



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

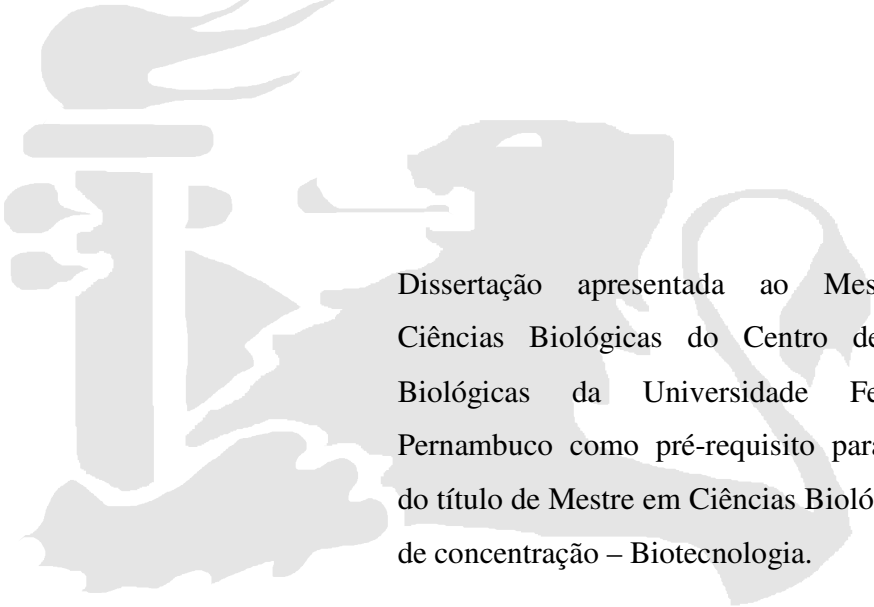
DAVID FERNANDO MORAIS NERI

**IMOBILIZAÇÃO DE XANTINA OXIDASE EM POLISSILOXANO-ÁLCOOL
POLIVINÍLICO MAGNETIZADO**

RECIFE, 2005.

DAVID FERNANDO MORAIS NERI

**IMOBILIZAÇÃO DE XANTINA OXIDASE EM POLISSILOXANO-ÁLCOOL
POLIVINÍLICO MAGNETIZADO**



Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração – Biotecnologia.

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Co-orientador:

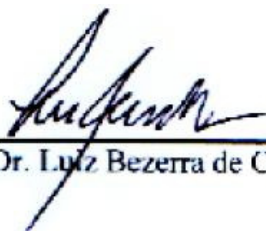
Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

RECIFE, 2005.

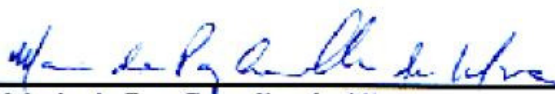
**IMOBILIZAÇÃO DE XANTINA OXIDASE EM POLISSILOXANO-ÁLCOOL
POLIVINÍLICO MAGNETIZADO**

DAVID FERNANDO MORAIS NERI

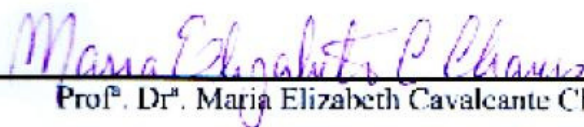
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior (Orientador)



Profª. Drª. Maria da Paz Carvalho da Silva



Profª. Drª. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves

Neri, David Fernando Moraes

Imobilização de xantina oxidase em polissiloxano-álcool polivinílico magnetizado / David Fernando Moraes Neri. – Recife : O Autor, 2005.

xviii, 50 folhas : il., tab., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2005.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Ciências biológicas – Biotecnologia. 2. Enzimas – Xantina oxidase – Polissiloxano-álcool polivinílico magnetizado. 3. Imobilização – Tetraetilortosilicato – Atividade enzimática – Ativação com glutaraldeído. I. Título.

**577.15
572.791**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
BC2005-588**

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMO	vii
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 IMOBILIZAÇÃO	01
1.1.1 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	02
1.2 SUPORTE	08
1.2.1 POLISSILOXANO-ÁLCOOL POLIVINÍLICO (POS-PVA)	09
1.3 ENZIMA	13
1.3.1 XANTINA OXIDASE	15
2 OBJETIVOS	19
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
4 ARTIGO CIENTÍFICO	29
“IMMOBILIZATION OF XANTHINE OXIDASE ON MAGNETIC POLYSILOXANE-POLYVINYL ALCOHOL COMPOSITE”	
5 CONCLUSÕES	44
6 ANEXOS	45

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

Ao Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, uma pessoa humana, sincera, presente, paciente, competente, de ótimo astral, que transmite tranquilidade e segurança, que me apoiou, que confiou em mim e que me deu a oportunidade e o prazer de ser orientado tanto científica como humanamente. Exemplo de pessoa, da qual, guardo muitos dos seus ensinamentos, dedicação, amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, pela disposição, amizade, dedicação, por todo o apoio, sem medir esforços e pela disponibilidade que sempre arrumava para poder ajudar.

Aos amigos, confidentes e conselheiros do setor de Bioquímica: Givanildo Oliveira, Ian Amaral, Fernando Soria, Débora Belleza, Sérgio Bezerra, Diego Buarque, Talita Espósito, Marcília Pinheiro, Mariane Lira e todas as outras pessoas que fazem o laboratório, pela companhia, pelo apoio, paciência e ajuda.

Aos meus pais Antonio Fernando de Oliveira Neri e Auriene Alves de Moraes Neri, aos meus irmãos Philipe e Fernanda, a minha avó Helena Alves da Rocha e a todos os meus familiares, pelo amor, presença, torcida, paciência, força, confiança e apoio que me deram.

Aos companheiros e amigos do setor de patologia: Mario Ribeiro, Jorge Luiz, Marcos, Luciano, Moacyr Barreto, Tatiana Mattos, Bruno Cabral, Ricardo Moura, Maira Gonçalves, pelo convívio, companhia e pela amizade.

A todos os funcionários do LIKA, em especial ao Sr, Otaviano Costa, pela sua pré-disposição e préstimo.

A todos que compõem o Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, nível mestrado, em especial a Adenilda Lima, pela dedicação, iniciativa e atenção dada.

“Se não podes fazer tudo, fazas tudo que podes”.

LISTA DE ABREVIATURA

XOD - Xantina oxidase

POS – Polissiloxano

PVA - Álcool Polivinílico

POS-PVA_{m-Glut} - Polissiloxano Álcool Polivinílico Magnetizado e ativado com glutaraldeído

HP – Hipoxantina

6MP – 6-mercaptopurina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Considerações fundamentais na seleção do suporte e método de imobilização (Bickerstaff, 1997) 07

Tabela 2: Classificação das enzimas segundo suas reações catalíticas 15

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Métodos de imobilização de enzimas (adaptado a partir de Bickerstaff, 1997) 06

Figura 2: Esquema da estrutura da rede de PVA 12

Figura 3: Esquema da estrutura do polissiloxano (POS) 12

Figura 4: Esquema da estrutura de rede semi-interpenetrada de POS-PVA 12

Figura 5: Via de oxidação da hipoxantina catalisada pela XOD 16

Figura 6: Reação de oxidação da 6-mercaptopurina 16

Figura 7: Estrutura tridimensional da XOD apresentando seus dois monômeros. 17

Figure 1: Polysiloxane synthesis from the hydrolysis and condensation of tetraethylorthosilicate (TEOS) and its interaction with polyvinyl alcohol (PVA). Adapted according to Uragami et al. (2002). 36

Figure 2: Relationship between the volume and the weight of the magnetic POS-PVA particles suspension. 37

Figure 3: Effect of the pH on soluble (○) and immobilized XOD (●) on POS-PVA activity	37
Figure 4: Effect of the temperature on the soluble (○) and immobilized XOD (●) on POS-PVA activity.	38
Figure 5: Retained activity after reuse of the immobilized XOD on POS-PVA.	38
Figure 6: Oxidative pathway of Hypoxanthine catalyzed by XOD.	39
Figure 7: Oxidative pathway of 6-mercaptopurine catalyzed by XOD.	40
Figure 8: Time course of the 6-mercaptopurine oxidation catalyzed by immobilized XOD on magnetic POS-PVA.	41

RESUMO

Xantina Oxidase (XOD, E.C. 1.17.3.2) é uma enzima que contém molibdênio de importância em análises clínicas com uma estrutura e ação bem definidas. XOD já foi imobilizada em diversas matrizes como contas de gel de poliacrilamida, poliamida-11, Dacron, polianilina-silicone, eletrodos de pasta de carbono modificada, eletrodos de nanocristais de ouro-carbono bem como vidro. No presente estudo um compósito híbrido inorgânico-orgânico magnetizado, baseado em uma rede de polissiloxano e álcool polivinílico (POS-PVA), ativado com glutaraldeído, é proposto como suporte para a imobilização de XOD extraída de leite bovino. A enzima foi parcialmente purificada através de fracionamento com sulfato de amônio (saturação entre 38 e 50%) com uma atividade específica de 69 mU/mg de proteína. A eficiência de imobilização foi de 42% da XOD oferecida com uma relação de 12,7 µg de XOD/mg de suporte. A XOD imobilizada em POS-PVA magnetizado apresentou um pH e temperatura ótimas de 8,8 e 45°C, respectivamente. A constante de Michaelis para a XOD imobilizada foi de 8,42 µM para a xantina. Quando a 6-mercaptopurina foi utilizada como substrato a XOD imobilizada ainda foi capaz de reconhecer este substrato e convertê-lo em ácido 6-tioúrico. Baseado nestes resultados, podemos propor o POS-PVA magnetizado como suporte para imobilização de XOD.

Palavras-Chave: Imobilização; Xantina Oxidase; e Suporte Magnético

1 INTRODUÇÃO

1.1 IMOBILIZAÇÃO

A imobilização em suportes insolúveis em água de biomoléculas, em especial proteínas, geralmente, apresenta maior estabilidade do que sua forma nativa e tem se mostrado importante ferramenta na biotecnologia, haja vista o derivado protéico obtido reter parte ou a totalidade de suas propriedades biológicas; ser facilmente removido do meio de incubação onde atua, permitindo sua reutilização; bem como, possibilitando a obtenção de seus produtos isentos de contaminação.

Não existe universalidade quanto a um método e/ou suporte que atenda a todos os pré-requisitos e aplicações, o que mostra a relevância do tema, novas propostas de imobilização (Hermanson et alii, 1992).

A importância da imobilização de biomoléculas é evidenciada pelo fato de muitos bioprocessos comerciais se basearem em catalisadores imobilizados, por exemplo, para a produção de fosfolipídeos, peptídeos, aminoácidos, xarope de frutose, antibióticos e uma ampla variedade de produtos farmacêuticos e intermediários quirais (Gill & Ballesteros, 2000).

Existem interesses em aplicações biomédicas, da imobilização covalente de biomoléculas em superfícies, tais como, biosensores, cromatografia de afinidade, bioprocessamento, síntese bio-orgânica, diagnósticos de fase sólida, terapia extracorpórea e liberação controlada de drogas (Malmsten et alii, 1999).

1.1.1 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Com as descobertas, nos últimos anos, nos campos da biotecnologia para imobilizar enzimas, as freqüentes limitações da mesma, na forma solúvel, devido ao seu alto custo relacionado a pequenas quantidades, e instabilidade, foram praticamente solucionadas (Kayastha et alii, 1999).

Quando o material a ser imobilizado é uma enzima, existe um especial interesse, em biotecnologia, devido às vantagens que o imobilizado oferece, entre os quais se destacam o aumento da estabilidade da enzima em função das interações físicas e químicas entre o suporte e esta molécula, a possibilidade de reutilização da enzima e a facilidade de recuperação do produto (Yahya et alii, 1998; Tisher & Kasche, 1999).

Enzimas imobilizadas são definidas como enzimas fisicamente confinadas ou localizadas numa certa região do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas e possibilidade de reutilização (Pereira et alii, 2002).

A maior estabilidade e resistência a altas temperaturas da enzima imobilizada, quando comparada à enzima livre, supera a atividade catalítica mais baixa desta última (Laska et alii, 1999).

O número de reutilizações, sem perda significativa de sua atividade, é outra importante vantagem da imobilização, proporciona uma diminuição do custo por análise, tornando a enzima imobilizada mais viável e preferível para utilização de rotina (Godjevargova et alii, 2003) em processos bioquímicos e biomédicos (Srivastava et alii, 2001).

A busca por soluções para seu uso eficiente desperta o interesse de muitos estudiosos até hoje, devido à importância da aplicação das enzimas em diversas reações.

Uma dessas soluções é a utilização de uma matriz (ou suporte) na qual a enzima possa ser ligada. Essas enzimas ligadas a uma matriz são chamadas enzimas imobilizadas e apresentam grandes vantagens em relação à enzima nativa no aspecto de melhorarem a estabilidade e de serem mais facilmente removidas do meio de reação (Xi et alii, 2005).

A imobilização de biocatalisador pode superar três obstáculos que são normalmente encontrados em reações catalisadas por enzimas. Muitas enzimas não são suficientemente estáveis sob as condições operacionais e podem perder sua atividade catalítica devido à auto-oxidação, autodigestão e/ou desnaturação pelo solvente ou pelo soluto; como as enzimas são moléculas solúveis em água, o seu uso repetido, economicamente importante, é problemático devido ao fato de que é difícil recolhê-las de um sistema aquoso e separá-las de substrato e produto; a produtividade de um processo industrial, medida como produção espaço-tempo, é geralmente baixa devido à limitada tolerância das enzimas a altas concentrações, tanto de substrato, como de produto (Faber, 1997).

Contudo, o alto poder catalítico e a versatilidade para realizar uma variedade de transformações sob condições brandas e de maneira seletiva são características que tornam o uso de enzimas, como catalisadores industriais, extremamente atrativo (Castro & Anderson, 1995).

Um problema comum da técnica de imobilização é a diminuição da atividade enzimática devido à obstrução estérica provocada pelo suporte insolúvel. O uso de um tipo de suporte fabricado com um material, cuja solubilidade varia com o pH, permite a condução da reação num pH no qual o complexo enzima-suporte é livremente solúvel. Ao final da reação o pH é alterado de forma a tornar o complexo enzima-suporte insolúvel, permitindo a recuperação da enzima por precipitação e sua posterior reutilização (Tucker et alii, 1995).

As propriedades do biocatalisador, tais como estabilidade, valor de K_m , temperatura e pH ótimos, podem ser significativamente alteradas, para melhor ou pior, dependendo da técnica de imobilização (Faber, 1997). Faz-se, portanto, necessário caracterizar a enzima imobilizada para avaliar seu desempenho e definir novos parâmetros no sentido de otimizar o processo. São relatadas mudanças de pH, da temperatura ótima e estabilidade térmica enzimática após a imobilização (Fadiloglu & Söylemez, 1998; Pereira et alii, 2002).

São muitos os métodos de imobilização de enzimas disponíveis. Porém, como eles exercem grande influência sobre as propriedades do biocatalisador resultante, é importante ressaltar que a escolha da estratégia de imobilização deriva das especificações do processo para o catalisador, incluindo parâmetros tais como atividade catalítica total, eficiência da utilização do catalisador, características de desativação e de regeneração e, obviamente, custos. Além disso, a toxicidade dos reagentes de imobilização deve ser considerada em conexão com o destino dos resíduos do processo de imobilização e com a aplicação pretendida para o catalisador enzimático imobilizado (Bailey & Ollis, 1986).

A retenção de um catalisador biologicamente ativo dentro de um sistema reator ou analítico, chamada imobilização, onde, o confinamento do biocatalisador pode estar dentro ou sobre a matriz.

A imobilização proporciona um complexo insolúvel em um meio especializado, dentro do qual, fluidos podem passar facilmente, transformando substrato em produto numa reação enzimática controlada e facilitando a remoção do catalisador e produto (Hermanson et alii, 1992).

A importância da imobilização de enzimas e componentes biológicos deve-se a sua ampla variedade de aplicações nas indústrias de alimento e farmacêutica e também suas

aplicações biomédicas (Bryjak & Kolarz, 1998; Chellapandian, 1998; Malmsten et alii, 1999; Villalonga et alii, 2000).

As enzimas imobilizadas podem substituir as enzimas nativas em vários processos, resultando em fácil remoção da enzima, menor contaminação da amostra e melhorando o interfaciamento para procedimentos modernos, como espectrometria de massa (Krogh et alii, 1999).

A suscetibilidade das enzimas à ação de fatores externos e às dificuldades de regeneração catalítica limita a aplicação das enzimas em larga escala. Alguns métodos de estabilização são comumente empregados para preservar a atividade da enzima, incluindo técnicas de imobilização física e/ou química, que abrem possibilidades para aplicações industriais. Entre estes, a ligação covalente de enzimas em matrizes insolúveis em água é o método mais atrativo para estabilização, reuso e recuperação de enzimas (Martinek et alii, 1977 ; Engasser et alii, 1977; Bryjak & Kolarz, 1998; Xi et alii, 2005).

Bickerstaff (1997) cita alguns dos principais métodos para imobilização de enzimas: adsorção, ligação covalente, aprisionamento, encapsulamento e ligação cruzada (Figura 1) e considerações à cerca do suporte e método de imobilização (Tabela 1).

Dentre as técnicas de imobilização conhecidas podem citar-se: adsorção, onde há uma interação física não-específica entre a enzima e a superfície da matriz; oclusão ou aprisionamento em uma matriz semipermeável ou no interior de polímeros; reações cruzadas ou “cross-linking” que consiste na ligação da enzima a uma outra proteína ou a grupos funcionais existentes na matriz; e ligação covalente entre a enzima e a matriz. É muito importante escolher um método de imobilização que conserve grande parte da atividade catalítica da enzima (Powell, 1990).

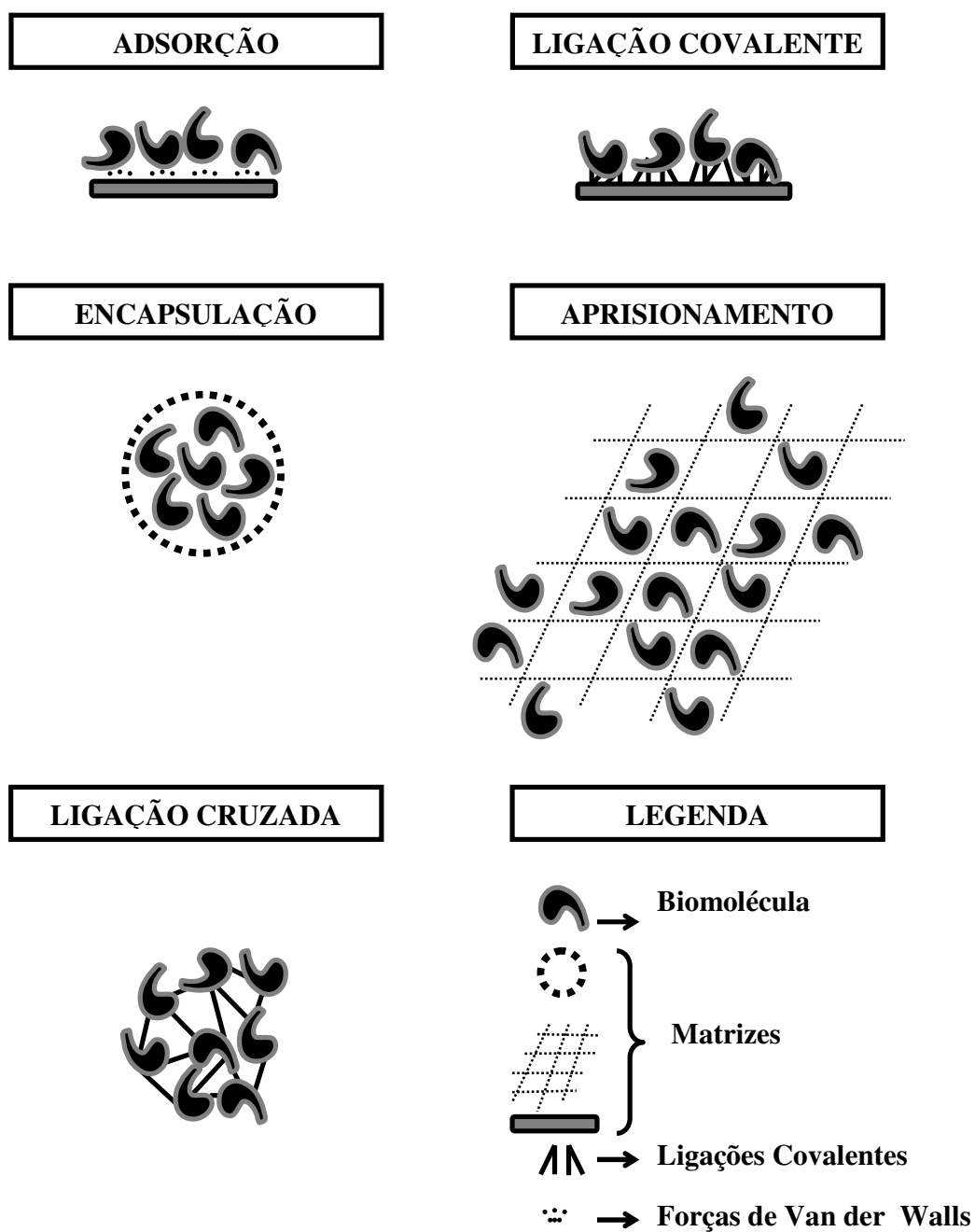


Figura 1: Métodos de imobilização de enzimas

(adaptado a partir de Bickerstaff, 1997).

Tabela 1: Considerações fundamentais na seleção do suporte e método de imobilização
(Bickerstaff, 1997).

Propriedades	Pontos para consideração
Física	Resistência, não compressão das partículas, área de superfície disponível, forma (partículas esféricas/lâminas/fibras), grau de porosidade, volume do poro, permeabilidade, densidade e vazão.
Química	Hidrofiliicidade (adsorção de água pelo suporte), neutralidade em relação à enzima, disponibilidade de grupos funcionais para modificação e regeneração/reutilização do suporte.
Estabilidade	Estocagem, atividade residual da enzima, regeneração da atividade enzimática, estabilidade mecânica do material do suporte.
Resistência	Ataque microbiano, rompimento por agentes químicos, pH, temperatura e solventes orgânicos.
Segurança	Biocompatibilidade, toxicidade dos componentes, reagentes, saúde e segurança dos operadores do processo e dos usuários do produto, especificações da preparação imobilizada para aplicações em alimentos, farmacêuticas e médicas.
Economia	Disponibilidade e custos do suporte, reagentes químicos e equipamentos, habilidade técnica requerida, impacto ambiental, preparação em escala industrial, possibilidade para aumentar a produção, processamento contínuo, reutilização do suporte, nível de risco calculado ou contaminação zero (produto livre de enzima)
Reação	Vazão, carregamento do suporte com a enzima e produtividade catalítica, cinética da reação, reações laterais, sistema de múltiplas enzimas, tipo de reator, limitações de difusão e transferência de massa de cofatores, substratos e produtos.

Dos métodos já citados, o mais estudado é o método de ligação covalente. Este método pode ser classificado de acordo com o tipo de ligação (diazotização, amida, base de Schiff, etc). As condições para imobilização por este método são mais complicadas e mais

agressivas que a técnica de adsorção. A ligação covalente pode ainda, alterar a estrutura conformacional e o sítio ativo da enzima, resultando em maior perda da atividade. Contudo, a força de ligação entre a enzima e a matriz é tão forte que mesmo na presença do substrato ou de soluções de alta força iônica a ligação não é desfeita e a enzima continua imobilizada (Hermanson et alii, 1992)

A estabilidade funcional, freqüentemente, limita a aplicação prática de enzimas solúveis em processos biotecnológicos e na medicina. A modificação da superfície de enzimas por substâncias macromoleculares constitui uma ferramenta útil para melhorar a estabilidade dessas biomoléculas. Em geral, a efetividade deste método depende de escolher as condições apropriadas baseadas em: 1) tipo, tamanho e estrutura da enzima; 2) estrutura e tamanho do polímero modificado; 3) tipo e condições para as reações químicas envolvidas no processo de modificação (Villalonga et alii, 2000). Em geral, a estrutura da proteína pode ser alterada pela imobilização, e por esse meio mudar as propriedades da enzima.

O impedimento estérico causado pela imobilização pode também interferir com o contato entre a enzima e o substrato. O grau de modificação depende do método de imobilização, da natureza do suporte e dos agentes de ligação e da especificidade dos grupos reativos (Chellapandian, 1998; Villalonga et alii, 2000).

1.2 SUPORTE

Um suporte ou matriz é qualquer material que um ligante bioespecífico pode ser ligado. A escolha da melhor matriz para uma determinada aplicação implicará no uso eficiente e otimizado da mesma. Dessa forma, é útil responder a algumas questões que

podem ajudar na escolha da matriz a ser utilizada, tais como: 1) a matriz pode ser obtida de uma fonte comercial segura e em quantidades suficientes; 2) é portadora de grupos funcionais em abundância e facilmente derivatizados; 3) possui boa estabilidade mecânica e química; 4) possui boa capacidade para reter a molécula alvo; 5) é econômica; pois a matriz ideal será aquela que proporcionar as melhores condições de uso para a aplicação desejada (Hermanson et alii, 1992).

O pesquisador deve estar atento a diversos fatores, ao escolher o suporte para a enzima, pois o suporte usado na imobilização pode afetar, significativamente, a sua cinética (Srivastava et alii, 2001), bem como a carga na superfície do carreador (Godjevargova et alii, 2003). A imobilização na face externa do suporte é um dos mais eficientes meios de diminuir a resistência de deslocamento de massa. Um braço espaçador entre o suporte e a enzima pode diminuir as mudanças na estrutura da enzima e torná-la mais flexível, levando, portanto, a uma melhora potencial na estabilidade da sua atividade catalítica (Srivastava et alii, 2001).

1.2.1 POLISSILOXANO-ÁLCOOL POLIVINÍLICO (POS-PVA)

Sabe-se, que a aplicação de enzimas em sua forma nativa, em diversas áreas, nem sempre é adequada e ótima (Bílková et alii, 2002). A ligação dessas enzimas a matrizes sólidas é uma modificação vantajosa de sua aplicação nas biociências e procedimentos diagnósticos especiais (Bílková et alii, 2002; Španová et alii, 2003). E a utilização dessas matrizes magnetizadas oferece ainda grandes vantagens, principalmente, em relação à facilidade dos procedimentos operacionais.

Desde sua concepção, no início do século XX, a tecnologia sol-gel tem se mostrado notadamente versátil na fabricação de matrizes de óxidos metálicos, sílica e organosiloxanos, de porosidade definida, na forma de monólitos, fibras, particuladas e filmes finos ou espessos. Este tipo de material tem encontrado amplo uso nas áreas de óptica, sensores, catalisadores e revestimentos (Gill & Ballesteros, 2000).

As partículas magnéticas (micropartículas, nanopartículas e ferrofluídos) são largamente estudadas para suas aplicações nas áreas biológica e biomédica. Os materiais magnéticos modificados são compostos de um núcleo de óxido de ferro coberto com um polímero. Essa cobertura, em geral, é biocompatível (tal como dextrana, PEG, etc), ou possui grupos ativos que podem ser conjugados a biomoléculas tais como proteínas e enzimas (Ma et alii, 2003; Yamaura et alii, 2004).

A utilização de partículas magnéticas, nas mais diversas áreas, tem sido largamente explorada na área biomédica (Pardoe et alii, 2001) e industrial (Hong et alii, 2004). Onde a maior parte das aplicações necessita de compostos estáveis quimicamente, biocompatíveis, solúveis em água, atóxicos e biodegradáveis (Hong et alii, 2004).

Vidros (silicatos) podem ser preparados pelo processo sol-gel alcóxido. Esta técnica envolve reações de hidrólise de precursores monoméricos (alcóxidos metálicos) a baixa temperatura com subsequente condensação dos hidroxiderivados e posterior secagem, maturação e sinterização (Kim et alii, 2001; Oréfice et alii, 2001; Lima-Barros et al., 2002). Além da homogeneidade, baixas temperatura e concentração de impurezas (Boonstra & Baken, 1989), uma característica muito importante da polimerização sol-gel é que sais, complexos metálicos e corantes orgânicos podem ser incorporados antes da formação do hidrogel, fornecendo um sol-gel dopado. A capacidade de formar vidros inorgânicos

dopados sob condições aquosas e temperatura ambiente possibilitou estender este tipo de processo ao encapsulamento de biomoléculas (Gill & Ballesteros, 2000).

A utilização de compostos híbridos em substituição aos vidros simples permite aliar as qualidades do processo sol-gel às características dos componentes inorgânicos e orgânicos. Pontos favoráveis da matriz vítrea incluem a inércia química, baixa absorção de água e solventes orgânicos, e boa estabilidade térmica e fotoquímica (Lima-Barros et alii, 2002). Entretanto, suportes obtidos apenas a partir de precursores inorgânicos podem apresentar valores muito elevados de hidrofobicidade, ou ainda serem friáveis, possuírem porosidade limitada e funcionalidade química pouco flexível (Gill & Ballesteros, 2000). A adição de compostos orgânicos visa agregar características que estão ausentes e que são necessárias à finalidade a que se destina o suporte.

Vários trabalhos descrevem a utilização de materiais híbridos dentre os quais as redes poliméricas interpenetradas (*interpenetrated polymeric nets* - IPNs) compostas de alginato, agar, gelatina, polivinilpirrolidona, álcool polivinílico e polietilenoglicol, com silicatos e siloxanos, para o encapsulamento de proteínas (Gill, 2001). As IPNs de polímeros orgânicos e silicatos/siloxanos apresentam estabilidade química e mecânica significativamente aumentadas e grande biocompatibilidade quando comparadas aos seus componentes isoladamente (Gill & Ballesteros, 2000). Lima-Barros e colaboradores (2002) procurando obter um microambiente compatível e uma superfície mais adequada à imobilização de proteínas, obtiveram o composto híbrido de polissiloxano e PVA (POS-PVA) pelo processo sol-gel. Após o preparo do suporte e a adição de um braço químico, glutaraldeído, via catálise ácida, a fração protéica pode ser então fixada covalentemente. As Figura 2, 3 e 4 mostram esquemas da rede de PVA, polissiloxano (POS) e a rede semi-interpenetrada de POS-PVA, onde podem ser vistas as possíveis interações entre suas

moléculas. Estes esquemas foram baseados no trabalho de Uragami et alii (2002) com algumas modificações.

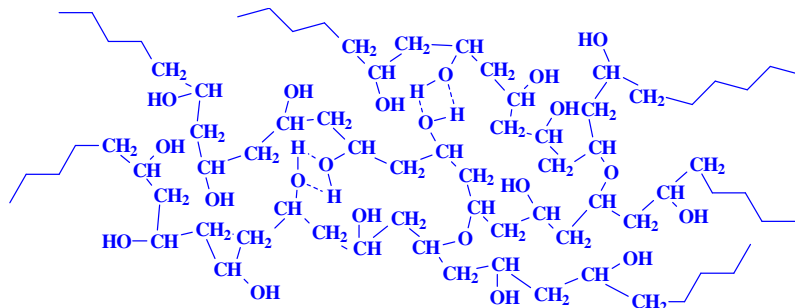


Figura 2: Esquema da estrutura da rede de PVA

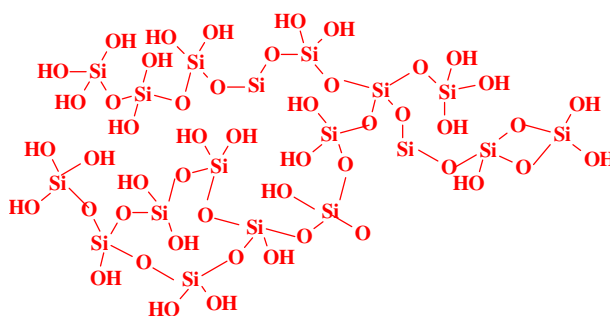


Figura 3: Esquema da estrutura do polissiloxano (POS)

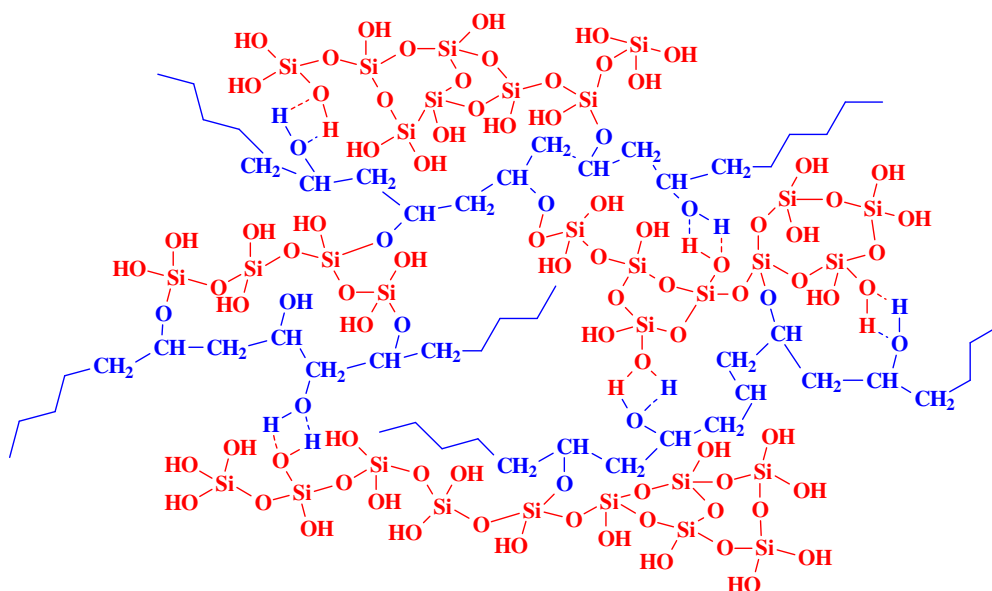


Figura 4: Esquema da estrutura de rede semi-interpenetrada de POS-PVA

A utilização de suportes magnetizados, através da conjugação da matriz com magnetita (Fe_3O_4), para a imobilização de proteínas apresenta vantagens em relação aos não magnetizados, pois permite separá-los do meio da reação pelo uso de uma força magnética, dispensando as etapas de centrifugação e/ou filtração, requeridas nos processos convencionais com fase sólida (Butler, 2000b).

Recentemente materiais sol-gel têm sido empregados para imobilização de enzimas por aprisionamento (Reetz et alii, 1998; Kelling-Tucker et alii, 2000). O processo sol-gel é um método eficiente para a preparação de vidros de sílica pela hidrólise de um precursor alcoilsilano e pela condensação dos silanóis remanescentes, seguidos de envelhecimento e secagem sob atmosfera ambiente, e sinterização (Lima-Barros et alii, 2002). Embora a técnica de sol-gel tenha sido empregada especialmente para o aprisionamento de proteínas, este método de imobilização possui limitações tais como problemas de transferência de massa (Faber, 1997), que podem afetar o poder catalítico da enzima. Assim, a técnica de ligação covalente da enzima no suporte pode se apresentar como uma alternativa atrativa de imobilização.

1.3 ENZIMA

A reação catalisada por enzima ocorre dentro dos limites de uma cavidade da enzima, o sítio ativo, o qual atua em contato direto com a substância (substrato) a ser transformada (Pereira et alii, 2002). No sítio ativo estão situados os radicais de aminoácidos, conhecidos como grupamentos catalíticos, que são responsáveis pela formação e ruptura de ligações (Stryer, 1992).

O fator que realmente distingue as enzimas da maioria dos catalisadores não enzimáticos é a formação de um complexo enzima-substrato (complexo ES) específico. O qual é mantido pelas mesmas forças que estabilizam proteínas, incluindo ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações iônicas e forças de Van der Waals (Lehninger et alii, 1993).

Apesar das enzimas diferirem em estrutura, especificidade e modo de catálise, algumas generalizações acerca de seus sítios ativos podem ser feitas:

- ocupam uma parte relativamente pequena do volume total da enzima;
- são uma entidade tridimensional (depressões ou fendas);
- os substratos são ligados através de múltiplas atrações fracas;
- a especificidade de ligação depende do arranjo, definido com precisão, dos átomos no sítio ativo (Stryer, 1992).

Como a característica mais importante de uma enzima é seu poder catalítico e não sua estrutura, enzimas são classificadas pelas reações que catalisam, em seis classes principais (Tabela 2). Cada enzima recebe um número EC, para “Enzyme Commission”, composto de quatro dígitos, EC a.b.c.d, os quais denotam o principal tipo de reação (a), subtipo, indicando o tipo de substrato ou o tipo de molécula transferida (b), a natureza do co-substrato (c) e o número individual da enzima (d), (Faber, 1997).

Tabela 2: Classificação das enzimas segundo suas reações catalíticas

Número	Classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons
2	Transferases	Reações grupo-transferência
3	Hidrolases	Reações de hidrólise
4	Liases	Adição de grupos à dupla ligações, ou formação de duplas ligações pela remoção de grupos
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de moléculas para produzir formas isômeras
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O, C-N por reações de condensação acopladas a clivagem de ATP

A aplicação de enzimas nativas, mesmo com inúmeras vantagens oferecidas em processos industriais e biomédicos, é limitada devido a sua instabilidade e a sua rápida perda de atividade biocatalítica durante os períodos operacionais e de estocagem, resultantes do processo autolítico, desnaturação e agregação da proteína. Além disso, a dificuldade para remover a enzima do meio de reação e a possibilidade de contaminação do produto formado são outras dificuldades observadas (Villalonga et alii, 2000; Xi et alii, 2005).

1.3.1 XANTINA OXIDASE

Xantina oxidase, XOD, (EC 1.17.3.2) é uma enzima envolvida no metabolismo de purinas em vários organismos (Hille & Nishino, 1995). XOD catalisa a oxidação de hipoxantina (HP) a xantina e depois a oxidação desta em ácido úrico (Figura 5).

- hipoxantina + O₂ + 2H₂O ↔ xantina + 2H₂O₂
- xantina + O₂ + 2H₂O ↔ ácido úrico + 2H₂O₂

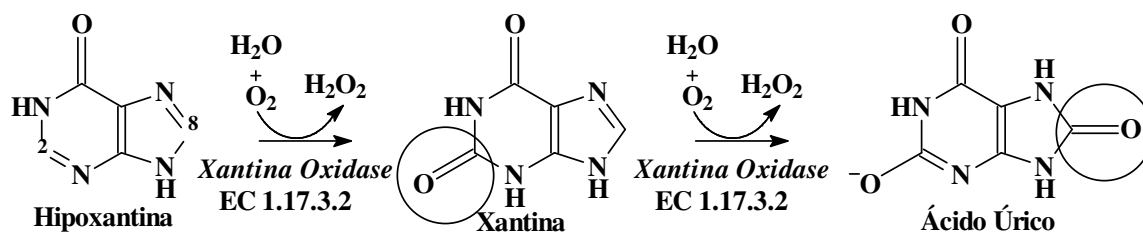


Figura 5: Via de oxidação da hipoxantina catalisada pela XOD

A 6-mercaptopurina (6MP), droga usada na terapêutica da leucemia, sofre oxidação pela XOD. A enzima catalisa a oxidação do primeiro o átomo de carbono na posição 8, para em seguida agir no número 2 (Figura 6). Esta ação é oposta à via de oxidação descrita para a oxidação da HP. O 6MP pode também formar o intermediário 6-tioxantina (Barbosa et alii, 1995).

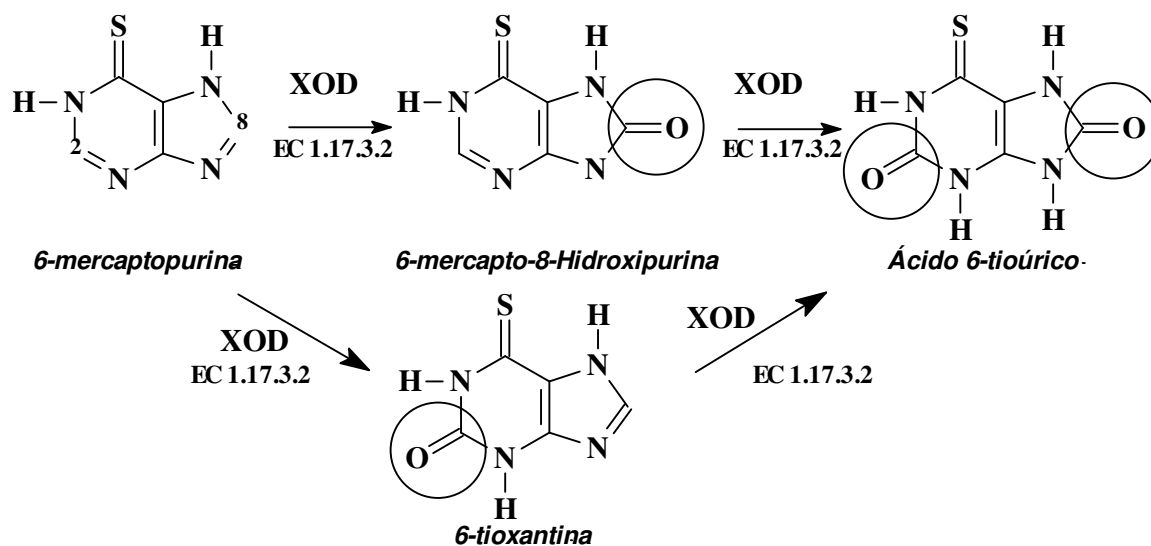


Figura 6: Reação de oxidação da 6-mercaptopurina

A inibição da xantina oxidase faz parte da estratégia de tratamento da hiperuricemia, condição médica conhecida como gota.

A enzima tem um peso molecular de aproximadamente 280.000 (Figura 7) e contém duas moléculas de flavina, ligadas na forma de FAD, dois átomos de molibdênio e oito átomos de ferro por unidade enzimática (Banu et alii, 2005).

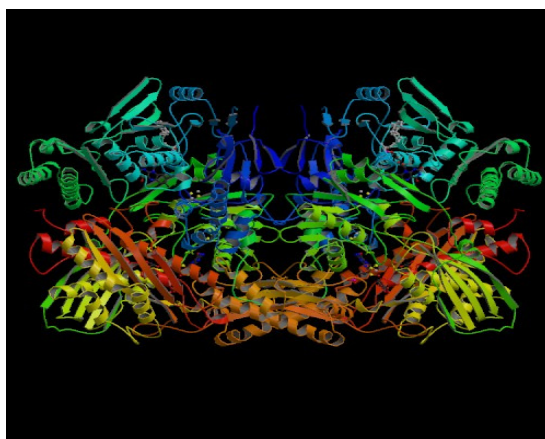


Figura 7: Estrutura tridimensional da XOD apresentando seus dois monômeros (Enroth et alii, 2000).

O leite, especialmente o bovino, é rico em XOD, a qual está associada principalmente às membranas dos glóbulos de gordura (leitelho). Tem sido especulado que a XOD de leite bovino é liberada do leitelho a partir de homogeneização e pode ser absorvida na forma nativa no trato gastrointestinal (Clifford et alii, 1983). A produção de radicais livres a partir da atividade catalítica da XOD pode causar danos no tecido cardiovascular pela diminuição de plasmogênio, mudanças ateroscleróticas, que podem culminar em doença cardíaca. Tem sido sugerido que a XOD está envolvida no surgimento do gosto azedo do leite comercializado e de seus derivados. Uma possível função da XOD

no leite é a sua participação na ancoragem da bicamada lipídica ao núcleo das gotículas apolares de lipídios (Kristensen et alii, 1998).

A XOD já foi imobilizada em dacron, poliamida 11 e grânulos de gel de poliacrilamida (Barbosa et alii, 1995), em álcool polivinílico-glutaraldeído (Araújo et alii, 1997) e em compósito de polianilina e silicone (Nadruz et alii, 1996). A proposição de novos suportes sintéticos e metodologias de imobilização têm caracterizado uma linha de pesquisa desenvolvida no setor de bioquímica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Extrair e imobilizar xantina oxidase de leite bovino em POS-PVA magnetizado.

2.2 Objetivos Específicos

- Extrair e purificar parcialmente a XOD de leite bovino através de precipitação com sulfato de amônio;
- sintetizar compósito híbrido de polissiloxano – álcool polivinílico magnetizado (POS-PVA_m);
- imobilizar a XOD em POS-PVA_m via ativação com glutaraldeído;
- investigar, para o substrato xantina, a atividade enzimática, pH ótimo e temperatura ótima da XOD imobilizada e comparar com a solúvel, e
- Avaliar o comportamento da XOD imobilizada, para o substrato 6-mercaptopurina.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A. M.; NEVES, Jr. M. T.; AZEVEDO, W. M.; OLIVEIRA, G. G.; FERREIRA, Jr. D. L.; COELHO, R. A. L.; FIGUEIREDO, E. A. P.; CARVALHO, Jr. L. B. Polyvinyl alcohol-glutaraldehyde network as a support for protein immobilization. *Biotechnology Techniques*, Netherlands, v. 11, n. 2, p. 67-70, sept. 1977.

BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. Biochemical Engineering Fundamentals. 2nd. ed. *New York: McGraw-Hill*, 1986. 984 p.

BANU, S.; GREENWAY, G. M.; WHEATLEY, R. A. Luminol chemiluminescence induced by immobilised xanthine oxidase. *Analytica Chimica Acta*, UK, v. 541, n. 1-2, p. 91-97, june 2005.

BARBOSA, R. M. N.; OLIVEIRA, E. A.; MELO, E. H. M.; NADRUZ, Jr. W.; CARVALHO, Jr. L. B. Action of Immobilized xanthine oxidase on purines. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, São Paulo, v. 28, p. 291-295, 1995.

BICKERSTAFF, G. F. Immobilization of enzyme and cells. In: Schmauder HP (Ed.) *Methods in Biotechnology*, Totowa: Humana Press, v. 1, 1996. 384 p. Bibliografia: p. 1-11.

BÍLKOVÁ, Z.; SLOVÁKOVÁ, M.; LYČKA, A.; HORÁK, D.; LENFELD, J.; TURKOVÁ, J.; CHURÁČEK, J. Oriented immobilization of galactose oxidase to bead and magnetic bead cellulose and poly(HEMA-co-EDMA) and magnetic poly(HEMA-co-EDMA) microspheres. *Journal OF Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, UK, v. 770, n. 1-2, p. 25-34, apr. 2002.

BOONSTRA, A. H.; BAKEN, J. M. E. Hydrolysis-condensation reactions of silica gels during autoclave drying. *Journal of Non-Crystalline Solids*, UK, v. 109, n. 1, p. 1-8, may 1989.

BRYJAK, J.; KOLARZ, B. N. Immobilisation of trypsin on acrylic copolymers. *Process Biochemistry*, UK, v. 33, n. 4, p. 409-417, mar. 1998.

BUTLER, J. E. Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and ather solid-phase immunoassays. *Methods*, UK, v. 22, n. 1, p. 4-23, sept. 2000b.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. *Química Nova*, São Paulo, v. 18, n. 6, p. 544-554, dec. 1995.

CHELLAPANDIAN, M. Preparation and characterization of alkaline protease immobilized on vermiculite. *Process Biochemistry*, UK, v. 33, n. 2, p. 169-173, feb. 1998.

CLIFFORD, A. I.; HO, C. Y.; SWENERTON, H. Homogenized bovine-milk xanthine-oxidase - a critique of the hypothesis relating to plasmalogen depletion and cardiovascular-disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 38, n. 2, p. 327-332, 1983.

ENGASSER, J. M.; COULET, P. R. Comparison of intrinsic stabilities of free and bound enzymes by graphical removal of diffusional effects. *Biochimica et Biophysica Acta*, Netherlands, v. 485, n. 1, p. 29-36, 1977.

ENROTH, C.; EGER, B. T.; OKAMOTO, K.; NISHINO, T.; NISHINO, T.; PAI, E. F. Crystal Structures of Bovine Milk Xanthine Dehydrogenase and Xanthine Oxidase: Structure-Based Mechanism of Conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA, v. 97, n. 20, p. 10723-10728, sept. 2000.

FABER, K. Biotransformations in organic chemistry: a textbook. 3rd. ed. *Berlin: Springer-Verlag*, 1997. 402 p.

FADIOGLU, S.; SÖYLEMEZ, Z. Olive oil hydrolysis by celite-immobilized *Candida rugosa* lipase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 8, n. 9, p. 3411-3414, sept. 1998.

GILL, I. Bio-doped nanocomposite polymers: sol-gel bioencapsulates. *Chemistry of Materials*, Washington, v.13, n. 10, p. 3404-3421, oct. 2001.

GILL, I.; BALLESTEROS, A. Bioencapsulation within synthetic polymers (Part I): sol-gel encapsulation biologicals. *Trends in Biotechnology*, UK, v. 18, n. 7, p. 282-296, july 2000.

GODJEVARGOVA, T.; GABROVSKA, K. Immobilization of urease onto chemically modified acrylonitrile copolymer membranes. *Journal of Biotechnology*, UK, v. 103, n. 2, p. 107-111, june 2003.

HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; SMITH, P. K. Immobilized Affinity Ligand Techniques. *New York: Academic Press Inc.* 1992. 448 p.

HILLE, R.; NISHINO, T. Flavoprotein structure and mechanism .4. xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *Faseb Journal*, Bethesda, v. 9, n. 11, p. 995-1003, aug. 1995.

HONG, X.; LI, J.; WANG, M. J.; XU, J.; GUO, W.; LI, J.; BAI, Y.; LI, T. Fabrication of magnetic luminescent nanocomposites by a layer-by-layer self-assembly approach. *Chemistry of Materials*, Washington, v. 16, n. 21, p. 4022-4027, oct. 2004.

KAYASTHA, A. M.; DAS, N. A simple laboratory experiment for teaching enzyme immobilization with urease and its application in blood urea estimation. *Biochemical Education*, UK, v. 27, n. 2, p. 114-117, apr. 1999.

KEELING-TUCKER, T.; RAKIC, M.; SPONG, C.; BRENNAN, J. D. Controlling the material properties and biological activity of lipase within sol-gel derived bioglasses via organosilane and polymer doping. *Chemistry of Materials*, Washington, v. 12, n. 12, p. 3695-3704, dec. 2000.

KIM, Y. D.; DORDICK, J. S.; CLARK, D. S. Siloxane-based biocatalytic films and paints for use as reactive coatings. *Biotechnology & Bioengineering*, New York, v. 72, n. 4, p. 475-482, feb. 2001.

KRISTENSEN, D.; NYLANDER, T.; RASMUSSEN, J. T.; PAULSSON, M.; BIRDI, K. S. Adsorbed and spread films of bovine milk xanthine oxidase at the air-water interface. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, Netherlands, v. 143, n. 2-3, p. 221-231, dec. 1998.

KROGH, T. N.; BERG, T.; HØJRUP, P. Protein analysis using enzymes immobilized to paramagnetic beads. *Analytical Biochemistry*, UK, v. 274, n. 2, p. 153-162, oct. 1999.

LASKA, J.; WŁODARCZYK, J.; ZABORSKA, W. Polyaniline as a support for urease immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, UK, v. 6, n. 6, p. 549-553, june 1999.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of Biochemistry. 2nd. ed. *New York: Worth*, 1993. 1013 p. Bibliografia: p. 198-239.

LIMA-BARROS, A. E.; ALMEIDA, A. M. P.; CARVALHO, Jr. L. B.; AZEVEDO, W. M. Polysiloxane/PVA-glutaraldehyde hybrid composite as solid phase for immunodetections by ELISA. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 459-463, apr. 2002.

MA, M.; ZHANG, Y.; LI, X. B.; FU, D. G.; ZHANG, H. Q.; GU, N. Synthesis and characterization of titania-coated Mn-Zn ferrite nanoparticles. *Colloids and surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, Netherlands, v. 224, n. 1-3, p. 207-212, aug. 2003.

MALMSTEN, M.; XING, K. Z.; LJUNGLÖF, A. Confocal Microscopy Studies of Trypsin Immobilization on Porous Glycidyl Methacrylate Beads. *Journal of Colloid and Interface Science*, UK, v. 220, n. 2, p. 436-442, sept. 1999.

MARTINEK, K.; KLIBANOV, A. M.; GOLDMACHER, V. S.; BEREZIN, I. V. Principles of enzyme stabilization .1. Increase in thermostability of enzymes covalently bound to a complementary surface of a polymer support in a multipoint fashion. *Biochimica et Biophysica Acta*, Netherlands, v. 485, n. 1, p. 1-12, 1977.

NADRUZ, Jr. W.; MARQUES, E. T. A.; AZEVEDO, W. M.; LIMA-FILHO, J. L.; CARVALHO, Jr. L. B. Immobilization of xanthine oxidase on a polyaniline silicone support. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 347-350, mar. 1996.

ORÉFICE, R. L.; HENCH, L. L.; CLARK, A. E.; BRENNAN, A. B. Novel sol-gel bioactive fibers. *Journal of Biomedical Materials Research*, New York, v. 55, n. 4, p. 460-467, june 2001.

PARDOE, H.; CHUA-ANUSORN, W.; ST. PIERRE, T. G.; DOBSON, J. Structural and magnetic properties of nanoscale iron oxide particles synthesized in the presence of dextran or polyvinyl alcohol. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, UK, v. 225, n. 1-2, p. 41-46, apr. 2001.

PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Esterification activity and stability os *Candida rugosa* lipase immobilized into chitosan. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Totowa, v. 98, p. 977-986, 2002.

POWELL, J.; SAWYER, J. F.; MEINDL, P. E.; SMITH, S. J. Structures of 3 compounds involving lithium-ion encapsulation by group-6 carbonyl phosphinite crown-ether complexes. *Acta Crystallographica Section B-Structural Science*, Copenhagen, v. 46, p. 753-762, part 6, dec. 1990.

REETZ, M. T.; ZONTA, A.; VIJAYAKRISSHNAN, V.; SCHIMOSSEK, K. Entrapment of lipases in hydrophobic magnetite-containing sol-gel materials; magnetic separation of heterogeneous biocatalysts. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, Laussane, v. 134, n. 1-3, p. 251-258, sept. 1998.

SRIVASTAVA, P.K.; KAYASTHA, A.M.; SRINIVASAN. Characterization of gelatin-immobilized pigeonpea urease and preparation of a new urea biosensor. *Biotechnology Applied Biochemistry*, UK, v. 34, p. 55-62, aug. 2001.

ŠPANOVÁ, A.; RITTICH, B.; HORÁK, D.; LENFELD, J.; PRODĚLALOVÁ, J.; SUČIKOVÁ, J.; ŠTRUMCOVÁ, S. Immunomagnetic separation and detection of Salmonella cells using newly designed carriers. *Journal of Chromatography A*, UK, v. 1009, n. 1-2, p. 215-221, aug. 2003.

STRYER, L. Bioquímica. 3rd. ed. *Rio de Janeiro: Guanabara Koogan*, 1992. 881 p.

TISCHER, W.; KASCHE, V. Immobilized enzymes: crystals or carriers? *Trends in Biotechnoogy*, UK, v. 17, n. 8, p. 326-335, aug. 1999.

TUCKER, G. A.; WOODS, L. F. J. Enzyme in food processing. 2nd. ed. *London: Blackie Academic & Professional*, 1995. 319 p. Bibliografia: p. 1-20.

URAGAMI, T.; OKAZAKI, K.; MATSUGI, H.; MIYATA, T. Structure and Permeation Characteristics of an Aqueous Ethanol Solution of Organic-Inorganic Hybrid Membranes Composed of Poly (vinyl alcohol) and Tetraethoxysilane. *Macromolecules*, USA, v. 35, p. 9156-9163, nov. 2002.

VILLALONGA, R.; VILLALONGA, M. L.; GÓMEZ, L. Preparation and functional properties of trypsin modified by carboxymethylcellulose. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, UK, v. 10, n. 5, p. 483-490, oct. 2000.

XI, F. N.; WU, J. M.; JIA, Z. S.; LIN, X. F. Preparation and characterization of trypsin immobilized on silica gel supported macroporous chitosan bead. *Process biochemistry*, UK, v. 40, n. 8, p. 2833-2840, july 2005.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reaction. *Enzyme and Microbial Technology*, Stoneham, v. 23, n. 7-8, p. 438-450, nov. 1998.

YAMAURA, M.; CAMILO, R. L.; SAMPAIO, L. C.; MACÊDO, M. A.; NAKAMURA, M.; TOMA, H. E. Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, UK, v. 279, n. 2-3, p. 210-217, aug. 2004.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Immobilization of Xanthine Oxidase on Magnetic Polysiloxane-Polyvinyl Alcohol Composite

David Fernando Moraes Neri², Débora Pimentel Belleza Bernardino², Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão^{1,2} and Luiz Bezerra de Carvalho Junior^{1,2*}.

Departamento de Bioquímica¹ and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami², Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.

* *Author for correspondence* (Fax: + 55 81 21268485; E-mail: lbcj@hotmail.com.br)

Keywords: immobilization, magnetic, polyvinyl alcohol, tetraethylorthosilicate, xanthine oxidase

Abstract

Xanthine oxidase (xanthine:oxygen oxidoreductase, XOD, E.C. 1.17.3.2) is a relevant molybdenum enzyme in clinical analysis with a well-established structure and mode of action. It has already been immobilized on several matrices such as polyacrylamide gel beads, polyamide-11, Dacron, polyaniline-silicone, modified carbon paste electrode, nanocrystal gold-carbon paste electrode and controlled-pore glass. In this study, a magnetized hybrid inorganic-organic composite, based on polysiloxane and polyvinyl alcohol (POS-PVA) network, activated with glutaraldehyde, is proposed as a matrix for the immobilization of bovine milk XOD. The enzyme was partially purified with ammonium sulfate fractioning at 38-50% saturation, yielding a preparation with a specific activity of 69 mU/mg of protein. The immobilization efficiency was of 42% of the offered protein and a maximum of 12.7 $\mu\text{g/mg}$ of support. The immobilized XOD on magnetic POS-PVA-glutaraldehyde presented an optima pH and temperature at 8.8 and 45°C, respectively. Michaelis constant for the XOD immobilized was 8.42 mM for xanthine. When 6-mercaptopurine was used as substrate, immobilized XOD was still able to recognize it and convert to 6-thiouric acid at 25°C and pH 8.2. Based on these results one can propose this magnetic POS-PVA-glutaraldehyde as support for the XOD immobilization.

Keyword: Immobilization; Xantine Oxidase; and Magnetic Support

Introduction

Hybrid material composed of organic and inorganic species can be easily synthesized by sol-gel process, in which the starting materials are in solution and synthesis are possible at a low temperature (Brinker & Scherer, 1990). Such materials combine the chemical and physical properties of the guest with an excellent optical, thermal and chemical stability of the host silicon oxide matrices. Attractive glasses can be produced as films, ceramics, aero gels, particles and fibers. In our laboratory silica glass beads were synthesized by alkoxide sol-gel process based on polyvinyl alcohol and tetraethylorthosilicate (TEOS) and were used as solid phase for antigen immobilization in immunodiagnosis (Barros et al., 2002, Coêlho et al., 2002). Also, these beads were converted in powder, magnetized and used in chemiluminescent assays (Coêlho et al., 2002). Membranes have also been prepared and their permeation and separation characteristics for an aqueous ethanol solution during pervaporation were investigated (Uragami et al., 2002).

Here, the polysiloxane/polyvinyl alcohol (POS-PVA) magnetic particles were used as a matrix for the immobilization of xanthine oxidase (xanthine:oxygen oxidoreductase, XOD, E.C. 1.17.3.2). This is a molybdenum enzyme with a well-established structure and mode of action. Despite of the variety of possible substrates, its main function is to oxidize hypoxanthine to xanthine and xanthine to uric acid (Banu et al., 2005). XOD have already been immobilized on polyacrylamide gel beads, polyamide-11 and Dacron (Barbosa et al., 1995), on a polyaniline silicone support (Nadruz et al., 1996), modified carbon paste electrode (Hu et al., 2000), nanocrystal gold-carbon paste electrode (Agüi et al., 2005) and controlled-pore glass (Banu et al., 2005).

In this study, the following properties of the immobilized enzyme were investigated: K_m using xanthine as substrate; optima pH and temperature, activity retention after reuse and the catalytic action on the 6-mercaptopurine oxidation pathway.

Materials and methods

Xanthine oxidase purification

Fresh bovine milk (1 L), with no preservative, was cooled down to 4°C overnight. The cream milk was separated from the fresh milk and then was hand churned for 3h at 4°C. Afterwards, the overlaid layer was removed and the buttermilk was cheesecloth filtered. Casein was precipitated at pH 4.8 by dropping 1 M HCl, followed by centrifugation at 27,000 g for 15 min and raising pH to 7.0 by adding 1 M NaOH. The casein-free buttermilk (65 mL) was 38% saturated by adding ammonium sulfate. The suspension was centrifuged at 12,000 g for 15 min and the precipitated formed was discarded. The supernatant was 50% saturated with ammonium sulfate. The precipitate formed was collected by centrifugation at 27,000 g for 30 min and dissolved 5 mL of 10mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 5 mM 2-mercaptoethanol and 100 μ M EDTA. The sample was dialyzed twice, first against the buffer containing 100 μ M EDTA and later against buffer containing 30 μ M EDTA. Sample was finally centrifuged at 35,000 g and the supernatant stored at 4°C and used throughout this work. .

POS-PVA synthesis and magnetization

POS-PVA beads were synthesized according to Barros et al. (2002). Briefly: 6 ml of 2% w/v polyvinyl alcohol (MW 72,000; Reagen), 5 ml of ethanol (Merck) and 5 ml of tetraethylorthosilicate (TEOS; Merck) were mixed in a beaker. After raising the temperature to 70°C, under stirring, 100 µl of 1M HCl were added and incubated for 50 min. Then the solution was distributed into ELISA microplates (150 µl/well) and allowed to solidify for about 48 h at 25° C. The beads were powdered by using a mortar and pestle and the particles (10 g) were suspended in deionized water (100 mL) and 10 mL of 0.6 M FeCl₂ and 1.1 M FeCl₃ were added drop-wise under stirring. The pH was adjusted to 11 with 28% (w/v) NH₄OH. After a 30 min incubation at 100°C, under stirring, the magnetized particles were washed with deionized water until reach pH 7 and dried at 50°C overnight.

Glutaraldehyde activation of magnetic POS-PVA particles

Magnetized particles (10 mg) were incubated with 2.5% (v/v) glutaraldehyde (100 µL) in 900µL of 0.1 M H₂SO₄ under mild stirring for 1 h at 25°C. Afterwards particles were washed five times with deionized water followed by buffer supplemented with 100 µM EDTA (5 x 1 mL) using magnetic field (6000 Oe) to recover the treated particles.

XOD immobilization on magnetic POS-PVA-glutaraldehyde

Magnetic POS-PVA-glutaraldehyde particles (10 mg) were incubated with XOD preparation (127 µg/mL) for 12 h at 4°C. The particles were collected under a magnetic

field and the supernatant used for protein determination according to Sedmak and Grossberg (1977) using bovine serum albumin as the standard.

Enzyme activity measurements

The soluble XOD (50 μL) was incubated with 1000 μL of 100 μM xanthine, prepared in 50 mM of Tris-HCl, pH 8.2, and following the uric acid production at 295 nm ($\epsilon_{293} = 9.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). The immobilized enzyme (10 mg) was mildly stirred with 1000 μL of 100 μM xanthine, prepared in 50 mM of Tris-HCl, pH 8.2, and at time intervals of 5 min the absorbance of the supernatant was analyzed at 295 nm being reincubated with the immobilized enzyme and allowed to continue the reaction for another time interval of 5 min. Immobilized XOD activity on 6-mercaptopurine was evaluated by incubating a solution at the concentration of 650 μM , prepared in 50 mM Tris/HCl, pH 8.2 at 25°C. Then the supernatant of the enzymatic reaction was simultaneously analyzed at 240 nm, 256 nm, 308 nm and 340 nm in intervals of 10 min.

Optima pH and temperature

The effect of pH and temperature in the enzyme activity were tested in the 7.6 – 9.0 and 30-65°C, respectively for the same reaction system described previously using xanthine as substrate.

Reuse of immobilized XOD in POS-PVA magnetic support

The retention of the immobilized XOD activity was evaluated incubating the same support with fresh 1 mL of xanthine (100 μM) every 10 min for 10 times.

Results and Discussion

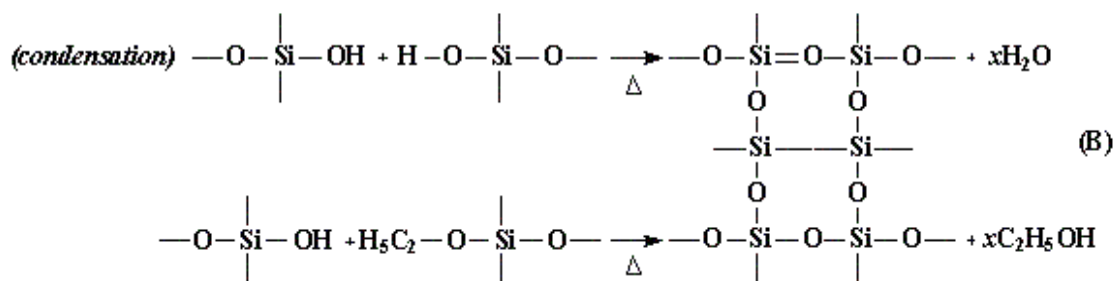
Xanthine oxidase was extracted from bovine milk and partially purified by ammonium sulfate precipitation. The fraction precipitated at 38-50% of ammonium sulfate presented the highest specific activity (69 mU/mg of protein with purification and yield of 1.57 and 66%, respectively). Previous report demonstrated that immobilized XOD using highly purified preparations lost activity during reuses (Nadruz et al., 1996). Probably, this deleterious effect is due to the release of free radicals (O_2^-) and H_2O_2 produced during XOD activity. Addition of catalase and superoxidase dismutase prevented this effect (Tramper et al., 1978).

Figure 1 schematically describes the basis of the present immobilization procedure. In the first step of the process of preparing POS-PVA hybrid beads, TEOS was hydrolyzed in the presence of an acid catalyst (A), and silanol groups were formed. These resulting silanol groups yielded siloxane bonds due to the dehydration or dealcoholysis reaction (B) with other silanol groups or ethoxy groups during the membrane drying. These reactions led to cohesive bodies between siloxane in the beads. Since these bodies of siloxane were dispersed in the beads, the silanol groups in the siloxane and the hydroxyl groups in the PVA formed hydrogen and covalent bonds, which are the crosslinking points, as illustrated in (C). These hybrid beads were smashed into small particles (powder) which were magnetized. Finally, bifunctional reagent glutaraldehyde reacts with PVA hydroxyl groups forming acetals, under acid catalysis, and remaining carbonyl groups of glutaraldehyde molecules can then further react with amino group of the XOD, forming covalent bonds (Araújo et al., 1997). These details can be also seen in (C).

The immobilization of XOD on magnetic POS-PVA yielded a preparation containing 5.4 μ g of protein per mg of support and a specific activity of 69 mU/mg of

protein. The homogeneity of the magnetic particles sizes is shown in Figure 2 that displays a linear relationship between their volume and weight.

Hydrolysis and condensation reaction for TEOS



Interaction between POS—PVA and XOD immobilization via glutaraldehyde

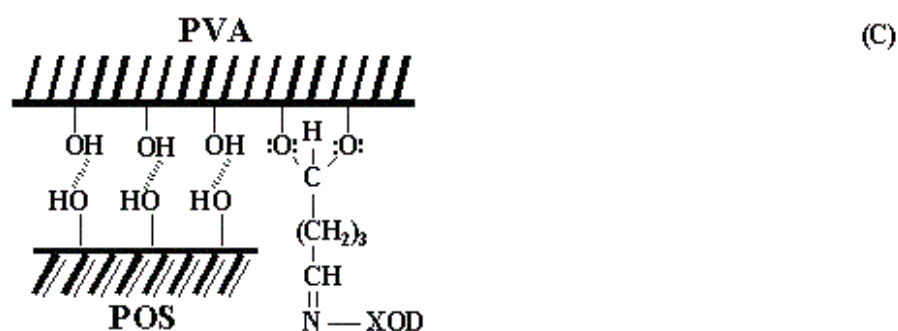


Figure 1 – Polysiloxane synthesis from the hydrolysis and condensation of tetraethylorthosilicate (TEOS) and its interaction with polyvinyl alcohol (PVA). Adapted according to Uragami et al. (2002).

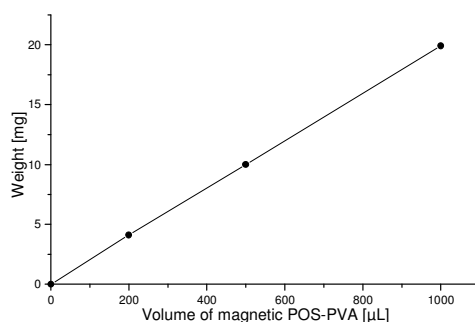


Figure 2. Relationship between the volume and the weight of the magnetic POS-PVA particles suspension.

Figure 3 shows that the optimum pH of the immobilized XOD on the magnetic POS-PVA particles (8.8) is higher than that found for the soluble enzyme (8.2), whereas Figure 4 displays that the optimum temperature for the immobilized enzyme (45°C) is lower than that estimated for the soluble one (55°C).

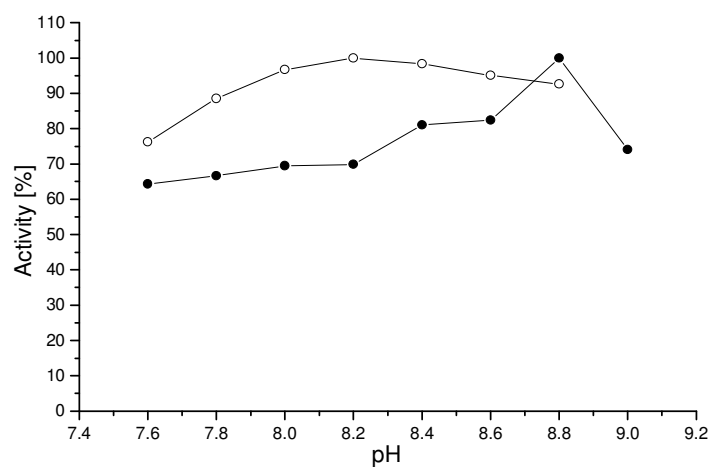


Figure 3: Effect of the pH on soluble (○) and immobilized XOD (●) on POS-PVA activity.

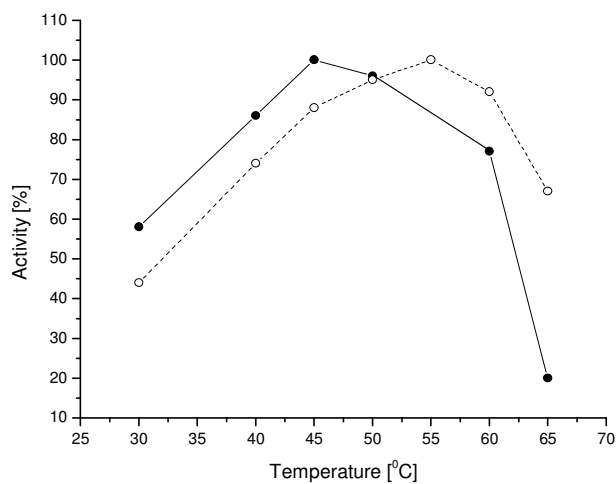


Figure 4: Effect of the temperature on the soluble (○) and immobilized XOD (●) on POS-PVA activity.

The Michaelis constant (K_m) calculated for the immobilized and soluble were 8.42 μM and 7.94 μM , respectively, and this difference showed to be not statistically different.

Figure 5 depicts the reuse of the immobilized XOD on magnetic POS-PVA. There was no decrease of activity after five reuses and only 17% was lost at the tenth reuse.

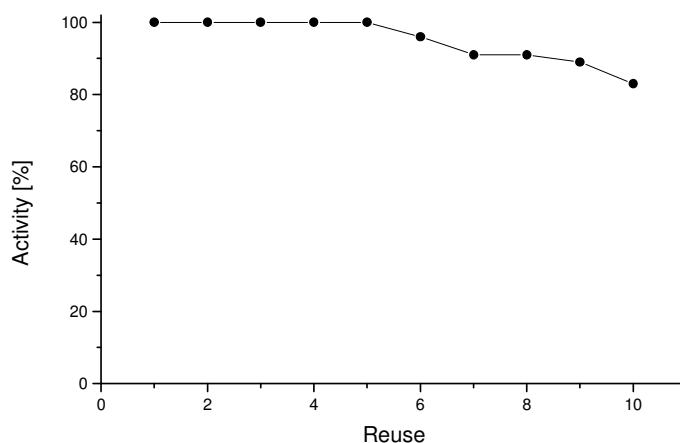


Figure 5: Retained activity after reuse of the immobilized XOD on POS-PVA.

XOD is recognized to have a large specificity so that can catalyze the oxidation of about one hundred compounds (Bray, 1962). The conversion of hypoxanthine to xanthine and from xanthine to uric acid are physiologically catalyzed by XOD. This pathway belongs to the purines catabolism and is shown in Figure 6. It is worthwhile to notice that the enzyme firstly attacks the carbon atom number two of the molecule and afterwards the number 8.

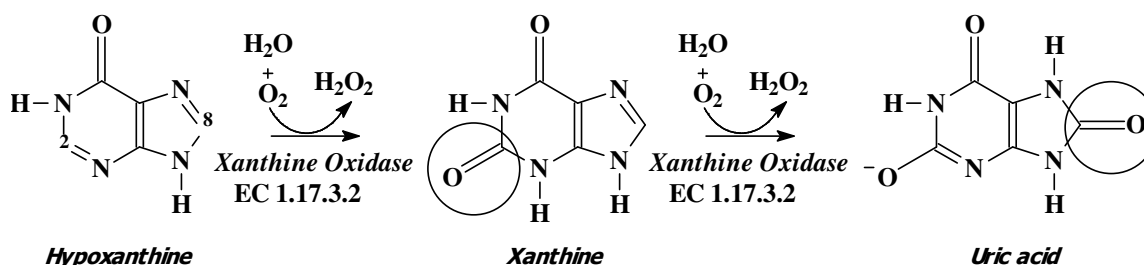


Figure 6. Oxidative pathway of Hypoxanthine catalyzed by XOD.

Another oxidative pathway catalyzed by XOD is that related to the 6-mercaptapurine catabolism, important chemical used in leukemia treatment. Figure 7 depicts the two possible ways, namely, the XOD firstly recognizing the carbon atom either number two or number eight of the 6-mercaptapurine. The appearance of either 6-thioxanthine or 6-mercapto-8-hydroxypurine (intermediates) can be spectrophotometrically detected based on the best points of the spectra of all involved compounds. Therefore, the formation of 6-mercapto-8-hydroxypurine, 6-thioxanthine and 6-thiouric acid can be followed at 240 nm, 256 nm, 308 nm and 340 nm, respectively (Bergman & Ungar, 1961). However, the alternative way through the 6-thioxanthine does not seem to occur (Bergman & Ungar, 1961). Differently from the hypoxanthine pathway, XOD firstly recognizes the

carbon atom number 8 of 6-mercaptopurine, forming 6-mercpto-8-hydroxypurine, and then attacks the carbon number 2, producing the 6-thiouric acid. This behavior may be ascribed to the specific properties of the sulfur atom which exhibits only a weak tendency to form hydrogen bonds and thus resists transformation into a tautomeric form, analogous to the activated form of hypoxanthine. In the absence of such an activation process, the polarity of the molecule in the ground state, becomes the decisive factor for orienting the enzymatic attack, namely, for the primary attachment of an hydroxyl ion.

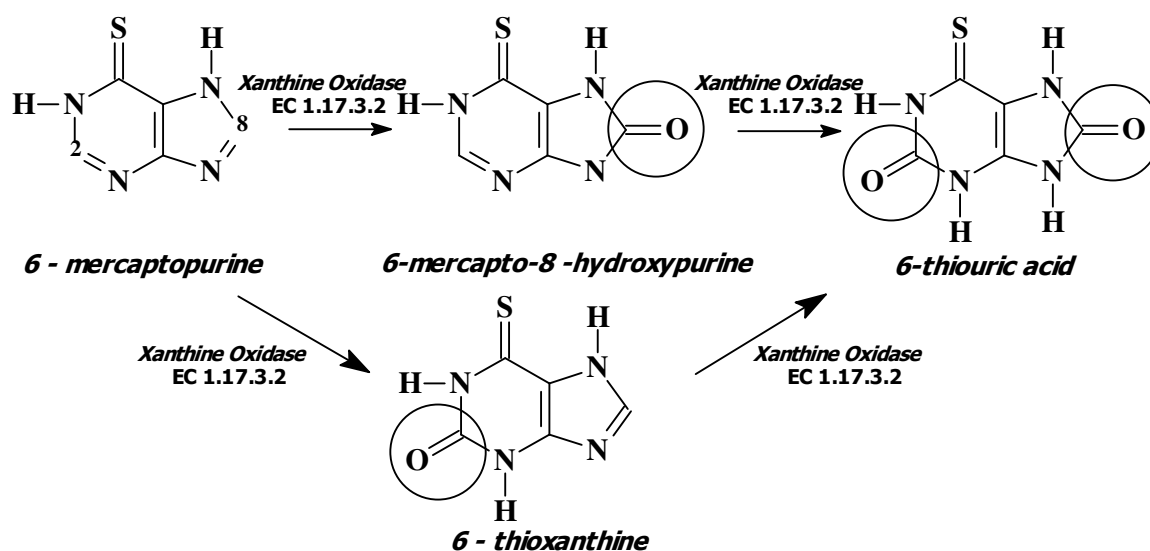


Figure 7. Oxidative pathway of 6-mercaptopurine catalyzed by XOD.

The 6-mercaptopurine oxidative pathway catalyzed by the immobilized xanthine oxidase has been shown to occur according to the matrix. For instance, immobilized XOD acts similar to the soluble enzyme for the derivatives synthesized with polyacrylamide, polyamide and polyaniline. On the other hand, the derivatives synthesized with chitosan, carboxymethyl cellulose and Dacron (polyethyleneterephthalate) does not recognize the

carbon atom number 8 so that the intermediate compound, 6-mercapto-8-hydroxypurine, becomes the final product and 6-thiouric acid is not formed.

Figure 8 displays the time course of the immobilized XOD on magnetic POS-PVA followed at the wavelengths 240 nm, 256 nm, 308 nm and 340 nm. These results suggest that the 6-mercaptopurine oxidation pathway is as follows: 6-mercaptopurine $\rightarrow$ 6-mercapto-8-hydroxypurine $\rightarrow$ 6-thiouric acid. There is no 6-thioxanthine formation because no absorbance decrease was detected at 308 nm. Therefore, one can assume that the immobilized XOD on magnetic POS-PVA catalyzes the oxidation 6-mercaptopurine as the soluble enzyme.

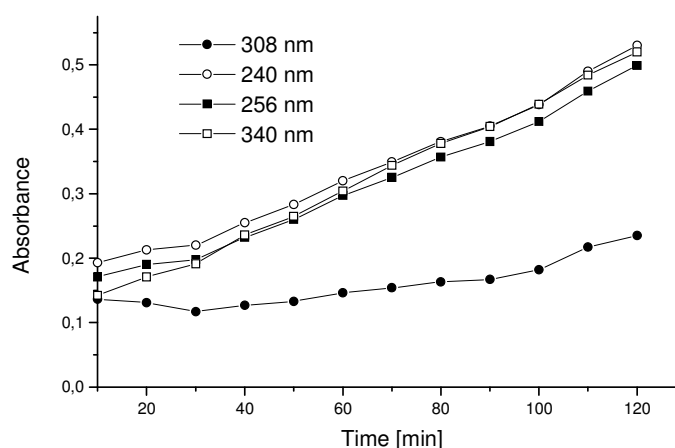


Figure 8. Time course of the 6-mercaptopurine oxidation catalyzed by immobilized XOD on magnetic POS-PVA.

From the above results one can conclude that an attractive water insoluble derivative of xanthine oxidase can be synthesized by using a magnetic semi-interpenetrated network composed of polysiloxane and polyvinyl alcohol as a matrix. This preparation

presents the following advantages: easy synthesis, low cost, reusable and can be easily removed from the reaction medium by a magnetic field.

Acknowledgements

The authors are thankful to CNPq for the financial support.

References

- Agüí L, Manso J, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM (2005) Amperometric biosensor for hypoxanthine based on immobilized xanthine oxidase on nanocrystal gold-carbon paste electrodes. *Sensors and Actuators*. (available on line at www.sciencedirect.com)
- Araújo AM, Neves Jr MT, Azevedo WM, Oliveira GG, Ferreira Jr DL, Coêlho RAL, Figueiredo EAP, Carvalho Jr LB (1997) Polyvinyl alcohol-glutaraldehyde network as a support for protein immobilization. *Biotechnol Tech*. **11**: 67-70.
- Banu S, Greenway GM, Wheatley RA (2005) Luminol chemiluminescence induced by immobilised xanthine oxidase *Analyt Chim Acta*. **541**: 91-97.
- Barbosa RMN, Oliveira EA, Melo EHM, Nadruz Jr W, Carvalho Jr LB (1995) Action of Immobilized xanthine oxidase on purines. *Braz J Med Biolog Research*. **28**: 291-295.
- Barros AEL, Almeida AMP, Carvalho Jr LB, Azevedo WM (2002) Polysiloxane/PVA-glutaraldehyde hybrid composite as solid phase for immunodetections by ELISA. *Braz J Med Biolog Research*. **35**: 459-463.
- Bergmann F, Ungar H (1961) The Enzymatic Oxidation of 6-Mercaptopurine to 6-Thiouric Acid. *Journal of the American Chemical Society*, **82** (15): 3957-3960.
- Bray RC (1962) Xanthine oxidase. In: Boyer PD, Lardy N & Myrback K (Editors) *The Enzymes*. Academic Press, New York, pp. 553-556.

- Brinker C. J. and Scherer G. W (1990) Sol-Gel Science - The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing, New York, Academic Press.
- Coêlho RAL, Jaques GA, Barbosa AD, Velazquez G, Montenegro SML, Azevedo WM, Carvalho Jr. LB (2002) Magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol composite as solid-phase in chemiluminescent assays. *Biotechnology Letters*, **24**: 1705-1708.
- Hu SS, Xu CL, Luo JH, Luo J, Cui DF (2000) Biosensor for detection of hypoxanthine based on xanthine oxidase immobilized on chemically modified carbon paste electrode. *Analyt Chim Acta*, **412 (1-2)**: 55-61.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-t4. *Nature*, **227 (5259)**: 680
- Nadruz Jr W, Marques ETA, Azevedo WM, Lima-Filho JL, Carvalho Jr LB (1996) Immobilization of xanthine oxidase on a polyaniline silicone support. *Braz J Med Biolog Research*. **29**: 347-350.
- Özer N, Müftüoğlu M, Ataman D, Ercan A, Ögüs IH (1999) Simple, high-yield purification of xanthine oxidase from bovine milk. *J Biochem Biophys Meth*. **39**: 153-159.
- Sedmak JJ and Grossberg SE (1977) A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie blue G-250. *Anal. Biochem*. **79**: 544-552.
- Tramper J, Müller, Van Der Plass HC (1978) Immobilized xanthine oxidase: kinetics (in)stability and stabilization by co-immobilization with superoxide dismutase and catalase. *Biotechnol. Bioeng*. **20**: 1507-1522.
- Uragami T, Okazaki K, Matsugi H, Miyata T (2002) Structure and Permeation Characteristics of an Aqueous Ethanol Solution of Organic-Inorganic Hybrid Membranes Composed of Poly (vinyl alcohol) and Tetraethoxysilane. *Macromolecules*, **35**: 9156-9163.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, concluímos que a (o):

- XOD foi obtida a partir de leite bovino na fração 38-50% de saturação com sulfato de amônio;
- A enzima foi imobilizada com sucesso em POS-PVA_m-Glut com uma eficiência de 42% e atividade enzimática de 69 mU/mg;
- pH e temperatura ótimos para a XOD imobilizada foram de 8,8 e 45°C, respectivamente;
- Km para a XOD imobilizada foi estimada em 8,42 µM e
- XOD imobilizada foi capaz de catalisar a oxidação da 6-mercaptopurina a ácido 6-tioúrico como a enzima solúvel.

6 ANEXO

Biotechnology Letters

Editor: C. Ratledge

ISSN: 0141-5492 (print version)

ISSN: 1573-6776 (electronic version)

Journal no. 10529

Springer Netherlands

Instructions for Authors

Aims and Scope

Biotechnology Letters is the world's leading rapid publication primary journal dedicated to biotechnology as a whole - that is to topics relating to actual or potential applications of biological reactions carried out by microbial, plant or animal cells and biocatalysts derived from them. All relevant aspects of genetics, molecular biology and cell biochemistry, of process and reactor design, of preand post-treatment steps, and of manufacturing or service operations are therefore included. Contributions from industrial and academic laboratories are equally welcome. Criteria for the acceptance of papers relate to our aim of publishing useful and informative results that will be of value to other workers in related fields. The emphasis is very much on novelty and immediacy in order to justify rapid publication of authors' results.

Manuscript Submission

It is essential that all co-authors of a paper have seen and have agreed to the submission of the paper. A statement to this effect should accompany the submission. Papers may be submitted electronically (see below) or by post. As Biotechnology Letters is a rapid publication journal, we print directly from authors' disks. No proofs are issued to authors. It is therefore imperative that authors ensure their papers are accurate and comply with the following instructions as closely as possible. The Editorial Policy is not to re-write poorly presented papers which will be returned to the authors without assessment. It is a condition of submission of a paper that it is not under consideration whole or in part by another journal nor has it already appeared in print, in whole or in part, in any language, in any other journal.

1. Prepare two error-free manuscripts with two disks, or an e-mail attachment in Word or Wordperfect (not Mac), as well as a covering letter indicating the novelty, urgency or timeliness of your communication. Include copies of any papers referred to as 'in press' or which may have appeared recently and are relevant to the paper under consideration.
2. Mail or e-mail one manuscript to the most appropriate member of the Editorial Board (please see list below), who will then make arrangements for refereeing. Inform the Editor or Editorial Secretary to whom the paper has been sent for review.
3. At the same time, mail one copy with the two disks of the manuscript or email the attachment, to the Editorial Secretary:

Mrs E.J. Sparke
Editorial Assistant for Biotechnology Letters
Department of Biological Sciences
University of Hull
Hull HU6 7RX
U.K.
E-mail: E.J.Sparke@hull.ac.uk

Language

The Editor and members of the Editorial Board are unable to undertake extensive rewriting of poorly written papers. If English is not your first language, we would urge you to have your paper thoroughly checked, preferably by a native English speaker, before it is submitted. Papers not reaching a satisfactory standard will be returned to the authors without assessment.

The maximum printed length of paper in the Journal is normally six pages. There is, however, no limit as to the number of tables or figures that may be used; as long as they will all fit within the limit of six printed pages authors are free to use as many or as few as they consider to be appropriate. The journal's language is English. British English or American English spelling and terminology may be used, but either one should be followed consistently throughout the article. Manuscripts should be printed or typewritten on A4 or US Letter bond paper, one side only, leaving adequate margins on all sides to allow reviewers remarks. Please ensure double-spaced typing of all material, including tables, legends to figures, notes to tables and references. Quotations of more than 40 words should be set off clearly, either by indenting the left-hand margin or by using a smaller typeface. Use double quotation marks for direct quotations and single quotation marks for quotations within quotations and for words or phrases used in a special sense.

title

author(s)

affiliation(s)

the author to whom correspondence is to be addressed should be indicated by an asterisk (*) together with his/her fax number and e-mail address but NOT telephone number, only one author should be listed

key words then leave a space of 4 cm for insertion (by Editor) of handling dates

Title

This must be informative and give key details of the work described. Do not use phrases such as "The effect of..." or "Study of ...". Please give an explicit clear title and include mention of the biological system being used.

Abstract

Please provide a short abstract that will occupy not more than 5 printed lines in the final printed paper. The abstract should not contain any undefined nonstandard abbreviations or unspecified references. Imprecise or qualitative statements should be avoided as should redundant words and phrases. Quantitative values of key data should always be given. Please avoid beginning with a phrase such as "This study shows...", or "We show in this paper...".

Symbols and Units

Mathematical units should be set out economically but unambiguously. A solidus (/) can be used for simple fractions or units – for example ml/h – but the double solidus is to be avoided – for example kg/m³h is correct but g/l/h is not. Units can also be given as g l⁻¹ etc. but the style must be consistent. Terms such as ppm are not encouraged; use mg l⁻¹ etc. as appropriate. Concentrations should be given, for example, as g ethanol l⁻¹ not g l⁻¹ ethanol. Uncommon units, symbols and all non-standard abbreviations must be defined at their first appearance but the minimum number of abbreviations is preferred. A list of mathematical terms, if needed, should be provided before the Introduction.

Section Headings

First-, second-, third-, and fourth-order headings should be clearly distinguishable but not numbered.

Appendices

Any supplementary material should be collected in an Appendix and placed before the Reference section.

Notes (footnotes for indicating essential information about the work or origins of the paper

Please use footnotes rather than endnotes. Notes should be indicated by consecutive superscript numbers in the text. A source reference note should be indicated by means of an asterisk after the title. This note should be placed at the bottom of the first typed page.

Introduction

Please keep this as short as possible (usually no more than one typed page); do not give a mini-review of the literature; give key references to recent, relevant publications; historical references are rarely useful. Space is precious - keep it for your results.

Methods

Give information concerning the key protocols only. Avoid describing routine or trivial matters such as how the micro-organisms are maintained, how and when the cultures were sampled. Suppliers of chemicals and manufacturers of equipment should only be given if these are not generally available or are in some way unusual or are crucial for success. Suppliers such as Sigma, Aldrich etc. are given without addresses. There is no need to give references to standard procedures, e.g. Lowry or Bradford methods etc. We encourage authors to place as much relevant information in the footnotes and legends of their tables and figures to increase understanding of these illustrations.

Results

Results given in tables and figures do not need to be described again at length in the text. Focus the reader's attention on your key results. Avoid repetition of the data that is given clearly in the tables and figures. The Results and Discussion sections may be combined. The ideal Results section would simply say: "The results are given in Tables 1 and 2 and further details are shown in Figures 1 and 2."

Discussion

Put your key results into the context of current information, avoid unwarranted or unsupported speculations. Keep your discussion short and focused on explaining the significance of your results.

Tables

Tables should be carefully selected to illustrate key points or data that cannot be easily described in the text. Each table should be numbered consecutively (1, 2, etc.). In tables, footnotes are preferable to long explanatory material in either the heading or body of the table. Such explanatory footnotes, identified by superscript letters, a, b, c etc., should be placed immediately below the table. Please place the title (without abbreviations) at the top on the table itself.

The lay-out of a table should be suitable for printing as either single column (7.5 cm) or double column (16 cm) width. Do not use vertical rulings (lines) and keep horizontal rulings to a minimum. Please ensure 100% relative values are also given in actual, absolute values in a footnote.

Do not quote values beyond the inherent accuracy (or inaccuracy) of the methods. State clearly how many times each complete experiment was done and how many times each individual determination was done. Data given in Tables and Figures should be understandable without recourse to the text: you can add key information regarding experimental procedures in footnotes and omit such details from the Methods section. It is essential that all non-standard abbreviations used in the Table be re-defined. Indicate the approximate position of the Table by a note in the margin of the text.

Figures

Figures should be carefully selected to illustrate key points or data that cannot be easily stated in the text. For example, it is rarely necessary to give a Lineweaver-Burk plot of an enzyme's activity; its K_m and V_{max} values can be easily stated in the text. Similarly with pH and temperature optima for reactions, these can usually be stated within the text. All photographs, graphs, diagrams and schemes should be referred to as a 'Figure' and they should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Multi-part figures should be labelled with upper case letters (A, B, etc.). Scale bars are inserted directly in any photographs or photomicrographs. Relatively small text and great variation in text sizes within figures should be avoided as figures are often reduced in size when printed. Figures will be sized to fit a single column width of the Journal; i.e. 7.5 cm width. Exceptionally, figures may be made to fit a double column width, e.g. 16 cm. Authors must take these sizes into account when designing their figures. All lines on a figure must be of equal thickness and of equal blackness. A detailed legend (without abbreviations) should be provided for each figure. It is preferable to give a full explanation of the protocol being used in the experiment being described in the figure. This information need not then be given in the Methods section. All figures must be referred to in the text; its approximate location in the margin should also be indicated – a handwritten note is acceptable. Please place the legends in the manuscript after the references and tables and on a page separate to the figure(s) themselves. Original or good quality printouts of all figures should be submitted with the manuscript.

Computer-generated printouts should be flawless and on good quality paper. Non-computer generated line figures should be drawn with Indian ink on white matt paper or tracing paper.

Photographs

These must be high-contrast, black and white prints that will show the key details when printed. Colour photographs may be printed without charge in exceptional papers if, in the opinion of the Editor, colour will enhance the illustration. For gels it is often advisable to have a line drawing placed alongside the actual photograph. Do not copy print-outs from recorders or computers attached to instruments - these are rarely of publishable quality. Do not scan-in material as it is impossible for the typesetter to scan-in such material. Avoid making black and white prints from coloured photographs - these do not have sufficient contrast. For photomicrographs, scale bars must be added on the print itself and the magnification given in the legend.

You should also supply the electronic versions of your figures. We prefer figures in TIFF, EPS, PS, PDF and Microsoft Office format. Be aware that we may not be able to use other file formats and that the hard copy may be scanned instead. For vector graphics, EPS is the preferred format. For bitmapped graphics, TIFF is the preferred format. The following resolutions are optimal: line figures - 600 - 1200 dpi; photographs - 300 dpi; screen dumps - leave as is. Colour figures can be submitted in the RGB colour system. Font-related problems can be avoided by using standard fonts such as Times Roman, Courier and Helvetica. Figures should be saved in separate files. The figure legends should be included in the text file.

Acknowledgements

Acknowledgements of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the References.

References

Normally about 15 references is regarded as the maximum number but this is reasonably flexible. References are cited in the text by giving the name(s) of the author or authors up to two and the year. When there are more than two authors, only the first author's name should be given followed by et al. In the event that a cited author has two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a, b etc. after the date to distinguish the works.

Examples:

(Cobley 2005a, b)

(Cobley 2005a, b, Pierce 2003)

(Cobley & Pierce 2002)

(Cobley et al. 2004, 2005)

References to websites should be given within the body of the text and not in the final reference list. References to books, journal articles, articles in collections and conference or workshop proceedings, and technical reports, all of which must be within the public domain, are listed at the end of the article in alphabetical order of the first author's name. Articles in preparation or articles submitted for publication, unpublished observations, personal communications, and any websites being referred to should not be included in the reference list but should only be mentioned in the article text (e.g., T. Moore, personal communication).

References to books should include the authors name; year of publication; title; page numbers where appropriate; publisher; place of publication, in the order given in the example below.

Smith JE (2005) *Biotechnology*, 5th edn. London: Arnold.

References to articles in an edited collection or book should include the authors' names; year of publication; article title; editors' names; title of collection; first and last page numbers; publisher; place of publication, in the order given in the example below.

Smith K, Wesson U (2003) Rotary discharge system. In: Cobley UT, Pierce T, eds. *Bioengineering for Beginners*, Nevada: Boot Hill Press, pp. 69-96.

References to articles in a book series should give the title of the article with the name of the series in full; for example Cobley UT & Pierce T (2002) Improvements in mass transfer systems. *Methods in Bioengineering* 114:122- 149.

References to articles in conference proceedings should include the authors name; year of publication; article title; editor's name (if any); title of proceedings; first and last page numbers; place and date of conference; publisher and/or organization from which the proceedings can be obtained; place of publication, in the order given in the example below. These must be within the public domain and the corresponding ISSN or ISBN should be given.

Shin SH, Chi HJ (2001) Studies of tissue culture of some medicinal plants. In: *Proceedings of the 3rd International Symposium on New Drug Development from Natural Products*, May 2-3, Seoul, pp. 79-80. ISSN 0 521 77074.

References to articles in journals and similar periodicals should include the author's name; year of publication; article title; abbreviated title of periodical; volume number (issue number where appropriate); first and last page numbers, in the order given in the example below. The correct abbreviations of journals should be given according to Chemical Abstracts or J. Biol. Chem.

Selmi B, Gontier E, Ergon F, Thomas D (1997) Enzymatic synthesis of tricaprylin in a solvent-free system: lipase region-specificity as controlled by glycerol adsorption on silica gel. *Biotechnol. Tech.* 11: 543-547. References to technical reports or doctoral dissertations, which also must be within the public domain, should include the author's name; year of publication; title of report or dissertation; institution; location of institution, in the order given in the example below.

Smith J (2005) Adhesion and immobilization of bacteria. PhD Thesis. Glasgow, UK: Strathclyde University.

General Points

Reproducibility of results:

The number of times a complete experiment has been carried out, together with the number of samples analysed on each occasion, should be indicated either in the Methods or in the Tables or Figures. The range of values should be indicated by $\pm$ in a table, or by an error-bar in a figure. Standard deviations (S.D.) should be given when appropriate.

Accuracy:

All values should be quoted within the experimental accuracy of the protocol being used, taking into account the type of analysis and instrumentation being used.

Please avoid using 'reduce' when you mean 'decrease' or 'lower' particularly in the context where there may be (bio)chemical reductions.

Units: please always leave a space between the number and the unit; e.g. 37 °C not 37°C.

Avoid 'ppm' and where possible '%' but give as mg/l or g/l etc. SI units and permitted alternatives are to be used. Use correct abbreviations for standard units: h not hr, g not gr etc. If you use % always state if v/v, w/v, v/w or w/w. Abbreviations are never made plural. Do not use normalities for solutions; molarities (M) should be given instead.

Avoid redundant words or phrases such as 'a blue colour', 'at a temperature of 30°C', 'at a wavelength of 340 nm', 'at a concentration of 2 g/l etc.' (Blue is a colour and does not need stating!) Also phrases such as 'It was observed that...' are also redundant and may, without exception, be deleted.

Concentrations are given as 10 g ethanol/l not 10 g/l ethanol; 5 mg kanamycin/ml etc. Mixtures of solvents are given as chloroform/methanol (2:1, v/v) or methanol/water/acetic acid (60:35:5, by vol.).

For presentation of cell growth, please give as dry weight values for both microbes and plant cell cultures. Optical densities (or turbidities) must be converted to the corresponding cell dry wt values. Please do not say "exponential (or logarithmic) growth" unless you have clear data to support that such rates were achieved. Most frequently, arithmetic growth rates are attained in most cell growth systems.

Please use non-standard abbreviations sparingly: these confuse more often than not and are unlikely to save more than 1 or 2 lines of space in the whole paper. Only use if they are replacing lengthy phrases or chemical names.

Checklist

A Checklist for authors is now provided in each issue of the Journal. This should be completed by the submitting author and included with the paper.

Proofs

No proofs are issued to authors. It is therefore imperative that the text of a submitted paper be thoroughly checked before submission. Proofs are, however, checked by the publisher (not the editor).

Offprints

Fifty offprints of each article will be provided free of charge. An order form for additional offprints will be sent to the corresponding author. The corresponding author receives a copy of the issue containing her/his article free of charge.

Page Charges and Colour Figures

No page charges are levied on authors or their institutions. Colour figures can be published without charge if the Editor agrees that the use of colour is essential. Otherwise the cost of colour printing has to be passed on to the author who will be contacted regarding costs and invoicing.

Copyright

Authors will be asked, upon acceptance of an article, to transfer copyright of the article to the Publisher. This will ensure the widest possible dissemination of information under copyright laws.>

Permissions

It is the responsibility of the author to obtain written permission for a quotation from unpublished material, or for all quotations in excess of 250 words in one extract or 500 words in total from any work still in copyright, and for the reprinting of figures, tables or poems from unpublished or copyrighted material.

Springer Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please click on the link below to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will publish as regular subscription model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.