biochem.* 262, 475–483.

Frederick, K.R., Tung, J., Emerick, M.S., Masiarz, F.R., Chamberlain, S.H., Vasavada, A., Rosenberg, S., 1990. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequencing, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. *J. Biol. Chem.* 265, 3793–3802.

Gouda, M.D., Singh, S.A., Rao, A.G.A., Thakur, M.S., Karanth, N.G., 2003. Thermal inactivation of glucose oxidase mechanism and stabilization using additives. *J. Biol. Chem.* 278, 24324–24333.

Gulla, K.C., Gouda, M.D., Thakur, M.S., Karanth, N.G., 2004. Enhancement of stability of immobilized glucose oxidase by modification of free thiols generated by reducing disulfide bonds and using additives. *Biosens. Bioelectron.* 19, 621–625.

Haouz, A., Glandières, J.M., Alpert, B., 2001. Involvement of protein dynamics in enzyme stability the case of glucose oxidase. *FEBS Lett.* 506, 216–220.

Henley, J.P., Sadana, A., 1986. Deactivation theory. *Biotechnol. Bioeng.* 73, 1277–1285.

Hottiger, T., De Virgilio, C., Hall, M.N., Boller, T., Wiemken, A., 1994. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vitro. *Eur. J. Biochem.* 219, 187–193.

Iyer, P.V., Ananthanarayan, L., 2008. Enzyme stability and stabilization—aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochem.* 43, 1019–1032.

Jaenicke, R., 2000. Stability and stabilization of globular proteins in solution. *J. Biotechnol.* 79, 193–203.

Jain, N.K., Roy, L., 2008. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci.* 18, 24–36.

Johnson, J.L., London, R.E., Rajagopalan, K.V., 1989. Covalently bound phosphate residues in bovine milk xanthine oxidase and in glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6493–6497.

Kalish, H.M., Hech, H.J., Schomburg, D., Schmid, R.D., 1991. Effect of carbohydrate depletion on the structure, stability and activity of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta* 1080, 138–142.

Lowry, O.H., Nira, J.N., Rosebrough, J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.

Moschou, E.A., Sharma, B.V., Deo, S.K., Daunert, S., 2007. Fluorescence glucose detection: advances toward the ideal in vivo biosensor. *J. Fluoresc.* 14, 537–547.

Nakamura, S., Koga, K., 1976. Alteration of thermal stability of glucose oxidase associated with the redox states. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 78, 806–810.

Pace, C.N., Treviño, S., Prabhakaran, E., Scholtz, J.M., 2004. Protein structure, stability and solubility in water and other solvents. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 359, 1225–1235.

Pradeep, L., Udgaonkar, J.B., 2007. Diffusional barrier in the unfolding of a small protein. *J. Mol. Biol.* 366, 1016–1028.

Rao, V.B., Sastri, N.V.S., Rao, P.V.S., 1981. Thermal stabilization of glucose oxidase and glucoamylase by physical entrapment. *Biochem. J.* 193, 389–394.

Rauf, S., Ihsan, A., Akhtar, K., Ghauri, M.A., Rahman, M., Anwar, M.A., Khalid, A.M., 2006. Glucose oxidase immobilization on a novel cellulose acetate-poly(methylmethacrylate) membrane. *J. Biotechnol.* 121, 351–360.

Ruan, K., Tian, S., Lange, R., Balny, C., 2000. Pressure effects on tryptophan and its derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 269, 681–686.

Rubio-Retama, J., Sánchez-Paniagua López, M., Hervás Pérez, J.P., Frutos Cabanillas, G., López-Cabarcos, E., López-Ruiz, B., 2005. Biosensors based on acrylic microgels: a comparative study of immobilized glucose oxidase and tyrosinase. *Biosens. Bioelectron.* 20, 2268–2275.

Sampedro, J.G., Cortés, P., Muñoz-Clares, R.A., Fernández, A., Uribe, S., 2001. Thermal inactivation of the plasma membrane  $H^+$ -ATPase from *Kluyveromyces fragilis*. Protection by trehalose. *Biochim. Biophys. Acta* 1544, 64–73.

Sampedro, J.G., Ruiz-Granados, Y.G., Nájera, H., Téllez-Valencia, A., Uribe, S., 2007. Fluorescence quenching by nucleotides of the plasma membrane  $H^+$ -ATPase from *Kluyveromyces fragilis*. *Biochemistry* 46, 5616–5622.

- Sampedro, J.G., Uribe, S., 2004. Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. *Mol. Cell. Biochem.* 256/257, 319–327.
- Seymour, S.L., Klinman, J.P., 2002. Comparison of rates and kinetic isotope effects using PEGmodified variants and glycoforms of glucose oxidase: the relationship of modification of the protein envelope to C-H activation and tunneling. *Biochemistry* 41, 8747–8758.
- Shimizu, S., Smith, D.J., 2004. Preferential hydration and the exclusion of cosolvents from protein surfaces. *J. Chem. Phys.* 121, 1148–1154.
- Singer, M.A., Lindquist, S., 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the yin and yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* 16, 460–468.
- Swodoba, B.E.P., Macey, V., 1965. Purification and properties of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem.* 240, 2209–2215.
- Teramoto, N., Sachinvala, N.D., Shibata, N., 2008. Trehalose and trehalose-based polymers for environmentally benign, biocompatible and bioactive materials. *Molecules* 13, 1773–1816.
- Tzanov, T., Costa, S.A., Göbitz, G.M., Cavaco-Paulo, A., 2002. Hydrogen peroxide generation with immobilized glucose oxidase for textile bleaching. *J. Biotechnol.* 93, 87–94.
- Wang, S., Yoshimoto, M., Fukunaga, K., Nakao, K., 2003. Optimal covalent immobilization of glucose oxidase-containing liposomes for highly stable biocatalyst bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 84, 444–453.
- Wong, C.M., Wong, K.H., Chen, X.D., 2008. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 927–938.
- Zoldák, G., Zubrik, A., Musatov, A., Stupák, M., Sedláč, E., 2004. Irreversible thermal denaturation of glucose oxidase from *Aspergillus niger* is the transition to the denatured state with residual structure. *J. Biol. Chem.* 279, 47601–47609.
- Zhu, Z., Momeu, C., Zakharov, M., Schwaneberg, U., 2006. Making glucose oxidase fit for biofuel cell applications by directed protein evolution. *Biosens. Bioelectron.* 21, 2046–2051.

**Anexo 2**

**Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y  
Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica  
A.C. Del 13 al 18 de noviembre de 2005; Oaxaca,  
Oaxaca.**





## INACTIVACIÓN TÉRMICA DE LA GLUCOSA OXIDASA DE *Aspergillus niger*

Paz-Alfaro K.J., Ruiz-Granados Y.G., Nájera-Peña H. y Sampedro J.G.

Área Académica de Nutrición. Instituto de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Abasolo 600, col. Centro. CP 4200. Pachuca, Hidalgo. México. Tel. 01(771)7172000 ext. 5114. CE: jg.sampedro@gmail.com

### INTRODUCCIÓN

La muerte celular por estrés se sabe está relacionada a la desnaturalización proteica. Algunos organismos han desarrollado una serie de mecanismos que le permiten vivir en estas condiciones adversas (1). La respuesta general al estrés incluye la síntesis de algunas enzimas antioxidantes, proteínas de choque térmico (hsp) y la acumulación de solutos compatibles (2).

Los solutos compatibles son pequeñas moléculas que se acumulan en el citoplasma en diferentes condiciones de estrés. La trehalosa, glicina betaína, manosil glicerato y el glicerol se acumulan en organismos tan variados como, las bacterias, levaduras, plantas y crustaceos (1). En este sentido se ha demostrado que la trehalosa es capaz de estabilizar a las proteínas contra el daño ocasionado por temperatura, deshidratación, presión y radicales libres (3). La estabilización de enzimas por trehalosa resulta en una disminución en la constante de velocidad de la inactivación y en la  $k_{cat}$  (4,5). Por lo que se observa una dependencia directa de estas constantes de velocidad con la viscosidad del medio (5). Por lo anterior se propuso que toda reacción en proteínas que contenga un componente difusivo sería inhibida por un aumento en la viscosidad del medio de acuerdo a la teoría de Kramers (5).

La enzima glucosa oxidasa (GOD) de *Aspergillus niger* es un homodimero con un peso molecular de 160 kDa y se encuentra altamente glicosilada (16% peso/peso) (6). La GOD contiene dos grupo prostéticos de FAD, los cuales están fuertemente pero no covalentemente unidos. El FAD participa en la reacción de oxidación-reducción (glucosa +  $O_2 \rightarrow \delta$ -gluconolactona) que lleva a cabo la enzima. La glucosa oxidasa es una enzima que presenta una alta resistencia a la desnaturalización; se sabe que la

inactivación térmica se debe principalmente la liberación del FAD (7). El objetivo del trabajo es estudiar el efecto de la trehalosa en la inactivación térmica de la GOD.

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Reactivos:** los reactivos utilizados para los diferentes experimentos incluyendo la GOD, fueron adquiridos de Sigma Chemical Co.

**Purificación de la glucosa oxidasa.** La GOD (Sigma Chemical Co.) fue purificada por cromatografía en columna (Sephacryl 200HR). La GOD se cargó en la columna y se eluyó con EGTA 1 mM en amortiguador de fosfatos 20 mM (pH 7.0) a una velocidad de flujo de 10ml/hr. Se colectaron fracciones de 1 ml y se midió la absorbencia a 280 nm. Posteriormente, se determinó la concentración de proteína (método de Lowry, con BSA como estándar) en las fracciones del pico máximo. La pureza de las fracciones se evaluó por SDS-PAGE. Para los experimentos de inactivación térmica se empleó la fracción más pura.

**Efecto de la presencia de trehalosa en la cinética de la GOD.** La cinética de saturación de la GOD fue determinada colorimetricamente empleando un sistema acoplado peroxidasa/o-dianisidina a 30°C: 3 ml vol. final conteniendo o-dianisidina (0.1 ml de o-dianisidina al 1% en 12 ml de amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M pH 6.5; saturado con oxígeno,) peroxidasa (6.6 µg/ml) y diferentes concentraciones de glucosa. La mezcla de reacción se preincubó por 10 min a 30° C, posteriormente la reacción se inició agregando 20µl de GOD (1.57 µg de prot.). El aumento de la absorbencia a 460 nm se siguió por 4 min y de la pendiente de la línea formada se calculó la velocidad de catálisis. El efecto de la trehalosa sobre la actividad de la GOD se determinó incluyendo diferentes concentraciones de trehalosa (M: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8) en la mezcla de reacción.

**Inactivación térmica de la GOD.** La inactivación térmica en presencia y ausencia de trehalosa se obtuvo a diferentes temperaturas (50,55,60,65,70 y75°C). La incubación de la GOD (43 µg de prot.) se realizó en amortiguador de fosfatos 20mM (pH 6.0) en ausencia y presencia de 0.6 M de trehalosa. La actividad residual de la GOD se determinó tomando alícuotas de 5µl a diferentes intervalos de tiempo durante 40 minutos.

**Efecto de la trehalosa en los cambios de centro de masa espectral de la GOD durante la Inactivación térmica.** Los espectros de fluorescencia se obtienen en un espectrofluorómetro en una celda de 10 mm de paso de luz con control de temperatura. A diferentes temperaturas (45, 50, 55, 60, 62.5, 65, 70 y 75), el espectro de fluorescencia (300-400 nm) de la GOD (43 µg prot.) suspendida en Pipes 10mM (pH 7.0), se obtuvo excitando la proteína a 285 nm en presencia y ausencia de trehalosa (0.6M). El espectro de fluorescencia de la GOD se obtuvo cada minuto durante 30 min. El cambio de centro de masa espectral (*CME*) se obtuvo de acuerdo a la siguiente ecuación:  $CME = \sum \lambda_i \times F_i / \sum F_{ii}$ .

### **OBJETIVO**

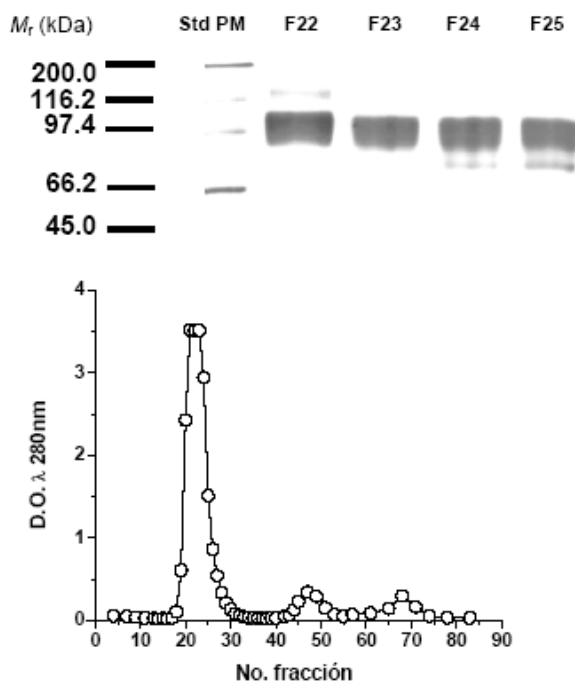
Estudiar el efecto de la trehalosa en la cinética de inactivación térmica de la glucosa oxidasa.

### **RESULTADOS Y CONCLUSIONES**

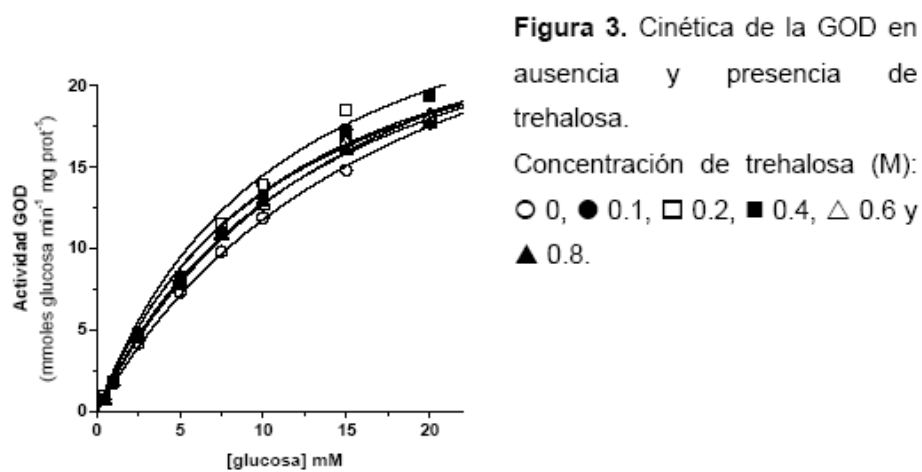
En el perfil de elución en la columna de sephacryl 200HR se encontró un pico de absorbencia a 280 nm entre las fracciones 19 a 30 (Fig. 1). Para estas fracciones se determinó la concentración de proteína y la pureza en un gel de SDS-PAGE. En este gel la fracción 23 fue la que presentó una mayor pureza (Fig1). El resto de las fracciones presentaron una pequeña banda inferior que corresponde probablemente a la enzima no glicosilada. Se sabe que la enzima glicosilada presenta una mayor resistencia a la desnaturalización debido precisamente a la presencia de los residuos de carbohidratos como se ha reportado (7). Por lo tanto se escogió la fracción 23 para llevar a cabo los experimentos de desnaturalización térmica.

La GOD presentó una cinética de saturación hiperbólica a 25°C. Los datos de velocidad obtenidos se ajustaron por regresión no-lineal a la ecuación de Michaelis-Menten; los parámetros cinéticos calculados ( $K_m = 18.76$  mM y  $V_{max} = 33.97$  mmoles glucosa  $\text{min}^{-1}$   $\text{mg prot}^{-1}$ ) fueron similares a los reportados en la literatura (6). La presencia de concentraciones crecientes de trehalosa aumentó la afinidad de la enzima por el sustrato; la  $K_m$  disminuyó hasta valores de 11.34 mM de glucosa (Fig. 1 y Tabla 1). Lo cual sugiere un efecto de la trehalosa sobre la estructura del sitio activo. En contraste, la falta de efecto sobre la  $V_{max}$  indica que los cambios conformacionales de la GOD durante el ciclo catalítico

son de baja magnitud. Ya que se ha demostrado que en enzimas con movimientos de dominios de gran magnitud son inhibidas por la viscosidad generada por la trehalosa (5).



**Figura 1.** Perfil de elusión de la GOD y SDS-PAGE de las fracciones.



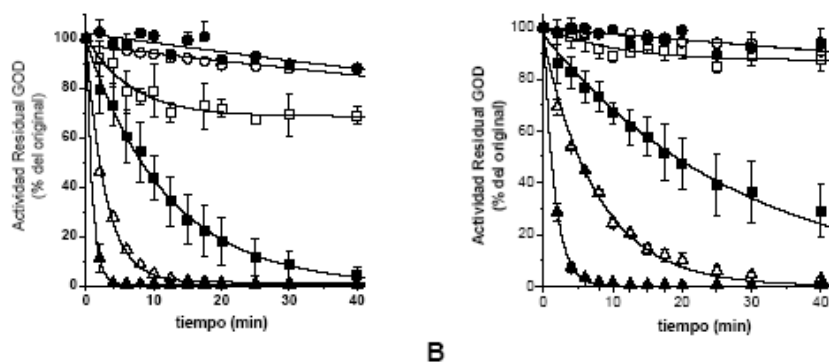
**Figura 3.** Cinética de la GOD en ausencia y presencia de trehalosa.

Concentración de trehalosa (M):  
 ○ 0, ● 0.1, □ 0.2, ■ 0.4, △ 0.6 y  
 ▲ 0.8.

**Tabla 1.** Efecto de la presencia trehalosa sobre los parámetros cinéticos de la GOD a 25°C

Trehalosa (M)	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (mmoles $\text{min}^{-1}$ mg prot $^{-1}$ )
0.0	18.76	33.97
0.1	11.34	28.87
0.2	11.34	31.00
0.4	11.12	28.40
0.6	15.42	32.39
0.8	13.60	30.24

La cinética de inactivación térmica de la GOD fue monofásica (Fig. 4A). Las constantes de velocidad de inactivación ( $k_i$ ) se obtuvieron ajustando los datos a la siguiente ecuación  $A_R = A \cdot e^{(-k_i t)}$  por regresión no-lineal (Fig. 4A y tabla 2). A partir de 60°C, la GOD presentó una rápida inactivación. En este sentido, se sabe que la termoinactivación de la GOD se debe a la disociación del FAD del sitio activo (7). La presencia de trehalosa (0.6 M) disminuyó a la mitad el valor de la  $k_i$  a todas las temperaturas probadas (Fig 4B y tabla 2), por ejemplo a 65°C la  $k_i$  disminuyó de  $8.4 \times 10^{-2}$  a  $3.5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  (tabla 2). Por lo tanto, la trehalosa estabiliza a la GOD evitando la disociación del FAD del sitio activo. El efecto de la trehalosa en la estructura de la GOD se evaluó por fluorescencia intrínseca analizando los cambios en los centros de masa espectral (CME) a diferentes temperaturas.

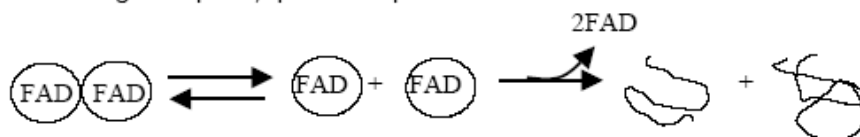


**Figura 4.** Termoinactivación de la GOD en ausencia (A) y presencia de trehalosa (B). Temperatura de incubación (°C): ○ 50, ● 55, □ 60, ■ 65, △ 70 y ▲ 75.

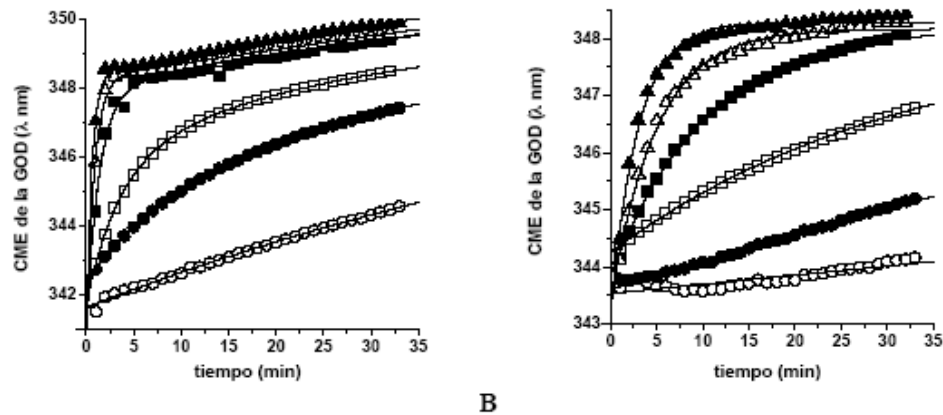
Tabla 2. Efecto de la trehalosa sobre la constante de velocidad de inactivación ( $k_i$ ) de la GOD.

Temp (°C)	Trehalosa (0.6M)	
	$k_i \times 10^{-2} \text{min}^{-1}$	$k_i \times 10^{-2} \text{min}^{-1}$
50	0.3	0.2
55	0.4	0.2
60	2.7	0.9
65	8.4	3.5
70	35.0	12.8
75	111.8	62.9

El cambio en el *CME* de la GOD se siguió en ausencia y en presencia de trehalosa (0.6 M). En contraste con el estudio de inactivación térmica, el *CME* presentó un cambio hacia el rojo a partir de 45°C; lo que indica que existe un paso previo a la pérdida del FAD; posiblemente la disociación de los monómeros. El cambio del *CME* por temperatura siguió una cinética bifásica ya que los datos se ajustaron a una ecuación biexponencial ( $CME_t = CME_0 + A_1 \cdot [1 - e^{(-k_1 \cdot t)}] + A_2 \cdot [1 - e^{(-k_2 \cdot t)}]$ ) por regresión no-lineal (Fig. 5A). La cinética bifásica describe dos pasos en el cambio del *CME*, el primer paso (de mayor amplitud) podría deberse a la disociación de los monómeros y el segundo a la disociación del FAD. Sin embargo, en presencia de trehalosa la cinética de cambio del *CME* fue monoexponencial ( $CME_t = CME_0 + A \cdot [1 - e^{(-k \cdot t)}]$ ) (Fig. 5B). La trehalosa disminuye la constante de velocidad de la primera fase e inhibe totalmente el segundo paso; que correspondería a la liberación del FAD.



A 60°C el cambio del *CME* se observa tanto en presencia y como en ausencia de trehalosa (Fig. 5A y 5B). En contraste, a esta misma temperatura la actividad de la GOD es totalmente estable en presencia de trehalosa (Fig. 4B). Los resultados sugieren que la trehalosa inhibe la disociación del FAD por temperatura y disminuye la velocidad de disociación de los monómeros en la GOD.



**Figura 5.** Centro de masa de la GOD en presencia y ausencia de trehalosa.  
 Temperatura de incubación (°C): ○ 45, ● 50, □ 55, ■ 60, △ 62.5 y ▲ 65.

#### Apoyos financieros

Este proyecto fue financiado por CONACYT (SEP-2004-c01-46537) y por SEP-PROMEP (UAEHGO-PTC- 192)

#### Referencias

1. Gacto M, Soto T, Vicente-Soler J, Villa TG, Cansado J.(2003) Learning from yeasts: intracellular sensing of stress conditions. *Int Microbiol.* (a publicarse en Septiembre).
2. Singer, M.A. y Lindquist, S. (1998) Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* **16**: 460-458.
3. Singer, M.A. y Lindquist, S. (1998) Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* **16**: 460-458.
4. Sampedro, J.G., Munoz-Clares, R.A. y Uribe, S. (2002) Trehalose-mediated inhibition of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from *Kluyveromyces lactis*: dependence on viscosity and temperature. *J. Bacteriol.* **184**: 4384-4391.
5. Uribe, S. y Sampedro, J.G. (2003) Measuring Solution Viscosity and its Effect on Enzyme Activity. *Biol. Proced. Online.* **5**: 108-115.
6. Akhtar, M.S., Ahmad, A. y Bhakuni, V. (2002) Divalent cation induced changes in structural properties of the dimeric enzyme glucose oxidase: Dual effect of dimer stabilization and dissociation with loss of cooperative interactions in enzyme monomer. *Biochemistry.* **41**: 7142-7149.
7. Gouda, M.D., Singh, S.A., Rao, A.G., Thakur, M.S. y Karanth, N.G. (2003) Thermal inactivation of glucose oxidase. Mechanism and stabilization using Additives. *J. Biol. Chem.* **278**: 24324-24333.

### **Anexo 3**

**Preparación de las soluciones empleadas en el  
desarrollo experimental**



### **3.1 SOLUCIONES PARA LA CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO DE LA GOx**

#### **3.1.1 Amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7.0:**

- Pesar 1.361 g de Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y disolver en 450 mL de agua destilada
- Ajustar el pH con KOH añadiéndolo gota a gota
- Aforar a 500 mL con agua destilada

#### **3.1.2 Solución de EGTA y amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7.0 (dilución 1:1000):**

- Mezclar 0.4 mL de EGTA 1 M con 399.6 mL de amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7.0.

**NOTA:** El EGTA se utiliza para evitar la proliferación de microorganismos.

### **3.2 SOLUCIONES PARA EL MÉTODO DE LOWRY**

#### **3.2.1 Solución A:**

- Pesar 0.5 g de sulfato de cobre pentahidratado y 1 g de citrato de sodio dihidratado
- Disolver y aforar a 100 mL con agua destilada

#### **3.2.2 Solución B:**

- Pesar 20 g de carbonato de sodio y 4 g de hidróxido de sodio
- Disolver y aforar en 1 L de agua destilada

#### **3.2.3 Solución C:**

- Mezclar 1 mL de la solución A con 50 mL de la solución B

**NOTA:** Esta solución se prepara al momento de emplearse.

#### **3.2.4 Solución D:**

- Diluir 10 mL de Folin-Ciocalteu en 10 mL de agua destilada

### 3.3 SOLUCIONES PARA SDS-PAGE

#### 3.3.1 Solución de acrilamida 30%/ bisacrilamida 2.67%:

- Pesar 29.2 g de acrilamida y 0.8 g de bisacrilamida
- Disolver y aforar a 100 mL con agua destilada

**Información de seguridad:** La acrilamida en polvo y en solución es neurotóxica y cancerígena, por lo tanto se debe usar máscara, guantes y lentes de protección para su manipulación.

#### 3.3.2 Amortiguador para el gel separador Tris-HCL 3 M pH 8.8:

- Pesar 36.34 g de tris-base y disolver en 80 mL de agua destilada
- Ajustar el pH a 8.8 con HCL concentrado
- Aforar a 100 mL con agua destilada

#### 3.3.3 Amortiguador para el gel concentrador Tris-HCL 0.5 M pH 6.8:

- Pesar 6.057 g de tris-base y disolver en 80 mL de agua destilada
- Ajustar el pH a 6.8 con HCL concentrado
- Aforar a 100 mL con agua destilada

#### 3.3.4 Solución SDS al 10 % (peso/volumen):

- Pesar 10 g de SDS
- Disolver y aforar a 100 mL con agua destilada

**NOTA:** Calentar ligeramente el SDS para favorecer su disolución ya que precipita si la temperatura ambiente es inferior a 18 °C.

**Información de seguridad:** El SDS es un polvo fino neurotóxico, por lo tanto se debe usar máscara, guantes y lentes de protección para su manipulación.

#### 3.3.5 Persulfato de amonio al 10 % (peso/volumen):

- Pesar 0.5 g de persulfato de amonio
- Disolver en 5 mL de agua destilada

**NOTA:** Una vez preparados los 5 mL se reparten en alícuotas de 1 mL en tubos eppendorf y se conservan a -20 °C hasta su uso.

### 3.3.6 Amortiguador de muestra

- Mezclar 1.2 mL de Tris-HCL 0.5 M pH 6.8, 1 mL de glicerol, 2 mL de SDS al 10% (p/v), 0.5 mL de azul de bromofenol al 0.1% y 4.8 mL de agua destilada.

**NOTA:** A esta solución se le agregó un 5 % de  $\beta$ -mercaptoetanol al momento de usarla, el cual se debe manipular en la campana de gases ya que es tóxico y de olor intenso.

### 3.3.7 Amortiguador de corrimiento 10 X Tris Glicina pH 8.3

- Pesar 30 g de tris-base, 144 g de glicina y 10 g de SDS y disolver en 800 mL de agua destilada
- Ajustar el pH a 8.3 con HCL concentrado
- Aforar a 1 L con agua destilada

**NOTA:** La solución está concentrada 10 veces y antes de utilizarla hay que diluirla (dilución 1:10). Esta solución puede almacenarse indefinidamente a temperatura ambiente.

## 3.4 SOLUCIONES PARA TINCIÓN DEL GEL CON AZUL DE COOMASSIE

### 3.4.1 Solución de tinción azul de Coomassie

- Pesar 1 g de azul de Coomassie R-250
- Añadir a 450 mL de agua destilada, 450 mL de metanol y 100 mL de ácido acético glacial.

**NOTA:** Esta solución se debe mantener en agitación hasta la disolución de la mayor parte del colorante, filtrar y almacenar en botellas de color ámbar.

**Información de seguridad:** Se debe preparar en la campana de gases y utilizar guantes ya que el metanol es tóxico.

### 3.4.2 Solución desteñidora de geles

- Mezclar 100 mL de metanol, 100 mL de ácido acético glacial y 800 mL de agua destilada.

**Información de seguridad:** Se debe preparar en la campana de gases y usar guantes ya que el metanol es tóxico.

### **3.5 SOLUCIONES PARA LA CINÉTICA DE SATURACIÓN E INACTIVACIÓN TÉRMICA DE LA GOx**

#### **3.5.1 Amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M pH 6.0**

- Pesar 6.805 g de fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y disolver en 450 mL de agua destilada.
- Ajustar el pH a 6.0 con KOH
- Aforar a 500 mL con agua destilada

#### **3.5.2 Solución de o-dianisidina al 1 %**

- Pesar 0.1 g de o-dianisidina
- Disolver en 10 mL de agua destilada

#### **3.5.3 Solución de peroxidasa al 0.14 %**

- Pesar 0.028 g de peroxidasa
- Disolver en 20 mL de agua destilada

#### **3.5.4 Solución de trehalosa 1 M en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 6.0 (solución stock)**

- Pesar 94.58 g de trehalosa
- Disolver y aforar a 250 mL con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 6.0

#### **3.5.5 Soluciones Stock de glucosa**

Solución de glucosa 50 mM:

- Pesar 0.901 g de glucosa
- Disolver y aforar a 100 mL con agua destilada

Solución de glucosa 200 mM:

- Pesar 3.604 g de glucosa
- Disolver y aforar a 100 mL con agua destilada

Solución de glucosa 300 mM:

- Pesar 5.406 g de glucosa
- Disolver y aforar a 100 mL con agua destilada

## **3.6 SOLUCIÓN PARA LOS EXPERIMENTOS DE FLUORESCENCIA**

### **3.6.1 Amortiguador pipes 10 mM pH 7.0**

- Pesar 0.605 g de Pipes y disolver en 150 mL de agua destilada
- Ajustar el pH con NaOH o KOH
- Aforar a 200 mL con agua destilada

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Biotechnology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jbiotec](http://www.elsevier.com/locate/jbiotec)

## Trehalose-mediated thermal stabilization of glucose oxidase from *Aspergillus niger*

Karina J. Paz-Alfaro<sup>a</sup>, Yadira G. Ruiz-Granados<sup>b</sup>, Salvador Uribe-Carvajal<sup>b</sup>, José G. Sampedro<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Área Académica de Nutrición, Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Abasco 600, Colonia Centro, C.P. 42000, Pachuca, Hidalgo, Mexico

<sup>b</sup> Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), A.P. 70-242, C.P. 04510, Ciudad Universitaria, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 August 2008

Received in revised form 11 March 2009

Accepted 16 March 2009

#### Keywords:

Glucose oxidase

Thermal inactivation

FAD dissociation

Trehalose

Fluorescence

### ABSTRACT

Thermal inactivation and enzyme kinetics of glucose oxidase (a FAD dependent enzyme) were studied in the absence and presence of trehalose. The inactivation rate constant decreased by up to 50% at temperatures between 50 and 70 °C in the presence of 0.6 M trehalose; as a consequence the glucose oxidase half-life increased. Intrinsic fluorescence spectra showed a maximum center of spectral mass (CSM) red shift of 6.5 nm. Therefore, major structural changes seem to be related to glucose oxidase thermal inactivation. Trehalose decreased the rate constant for unfolding as monitored by CSM red shift kinetics indicating that this disaccharide favors the most compact folded state. The  $E_a$  for unfolding was increased from 204 to 221 kJ mol<sup>-1</sup>. It is proposed that FAD dissociation is preceded by the exposition of hydrophobic regions, while the presence of trehalose was able to hinder the release of FAD. Enzyme kinetics analysis showed that trehalose does not affect  $V_{max}$  but instead decreases  $K_m$ ; as a result enzyme efficiency was increased. The stabilizing effect of trehalose in a cofactor-dependent enzyme has not been tested to date. In addition, glucose oxidase has an enormous commercial importance and therefore, the use of trehalose to stabilize glucose oxidase in its multiple applications seems to be promising.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Glucose oxidase (EC 1.1.3.4) from *Aspergillus niger* catalyzes the oxidation of  $\beta$ -D-glucose by molecular oxygen to  $\beta$ -D-gluconolactone, which spontaneously hydrolyzes to gluconic acid and hydrogen peroxide (Frederick et al., 1990). Glucose oxidase is a dimer of 160 kDa molecular weight; each monomer contains a non-covalently bound FAD molecule. The protein is glycosylated, containing between 11% and 30% carbohydrates: mostly amino- and neutral-sugars (Nakamura and Koga, 1976; Kalish et al., 1991). Glucose oxidase is of considerable commercial importance (Bourdillon et al., 1988; Tzanov et al., 2002; Moschou et al., 2007), however new applications are limited by its structural instability. In this regard, some researchers have tried to increase the stability of glucose oxidase, e.g. by attaching long polyethylene glycol molecules to the protein surface (Seymour and Klinman, 2002), by immobilizing the enzyme to matrices and/or crosslinking to membranes

and liposomes (Rao et al., 1981; Wang et al., 2003; Rubio-Retama et al., 2005; Rauf et al., 2006), and by adding polyalcohols (glycerol and sorbitol), mono- and divalent salts or other proteins (Ahmad et al., 2001; Akhtar et al., 2002; Gulla et al., 2004). However, not all these efforts have led to a proper balance between structural stability and enzyme activity (Ahmad et al., 2001; Akhtar et al., 2002; Betancor et al., 2006; Rauf et al., 2006).

Through evolution, several molecules named compatible solutes have been selected by their ability to stabilize cellular structures without affecting function (Singer and Lindquist, 1998; Jain and Roy, 2008). The disaccharide trehalose ( $\alpha$ -D-glucopyranosyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside) seems to be one of the best protein stabilizing compatible solutes found in nature (Sampedro et al., 2001; Jain and Roy, 2008), its stabilizing property is explained by the preferential hydration theory (Shimizu and Smith, 2004; Auton et al., 2008); the ability of trehalose to be excluded from the protein surface and thus, facilitating the interaction between the protein and water molecules. In addition, it has been proposed that trehalose increases the stability of proteins by favoring the most compact folded state, while high viscosity hinders protein domain motions leading to unfolding (Sampedro and Uribe, 2004; Pradeep and Udgaonkar, 2007). In the case of glucose oxidase, high structural stability is required in its many commercial presentations; however it is also desirable to avoid any deleterious effect on its catalytic activity. In this regard, the protective ability of trehalose against the

\* Corresponding author. Present address: Department of Molecular Cellular and Developmental Biology, The University of Michigan, 830 North University, Ann Arbor, MI 48109, United States. Tel.: +1 734 647 7964/+52 77 1717 2000x5114; fax: +1 734 647 0884/+52 77 1717 2000x5111.

E-mail addresses: [jg.sampedro@gmail.com](mailto:jg.sampedro@gmail.com), [sampedro@umich.edu](mailto:sampedro@umich.edu) (J.G. Sampedro).

oxidative damage mediated by hydrogen peroxide (Benaroudj et al., 2001) would be an additional property to consider during glucose oxidase stabilization.

In this work, the thermal inactivation of glucose oxidase was studied in the absence and in the presence of physiological concentrations of trehalose. At each temperature tested, it was found that trehalose stabilizes glucose oxidase by decreasing the inactivation rate constant by up to 50%. Furthermore, heat stabilization of glucose oxidase was related to a decrease in the rate constant for the red shift of the center of spectral mass (CSM), suggesting that trehalose favors the most compact folded state of the protein. Interestingly, enzyme kinetics analysis showed that high trehalose concentrations in the reaction media increases enzyme efficiency; enzyme affinity was increased while  $V_{\max}$  was not affected. It is suggested that FAD dissociation takes place after exposition of hydrophobic regions and trehalose presence would inhibit this process.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Glucose oxidase type X-S from *A. niger*, *o*-dianisidine, trehalose, glucose and horseradish peroxidase were from Sigma Chemical Co (St Louis, MO), Sephacryl 200HR was from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). All other reagents were of the highest quality available commercially.

### 2.2. Glucose oxidase purification

The enzyme was purified from the commercial suspension essentially as described by Gouda et al. (2003) using size exclusion chromatography in a Sephacryl 200HR column. Protein (5 mg) was loaded in a pre-equilibrated column with 20 mM phosphate buffer, pH 7.0. Elution was performed with 20 mM phosphate buffer, pH 7.0, 1 mM EGTA, and a flow rate of 10 ml/h. To obtain the elution profile, fractions (1 ml) were collected and analyzed for absorbance at 280 nm. Highly absorbing fractions were analyzed for protein content and purity. Protein concentration measurements were performed by the method of Lowry et al. (1951) using BSA as standard. Protein purity was determined by SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue. Fractions containing a highly pure protein were used for spectroscopic and enzyme kinetics experiments.

### 2.3. Enzyme kinetics

Glucose oxidase saturation kinetics were performed at 25 °C using a peroxidase coupled assay. Briefly, glucose oxidase (1.57 μg protein in 20 μl) was added to 2.5 ml 100 mM phosphate buffer, pH 6.5, dianisidine (0.1 ml *o*-dianisidine 1% in 12 ml phosphate buffer, pH 6.5), 6.6 μg ml<sup>-1</sup> oxygen saturated peroxidase and increasing concentrations of glucose mutarotated by at least 6 h. Trehalose was added at the indicated concentration from a 1 M stock solution. The reaction mixture was preincubated for 10 min at the assay temperature before adding the enzyme. The absorbance increase at 460 nm was followed by 4 min in a UV/vis Shimadzu 1601 spectrophotometer equipped with a thermostated cell. Reaction velocity was calculated from the slope of the line formed.

### 2.4. Thermal inactivation kinetics

The effect of trehalose on glucose oxidase inactivation was tested at different temperatures ranging from 50 to 70 °C. Briefly, the enzyme was incubated in 20 mM phosphate buffer, pH 6.0. Trehalose (0.6 M) was added from a 1 M stock solution prepared in the same phosphate buffer. After adding the enzyme, the suspension

was gently mixed and an aliquot (5 μl) was removed each minute and immediately assayed for activity using the enzyme coupled assay described above in the presence of 50 mM glucose.

### 2.5. Center of spectral mass red shift kinetics

The kinetics of center of spectral mass red shift (CSM, the average emission wave number) for glucose oxidase at different temperatures ranging from 50 to 70 °C were obtained in the absence and presence of 0.6 M trehalose. Briefly, glucose oxidase was suspended in 2 ml of 10 mM pipes, pH 7.0, and 0.6 M trehalose was added when indicated from a 1 M stock solution. Intrinsic fluorescence spectra (300–400 nm) were recorded each minute after exciting the protein at 285 nm. A Shimadzu RF5301 spectrofluorophotometer equipped with a thermostated cell chamber and constant stirring was used for all fluorescence assays.

### 2.6. Thermal inactivation kinetics

Glucose oxidase thermal inactivation kinetics at a given temperature and in the absence and presence of trehalose were analyzed using the two-state mechanism ( $N \leftrightarrow U$ ). Residual activity was plotted versus incubation time and fitted to Eq. (1) by nonlinear regression using the iterative software Microcal Origin<sup>®</sup> (Northampton, MA) (Henley and Sadana, 1986).

$$A_R = A \times \exp(-k_i \times t) \quad (1)$$

where  $A_R$  is the residual activity at time ( $t$ ),  $A$  is the amplitude of the inactivation process and  $k_i$  is the apparent rate constant for enzyme inactivation.

### 2.7. Thermal unfolding kinetics

The CSM red shift kinetics was analyzed as follows: the fluorescence spectra were quantified using Eq. (2) to obtain the CSM (Ruan et al., 2000).

$$\text{CSM} = \frac{\sum \lambda_i F_i}{\sum F_i} \quad (2)$$

where  $\lambda_i$  is the wavelength and  $F_i$  is the fluorescence intensity at a given wavelength. The CSM red shift kinetics at a given incubation temperature and in the absence and presence of trehalose was studied by fitting the data to Eq. (3) by nonlinear regression.

$$\text{CSM} = \text{CSM}_0 + A \times \exp(-k_{\text{CSM}} \times t) \quad (3)$$

where  $\text{CSM}_0$  is the CSM of glucose oxidase at time zero,  $t$  is the incubation time,  $A$  is the amplitude of the process and  $k_{\text{CSM}}$  is the rate constant for CSM red shift.

### 2.8. Enzyme kinetics

Initial velocities for glucose oxidation versus substrate concentration were plotted and fitted to the Michaelis–Menten equation (Eq. (4)) by nonlinear regression.

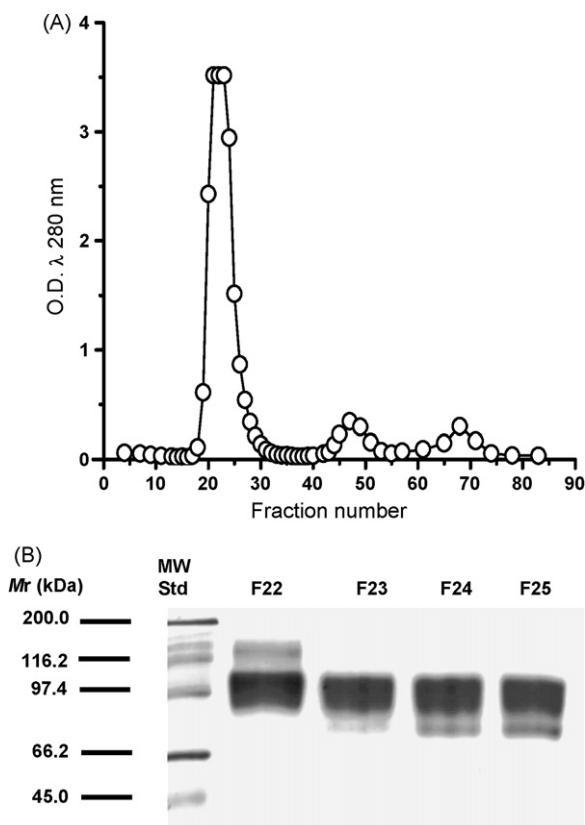
$$v_0 = \frac{V_{\max} \times S}{K_m + S} \quad (4)$$

where  $v_0$  is the initial velocity at a given substrate concentration,  $V_{\max}$  is the maximum velocity of the enzyme catalyzed reaction,  $K_m$  is the substrate concentration when  $v_0 = 1/2V_{\max}$ . The enzyme efficiency was defined as the ratio of  $V_{\max}/K_m$ .

The energy of inactivation ( $E_a$ ) for glucose oxidase thermal inactivation and CSM change in the absence and presence of trehalose was obtained by linear regression of the data using the Arrhenius equation (Eq. (5)).

$$k = A_0 \times \exp(-E_a/RT) \quad (5)$$





**Fig. 1.** Purification of commercial glucose oxidase from *Aspergillus niger*. (A) Elution profile of glucose oxidase on a Sephacryl 200HR column. The enzyme (5 mg protein) was loaded and eluted with 20 mM phosphate buffer, pH 7.0, 1 mM EGTA, and 10 ml/h flow rate. Fractions (1 ml) were collected and analyzed for absorbance at 280 nm. (B) Highly absorbing fractions were analyzed for protein content and purity in SDS-PAGE.

where  $k$  is the inactivation rate constant ( $k_i$ ) or the rate constant for the CSM change ( $k_{CSM}$ ),  $R$  is the gas constant ( $8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),  $T$  is the absolute temperature and  $A_0$  is a constant.

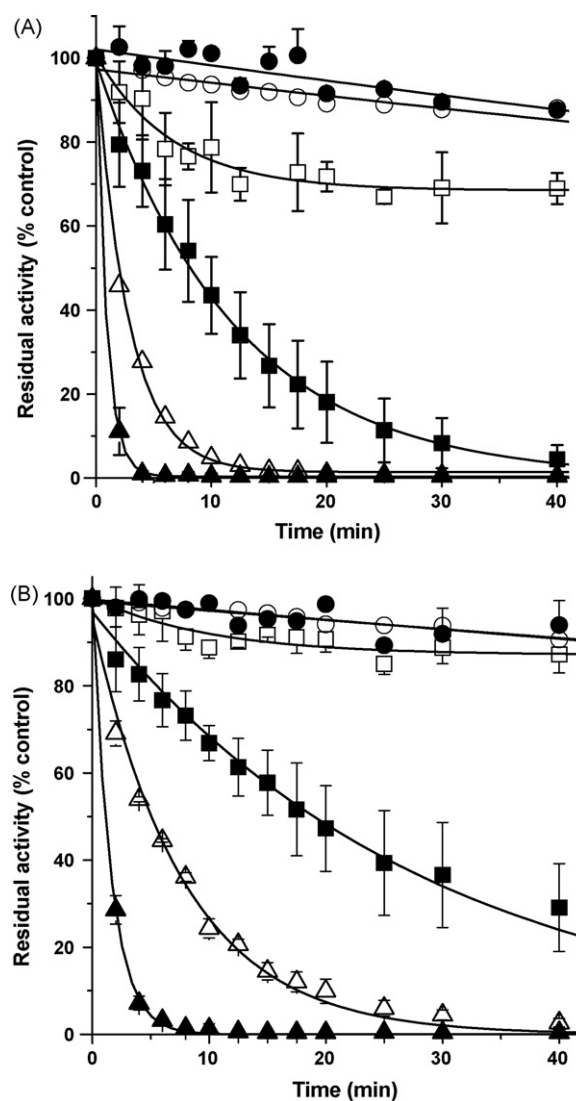
### 3. Results and discussion

Glucose oxidase was purified using a Sephacryl 200HR chromatographic column (Fig. 1A) and enzyme purity was evaluated by SDS-PAGE (Fig. 1B). In the protein elution profile a single main peak absorbing at 280 nm was observed (Fig. 1A). However, it was found that most of the fractions composing the peak showed a slightly contaminated enzyme and only one fraction (F23) was constituted of pure glucose oxidase (Fig. 1B). The calculated kinetics parameters for F23 at 25 °C were  $V_{max} = 33.97 \pm 0.43 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$  and  $K_m = 18.76 \pm 0.63 \text{ mM}$ . In this regard,  $K_m$  was similar to that reported for pure glucose oxidase, while  $V_{max}$  was 2–3 times higher (Zhu et al., 2006). Further, the UV/vis absorption spectrum for F23 was obtained and the calculated absorption ratio 280 nm/450 nm was 10.28, in good agreement with the stated value of 10.3 for a pure glucose oxidase (Johnson et al., 1989). In addition, in a 10  $\mu\text{M}$  glucose oxidase solution ( $1.6 \text{ mg ml}^{-1}$ ) prepared from F23, the FAD concentration was 21.6  $\mu\text{M}$  as quantified by using a molar extinction coefficient ( $\epsilon$ ) of  $14,100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 450 nm (the  $\epsilon$  value for a FAD bound glucose oxidase; Swodoba and Macey, 1965); thus, the relationship FAD:glucose oxidase in F23 was 2:1 (or one FAD per monomer). Therefore, F23 was used to perform both thermal stability and enzyme kinetics studies.

Glucose oxidase thermal inactivation kinetics was studied at different temperatures (50–70 °C). Thermal inactivation displayed a

single exponential decay at all tested temperatures (Fig. 2). Inactivation data fitted well to Eq. (1) by nonlinear regression and kinetic parameters were obtained. The observed one-step inactivation process was in agreement to the proposal that thermal inactivation occurs upon FAD dissociation (Gouda et al., 2003). In this regard, the inactivation rate constant ( $k_i$ ) was increased from  $0.33 \pm 0.04 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  at 50 °C to  $111.81 \pm 0.97 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  at 70 °C (Fig. 2A, Table 1). Remarkably, the half-life ( $t_{1/2}$ ) was diminished from 210 min at 50 °C to 0.61 min at 70 °C (Table 1). These results illustrate the extreme thermal structural instability characterizing glucose oxidase.

The disaccharide trehalose is accumulated in yeast and other organisms in response to high environmental temperatures (Jain and Roy, 2008). Some authors have showed that trehalose is able to stabilize enzymes from heat induced inactivation (Sampedro et al., 2001). Therefore, glucose oxidase thermal inactivation kinetics was studied in the presence of 0.6 M trehalose; this is the concentration in yeast cytoplasm during stress (Hottiger et al., 1994). Glucose



**Fig. 2.** Thermal inactivation of glucose oxidase. Thermal inactivation kinetics was performed at different temperatures by suspending the enzyme in 20 mM phosphate buffer, pH 6.0, in the absence (A) and presence (B) of 0.6 M trehalose. An aliquot (5  $\mu\text{l}$ ) was removed each minute and immediately assayed for activity at 25 °C using the peroxidase coupled assay containing 50 mM glucose as substrate. Incubation temperatures (°C) were: (○) 50; (●) 55; (□) 60; (■) 62.5; (△) 65 and (▲) 70. Inactivation data were fitted to Eq. (1) by nonlinear regression to obtain the  $k_i$  (Table 1).

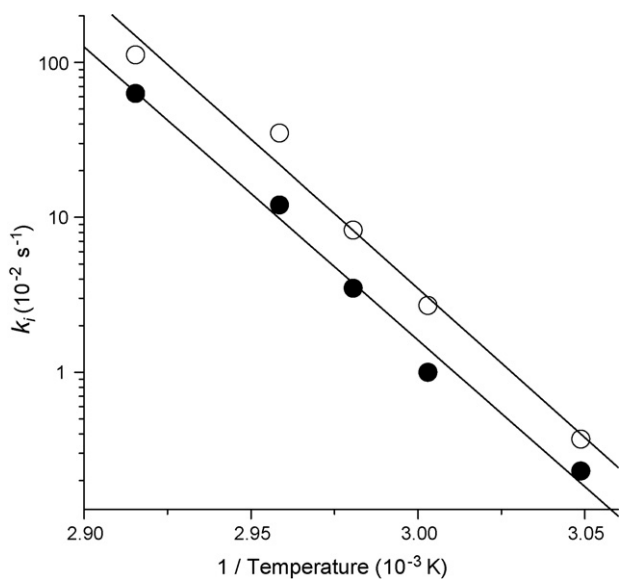
**Table 1**  
Effect of trehalose on thermal inactivation of glucose oxidase from *Aspergillus niger*<sup>a</sup>.

Temperature (°C)	$k_i$ ( $10^{-2} \text{ min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)	Trehalose (0.6 M)	
			$k_i$ ( $10^{-2} \text{ min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)
50	0.33 ± 0.04	210.00	0.22 ± 0.01	315.00
55	0.37 ± 0.07	187.29	0.23 ± 0.06	301.30
60	2.70 ± 0.25	25.66	1.00 ± 0.03	69.30
62.5	8.28 ± 0.48	8.36	3.49 ± 0.09	19.85
65	35.03 ± 1.31	1.97	12.76 ± 0.53	5.43
70	111.81 ± 0.97	0.61	62.92 ± 1.04	1.10

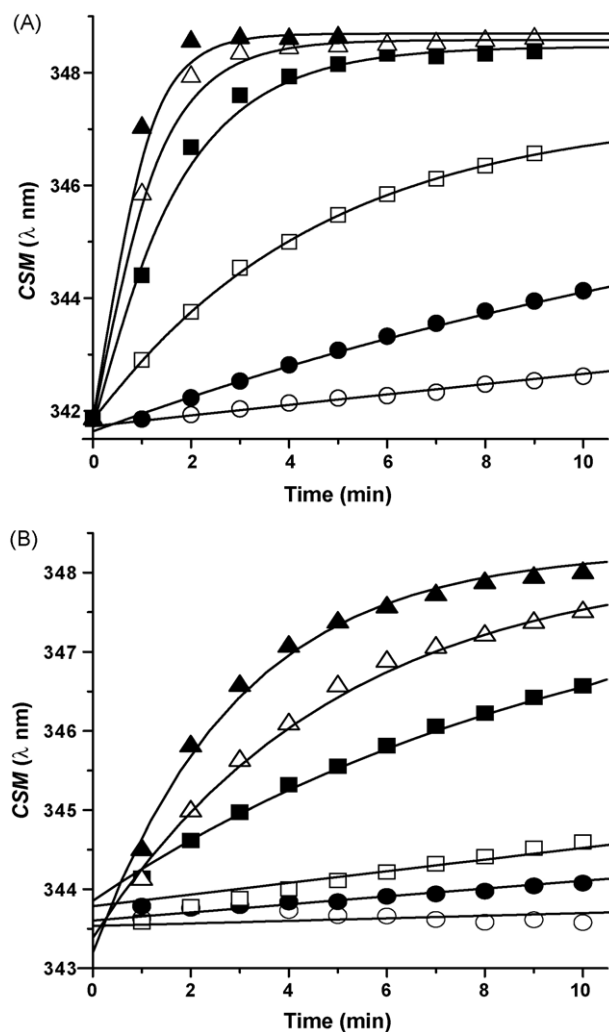
<sup>a</sup> Eq. (1) was used to calculate the inactivation rate constant ( $k_i$ ) and half-life ( $t_{1/2}$ ).

oxidase thermal stability was increased by the presence of physiological concentrations of trehalose in the incubation media (Fig. 2B). Thermal inactivation data were analyzed by nonlinear regression and it was found that the  $k_i$  was largely decreased to half the values observed in the absence of trehalose (Fig. 2B and Table 1), i.e. at 70 °C it was  $62.92 \pm 1.04 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ . The increase in thermal stability mediated by trehalose was also observed as a twofold increase in the  $t_{1/2}$  (Table 1), e.g. at 60 °C,  $t_{1/2}$  was increased from 25.66 to 69.30 min in the absence and presence of 0.6 M trehalose respectively. This result is of considerable importance as a long shelf life is highly desirable for commercial preparations of enzymes. The activation energy ( $E_a$ ) of the deactivation process was also calculated and it showed a slight increase in the presence of trehalose;  $E_a = 262 \text{ kJ mol}^{-1}$  and  $E_{a(0.6M \text{ trehalose})} = 268 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Fig. 3). The  $E_a$  value was in agreement with those obtained in other independent studies (Zoldák et al., 2004).

Large fluctuations on glucose oxidase structure were also studied at high temperature. It is known that when proteins unfold they usually show a CSM red shift that is related to an increased polarity in the surroundings of tryptophan residues (Dumoulin et al., 1999). Therefore, the CSM red shift kinetics for glucose oxidase at different incubation temperatures was analyzed. Interestingly, glucose oxidase displayed a CSM red shift at the same temperatures where thermal inactivation take place (Fig. 4) thus suggesting that major structural changes are related to glucose oxidase inactivation. The kinetics for CSM red shift was analyzed by fitting the data by nonlinear regression to the single exponential Eq. (3). CSM red shift



**Fig. 3.** Arrhenius plot for thermal inactivation of glucose oxidase. The  $E_a$  was calculated from the slope of the line obtained by linear regression of the data using Eq. (5). Inactivation rate constant  $k_i$  (○) in the absence and (●) presence of 0.6 M trehalose. The calculated  $E_a$  for glucose oxidase thermal inactivation was 262 and 268  $\text{kJ mol}^{-1}$  in the absence and presence of 0.6 M trehalose, respectively.



**Fig. 4.** Center of spectral mass (CSM) red shift kinetics. The glucose oxidase CSM red shift kinetics was obtained at different temperatures in the absence (A) and presence (B) of 0.6 M trehalose. Glucose oxidase was suspended in 2 ml of 10 mM pipes, pH 7.0, and 0.6 M trehalose was added when indicated from 1 M stock solution. Intrinsic fluorescence spectra (300–400 nm) were recorded each minute upon exciting the protein at 285 nm. Incubation temperature (°C): (○) 50; (●) 55; (□) 60; (■) 62.5; (△) 65 and (▲) 70. CSM red shift data were fitted to Eq. (3) by nonlinear regression to obtain the  $k_{\text{CSM}}$  value at each incubation temperature.

kinetics data fitted well to Eq. (3) (Fig. 4A) and the rate constant for CSM red shift ( $k_{\text{CSM}}$ ) was calculated at each temperature. The maximum CSM red shift amplitude observed was 6.5 nm (Fig. 4) and the  $k_{\text{CSM}}$  was dramatically increased from  $5.3 \pm 0.1 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  at 50 °C to  $148.6 \pm 5.60 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  at 65 °C (Table 2). The possibility that glucose oxidase thermal inactivation could be due to dimer dissociation is ruled out as it has been observed that the thermally

**Table 2**  
Effect of trehalose on thermal unfolding of glucose oxidase from *Aspergillus niger*.

Temperature (°C)	$k_{\text{CSM}}$ ( $10^{-2} \text{ min}^{-1}$ ) <sup>a,b</sup>	Trehalose 0.6 M
		$k_{\text{CSM}}$ ( $10^{-2} \text{ min}^{-1}$ )
50	5.3 ± 0.1	1.1 ± 0.04
55	18.0 ± 3.8	3.0 ± 0.01
60	59.0 ± 5.5	9.8 ± 0.02
62.5	98.0 ± 6.10	22.0 ± 2.90
65	148.6 ± 5.60	34.2 ± 2.80
70	ND	129.8 ± 3.60

<sup>a</sup> CSM was calculated using Eq. (2).

<sup>b</sup> Red shift rate constant was calculated using Eq. (3).

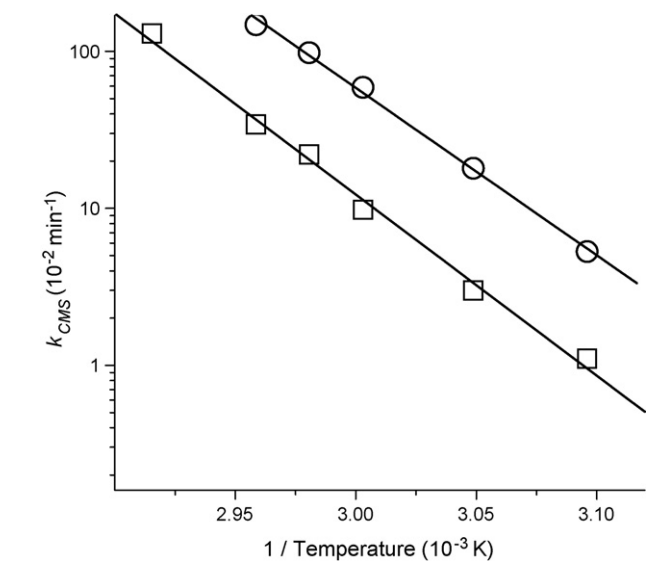
**Table 3**  
Effect of trehalose on the kinetic parameters of glucose oxidase from *Aspergillus niger* at 25 °C<sup>a</sup>.

Trehalose (M)	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ )	$V_{max}/K_m$ ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1} \text{mM}^{-1}$ )
0.0	$18.76 \pm 0.63$	$33.97 \pm 0.43$	1.81
0.1	$11.34 \pm 0.96$	$28.87 \pm 0.71$	2.54
0.2	$12.87 \pm 0.82$	$32.38 \pm 0.65$	2.51
0.4	$11.12 \pm 0.79$	$28.40 \pm 0.60$	2.55
0.6	$12.42 \pm 0.28$	$32.39 \pm 0.61$	2.60
0.8	$13.60 \pm 0.64$	$30.24 \pm 0.26$	2.22

<sup>a</sup> Eq. (4) was used to calculate the kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$ .

inactivated enzyme is a homodimer and therefore independent of protein concentration (Result not shown, Zoldák et al., 2004).

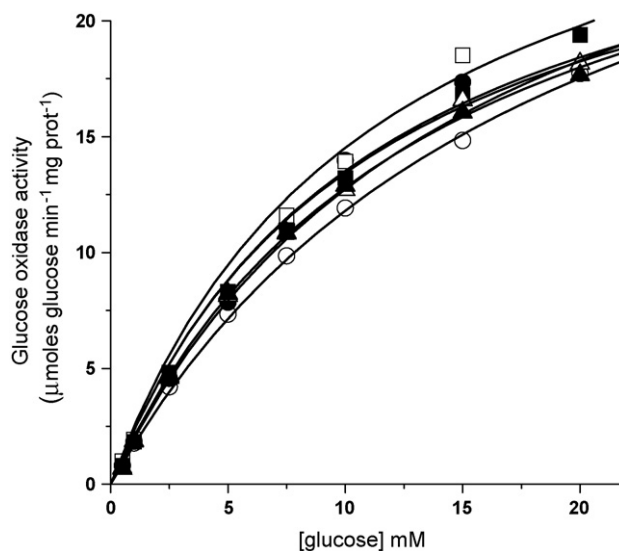
In solution, trehalose inhibits protein domain motions (Pradeep and Udgaonkar, 2007) and this effect has been related to its protein stabilizing property (Sampedro et al., 2001). In this regard, protein unfolding is a process where large structural changes usually take place (Jaenicke, 2000). Therefore, it was hypothesized that the presence of trehalose would have an effect on the rate of CSM red shift in glucose oxidase that would be related to the increased thermal stabilization observed in Fig. 2B. Interestingly, in the presence of 0.6 M trehalose the  $k_{CSM}$  was diminished at all temperatures tested (Table 2), i.e. at 65 °C and 0.6 M trehalose,  $k_{CSM}$  was  $34.2 \pm 2.80 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ . Notably, the sole presence of trehalose in the media induced a slight CSM red shift in the native glucose oxidase; CSM changed from 341.5 to 343.5 nm in the presence of 0.6 M trehalose (Fig. 4). Therefore, trehalose *per se* has an effect on glucose oxidase structure as revealed by the change in its overall spectral absorbance property; this result was in agreement with the observed effects of compatible solutes on protein structure (Coelho-Sampaio et al., 1994; Dashnau et al., 2005). The  $E_a$  for glucose oxidase unfolding was increased from 204 to 221 kJ mol<sup>-1</sup> by including trehalose in the incubation media (Fig. 5). Interestingly, the  $E_a$  for thermal unfolding in the absence of trehalose was 42 kJ mol<sup>-1</sup> lower than that obtained for the thermal inactivation. Overall, our result suggests that in the glucose oxidase thermal inactivation process the protein core is first exposed, probably forming a molten globule-like structure as described by some authors (Zoldák et al., 2004) and then FAD dissociates from active site. Therefore,



**Fig. 5.** Arrhenius plot of the CSM red shift reaction for glucose oxidase. The  $E_a$  was calculated from the line slope obtained by linear regression of the data using Eq. (5).  $k_{CSM}$  (○) in the absence and (□) presence of 0.6 M trehalose. The calculated  $E_a$  for glucose oxidase CSM red shift reaction was 204 and 221 kJ mol<sup>-1</sup> in the absence and presence of 0.6 M trehalose, respectively.

trehalose seems to inhibit major structural motions preventing core exposition and thus FAD release and enzyme inactivation. Nonetheless, the effectiveness of three-dimensional structure stabilization may depend also on some characteristics of proteins, e.g. the hydrophobic/hydrophilic and surface electrostatic character, and the mechanism of interaction with compatible solutes (Pace et al., 2004).

Hampering of protein structural fluctuations by trehalose has been related to enzyme inhibition and prevention of ligand release in domain-motion dependent enzymes (Sampedro and Uribe, 2004; Cordone et al., 2005). For glucose oxidase, it was found that enzyme activity was not inhibited by increasing trehalose concentration in the reaction media (up to 0.8 M) (Fig. 6) as  $V_{max}$  remained nearly constant (Table 3). This result suggests that large domain motions are probably absent during catalysis in glucose oxidase (Haouz et al., 2001). In contrast, it was observed a slight increase in the enzyme affinity for substrate, i.e. the  $K_m$  decreased from  $18.76 \pm 0.63$  to  $13.60 \pm 0.64$  mM in the presence of 0.8 M trehalose. Thus, the effect of trehalose on  $K_m$  resulted in increased catalytic efficiency (Table 3) from 1.81 to 2.22  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1} \text{mM}^{-1}$  in the presence of 0.8 M trehalose. Therefore, trehalose favors the interaction with substrate in the glucose oxidase binding site or stabilizes the enzyme–substrate complex. This proposal is in agreement with the observation that under native conditions



**Fig. 6.** Glucose oxidase kinetics in the presence of different concentration of trehalose. Enzyme kinetics was performed by using a peroxidase coupled assay: glucose oxidase (1.57  $\mu\text{g}$  protein in 20  $\mu\text{l}$ ) was added to 2.5 ml 100 mM phosphate buffer, pH 6.5, *o*-dianisidine (0.1 ml *o*-dianisidine 1% in 12 ml phosphate buffer, pH 6.5), 6.6  $\mu\text{g ml}^{-1}$  peroxidase, oxygen saturated, and increasing concentrations of glucose mutarotated by at least 6 h, trehalose was included at the indicated concentration. The increase in absorbance at 460 nm was followed in spectrophotometer equipped with a thermostated cell. Temperature was maintained at 25 °C. Reaction velocity was calculated from the slope of the line formed. Trehalose concentration (M): (○) 0; (●) 0.1; (□) 0.2; (■) 0.4; (△) 0.6 and (▲) 0.8. The mean of three experiments is showed, SD were less than 5%. Data were fitted to Eq. (4) by nonlinear regression.

trehalose and sucrose induce a compactness of the ribosomal protein S6 (Chen et al., 2006). In contrast to our results other stabilizing solutes tested, such as mono- and divalent salts and proteins, inhibit glucose oxidase activity or promote unfolding when used at high concentrations (Ahmad et al., 2001; Akhtar et al., 2002). These effects are due to the intrinsic property of mono- and divalent cations to bind tightly to the protein surface (Akhtar et al., 2002). Therefore, a proper stabilizing additive would be required in order to avoid both an undesirable effect on both protein structure and function (Jaenicke, 2000). Trehalose seems to fulfill these requirements, thus explaining why this disaccharide was selected by nature to stabilize cellular structures (Jain and Roy, 2008).

Glucose oxidase is mainly intended to be used in solid supports. In this regard, multipoint covalent attachment has been proved to be the most effective immobilization method for stabilizing glucose oxidase (Betancor et al., 2006; Rauf et al., 2006). This system acts by preventing subunit dissociation and decreasing inactivation by intrasubunit crosslinking (Iyer and Ananthanarayan, 2008). However, it has been found that glucose oxidase may be largely affected upon linking, i.e. a loss of up to 50% activity or a negative effect on the kinetics parameters ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) may be observed after the entrapment procedure (Betancor et al., 2006; Rauf et al., 2006). In this regard, it would be interesting to test the use of trehalose in combination with some of the most successful entrapment methods, e.g. the synthesis of trehalose-based polymers, where the trehalose molecules are covalently linked to the matrix to provide to the entrapped enzyme the stability required for its use under harsh conditions and/or during long term storage (Teramoto et al., 2008).

Glucose oxidase has an enormous commercial importance, applications are found in textile industry as fiber bleaching, in food industry as a preservative, in fermentation industry in the production of gluconic acid, in medical diagnostics as analytical tool in glucose detection kits, and in environmental monitoring (Bourdillon et al., 1988; Tzanov et al., 2002; Moschou et al., 2007; Wong et al., 2008). Irreversible thermal inactivation of glucose oxidase seems to occur by a loosening of the protein core preceding FAD release. Trehalose increased the thermal stability of glucose oxidase by decreasing both the rate constant for inactivation and unfolding; as monitored by CSM red shift. Trehalose seems to be an appropriate stabilizing additive for glucose oxidase as no undesirable effects were observed on either protein structure or function, indeed trehalose increased enzyme affinity for substrate and thus catalytic efficiency. Further, the protective ability of trehalose against oxidative damage mediated by hydrogen peroxide (Benaroudj et al., 2001) would be an additional reason to opt for trehalose as a potential stabilizer for glucose oxidase. Although, the use of trehalose has been limited primarily to the laboratory handling and/or purification of labile enzymes (Sampedro et al., 2007), the stabilization of glucose oxidase by trehalose in its multiple applications seems to be promising.

## Acknowledgements

Dr. Antonio Peña (Instituto de Fisiología Celular, UNAM Mexico) gently provided us with equipment and reagents to perform some experiments. This work was partially supported by a grant from CONACYT SEP-2004-C01-46537.

## References

- Ahmad, A., Akhtar, M.S., Bhakuni, V., 2001. Monovalent cation-induced conformational change in glucose oxidase leading to stabilization of the enzyme. *Biochemistry* 40, 1945–1955.
- Akhtar, M.S., Ahmad, A., Bhakuni, V., 2002. Divalent cation induced changes in structural properties of the dimeric enzyme glucose oxidase: dual effect of dimer stabilization and dissociation with loss of cooperative interactions in enzyme monomer. *Biochemistry* 41, 7142–7149.
- Auton, M., Bolen, D.W., Rösgen, J., 2008. Structural thermodynamics of protein preferential solvation: osmolyte solvation of proteins, aminoacids, and peptides. *Proteins* 73, 802–813.
- Benaroudj, N., Lee, D.H., Goldberg, A.L., 2001. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* 276, 24261–24267.
- Betancor, L., López-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Dellamora-Ortiz, G., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R., 2006. Preparation of a very stable immobilized biocatalyst of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J. Biotech.* 121, 284–289.
- Bourdillon, C., Lortie, R., Laval, J.M., 1988. Gluconic acid production by an immobilized glucose oxidase reactor with electrochemical regeneration of an artificial electron acceptor. *Biotechnol. Bioeng.* 31, 553–558.
- Chen, L.Y., Ferreira, J.A.B., Costa, S.M.B., Cabrita, G.J.M., Otzen, D.E., Melo, E.P., 2006. Compaction of ribosomal protein S6 by sucrose occurs only under native conditions. *Biochemistry* 45, 2189–2199.
- Coelho-Sampaio, T., Ferreira, S.T., Castro, E.J., Viera, A., 1994. Betaine counteracts urea-induced conformational changes and uncoupling of the human erythrocyte  $Ca^{2+}$  pump. *Eur. J. Biochem.* 221, 1103–1110.
- Cordone, L., Cottone, G., Giuffrida, S., Palazzo, G., Venturoli, G., Viappiani, C., 2005. Internal dynamics and protein–matrix coupling in trehalose-coated proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1749, 252–281.
- Dashnau, J.L., Zelent, B., Vanderkooi, J.M., 2005. Tryptophan interactions with glycerol/water and trehalose/sucrose cryosolvents: infrared and fluorescence spectroscopy and ab initio calculations. *Biophys. Chem.* 114, 71–83.
- Dumoulin, M., Ueno, H., Hayashi, R., Balny, C., 1999. Contribution of the carbohydrate moiety to conformational stability of the carboxypeptidase Y. High pressure study. *Eur. J. Biochem.* 262, 475–483.
- Frederick, K.R., Tung, J., Emerick, M.S., Masiarz, F.R., Chamberlain, S.H., Vasavada, A., Rosenberg, S., 1990. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequencing, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. *J. Biol. Chem.* 265, 3793–3802.
- Gouda, M.D., Singh, S.A., Rao, A.G.A., Thakur, M.S., Karanth, N.G., 2003. Thermal inactivation of glucose oxidase mechanism and stabilization using additives. *J. Biol. Chem.* 278, 24324–24333.
- Gulla, K.C., Gouda, M.D., Thakur, M.S., Karanth, N.G., 2004. Enhancement of stability of immobilized glucose oxidase by modification of free thiols generated by reducing disulfide bonds and using additives. *Biosens. Bioelectron.* 19, 621–625.
- Haouz, A., Glandières, J.M., Alpert, B., 2001. Involvement of protein dynamics in enzyme stability the case of glucose oxidase. *FEBS Lett.* 506, 216–220.
- Henley, J.P., Sadana, A., 1986. Deactivation theory. *Biotechnol. Bioeng.* 73, 1277–1285.
- Hottiger, T., De Virgilio, C., Hall, M.N., Boller, T., Wiemken, A., 1994. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vitro. *Eur. J. Biochem.* 219, 187–193.
- Iyer, P.V., Ananthanarayan, L., 2008. Enzyme stability and stabilization—aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochem.* 43, 1019–1032.
- Jaenicke, R., 2000. Stability and stabilization of globular proteins in solution. *J. Biotechnol.* 79, 193–203.
- Jain, N.K., Roy, I., 2008. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci.* 18, 24–36.
- Johnson, J.L., London, R.E., Rajagopalan, K.V., 1989. Covalently bound phosphate residues in bovine milk xanthine oxidase and in glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6493–6497.
- Kalish, H.M., Hech, H.J., Schomburg, D., Schmid, R.D., 1991. Effect of carbohydrate depletion on the structure, stability and activity of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta* 1080, 138–142.
- Lowry, O.H., Nira, J.N., Rosebrough, J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Moschou, E.A., Sharma, B.V., Deo, S.K., Daunert, S., 2007. Fluorescence glucose detection: advances toward the ideal in vivo biosensor. *J. Fluoresc.* 14, 537–547.
- Nakamura, S., Koga, K., 1976. Alteration of thermal stability of glucose oxidase associated with the redox states. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 78, 806–810.
- Pace, C.N., Treviño, S., Prabhakaran, E., Scholtz, J.M., 2004. Protein structure, stability and solubility in water and other solvents. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 359, 1225–1235.
- Pradeep, L., Udgaonkar, J.B., 2007. Diffusional barrier in the unfolding of a small protein. *J. Mol. Biol.* 366, 1016–1028.
- Rao, V.B., Sastri, N.V.S., Rao, P.V.S., 1981. Thermal stabilization of glucose oxidase and glucoamylase by physical entrapment. *Biochem. J.* 193, 389–394.
- Rauf, S., Ihsan, A., Akhtar, K., Ghauri, M.A., Rahman, M., Anwar, M.A., Khalid, A.M., 2006. Glucose oxidase immobilization on a novel cellulose acetate-polymethylmethacrylate membrane. *J. Biotechnol.* 121, 351–360.
- Ruan, K., Tian, S., Lange, R., Balny, C., 2000. Pressure effects on tryptophan and its derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 269, 681–686.
- Rubio-Retama, J., Sánchez-Paniagua López, M., Hervás Pérez, J.P., Frutos Cabanillas, G., López-Cabarcos, E., López-Ruiz, B., 2005. Biosensors based on acrylic microgels: a comparative study of immobilized glucose oxidase and tyrosinase. *Biosens. Bioelectron.* 20, 2268–2275.
- Sampedro, J.G., Cortés, P., Muñoz-Clares, R.A., Fernández, A., Uribe, S., 2001. Thermal inactivation of the plasma membrane  $H^+$ -ATPase from *Kluyveromyces lactis*. Protection by trehalose. *Biochim. Biophys. Acta* 1544, 64–73.
- Sampedro, J.G., Ruiz-Granados, Y.G., Nájera, H., Téllez-Valencia, A., Uribe, S., 2007. Fluorescence quenching by nucleotides of the plasma membrane  $H^+$ -ATPase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemistry* 46, 5616–5622.



- Sampedro, J.G., Uribe, S., 2004. Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. *Mol. Cell. Biochem.* 256/257, 319–327.
- Seymour, S.L., Klinman, J.P., 2002. Comparison of rates and kinetic isotope effects using PEGmodified variants and glycoforms of glucose oxidase: the relationship of modification of the protein envelope to C-H activation and tunneling. *Biochemistry* 41, 8747–8758.
- Shimizu, S., Smith, D.J., 2004. Preferential hydration and the exclusion of cosolvents from protein surfaces. *J. Chem. Phys.* 121, 1148–1154.
- Singer, M.A., Lindquist, S., 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the yin and yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* 16, 460–468.
- Swodoba, B.E.P., Macey, V., 1965. Purification and properties of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem.* 240, 2209–2215.
- Teramoto, N., Sachinvala, N.D., Shibata, N., 2008. Trehalose and trehalose-based polymers for environmentally benign, biocompatible and bioactive materials. *Molecules* 13, 1773–1816.
- Tzanov, T., Costa, S.A., Gübitz, G.M., Cavaco-Paulo, A., 2002. Hydrogen peroxide generation with immobilized glucose oxidase for textile bleaching. *J. Biotechnol.* 93, 87–94.
- Wang, S., Yoshimoto, M., Fukunaga, K., Nakao, K., 2003. Optimal covalent immobilization of glucose oxidase-containing liposomes for highly stable biocatalyst bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 84, 444–453.
- Wong, C.M., Wong, K.H., Chen, X.D., 2008. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 927–938.
- Zoldák, G., Zubrik, A., Musatov, A., Stupák, M., Sedlák, E., 2004. Irreversible thermal denaturation of glucose oxidase from *Aspergillus niger* is the transition to the denatured state with residual structure. *J. Biol. Chem.* 279, 47601–47609.
- Zhu, Z., Momeu, C., Zakhartsev, M., Schwaneberg, U., 2006. Making glucose oxidase fit for biofuel cell applications by directed protein evolution. *Biosens. Bioelectron.* 21, 2046–2051.



## INACTIVACIÓN TÉRMICA DE LA GLUCOSA OXIDASA DE *Aspergillus niger*

Paz-Alfaro K.J., Ruiz-Granados Y.G., Nájera-Peña H. y Sampedro J.G.

Área Académica de Nutrición. Instituto de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Abasolo 600, col. Centro. CP 4200. Pachuca, Hidalgo. México. Tel. 01(771)7172000 ext. 5114. CE: [jg.sampedro@gmail.com](mailto:jg.sampedro@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

La muerte celular por estrés se sabe está relacionada a la desnaturalización proteica. Algunos organismos han desarrollado una serie de mecanismos que le permiten vivir en estas condiciones adversas (1). La respuesta general al estrés incluye la síntesis de algunas enzimas antioxidantes, proteínas de choque térmico (hsp) y la acumulación de solutos compatibles (2).

Los solutos compatibles son pequeñas moléculas que se acumulan en el citoplasma en diferentes condiciones de estrés. La trehalosa, glicina betaína, manosil glicerato y el glicerol se acumulan en organismos tan variados como, las bacterias, levaduras, plantas y crustáceos (1). En este sentido se ha demostrado que la trehalosa es capaz de estabilizar a las proteínas contra el daño ocasionado por temperatura, deshidratación, presión y radicales libres (3). La estabilización de enzimas por trehalosa resulta en una disminución en la constante de velocidad de la inactivación y en la  $k_{cat}$  (4,5). Por lo que se observa una dependencia directa de estas constantes de velocidad con la viscosidad del medio (5). Por lo anterior se propuso que toda reacción en proteínas que contenga un componente difusivo sería inhibida por un aumento en la viscosidad del medio de acuerdo a la teoría de Kramers (5).

La enzima glucosa oxidasa (GOD) de *Aspergillus niger* es un homodimero con un peso molecular de 160 kDa y se encuentra altamente glicosilada (16% peso/peso) (6). La GOD contiene dos grupo prostéticos de FAD, los cuales están fuertemente pero no covalentemente unidos. El FAD participa en la reacción de oxidación-reducción (glucosa +  $O_2 \rightarrow \delta$ -gluconolactona) que lleva a cabo la enzima. La glucosa oxidasa es una enzima que presenta una alta resistencia a la desnaturalización; se sabe que la

inactivación térmica se debe principalmente la liberación del FAD (7). El objetivo del trabajo es estudiar el efecto de la trehalosa en la inactivación térmica de la GOD.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Reactivos:** los reactivos utilizados para los diferentes experimentos incluyendo la GOD, fueron adquiridos de Sigma Chemical Co.

**Purificación de la glucosa oxidasa.** La GOD (Sigma Chemical Co.) fue purificada por cromatografía en columna (Sephacryl 200HR). La GOD se cargó en la columna y se eluyó con EGTA 1 mM en amortiguador de fosfatos 20 mM (pH 7.0) a una velocidad de flujo de 10ml/hr. Se colectaron fracciones de 1 ml y se midió la absorbencia a 280 nm. Posteriormente, se determinó la concentración de proteína (método de Lowry, con BSA como estándar) en las fracciones del pico máximo. La pureza de las fracciones se evaluó por SDS-PAGE. Para los experimentos de inactivación térmica se empleó la fracción más pura.

**Efecto de la presencia de trehalosa en la cinética de la GOD.** La cinética de saturación de la GOD fue determinada colorimetricamente empleando un sistema acoplado peroxidasa/*o*-dianisidina a 30°C: 3 ml vol. final conteniendo *o*-dianisidina (0.1 ml de *o*-dianisidina al 1% en 12 ml de amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M pH 6.5; saturado con oxígeno,) peroxidasa (6.6 µg/ml) y diferentes concentraciones de glucosa. La mezcla de reacción se preincubó por 10 min a 30° C, posteriormente la reacción se inició agregando 20µl de GOD (1.57 µg de prot.). El aumento de la absorbencia a 460 nm se siguió por 4 min y de la pendiente de la línea formada se calculó la velocidad de catálisis. El efecto de la trehalosa sobre la actividad de la GOD se determinó incluyendo diferentes concentraciones de trehalosa (M: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8) en la mezcla de reacción.

**Inactivación térmica de la GOD.** La inactivación térmica en presencia y ausencia de trehalosa se obtuvo a diferentes temperaturas (50,55,60,65,70 y75°C). La incubación de la GOD (43 µg de prot.) se realizó en amortiguador de fosfatos 20mM (pH 6.0) en ausencia y presencia de 0.6 M de trehalosa. La actividad residual de la GOD se determinó tomando alícuotas de 5µl a diferentes intervalos de tiempo durante 40 minutos.

**Efecto de la trehalosa en los cambios de centro de masa espectral de la GOD durante la Inactivación térmica.** Los espectros de fluorescencia se obtienen en un espectrofluorómetro en una celda de 10 mm de paso de luz con control de temperatura. A diferentes temperaturas (45, 50, 55, 60, 62.5, 65, 70 y 75), el espectro de fluorescencia (300-400 nm) de la GOD (43 µg prot.) suspendida en Pipes 10mM (pH 7.0), se obtuvo excitando la proteína a 285 nm en presencia y ausencia de trehalosa (0.6M). El espectro de fluorescencia de la GOD se obtuvo cada minuto durante 30 min. El cambio de centro de masa espectral (*CME*) se obtuvo de acuerdo a la siguiente ecuación:  $CME = \sum \lambda_i \times F_i / \sum F_{i\lambda}$ .

## **OBJETIVO**

Estudiar el efecto de la trehalosa en la cinética de inactivación térmica de la glucosa oxidasa.

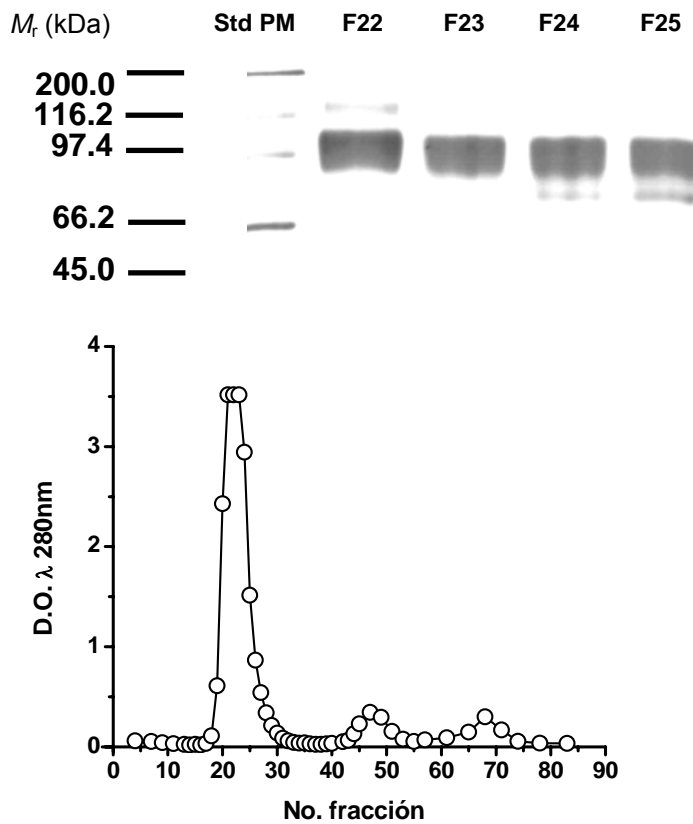
## **RESULTADOS Y CONCLUSIONES**

En el perfil de elución en la columna de sephacryl 200HR se encontró un pico de absorbencia a 280 nm entre las fracciones 19 a 30 (Fig. 1). Para estas fracciones se determinó la concentración de proteína y la pureza en un gel de SDS-PAGE. En este gel la fracción 23 fue la que presentó una mayor pureza (Fig1). El resto de las fracciones presentaron una pequeña banda inferior que corresponde probablemente a la enzima no glicosilada. Se sabe que la enzima glicosilada presenta una mayor resistencia a la desnaturalización debido precisamente a la presencia de los residuos de carbohidratos como se ha reportado (7). Por lo tanto se escogió la fracción 23 para llevar a cabo los experimentos de desnaturalización térmica.

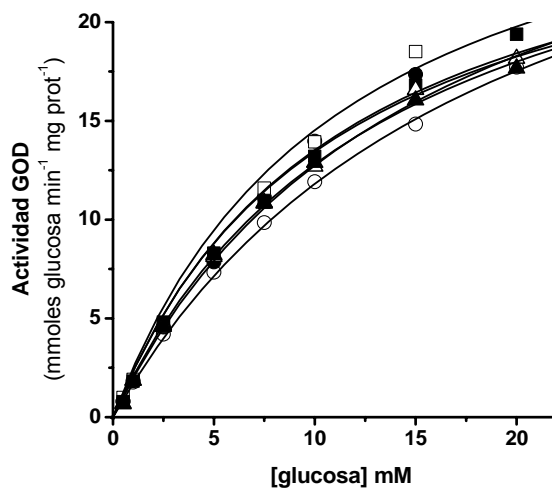
La GOD presentó una cinética de saturación hiperbólica a 25°C. Los datos de velocidad obtenidos se ajustaron por regresión no-lineal a la ecuación de Michaelis-Menten; los parámetros cinéticos calculados ( $K_m = 18.76$  mM y  $V_{max} = 33.97$  mmoles glucosa  $\text{min}^{-1}$  mg prot<sup>-1</sup>) fueron similares a los reportados en la literatura (6). La presencia de concentraciones crecientes de trehalosa aumentó la afinidad de la enzima por el sustrato; la  $K_m$  disminuyó hasta valores de 11.34 mM de glucosa (Fig. 1 y Tabla 1). Lo cual sugiere un efecto de la trehalosa sobre la estructura del sitio activo. En contraste, la falta de efecto sobre la  $V_{max}$  indica que los cambios conformacionales de la GOD durante el ciclo catalítico



son de baja magnitud. Ya que se ha demostrado que en enzimas con movimientos de dominios de gran magnitud son inhibidas por la viscosidad generada por la trehalosa (5).



**Figura 1.** Perfil de elución de la GOD y SDS-PAGE de las fracciones.



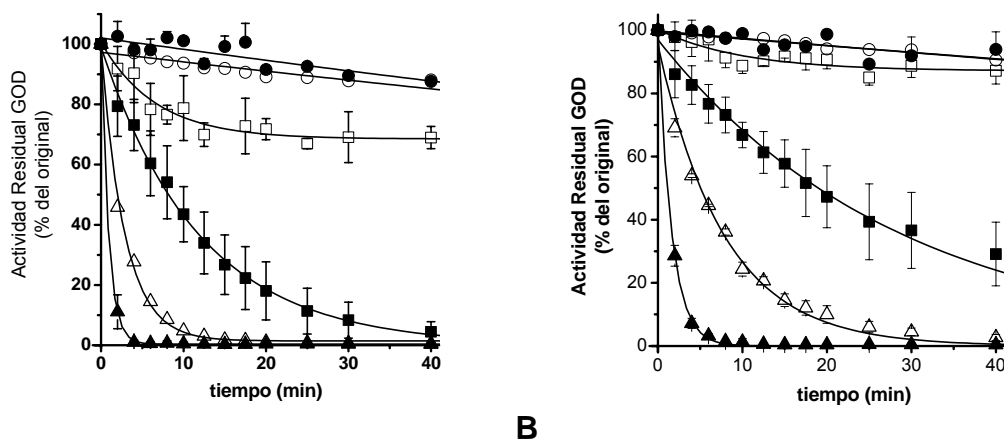
**Figura 3.** Cinética de la GOD en ausencia y presencia de trehalosa.

Concentración de trehalosa (M):  
 ○ 0, ● 0.1, □ 0.2, ■ 0.4, △ 0.6 y  
 ▲ 0.8.

**Tabla 1.** Efecto de la presencia trehalosa sobre los parámetros cinéticos de la GOD a 25°C

Trehalosa (M)	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (mmoles $\text{min}^{-1}$ $\text{mg prot}^{-1}$ )
0.0	18.76	33.97
0.1	11.34	28.87
0.2	11.34	31.00
0.4	11.12	28.40
0.6	15.42	32.39
0.8	13.60	30.24

La cinética de inactivación térmica de la GOD fue monofásica (Fig. 4A). Las constantes de velocidad de inactivación ( $k_i$ ) se obtuvieron ajustando los datos a la siguiente ecuación  $A_R = A \cdot e^{-k_i t}$  por regresión no-lineal (Fig. 4A y tabla 2). A partir de 60°C, la GOD presentó una rápida inactivación. En este sentido, se sabe que la termoinactivación de la GOD se debe a la disociación del FAD del sitio activo (7). La presencia de trehalosa (0.6 M) disminuyó a la mitad el valor de la  $k_i$  a todas las temperaturas probadas (Fig 4B y tabla 2), por ejemplo a 65°C la  $k_i$  disminuyó de  $8.4 \times 10^{-2}$  a  $3.5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  (tabla 2). Por lo tanto, la trehalosa estabiliza a la GOD evitando la disociación del FAD del sitio activo. El efecto de la trehalosa en la estructura de la GOD se evaluó por fluorescencia intrínseca analizando los cambios en los centros de masa espectral (CME) a diferentes temperaturas.

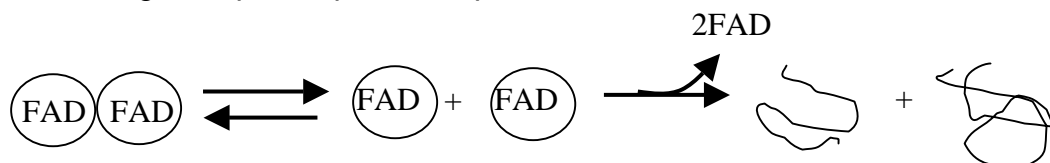


**Figura 4.** Termoinactivación de la GOD en ausencia (A) y presencia de trehalosa (B). Temperatura de incubación (°C): ○ 50, ● 55, □ 60, ■ 65, △ 70 y ▲ 75.

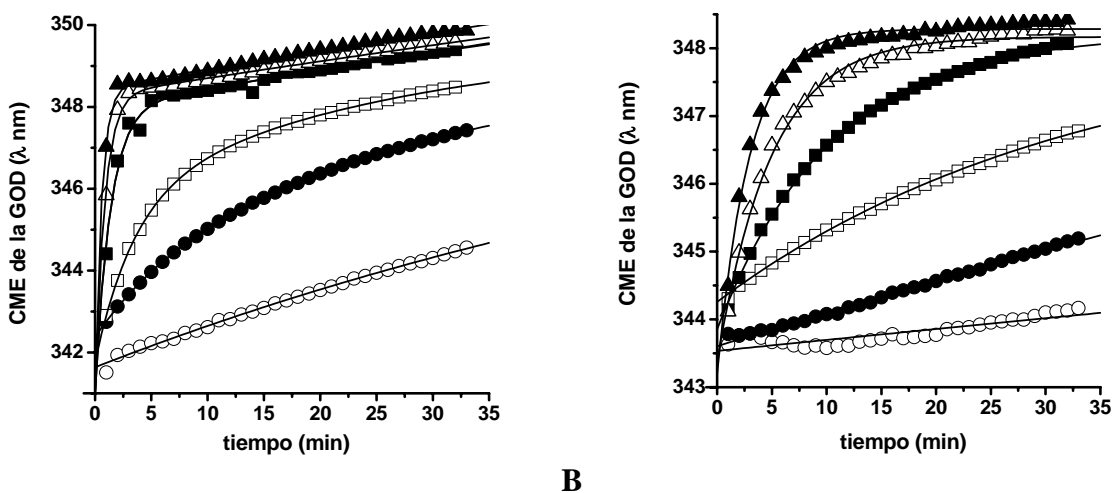
**Tabla 2.** Efecto de la trehalosa sobre la constante de velocidad de inactivación ( $k_i$ ) de la GOD.

Temp (°C)	Trehalosa (0.6M)	
	$k_i \times 10^{-2} \text{min}^{-1}$	$k_i \times 10^{-2} \text{min}^{-1}$
50	0.3	0.2
55	0.4	0.2
60	2.7	0.9
65	8.4	3.5
70	35.0	12.8
75	111.8	62.9

El cambio en el *CME* de la GOD se siguió en ausencia y en presencia de trehalosa (0.6 M). En contraste con el estudio de inactivación térmica, el *CME* presentó un cambio hacia el rojo a partir de 45°C; lo que indica que existe un paso previo a la pérdida del FAD; posiblemente la disociación de los monómeros. El cambio del *CME* por temperatura siguió una cinética bifásica ya que los datos se ajustaron a una ecuación biexponencial ( $CME_t = CME_0 + A_1 \cdot [1 - e^{(-k_1 \cdot t)}] + A_2 \cdot [1 - e^{(-k_2 \cdot t)}]$ ) por regresión no-lineal (Fig. 5A). La cinética bifásica describe dos pasos en el cambio del *CME*, el primer paso (de mayor amplitud) podría deberse a la disociación de los monómeros y el segundo a la disociación del FAD. Sin embargo, en presencia de trehalosa la cinética de cambio del *CME* fue monoexponencial ( $CME_t = CME_0 + A \cdot [1 - e^{(-k \cdot t)}]$ ) (Fig. 5B). La trehalosa disminuye la constante de velocidad de la primera fase e inhibe totalmente el segundo paso; que correspondería a la liberación del FAD.



A 60°C el cambio del *CME* se observa tanto en presencia y como en ausencia de trehalosa (Fig. 5A y 5B). En contraste, a esta misma temperatura la actividad de la GOD es totalmente estable en presencia de trehalosa (Fig. 4B). Los resultados sugieren que la trehalosa inhibe la disociación del FAD por temperatura y disminuye la velocidad de disociación de los monómeros en la GOD.



**Figura 5.** Centro de masa de la GOD en presencia y ausencia de trehalosa. Temperatura de incubación (°C): ○ 45, ● 50, □ 55, ■ 60, △ 62.5 y ▲ 65.

### Apoyos financieros

Este proyecto fue financiado por CONACYT (SEP-2004-c01-46537) y por SEP-PROMEP (UAEHGO-PTC- 192)

### Referencias

1. Gacto M, Soto T, Vicente-Soler J, Villa TG, Cansado J.(2003) Learning from yeasts: intracellular sensing of stress conditions. *Int Microbiol.* (a publicarse en Septiembre).
2. Singer, M.A. y Lindquist, S. (1998) Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* **16**: 460-458.
3. Singer, M.A. y Lindquist, S. (1998) Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* **16**: 460-458.
4. Sampedro, J.G., Munoz-Clares, R.A. y Uribe, S. (2002) Trehalose-mediated inhibition of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from *Kluyveromyces lactis*: dependence on viscosity and temperature. *J. Bacteriol.* **184**: 4384-4391.
5. Uribe, S. y Sampedro, J.G. (2003) Measuring Solution Viscosity and its Effect on Enzyme Activity. *Biol. Proced. Online.* **5**: 108-115.
6. Akhtar, M.S., Ahmad, A. y Bhakuni, V. (2002) Divalent cation induced changes in structural properties of the dimeric enzyme glucose oxidase: Dual effect of dimer stabilization and dissociation with loss of cooperative interactions in enzyme monomer. *Biochemistry.* **41**: 7142-7149.
7. Gouda, M.D., Singh, S.A., Rao, A.G., Thakur, M.S. y Karanth, N.G. (2003) Thermal inactivation of glucose oxidase. Mechanism and stabilization using Additives. *J. Biol. Chem.* **278**: 24324-24333.