

IMPLEMENTAÇÃO EM LINGUAGEM PYTHON DE MÉTODOS DE ESTIMAÇÃO E COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS APLICADO A HIDRÓLISE CATALISADA POR ALDC

A. S. PEREIRA¹, J. B. M. NETO¹, C. M. G. FARIAS¹ e L. R. B. GONÇALVES¹

¹ Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química
E-mail para contato: lrg@ufc.com

RESUMO – A enzima α -acetolactato descarboxilase (ALDC) é amplamente utilizada no processo cervejeiro, aumentando a eficiência da fermentação e convertendo α -acetolactato diretamente em acetoína, reduzindo assim a formação de diacetil que é um produto indesejável por alterar algumas características organolépticas. O estudo laboratorial permite a determinação dos parâmetros cinéticos através do método diferencial que leva em consideração a velocidade inicial da formação do complexo enzima-substrato, onde a concentração desse substrato irá influenciar na velocidade máxima da reação de catálise ($V_{m\acute{a}x}$) e na constante de Michaelis-Menten (K_m). Este trabalho tem como objetivo desenvolver um programa em ambiente de programação IPython Notebook, para obtenção e comparação dos parâmetros cinéticos da reação. Para demonstração, estes parâmetros foram estimados para ALDC, através das equações proposta por: Lineweaver-Burk, Eisenthal e Cornish-Bowden e Michaelis-Menten.

1. INTRODUÇÃO

O estudo da cinética enzimática permite compreender as reações químicas catalisadas por enzimas, assim como o mecanismo catalítico, o metabolismo enzimático e seus tipos de inibições. Algumas das finalidades são medir as velocidades das transformações, estudar a influência nas condições de trabalho, otimizar processos e projetar reatores adequados para cada reação. Para isso, faz-se necessário a determinação dos parâmetros enzimáticos: velocidade máxima da reação ($V_{m\acute{a}x}$) e da constante de Michaelis-Menten (K_m).

Existem vários métodos de estimar esses parâmetros, variando-se a concentração de substrato [S] nas reações enzimáticas. Neste trabalho, desenvolveu-se um programa implementado em linguagem científica Python e seus módulos, que utiliza o modelo de Michaelis-Menten e os métodos de linearização proposta por Lineweaver-Burke e por Eisenthal e Cornish-Bowden para estimar os valores de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m .

Em caráter demonstrativo do programa desenvolvido, escolheu-se estudar a cinética da enzima α -acetolactato descarboxilase (ALDC) muito importante para indústria cervejeira por diminuir o tempo de maturação e assim aumentar a produtividade industrial. A ALDC gera uma conversão direta de α -acetolactato em acetoína, que provoca uma redução no tempo de

reação, evitando a necessidade de maturação secundária de diacetil para acetoína. A formação do diacetil pela descarboxilação oxidativa do α -acetolactato, processo lento e não-enzimático, confere a bebida sabor amanteigado que afeta a qualidade do produto.

2. METODOLOGIA

2.1. Materiais

Substrato: etil-2-acetoxi-2-metilacetolactato.

Enzima: α -acetolactato descarboxilase (solução com concentração de proteína de 2,677 mg/ml a 30°C e pH de 6,0).

2.2. Métodos

Procedimento experimental: Utilizou-se o método diferencial, que leva em consideração a velocidade inicial da reação (V_0) e permite desprezar a reação inversa, caso seja reação reversível. Para determinar a atividade da enzima ALDC, empregou-se o procedimento modificado estabelecido por Stormer (1975). Adicionou-se a uma amostra de 5 μ L de enzima, em 95 μ L de tampão MES 50 mM, 200 μ L de solução de substrato. Repetiu-se esse procedimento para diferentes concentrações de substrato, medindo-se a atividade enzimática após 40 min de reação. Uma unidade (U) de ALDC foi definida como sendo a quantidade de enzima para liberar 1 μ mol de acetoína/min (V_0) nas condições analisadas.

Método numérico: As equações dos modelos matemáticos foram resolvidas numericamente através de programa implementado em linguagem Python/IPython Notebook associada a alguns de seus módulos científicos e os gráficos gerados são apresentados nesse trabalho. Observou-se que os dados experimentais se ajustam muito bem ao modelo proposto por Michaelis-Menten, certificando o trabalho de Dulieu *et al.* (2000).

3. MODELOS MATEMÁTICOS

3.1. Cinética de Michaelis-Menten

Michaelis e Menten (1913) propuseram que a formação do complexo enzima-substrato é reversível e que o reaparecimento da enzima livre e a formação do produto, segunda etapa, é irreversível e o passo mais lento neste modelo. A Equação 1 relaciona quantitativamente a constante de Michaelis-Menten (K_m), a velocidade inicial (V_0), a velocidade inicial máxima ($V_{m\acute{a}x}$) e a concentração inicial de substrato [S] descrita por estes pesquisadores.

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

De forma simples, o valor de K_m é interpretado como a afinidade enzima-substrato, e quanto menor seu valor maior a afinidade entre o complexo. É importante lembrar que a $V_{m\acute{a}x}$ não é constante, depende da concentração da enzima utilizada nos experimentos.

3.2. Linearização por Lineweaver-Burk

A Equação 2 proposta por Lineweaver e Burk (1934), também conhecida como duplo recíprocos, é obtida pela inversão da Equação 1 de Michaelis-Menten. O gráfico de $1/V_0$ versus $1/[S]$ será representado por uma reta, onde: o coeficiente angular é igual a $K_m/V_{m\acute{a}x}$ e o coeficiente linear é igual a $1/V_{m\acute{a}x}$.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (2)$$

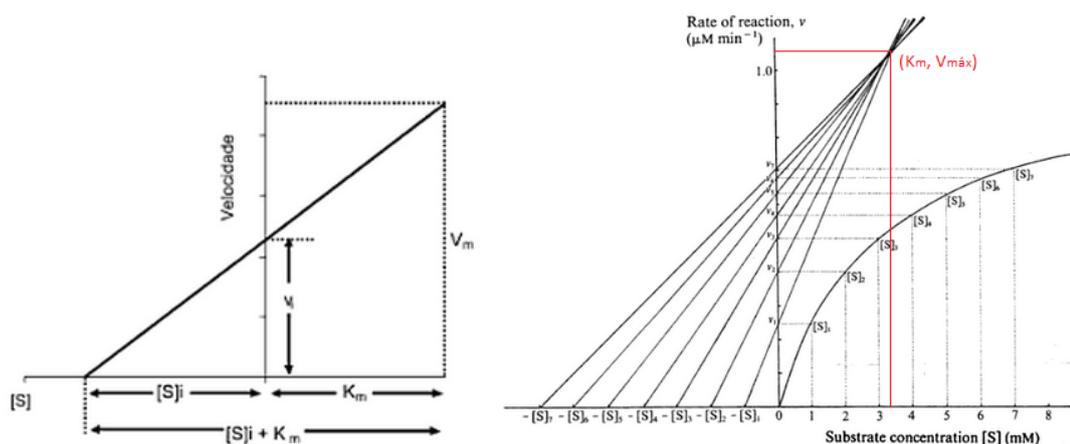
Este método de linearização é muito utilizado para testar qualitativamente o mecanismo da reação proposta, mas não é adequado para se estimar os parâmetros cinéticos por intensificar o erro experimental da concentração do substrato e da velocidade inicial da reação, por ser necessário aplicar o inverso dos valores no modelo.

3.3. Linearização por Eisenthal e Cornish-Bowden

No método proposto por Cornish-Bowden e Eisenthal (1974), a equação de Michaelis-Menten é expressa em forma de proporção, Equação 3. Como pode ser observado na Figura 1, para qualquer triângulo retângulo de catetos V_i e $[S]_i$, terá um triângulo semelhante de catetos $V_{m\acute{a}x}$ e $[S]_i + K_m$, respectivamente. Isso significa que todas as retas que forem traçadas passando por V_i e $[S]_i$ e que obedecerem o modelo de Michaelis-Menten, se cruzaram em um único ponto de coordenadas $V_{m\acute{a}x}$ e K_m , como afirma Pinto e Menezes (2009).

$$\frac{V_0}{[S]} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{K_m + [S]} \quad (3)$$

Figura 1 – Gráfico de Eisenthal e Cornish-Bowden. Fonte: Chaplin e Bucke (1990).



As equações a seguir mostram a forma matemática desenvolvida neste trabalho para simular a linearização por Eisenthal e Cornish-Bowden, método gráfico. Dessa forma, pode-se determinar o coeficiente angular para cada reta e substituir o ponto $(0, V_i)$, obtendo-se assim todas as retas e conseqüentemente os parâmetros cinéticos.

$$m = \frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{V_i - 0}{0 - (-[S]_i)} = \frac{V_i}{[S]_i} \quad (4)$$

$$y = \frac{V_i}{[S]_i} \cdot x + V_i \quad (5)$$

A existência de erros experimentais introduzidos na determinação de V_i e $[S]_i$ fazem com que as retas não se cruzem em um único ponto. A melhor estimativa para os parâmetros cinéticos é através de um tratamento estatístico, onde se utiliza a mediana dos pontos de intersecção, sendo o mais preciso dos métodos apresentados neste trabalho por não ser influenciado pelos pontos anômalos. Isso não acontece para modelos que utilizam o método dos mínimos quadrados para obtenção dos parâmetros cinéticos, mostrado por Cornish-Bowden e Endrenyi (1981).

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

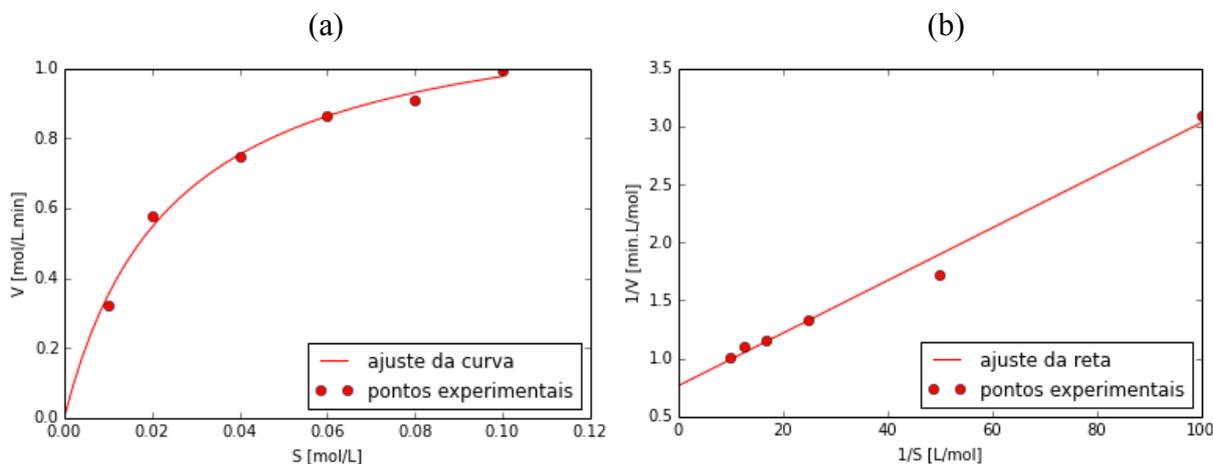
A tabela 1 mostra a relação entre as variações das concentrações de substrato e as velocidades iniciais obtidas. As simulações apresentadas neste trabalho foram realizadas na ferramenta computacional livre Python e seus módulos, onde a implementação dos modelos foram validados de forma indireta pelo software gráfico, para análise de dados, Origin.

Tabela 1– Dados experimentais.

[S] (mol/L)	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1
V_0 (mol/L)	0,323	0,579	0,748	0,862	0,91	0,991

A Figura 2 traz o ajuste dos modelos de Michaelis-Menten e de Lineweaver-Burk utilizando o método dos mínimos quadrados. Como apresentado ao longo deste trabalho, ambos levam em consideração os erros experimentais anômalos, que acabam prejudicando o ajuste dos parâmetros cinéticos.

Figura 2 – Ajuste por mínimos quadrados: (a) Michaelis-Menten e (b) Lineweaver-Burk.



Na Figura 3 foi utilizado o modelo de Cornish-Bowden e Eisenthal, e observa-se a existência de pontos experimentais com erros aleatórios. Como este método permite um tratamento estatístico, faz-se necessário todos os valores das intersecções das retas. Esses

valores foram obtidos de forma analítica, utilizando o Python, e ordenados de forma crescente na Tabela 2, utilizando a Equação 6 para determinar todas as combinações sem repetições possíveis, onde: n = números de pontos experimentais e p = números de parâmetros. Pinto e Menezes (2009).

$$N = \frac{n!}{p!(n-p)!} = \frac{6!}{2!(6-2)!} = 15 \text{ interseções possíveis}$$

(6)

Figura 3 – (a) Linearização de Cornish-Bowden e Eisenthal; (b) Ampliação do gráfico.

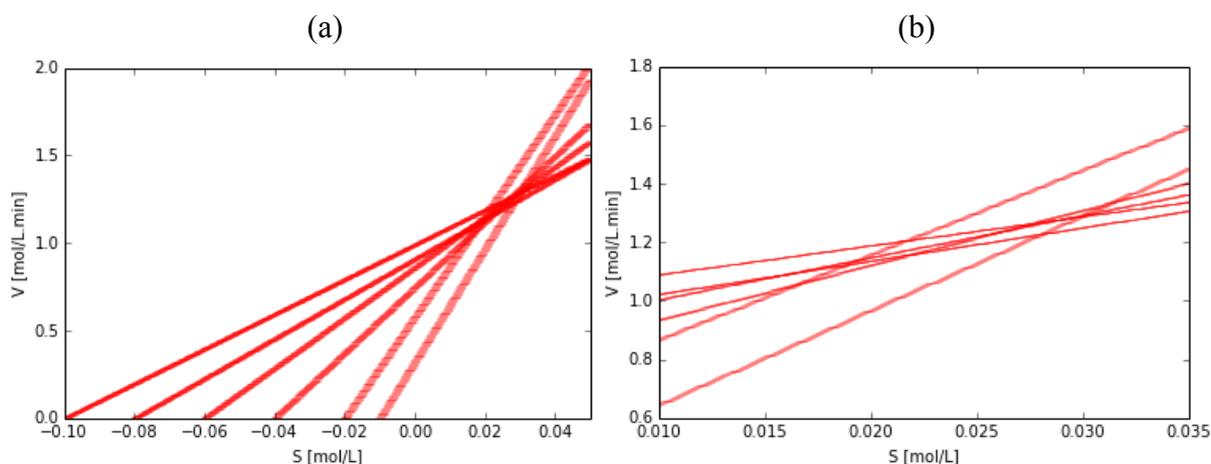


Tabela 2 – Valores crescentes das interseções das retas de Cornish-Bowden e Eisenthal.

V_0	11.560	11.784	11.842	12.066	12.107	12.522	12.522	12.663
(mol/L)	12.696	12.820	12.878	12.895	13.027	15.518	17.519	
[S]	0.0199	0.0207	0.0209	0.0216	0.0247	0.0269	0.0271	0.0276
(mol/L)	0.0292	0.0293	0.0299	0.0299	0.0303	0.0442	0.0565	

A mediana dos pontos de interseção são $V_0 = 1,2663$ mol/L.min e $[S] = 0,0276$ mol/L, que representa o valor da velocidade inicial máxima da reação e constante de Michaelis-Menten, respectivamente. Dessa forma, o modelo de Cornish-Bowden e Eisenthal é o mais preciso por não levar em consideração os dados experimentais anômalos.

Percebe-se pela Tabela 3 e Figura 4, que os desvios de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk são muito pequenos para o ajuste dos parâmetros cinéticos da ALDC, mostrando que qualquer dos três modelos poderia ser utilizados sem grandes erros.

Figura 4 – Comparação dos modelos.

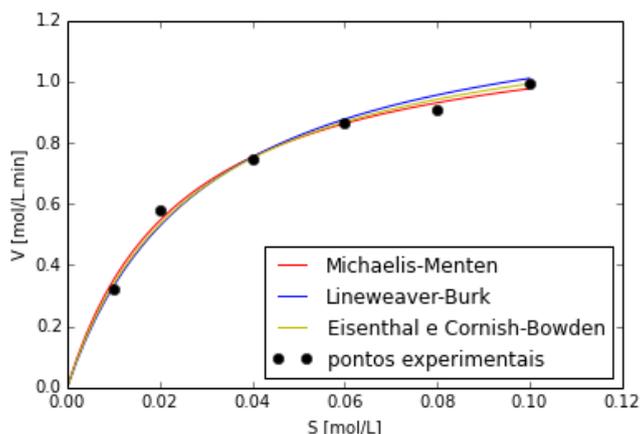


Tabela 3 – Resumo dos parâmetros cinéticos para cada modelo apresentado.

	Michaelis-Menten	Lineweaver-Burk	Eisenthal e Cornish-Bowden
$V_{\text{máx}}$ (mol/L.min)	12.171	13.098	12.663
K_m (mol/L)	0.0247	0.0296	0.0276

5. CONCLUSÃO

A cinética enzimática é essencial pra compreender o mecanismo catalítico, o metabolismo enzimático e seus tipos de inibições. Com isso, percebe-se a importância de determinar os parâmetros cinéticos, $V_{\text{máx}}$ e K_m .

Neste trabalho, implementou-se três modelos de estimação desses parâmetros utilizando o Python/IPython Notebook associada a alguns de seus módulos científicos. O código desenvolvido estima os parâmetros cinético, simula comportamento, apresenta gráficos e compara modelos de forma muito simples para o usuário.

6. REFERÊNCIAS

- CORNISH-BOWDEN, A.; ENDRENYI, L.; Fitting of enzyme Kinect data without prior knowledge of weights. *Biochem. J.*, v. 193, p. 1005-1008, 1981.
- CHAPLIN, M. F.; BUCKE, C. *Enzyme Tecnology*. Cambridge: Cambridge University, 1990.
- DULIEU, C.; MOLL, M.; BOUDRANT, J.; PONCELET, D.; Improved Performances and Control of Beer Fermentation Using Encapsulated α -Acetolactato Descarboxylase and Modeling. *Biotechnol. Prog.* 2000.
- EISENTHAL, R.; CORNISH-BOWDEN, A.; The direct linear plot. *Biochem. J.*, v. 139, p. 715-20, 1974.
- LINEWEAVER, H.; BURK, D.; The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc*, v. 56, p. 658-666, 1934.

MICHAELIS, L.; MENTEN, M.L.; The kinetics of invertin action. *Biochem. Z.* v. 49, p. 333-69, 1913.

PINTO, G. F.; MENEZES, R. R. Cinética enzimática. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2009.

STORMER, F. C. *Methods in Enzymology*, XLI, p. 526-529, 1975.