

INVERTASE DE LEVEDURA DE PÃO: CONCENTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO, ESTABILIDADE E ELETROFORESE

ALINE FARIAS ROSSLER¹; LUISA KNUTH NEVES; MARCELA VEGA FERREIRA; CESAR VALMOR ROMBALDI; WALTER AUGUSTO RUIZ²; RICARDO PERAÇA TORALLES³

¹*Instituto Federal Sul-rio-grandense campus Pelotas – alinerrossler@yahoo.com.br*

²*Instituto Federal Sul-rio-grandense campus Pelotas; Universidade Federal de Pelotas;
Universidade Federal do Rio Grande – marchii20@yahoo.es*

³*Instituto Federal Sul-rio-grandense campus Pelotas – toralles@pelotas.if sul.edu.br*

1. INTRODUÇÃO

O açúcar invertido é uma mistura equimolar de glicose e frutose obtido da hidrólise ou inversão da sacarose. A hidrólise enzimática da sacarose é preferível à hidrólise ácida, uma vez que não resulta na formação indesejável de sabor, assim como impurezas coloridas características do escurecimento não enzimático e subsequente formação de HMF, que são compostos cancerígenos (RODRIGUES, 2000). Invertase ou β -D frutofuranosidase (EC 3.2.1.26) é uma enzima que catalisa a hidrólise da ligação glicosídica entre D-glicose e D-frutose, terminal não redutor do resíduo β -D-frutofuranosídeo (C2-O) em frutofuranosídeos (VITOLO et al., 2004). Esta enzima é encontrada em leveduras, sobretudo na espécie *Saccharomyces cerevisiae*, invertebrados, vertebrados, algas verdes, bactérias, vegetais e fungos. O objetivo desse trabalho foi estudar o efeito da concentração do extrato, da purificação e da estabilidade na atividade da invertase extraída de levedura comercial bem como identificar as isoenzimas por eletroforese. Tal estudo será usado como protocolo e testemunha para trabalhos futuros que estão sendo desenvolvidos para invertase extraída de levedura de pêssego.

2. METODOLOGIA

Os extratos enzimáticos foram obtidos usando o método de extração com bicarbonato de sódio 0.1M por 24h a 40°C e 200 rpm. O progresso da reação foi acompanhado por incremento na absorbância a 490 nm, utilizando a reação com DNS para estimativa colorimétrica da quantidade de glicose produzida a partir da inversão da sacarose mediada pela invertase como descrito em Toralles et al. (2014) e o teor de proteína pelo método de Lowry et al. (1951). Para avaliar o efeito da diluição do extrato na atividade, usou-se extrato bruto diluído em água nas seguintes proporções: 1:2, 1:10, 1:100 e 1:1000. O estudo da recuperação da atividade da invertase de levedura de pão (ILP) foi conduzido por precipitação do extrato bruto em solventes orgânicos: acetona e álcool. A estabilidade da invertase do extrato bruto e purificado de ILP foram estudados durante 30 dias de armazenamento a -20 e 6°C. Os extratos recuperados foram utilizados para detecção das isoenzimas por eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida 6%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da concentração do extrato bruto

Na Figura 1 tem-se os resultados do efeito da concentração do extrato enzimático bruto, em diferentes diluições, na atividade da ILP. A maior atividade foi observada na diluição de E1/10 com 202 U.mL^{-1} e $930 \mu\text{g.mL}^{-1}$ proteína. Para diluição E1/1000, tanto o teor de proteína ($91 \mu\text{g.mL}^{-1}$) quanto a concentração de açúcares redutores (25 mg.mL^{-1}) ficaram abaixo dos limites de quantificação que são, respectivamente, $242 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e 108 mg.mL^{-1} .

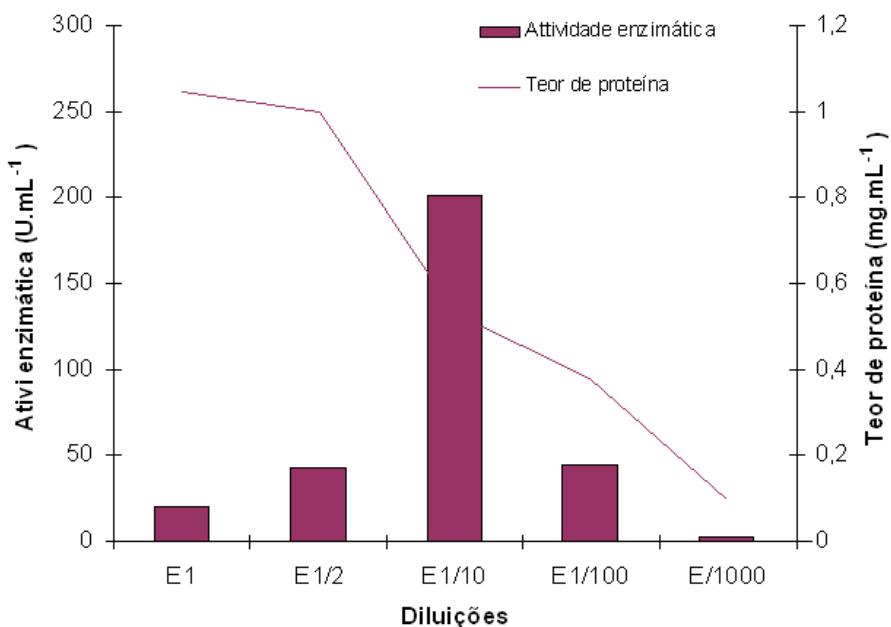


Figura 1. Efeito da diluição na atividade da invertase.

Purificação parcial da invertase

A recuperação com acetona foi superior do que com álcool para ILP, com uma atividade de 147 U.mL^{-1} e com uma recuperação de 72%.

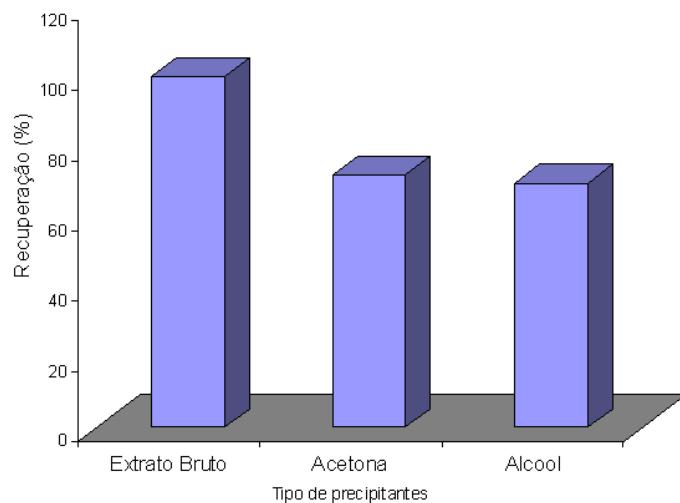


Figura 2. Efeito da adição de acetona e álcool na recuperação da atividade da invertase.

Estabilidade da invertase

Após 30 dias armazenados a -20°C, observou-se uma perda de cerca de 5% da atividade tanto para o extrato bruto como para o extrato purificado com acetona para ILP e 14% para o extrato purificado com álcool (Figura 3). O extrato bruto de ILP, quando armazenado a 6°C, observou-se uma perda superior a 55% após 30 dias (Figura 3).

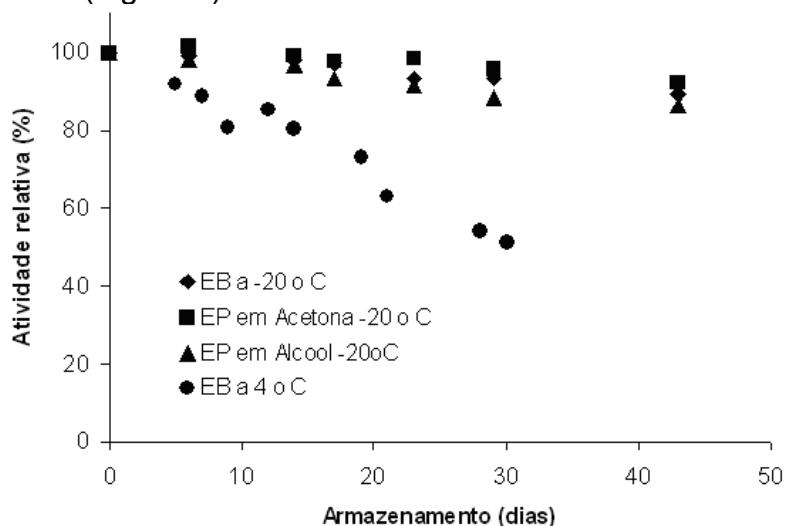


Figura 3. Estabilidade da invertase de pão: extra bruto a 4°C (●), extra bruto a -20°C (▲), extrato purificado em acetona -20°C (■), extrato purificado em álcool -20°C (◆).

Na eletroforese, as partículas de natureza proteica do extrato, migraram para o ânodo. Tal comportamento é característico de um zwitterion negativo tamponado em pH básico. Andjelkovic et al. (2010) em seus estudos com invertase extraídas de células de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando uma metodologia de extração semelhante à desse trabalho, mostraram a existência de quatro isoformas de invertase extracelular. Assim, três bandas proteicas foram identificadas e, possivelmente, três isoenzimas foram detectadas, preliminarmente (Figura 4).

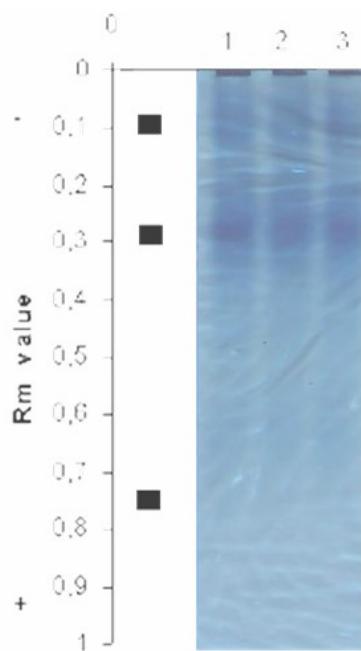


Figura 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida 6% usando como tampão de corrida LiOH-H₃BO₃ em pH 8, 90 volts e 2 horas de separação.

4. CONCLUSÕES

A recuperação é superior para invertase extraída de levedura de pão com acetona como agente precipitante. Após 30 dias armazenamento dos extratos de ILP, a estabilidade é superior a -20°C do que 6°C, sendo que o extrato purificado com acetona se manteve mais estável. Na eletroforese, três isoenzimas foram detectadas, preliminarmente. As técnicas utilizadas mostram-se práticas, exatas e precisas e pode serem estendidas para invertase extraída de levedura de pêssego.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDJELKOVIĆ, U.; PIĆURIĆ, S.; VUJČIĆ, Z. Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. **Food Chemistry**, n. 120, p 799-804, 2010.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALLI, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

RODRIGUES, M. V. N.; RODRIGUES, R. A. F.; SERRA, G. E. ANDRIETTA, S. R.; FRANCO, T. Produção de xarope de açúcar invertido obtido por hidrólise heterogênea, através de planejamento experimental. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n.1, p.103-109, 2000.

TORALLES, R.P.; KUHN, C. R.; SILVA, P.S.; RUIZ, W.A. Extração e caracterização parcial de invertase de levedura de purê e resíduo de pêssego. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Paraná-UTFPR, 2014.

VITOLO, M. Tópicos de Enzimologia Industrial. In: Enzimas como agentes biotecnológicos. Said, S e Pietro, R. C. L. R. Eds, Ed. Legis Summa. Ribeirão Preto, 2004.