
IMOBILIZAÇÃO DE INVERTASE DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EM ESFERAS DE ÁCIDO ALGÍNICO

JOÃO BATISTA BUZATO¹
REINALDO LUIZ BROGGI²
MARIA ANTONIA P.C. CELLIGOI³

BUZATO, J. B.; BROGGI, R. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. Imobilização de invertase de *Saccharomyces cerevisiae* em esferas de ácido algínico. *Semina: Ci. Biol. Saúde*, Londrina, v. 20/21, n. 2, p. 33-37, jun. 1999/2000.

RESUMO: Este trabalho relata a imobilização de invertase de *S. cerevisiae* em alginato de cálcio e cobre. Os resultados mostraram que a imobilização da enzima em alginato de cálcio é de natureza frouxa e que com o passar do tempo, ocorre diminuição da velocidade da reação de hidrólise da sacarose. Entretanto, ainda que a imobilização da invertase em alginato de cobre seja firme, a maneira pela qual esta se estabeleceu provocou inativação da enzima.

PALAVRAS-CHAVE: Invertase; imobilização; alginato.

INTRODUÇÃO

A definição do termo xarope de açúcar invertido segundo Filho (1999) é a de um produto da hidrólise de sacarose e constitui uma mistura de açúcares em solução, principalmente glicose, frutose e sacarose. O xarope de açúcar invertido possui aplicação na indústria alimentícia como adoçante em diversos produtos ou é usado como matéria prima na obtenção de frutose e ácido glicônico (Goldstein, 1977).

Industrialmente o processo econômico utilizado para produzir esse xarope é por hidrólise ácida. Esse método é bastante utilizado nos Estados Unidos e é também o método empregado no Brasil. Entretanto o produto obtido por hidrólise ácida é bastante colorido (devido a formação de hidroximetilfurfural), uma vez que as condições de reação são drásticas (pH baixo e temperatura elevada).

O processo enzimático utiliza a enzima invertase e resulta em um xarope de melhor qualidade uma vez que o mesmo, apresenta grau de cristalização menor bem como, não apresenta coloração. Esse procedimento ainda é de uso restrito em alguns países da Europa e Japão (Rodrigues *et al.*, 2000). O fator limitante no uso da hidrólise enzimática da sacarose é o elevado custo

da enzima, considerando que a mesma é usada na forma livre (enzima solúvel) e assim não é reciclada, não sendo recuperada ao final de cada operação. Para tornar o processo enzimático economicamente mais atraente, este deveria ser operado de modo a reutilizar a enzima.

O desenvolvimento de uma tecnologia de imobilização de invertase em uma matriz inerte, oferece uma alternativa para diminuir o custo na obtenção de xarope de açúcar invertido (Bon & Pereira, 1999).

O procedimento de imobilização não pode ser prejudicial à estrutura enzimática e tampouco produzir algum contaminante tóxico no xarope. Ainda que existe uma grande variedade de suportes e métodos de imobilização, poucos atendem as exigências citadas. Entre eles, o método de encapsulamento de enzima em gel aquoso de ácido algínico, é de baixo custo, ausente de toxidez e de manuseio fácil. O gel de ácido algínico é bastante empregado na indústria farmacêutica e alimentícia, por apresentar porosidade adequada na retenção de células e moléculas de alto peso molecular, como as enzimas (Gordon *apud* Bicherstaff, 1997).

O objetivo desse trabalho foi o de imobilizar a enzima invertase em esferas de alginato de cálcio e alginato de cobre.

¹ Doutor – Departamento de Bioquímica – CCE – UEL

² Discente do curso de Química (Bolsista PIBIC) – Depto. de Química – CCE – UEL

³ Doutora – Departamento de Bioquímica – CCE – UEL

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção de invertase de *Saccharomyces cerevisiae*

O procedimento utilizado para obter a enzima foi de acordo com Villela *et al.* (1973). O fermento comercial usado foi da marca Fleischmann. Pesou 50g de levedura seca (fermento) e suspendeu em 250 mL de bicarbonato de sódio 0,15M e deixou em Banho Maria a 37 °C durante 24 horas com agitação ocasional. Desprezou o sedimento e coletou o sobrenadante o qual contém a enzima invertase ativa. Mediu a atividade enzimática. Guardou em geladeira a 4 °C.

Imobilização de invertase em alginato de cálcio ou cobre

O procedimento é baseado em Gordon (*apud* Bicherstaff, 1997). Fizeram diluição adequada da solução enzimática, de acordo com a atividade desejada e juntaram com 10 mL de ácido algínico a 3% (P/V). Homogeneizaram gentilmente a solução. Com o uso de uma bomba peristáltica e fiação de silicone, gotearam com o auxílio de uma agulha em solução de cloreto de cálcio ou sulfato de cobre. As esferas são formadas prontamente. Decantaram o sobrenadante e completaram para o volume desejado.

Atividade enzimática

A atividade invertásica foi estimada pela quantidade de glicose formada em uma solução de sacarose a 20% (P/V) e em temperatura de 25 °C. A glicose era medida pela enzima glicose-oxidase da marca comercial Labtest e utilizando-se um padrão de 100 mg/mL cuja absorvância corresponde a 0,120.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtenção de invertase

Goldstein *et al.* (1977) Avaliaram as propriedades enzimáticas de diferentes marcas comerciais de invertase existente no mercado. Estes autores concluíram que as marcas que apresentaram

elevada atividade eram muito caras enquanto que aquelas de baixo custo, a preparação apresentava atividade pouco expressiva e com atividade proteolítica, o que interfere de maneira negativa em ensaios de imobilização. Na caracterização de uma enzima é desejável que esta esteja altamente purificada (Asare-Brown & Bullock, 1989) entretanto, o nosso objetivo é a utilização industrial e assim optou-se imobilizar invertase extraída de fermento pois o custo é baixo. A Tabela 1, mostra os valores encontrados de atividade enzimática nas extrações utilizadas neste trabalho

Neumann (1967) utilizaram diversos procedimentos de extração de invertase de fermento. A atividade enzimática obtida por esses autores foi considerada elevada. Nossas extrações apresentaram atividade enzimática satisfatória. A diferença nos valores encontrados de atividade pode ser explicada, uma vez que foram utilizadas diferentes amostras de fermento em cada extração. Bokassa *et al.* (1993) cultivaram *S. cerevisiae* e posteriormente extraíram invertase do fermento seco obtido. Os valores de atividade enzimática também mostraram grandes variações (100 a 400 U/g de fermento seco).

Capacidade das esferas de ácido algínico em reter a enzima

A capacidade das esferas de ácido algínico de reter as moléculas de invertase, foi avaliada pela atividade invertásica presente no sobrenadante de uma solução em repouso que contém as esferas. As moléculas enzimáticas que deixam as esferas são portanto detectadas no sobrenadante, através da medida de atividade das mesmas. A capacidade foi avaliada em relação a proporções crescentes de solução enzimática imobilizada nas esferas e com o decorrer do tempo. A capacidade de retenção foi avaliada em esferas confeccionadas com gel de alginato de cálcio e alginato de cobre.

A Tabela abaixo mostra a atividade enzimática presente no sobrenadante quando utilizou esferas de alginato de cálcio na imobilização.

Arruda & Vitolo (1999) estudaram a imobilização de invertase em esferas de alginato de cálcio. Estes autores concluíram que a procedência do ácido algínico utilizado e o pH influenciavam na capacidade das esferas em reter as moléculas enzimáticas.

Tabela 1 – Atividade Invertásica presente nos extratos.

EXTRAÇÃO	Atividade Enzimática ($\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min}$)
1	$35,29 \times 10^2$
2	$22,06 \times 10^2$

Os valores de perda de moléculas enzimática para o meio variaram de 34 a 50% do total de atividade enzimática que fora imobilizada. Ro & Kim (1991) verificaram perdas enzimáticas superiores a 80% quando invertase era encapsulada diretamente em esferas de alginato de cálcio. Analisando os resultados da Tabela 2 verificamos com o decorrer do tempo um aumento gradativo de atividade enzimática no sobrenadante. Ainda mais, na medida que a carga enzimática aumentava na esfera, também aumentava a atividade enzimática no sobrenadante. Isso sugere que as moléculas de invertase eram liberadas da esfera para o sobrenadante com o decorrer do tempo e que, a liberação era mais pronunciada na medida que a carga enzimática nas esferas era maior.

Barker *et al.* (1971) testaram sais de titânio e outros metais de transição na imobilização de enzimas em suportes inerte, entre elas a invertase. Os resultados foram promissores nos testes da enzima α -amilase, quando a celulose foi usada como suporte. Mais recentemente, Palmieri *et al.* (1994) descreveram um novo enfoque para o encapsulamento de enzimas em gel de ácido algínico, fazendo uso de íons cobre como agente gelificante. Esses autores verificaram que as esferas obtidas apresentaram aumento de estabilidade e resistência, quando comparadas com as esferas de alginato de cálcio. Dessa maneira, os resultados seguintes, mostrados na Tabela 3, foram obtidos com o uso de esferas confeccionadas com gel de alginato de cobre.

Palmieri *et al.* (1994) conseguiram imobilizar até 85% da enzima fenol-oxidase em esferas de alginato de cobre. Os resultados obtidos neste trabalho mostram atividade enzimática baixa presente no sobrenadante tanto com o passar do tempo, como em relação a carga enzimática usada na imobilização. Isso sugere que a enzima fica aprisionada na esfera de ácido algínico, quando sulfato de cobre foi usado na confecção das esferas.

Comparação entre atividade enzimática da invertase livre com invertase imobilizada em alginato de cálcio e cobre

Em vista da importância biotecnológica de enzimas como a invertase, justifica-se o interesse na sua imobilização (Bon & Pereira, 1999). De acordo com Bickerstaff (1997), a enzima invertase pode ser imobilizada por diversos métodos e em uma variedade de suportes. Ro & Kim (1991) utilizaram quitina como suporte na imobilização simultânea de invertase e *Zymomonas mobilis* na produção células de ácido glicônico e sorbitol enquanto que Barker *et al.* (1971) usaram celulose. Mais recentemente Kirk & Doelle (1994) escolheram ácido algínico como suporte para imobilizar invertase. Assim para avaliar a conservação da atividade enzimática nas esferas de ácido algínico, procedeu-se a comparação entre a atividade da enzima livre com atividade invertásica presente nas esferas de alginato de cálcio e cobre. Proporções

Tabela 2 – Atividade enzimática (absorvância) presente no sobrenadante das esferas de cloreto de cálcio com diferentes cargas enzimáticas, em relação ao tempo de reação.

CARGA ENZIMÁTICA (mL)	TEMPO (horas) 0	TEMPO (horas) 1	TEMPO (horas) 22	TEMPO (horas) 68
0,2	0,006	0,015	0,061	0,238
0,4	0,009	0,009	0,106	0,529
0,5	0,012	0,017	0,064	0,500
0,6	0,006	0,011	0,282	0,659
0,8	0,014	0,023	0,264	0,738
0,9	0,013	0,084	0,489	1,334
1,0	0,015	0,048	0,613	1,978

Tabela 3 – Atividade enzimática (absorvância) presente no sobrenadante das esferas de cloreto de cobre com diferentes cargas enzimáticas em relação ao tempo de reação.

CARGA ENZIMÁTICA (mL)	TEMPO (horas) 0	TEMPO (horas) 1	TEMPO (horas) 22	TEMPO (horas) 68
0,2	0,086	0,087	0,035	0,088
0,4	0,059	0,068	0,050	0,083
0,5	0,055	0,072	0,030	0,083
0,6	0,083	0,082	0,038	0,085
0,8	0,084	0,087	0,009	0,091
0,9	0,078	0,082	0,052	0,097
1,0	0,092	0,093	0,033	0,098

crecentes de solução enzimática foram imobilizadas nas esferas de ácido algínico. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Os resultados da Tabela 4 mostram que com o progredir da proporção de enzima imobilizada em alginato de cálcio, os valores de atividade invertásica se elevam. A elevação é mais pronunciada no primeiro minuto de reação e nos tempos subsequentes a velocidade de formação de glicose decai. Nota-se entretanto que no tempo de 10 minutos de reação, as esferas imobilizadas com a maior proporção de enzimas equivalem ao valor atingido pela enzima livre, não imobilizada. Filho *et al.* (1999) afirmaram que esse fato pode ser explicado pela ocorrência de inibição na reação, exercida pelos produtos, a glicose e frutose.

Entretanto os resultados da Tabela 5, mostram valores muito baixos de atividade enzimática tanto em relação ao tempo como no aumento da proporção de enzimas imobilizadas nas esferas de alginato de cobre. Palmieri *et al.* (1994) testaram diferentes cátions de alginato na imobilização da enzima fenol-oxidase. O único cátion que não provocava progressiva inativação da enzima foi o de cobre. Esses autores ressaltam que a enzima fenol-oxidase é dependente de cobre em sua catálise e por isso não houve a desnaturação enzimática. Por sua vez, de acordo com Neumann & Lampen (1967), a invertase apresenta carboidratos associados à sua estrutura. Sendo assim, o cobre pode ter exercido um efeito idêntico que aqueles cátions provocaram na inativação da fenol-oxidase.

Tabela 4 – Atividade enzimática livre e de diferentes alíquotas de invertase imobilizadas em alginato de cálcio.

TEMPO DE REAÇÃO (min)	ENZIMA LIVRE (mL)	Quantidade de solução enzimática imobilizada (mL)			
		1	2	3	4
1	0,183	0,078	0,152	0,183	0,256
5	0,285	0,061	0,163	0,203	0,280
10	0,329	0,074	0,158	0,215	0,317

Tabela 5 – Atividade enzimática de diferentes alíquotas de invertase imobilizadas em alginato de cobre

TEMPO DE REAÇÃO (min)	Quantidade de solução enzimática imobilizada (mL)			
	1	2	3	4
1	0,042	0,039	0,035	0,058
10	0,047	0,058	0,062	0,085

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que a invertase é passível de imobilização em esferas de alginato de cálcio e alginato de cobre. A imobilização em alginato de cálcio é de

natureza frouxa e que com passar tempo, ocorre diminuição da velocidade da reação. Entretanto, ainda que, a imobilização da invertase em alginato de cobre seja firme, a maneira pela qual esta se estabelece, provoca inativação da enzima.

BUZATO, J. B.; BROGGI, R. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. *Saccharomyces cerevisiae* immobilisation into alginate acid beads. *Semina: Ci. Biol. Saúde*, Londrina, v. 20/21, n. 2, p. 33-37, jun. 1999/2000.

ABSTRACT: Immobilization of *S. crevisiae* invertase on both calcium and copper alginate has been carried out. The results have shown that when calcium alginate was the inert support utilised, the immobilization was loosed and that as the time went by the speed reaction of sucrose hydrolysis slowed down. However copper alginate immobilization was strong but it caused invertase denaturation.

KEY WORDS: Invertase; immobilization; alginate.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRUDA, L.M.O.; VITOLO, M. Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. *Appl. Biochem Biotechnol.* v. 81, p.23-33, 1999.
- ASARE-BROWN, E.; BULLOCK, C. Simple practical investigations using invertase. *Biochemistry.* p. 41-42, 1989.
- BARKER, S.A.; EMERY, A.N.; NOVAIS, J.M. Enzymes reactors for industry. *Process Biochemistry.* p.11-13, 1971.
- BICKERSTAFF, G.F. *Immobilization of enzymes and cells.* Totowa: Humana Press, 1997. 367p.
- BOKOSSA, I.P.; KRASTANOV, A.I.; ROCHKOVA, Z.; ANGELOV, A. Biosynthesis of invertase by *Saccharomyces cerevisiae* with sugarcane molasses as substrate. *World J. Microb. Biotech.* v. 9, n. 9, p.662-663, 1993.
- BON, E. P.; PEREIRA, N. *Tecnologia Enzimática.* Rio de Janeiro: Fundação Biblioteca Nacional, 1999. 113p.
- FILHO, U.C.; HORI, C.E.; RIBEIRO, E.J. Influence of the reaction products in the inversion of sucrose by invertase. *Brazilian J. Chem. Eng.* v.11, n.2, 1999.
- GOLDSTEIN, H.; BARRY, P.W.; RIZZUTO, A.B.; VENKATASUBRAMANIAN, K. E VIETH, W.R. Continuous enzymatic production of invert sugar. *J. Ferment. Technol.* v. 55, n.5, p.516-524, 1977.
- KIRK, L.A.; DOELLE. Simultaneous fructose and ethanol production from sucrose, using *Zymomonas mobilis* 2864 co-immobilized with invertase. *Biotechnol. Lett.* v.16, n.5, p.533-538, 1994.
- NEUMANN, N. P.; LAMPEN J.O. Purification and properties of yeast invertase. *Biochemistry.* v. 6, n.2, p. 468-475, 1967.
- PALMIERI, G.; GIARDANA, P.; DESIDERIO, B.; MARZULLO, L. GIAMBERINI, M. E SANNIA, G. A new enzyme immobilization procedure using copper alginate gel: application to a fungal phenol oxidase. *Enzyme Microb. Technol.* v.16, p.151-158, 1994.
- RO, H.S.; KIM, H.S. Continuous production of gluconic acid and sorbitol from sucrose using invertase and na oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. *Enzyme Microb. Technol.* v. 13, p. 920-924, 1991.
- RODRIGUES, M.V.N; RODRIGUES,R.A.F; SERRA,G.E.; ANDRIETTA, S.R. FRANCO,T.T. Produção de xarope de açúcar invertido obtido por hidrólise heterogênea, através de planejamento experimental. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v. 20, n.1, p.103-109, 2000.
- VILLELA,G.G.; BACILA, M. ; TASTALDI, H. *Técnicas e Experimentos de Bioquímica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973. 552p.