

EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO, ANÁLISE CINÉTICA E ELETROFORÉTICA DE INVERTASE DE *Candida guilliermondii* DE RESÍDUO DE PÊSSEGO

TARIANI LEMOS DE AVILA¹; MARCELA VEGA FERREIRA²; WALTER A. RUIZ³; CESAR VALMOR ROMBALDI⁴; RICARDO PERAÇA TORALLES⁵

¹Instituto Federal Sul-rio-grandense – tarianilemos@hotmail.com

^{2,4}Universidade Federal de Pelotas

³Fundação Universidade do Rio Grande

⁵Instituto Federal Sul-rio-grandense – toralles@pelotas.ifsul.edu.br

1. INTRODUÇÃO

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 (CANTARELLA et al., 2003). A principal aplicação é seu alto poder catalítico na hidrólise da sacarose, produzindo uma mistura de glicose e frutose chamada açúcar invertido, que é usado nas indústrias de alimentos e farmacêutica. Além das leveduras, sobretudo na espécie *S. cerevisiae*, as invertases são também encontradas em invertebrados, vertebrados, algas verdes, bactérias, vegetais e fungos (OLIVEIRA et al., 2006; GOULART et al., 2013).

Em *S. cerevisiae* foram identificadas 2 diferentes formas de invertase: uma não glicosilada, que se encontra no citoplasma, e outra localizada no espaço periplasmática, que é glicosilada, se encontra ligada à parede celular da levedura, sendo a extracelular a forma predominante (BOFO et al., 2005; CANTARELLA et al., 2003). A *Candida utilis* também apresenta essas duas isoformas (GUIMARÃES et al., 2007).

Recentemente em purê de pêssago e seus resíduos já foram identificados e quantificados vários micro-organismos em diferentes etapas do processamento, destacando-se a levedura *S. cerevisiae* com potencial fermentativo e resitência térmica significativa (LOPEZ et al. 2014); também com potencial para produção de invertase (FERREIRA et al. 2016).

O objetivo desse trabalho foi estudar o efeito do pH, da temperatura e concentração de sacarose na atividade da invertase de *C. guilliermondii* (ICg) extraída de resíduo de pêssago e recuperada por precipitação com acetona bem como identificar as isoenzimas por eletroforese.

2. METODOLOGIA

A *C. guilliermondii* foi extraída de resíduo de pêssago e identificada pelo sistema API 20C AUX, seguido de cultivo em batelada como descrito por Ferreira et al., 2016, com posterior liofilização das colônias para extração da enzima.

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.

A recuperação da invertase foi feita através de precipitação das proteínas com acetona seguido de diálise. Os extratos recuperados foram utilizados para detecção das isoenzimas por eletroforese horizontal em gel de poli(acrilamida) 6% e usando BSA como marcador de proteína. As isoenzimas foram identificadas em um

sistema contendo 2% de sacarose em pH 5, com nitroblue tetrazolium e phenazine metasulfate. Também se estudou o efeito do pH (3-8) e da temperatura (10-90°C) na atividade da invertase, bem como se determinou a constante cinética K_m à 25 e 50°C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do pH e Tempertura

Na figura 1 tem-se o efeito do pH na atividade hidrolítica da invertase de *C. guilliermondii* de resíduo de pêssgo (ICg). A hidrólise da sacarose foi realizada durante 10 minutos a 25°C e uma concentração final de 40 mM sacarose no meio reacional. A máxima atividade para ICg foi observado em 5,0. No pH ótimo, a atividade relativa (AR) de 100% corresponde a uma atividade específica $27,7 \pm 0,7$ U.mg⁻¹.

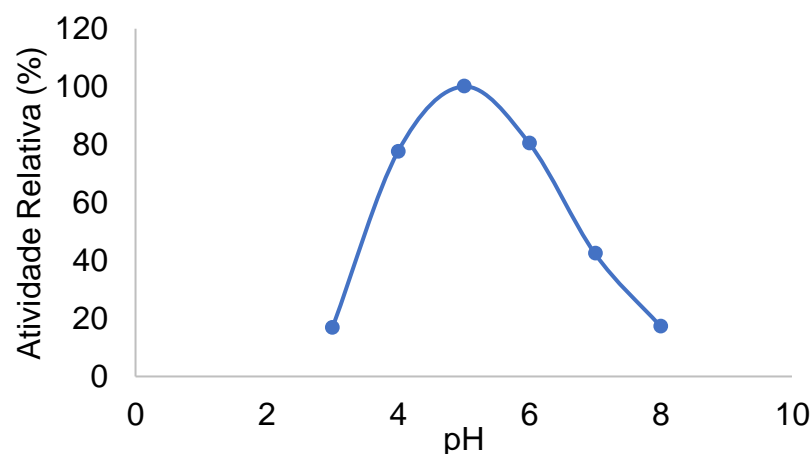


Figura 1. Efeito do pH na atividade da invertase de *C. guilliermondii* de resíduo de pêssgo. Tampão Mcllvaine: citrato (100 mM) - fosfato (200 mM). Temperatura: $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Enzima: 1,0 mL em 3,0 mL de meio reativo com 40 mM sacarose. Os pontos são a média de 3 repetições. 100% de AR é $27,7 \pm 0,7$ U.mg⁻¹.

A temperatura ótima foi 50°C (Figura 2). A estabilidade foi diminuindo a partir do ponto ótimo, sendo que na temperatura de 80°C nenhuma atividade residual foi detectada.

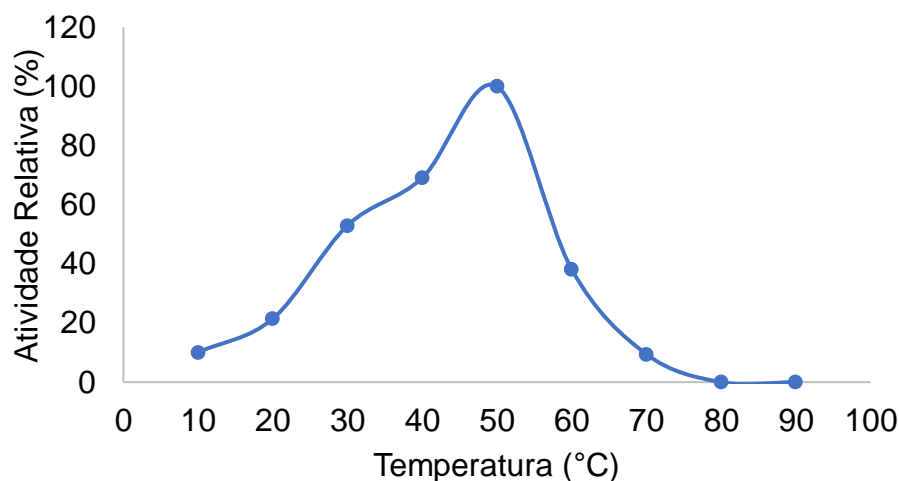


Figura 2. Efeito da temperatura na atividade da invertase de *C. guilliermondii* de resíduo de pêssgo (ICg). Tampão Mcllvaine pH 5. Enzima: 1,0 mL em 3,0 mL de meio reativo com 40 mM sacarose. Os pontos são a média de 3 repetições. 100% de AR é $74,9 \pm 2,1$ U.mg⁻¹.

Efeito da concentração da sacarose

Os parâmetros cinéticos para a velocidade de hidrólise da sacarose foram determinados para invertase (ICg) por regressão não linear nas temperaturas de 25°C e 50°C (Tabela 1).

Tabela 1. Constante de Michaelis-Menten (K_m) da invertase de *C. guilliermondii* de resíduo de pêssgo (ICg) a 25°C e 50°C.

Parâmetros	Invertase de <i>Candida guilliermondii</i>	
	25°C ^a	50°C ^a
K_m^a (mM)	30,5 ± 1,04**	28,7 ± 0,72**
R^2	0,98	0,99

^a valor ± intervalo de confiança a $p=0.05$. **Significativo ($p \leq 0,01$).

Tanto para 25°C como para 50°C, observou-se um comportamento hiperbólico entre velocidade de hidrólise ($U \cdot mg^{-1}$) versus concentração de sacarose (mM) durante o caminho da reação, sugerindo uma cinética de Michaelis-Menten (Figura não mostrada). Os pontos experimentais foram confirmados pela linearidade do gráfico de Lineweaver-Burk (Figura não mostrada). Os valores da constante aparente de Michaelis ($K_{m,ap}$) para 25°C e 50°C foram 30,5mM e 28,7mM de sacarose respectivamente. A velocidade máxima (V_{max}) a 50°C foi cerca de 30% maior do que V_{max} a 25°C.

Eletroforese

Três isoenzimas foram separadas a partir do extrato concentrado com acetona para ICg usando eletroforese de gel de poliacrilamida 6% com tampão de corrida 8,9 com solução de azul de Coomassie 0,1 % m/v para BSA e um sistema contendo sacarose 2% para as isoenzimas (Figura 3). Para ICg, uma banda com 0,1 e outra com 0,3 de mobilidade relativa (MR) apresentaram uma mobilidade inferior ao padrão BSA (INLAB), fração V, com massa molecular de 66KDa, teve um MR de 0,5. Também se observou uma terceira (MR=0,55). 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.

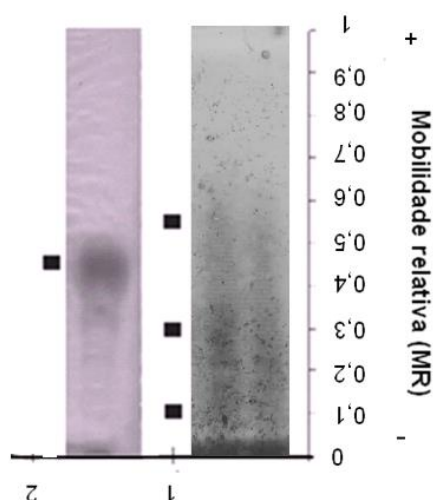


Figura 3 Perfil eletroforético de ICg a partir de seu extrato concentrado com acetona com cerca de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de proteína. Inserido: eletroforese em gel de poliacrilamida 6% pH 8,9 com solução de azul de Coomassie 0,1 % m/v para BSA e um sistema contendo sacarose 2% para as isoenzimas.

4. CONCLUSÕES

A invertase A *C. guilliermondii* tem ótima atividade em pH 5 a 50°C. A partir dessa temperatura há uma redução significativa da sua atividade.

A recuperação da atividade foi de 56% e se manteve estável 30 dias de armazenamento à -20°C. Na eletroforese, três frações foram detectadas.

A invertase tem comportamento Michaeliano e seus dados cinéticos também seguiram o modelo linear de Lineweaver-Burk sendo mais específica a 50°C do que 25°C.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOFO, D.C.S.; CASTRO, H.F.; MEDEIROS, M.B. Comparação da eficiência de imobilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX (osmotolerante) e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, em bagaço de cana de açúcar. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, V SIPAL, p. 121-124, 2005.

CANTARELLA, L.; ALFANI, F.; CANTARELLA, M. β -D-Fructofuranoside Fructohydrolase. In WHITAKER, J. R., VORAGEN, A.G. J., WONG, D. W. S. (Eds.), **Handbook of Food Enzymology**. New York: Marcel Dekker, (2003). pp. 787-804.

FERREIRA, M. V.; AVILA, T. L.; TORALLES, R. P.; KUHN, C.R.; ROMBALDI, C.V. Identifying yeast isolated from spoiled peach puree and assessment of its batch culture for invertase production. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 36, n. 4, p. 701–708, 2016.

GOULART, A. J.; SANTOS, A. F.; TAVANO, O. L.; VINUEZA, J. C.; CONTIERO, J.; MONTI, R. Glucose and Fructose Production by *Saccharomyces cerevisiae* Invertase Immobilized on MANAE-Agarose Support. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**, Araraquara, v. 34, n. 2, p. 169–175, 2013.

GUIMARÃES, L. H. S.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; JORGE, J. A. Production and characterization of thermostable extracellular β -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, Maryland Heights, v. 42, n. 1, p. 52–57, 2007.

LOPES, A. M.; TORALLES, R. P.; ROMBALDI, C. V. Thermal inactivation of polyphenoloxidase and peroxidase in Jubileu clingstone peach and yeast isolated from its spoiled puree. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 34, n. 1, p.150-156, 2014.

OLIVEIRA, D.P.; OLIVEIRA, L.E.M.; FILHO, N.D. Optimization of invertase assay conditions rubber tree plants (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Sociedade de Investigações Florestais**, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 687–692, 2006.

TORALLES, R.P.; KUHN, C.R.; SILVA, P.; RUIZ, W.A. Extração e Caracterização Parcial de Invertase de Levedura de Purê e Resíduo de Pêssego. **Revista Brasileira de tecnologia Agroindustrial**, Paraná, v.8, n. 2, p.1399–1415, 2014.