

## IMOBILIZAÇÃO E CINÉTICA DA INVERTASE DE LEVEDURA DE PÃO EM AGAROSE

MARCELA VEGA FERREIRA<sup>1</sup>; ALINE FARIAS ROSSLER; RICARDO PERAÇA TORALLES; WALTER AUGUSTO RUIZ<sup>2</sup>; CÉSAR VALMORE ROMBALDI<sup>3</sup>

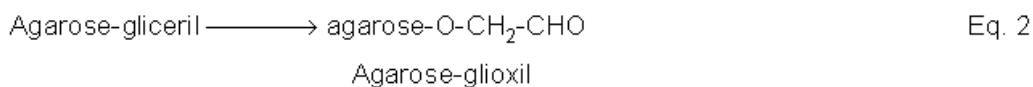
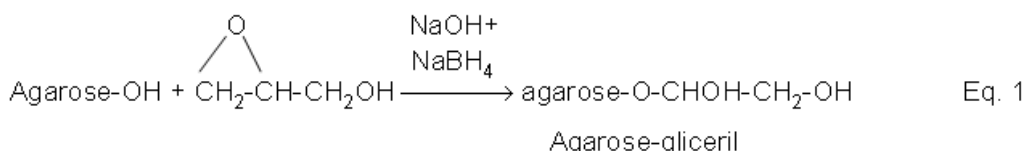
<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – marchii20@yahoo.es

<sup>2</sup>Instituto Federal Sul-rio-grandense campus Pelotas; Universidade Federal do Rio Grande

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – cesarvrf@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

Uma alternativa para produção de açúcar invertido é a hidrólise enzimática usando invertase imobilizada. As invertases de origem microbiana têm sido bastante estudadas, especialmente de *Saccharomyces cerevisiae*. A imobilização consiste em reter ou ligar enzimas ou sistemas enzimáticos em uma região definida do espaço, normalmente um suporte. Nesse processo é importante preservar a atividade catalítica, de modo a permitir seu uso de maneira repetida e contínua. A imobilização da invertase ocorre principalmente por adsorção ou ligação covalente em um suporte ou aprisionamento em membranas (KOTWAL e SHANKAR, 2009). Neste trabalho escolhemos uma imobilização por ligação covalente a um suporte que pode ser explicada resumidamente em duas etapas. A primeira etapa envolve a reação da agarose com o glicidol em presença de NaOH e NaBH<sub>4</sub> resultando agarose-gliceril (Eq. 1) e sua oxidação em presença de periodato de sódio para dar gel de agarose-glioxil (Eq. 2), que é o suporte pronto para imobilizar a invertase. Este tipo mecanismo confere uma maior estabilidade, dificultando a soltura da enzima do suporte e permitindo a utilização de substrato mais concentrado (CARAVANTE, 2013).



Comercialmente, a imobilização permite aproveitar a atividade enzimática por mais tempo, montar um biorreator com enzimas imobilizadas, melhorar a estabilidade de enzima, operar de forma contínua, entre outras (GUISAN, 2006).

O objetivo deste trabalho foi estudar o processo de imobilização da invertase obtida de levedura pão imobilizada em suporte de agarose-glioxil. As variáveis selecionadas foram: estabilidade da enzima livre, carga de proteína ofertada ao suporte, quantidade de suporte e pH de imobilização. Também estudou-se o efeito da concentração da sacarose na atividade da invertase livre e imobilizada.

### 2. METODOLOGIA

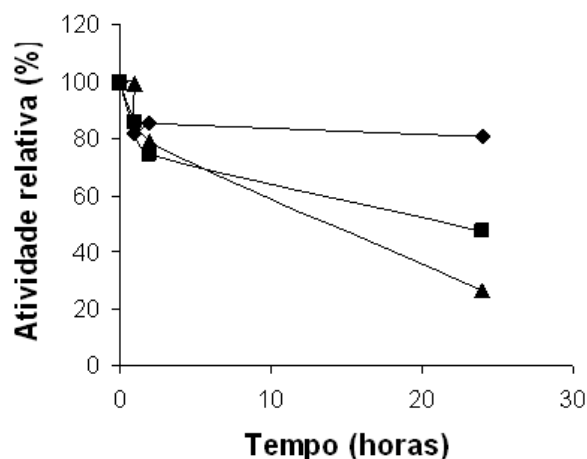
O extrato enzimático foi obtido usando extração com NaHCO<sub>3</sub>, conhecido como autólise. Para cada 100g de levedura, são utilizados 300mL de solução de NaHCO<sub>3</sub> 0.1M a 40 °C e 200 rpm. O suporte agarose-glioxil foi preparado por esterificação da agarose com glicidol e posterior oxidação com periodato de

sódio, Conforme equações 1 e 2 descritas anteriormente. As quantidades e a técnica estão descritas em Komesu (2009). A eficiência da formação do suporte de agarose-glioxil, foi determinado pelo periodato ( $\text{IO}_4^-$ ) não consumido na reação de oxidação dos grupos gliceril. A evolução da oxidação foi acompanhada pela medida da absorbância a 560 nm que foi definida por varredura, usando um sistema reacional contendo KI,  $\text{NaHCO}_3$  saturado com adição de  $\text{NaIO}_4$ . A imobilização da invertase em agarose-glioxil foi realizada a 25°C, 50 rpm durante 24h em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 e tampão bicarbonato de sódio 100 mM pH 10. Uma alíquota de 1mL do meio reacional contendo tampão de imobilização e enzima foi retirada para medida de atividade inicial (branco de imobilização). Adicionou-se na suspensão de imobilização boroidreto de sódio (1 mg /mL suspensão), durante 30 minutos com agitação (100 rpm), 25 °C, com posterior centrifugação e reconstituição com tampão acetato de sódio 200mmol/L pH 5. A atividade da invertase livre e imobilizada foram acompanhadas por estimativa colorimétrica da glicose usando 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e sacarose como substrato. A hidrólise foi conduzida 25 °C e pH de 5 como definido por Toralles et al. (2014). A concentração de proteínas foi determinada pelo método Lowry.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Estabilidade da enzima livre em diferentes pHs

A estabilidade da invertase avaliada durante 24 horas, a 25°C e 50 rpm, todos extratos na mesma diluição de 10% v/v, teve como objetivo avaliar a perda de atividade da enzima livre. Após 24 horas de incubação, o extrato diluído em água reteve 80% de sua atividade inicial, seguido do extrato diluído em pH 10, retraindo 49% da atividade da invertase.



**Figura 1.** Estabilidade da invertase de levedura de pão. Os extratos purificados foram diluídos em (◆) água, (■) em pH 10 e (▲) em pH 7. Todos foram incubados durante 24 horas a 25°C e 50 rpm, com uma diluição final de 10% v/v.

#### Parâmetros de imobilização para invertase de levedura de pão

Na Tabela 1 tem-se os parâmetros de imobilização da invertase de levedura de pão utilizando gel de agarose-glioxil como suporte. Pode-se observar que na “carga” oferecida de proteína de 5,6 mg por grama de gel, em pH 10, foi onde se observou melhor rendimento de imobilização (44,7%), mas a carga 1,4 e

pH 10 favoreceram a recuperação de atividade. Por outro lado, a maior atividade foi observada em pH 7,0.

Tabela 1. Rendimento de imobilização (RI), atividade recuperada (AR) para diferentes cargas de proteínas oferecidas ao suporte de agarose-glioxil, com pH 7 e 10, de imobilização a 25°C e 50 rpm.

Gel <sup>a</sup> (g)	Carga <sup>b</sup> (mg/g gel <sup>-1</sup> )	pH	Recuperação (%)	RI (%)	Atividade (U.mL <sup>-1</sup> )	Atividade (U.g gel <sup>-1</sup> )
0,00	14,1	7,0	100,0	0	316,9	---
2,50	5,6	7,0	2,3	29,6	7,40	74,4
5,00	2,8	7,0	11,4	37,1	36,0	180,2
0,00	14,1	10,0	100	0	35,9	---
2,50	5,6	10,0	30,3	44,7	10,9	108,7
5,00	2,8	10,0	46,4	37,5	16,7	83,3
10,0	1,4	10,0	47,4	30,9	17,0	42,5

<sup>a</sup>Gel= gel de agarose-glioxil; <sup>b</sup>Carga= carga oferecida de proteína (mg) por gel de agarose-glioxil (g).

### Parâmetros cinéticos para invertase livre e imobilizada

Os parâmetros cinéticos para a velocidade de inversão da sacarose foram determinados para invertase de levedura de pão livre e imobilizada por regressão não linear (Tabela 2) e observou-se um comportamento michaeliano para todos os casos da tabela 1, com exceção para carga de 2,8 e pH=10 (dados não mostrados). Para extrato bruto da invertase livre, o valor de  $K_m$  foi cerca de 24 mM sacarose (Tabela 2) que é muito próximo ao encontrado por Andjelković et al. (2010) para mesma invertase de *S. cerevisiae*. Por outro lado, para o extrato purificado em acetona, o valor é cerca de quatro vezes menor, 6 mM. Tal fato indica que a purificação melhora a afinidade pela sacarose.

Com relação a invertase imobilizada, a afinidade foi maior em pH 7 do que em pH 10 quando comparamos os valores  $K_m$ . Os valores  $V_{m\max}/K_m$ , que é chamado de coeficiente de especificidade, foram de cerca de 211 e 112 U.mg<sup>-1</sup>.mM<sup>-1</sup>, respectivamente, indicando que a invertase imobilizada, em suporte de agarose-glioxil em pH 7, tem cerca do dobro de especificidade do que a imobilizada em pH 10. Emregul et al. (2006), trabalhando com imobilização em gel de poliácridamida em pH 7,2, encontraram 86 mM e 166 mM para invertase livre e imobilizada, respectivamente. Eles alegaram que o aumento de cerca de 1,92 no valor de  $K_m$  pode ser devido ao limitado acesso das moléculas de sacarose ao sítio ativo da enzima imobilizada. Tal fato pode ser a sua distribuição ao longo da camada do polímero utilizado para imobilização e sua modificação conformacional.

Tabela 2. Constante de Michaelis ( $K_m$ ) e velocidade máxima ( $V_{m\max}$ ) da invertase de levedura comercial livre e imobilizada

Parâmetros	Enzima Livre		Enzima Imobilizada	
	Extrato bruto <sup>b</sup>	Purificado	pH=7	pH=10
$K_m^a$ (mM)	23,98 ± 3,25**	6,61 ± 0,14**	5,95 ± 0,27**	13,6 ± 2,03**
$V_{m\max}^a$ (U.mg <sup>-1</sup> )	47,31 ± 2,25**	389 ± 2,30**	211 ± 2,01**	112 ± 5,23**
$V_{m\max}/K_m$	1,97	58,8	35,4	8,23
$R^2$	0,97	0,99	0,90	0,92

<sup>a</sup> valor ± intervalo de confiança a p=0.05. \*\*Significativo (p≤0,01). <sup>ns</sup> Não significativo.

<sup>b</sup> valor publicado por Toralles et al. 2014

#### 4. CONCLUSÕES

Nas condições de imobilização (24 horas, 25°C e 50 rpm), a invertase livre é mais estável em pH=10. Também nesse pH é maior a recuperação da atividade após sua imobilização e maior o rendimento para carga ofertada de 2,8 miligramas de proteína por grama de gel, mas sem comportamento michaeliano para essa carga. Quando comparadas com extrato bruto, pode-se afirmar que a purificação aumenta 3-4 vezes a afinidade pela sacarose e 25 vezes a especificidade. Entre as imobilizadas, a afinidade é maior em pH=7.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CARAVANTE, A.L.C. **Produção de açúcar invertido utilizando biorreator com invertase imobilizada em sabugo de milho**. 2013. 46f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Curso de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- UNESP.

EMREGUL, E.; SUNGUR, S.; AKBULUT, U. Polyacrylamide-gelatine carrier system used for invertase immobilization. **Food Chemistry**, n.97, p.591-597, 2006.

GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. Totowa: Humana, 2006. 2v.

KOMESU, A.; ADRIANO, W. S.; TARDIOLI, P.W.; GIORDANO, R.C. Imobilização da enzima xilanase em agarose e quitosan utilizando diferentes protocolos de ativação. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA DA UFU**, 8., Uberlândia, Minas Gerais-BR. 2009.

KOTWAL, S.M.; SHANKAR, V. Immobilized invertase. **Biotechnology Advances**, v.27, p.311-322, 2009.

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, v.08, n. 02, p.1399-1415, 2014.