

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS- ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

**IMOBILIZAÇÃO DE INVERTASE COMERCIAL E DE
Saccharomyces cerevisiae EM SABUGO DE MILHO
E BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

ANDRÉA FRANCISCO DOS SANTOS

Orientador: Prof. Dr. Rubens monti

ARARAQUARA-SP

2010

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNESP – Campus de Araraquara

Santos, Andréa Francisco dos

S237i Imobilização de invertase comercial e de *Saccharomyces cerevisiae* em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar. / Andréa Francisco dos Santos. – Araraquara, 2010.

93 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição
Orientador: Rubens Monti

ANDRÉA FRANCISCO DOS SANTOS

**IMOBILIZAÇÃO DE INVERTASE COMERCIAL E DE
Saccharomyces cerevisiae EM SABUGO DE MILHO
E BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, *campus* Araraquara-UNESP, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição, área de Ciências dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Monti

ARARAQUARA-SP

2010

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rubens Monti

(Orientador)

Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona

(Membro)

Profa. Dra. Maristela Freitas Sanches Peres

(Membro)

Araraquara, 28 de maio de 2010

DEDICATÓRIA

A Deus, pela constante presença em minha vida e por me dar forças para lutar pelos meus sonhos.

A minha querida mãe Leniuza, pelo incentivo e apoio, te amo.

Ao meu querido pai José, por muitas vezes deixar de realizar seus sonhos para realizar os meus, você representa todos os meus sonhos, é por você que construo castelos. Obrigada, te amo muito.

Aos meus irmãos: Roseli, Cleber, Marcos, Wilson, Sandra (in memoriam), Luciano, Marcelo, David e sobrinhos.

Ao meu namorado Fábio, pelo apoio desde o início de minha caminhada, compartilhando os meus ideais, incentivando-me a prosseguir na jornada, fosse quais fossem os obstáculos a ultrapassar, te amo.

Aos meus avôs

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rubens Monti, pelo ensinamento, orientação, confiança e amizade.

Ao prof. Dr. Antônio Carlos Pizzolito, por abrir portas para o ingresso ao mestrado.

Aos Professores Eleonora Cano Carmona e Maristela de Freitas, pelas valiosas sugestões para a minha dissertação de mestrado.

Ao meu amigo Messias, por me incentivar a ingressar na pós-graduação e pela sincera amizade.

As minhas amigas: Tarsia, Cristiane, Thaís, Ana Cláudia, Meline, Jéssica, Maria Olívia e Ana Lúcia, pela amizade e carinho.

Aos meus amigos Caio e Júlio pela amizade conquistada a cada dia e por me ajudar em todas as dificuldades encontradas durante o mestrado.

Aos amigos de laboratório: Daniela, Juliana, Ozeni, Ana Lúcia, Carol, Raquel, Antônio e Vinicius, pelos bons momentos.

Aos amigos de faculdade: Fernando, Natália, Ederlan, Adolfo, Priscila, Laura, Vitor, Ana Paula, Josiane, Isabel e Viviane.

Aos meus cunhados, cunhadas e sogra.

A todos os funcionários da biblioteca, limpeza, portaria, técnicas de laboratório e refeitório.

Eu aprendi...
...que ignorar os fatos não os altera;

Eu aprendi...
...que quando você planeja se nivelar com alguém, apenas esta permitindo que essa pessoa continue a magoar você;

Eu aprendi...
...que o AMOR, e não o TEMPO, é que cura todas as feridas;

Eu aprendi...
...que ninguém é perfeito até que você se apaixone por essa pessoa;

Eu aprendi...
...que a vida é dura, mas eu sou mais ainda;

Eu aprendi...
...que as oportunidades nunca são perdidas; alguém vai aproveitar as que você perdeu.

Eu aprendi...
...que quando o ancoradouro se torna amargo a felicidade vai aportar em outro lugar;

Eu aprendi...
...que não posso escolher como me sinto, mas posso escolher o que fazer a respeito;

Eu aprendi...
...que todos querem viver no topo da montanha, mas toda felicidade e crescimento ocorre quando você esta escalando-a;

Eu aprendi...
...que quanto menos tempo tenho, mais coisas consigo fazer.

William Shakespeare

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1. INVERTASE	22
2.2. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	23
2.2.1. VANTAGENS DA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	27
2.2.2. SUPORTES ALTERNATIVOS PARA IMOBILIZAÇÃO	28
2.3. CATÁLISE ENZIMÁTICA	32
2.3.1. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	35
2.3.1.1. Inibição competitiva	35
2.3.1.2. Inibição Incompetitiva	35
2.3.1.3 Inibição mista	35
2.4. FATORES QUE INFLUENCIAM A ATIVIDADE ENZIMÁTICA	36
2.4.1. CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO	36
2.4.2. CONCENTRAÇÃO DE ENZIMAS	36
2.4.3. PH	36
2.4.4. TEMPERATURA	37
3. OBJETIVOS	38
3.1. OBJETIVO GERAL	39
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1. MATERIAL	41
4.1.1. ENZIMA	41
4.2. MÉTODOS	41
4.2.1. EXTRAÇÃO DA ENZIMA INVERTASE	41
4.2.2. CROMATOGRAFIA EM RESINA DEAE-SEPHACEL	41
4.2.3. SDS-PAGE	41
4.2.4. DETERMINAÇÃO PROTÉICA	42
4.2.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	42
4.2.6. ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA	42
4.2.7. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA INVERTASE LIVRE COMERCIAL E EXTRAÍDA	42
4.2.7.1. Concentração de substrato	42
4.2.7.2. Determinação de pH ótimo	43
4.2.7.3. Estabilidade frente ao pH	43

4.2.7.4. Determinação da temperatura ótima	43
4.2.7.5. Estabilidade térmica da enzima livre	44
4.2.8. OBTENÇÃO DOS SUPORTES	44
4.2.8.2. Suporte alternativo de resíduo agroindustrial- Bagaço de cana (BC)	44
4.2.9. TRATAMENTO DOS SUPORTES	45
4.2.9.1. Descompressão explosiva térmica dos suportes alternativos	45
4.2.9.2. Ativação dos suportes	45
4.2.9.3. Suporte glioxil	46
4.2.9.4. Suporte amino	46
4.2.9.5. Suporte glutaraldeído	47
4.2.10. PREPARO DE DERIVADOS ENZIMÁTICOS	47
4.2.10.1. Derivados de glioxil- SM e BC	47
4.2.10.2. Derivado amino – SM e BC	47
4.2.10.3. Derivado glutaraldeído- SM e BC	48
4.2.10.4. Ensaio enzimático dos derivados	48
4.2.11. RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO	49
4.2.12. EFICIÊNCIA CATALÍTICA	49
4.2.13. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DOS DERIVADOS DE INVERTASE COMERCIAL E EXTRAÍDA	49
4.2.13.1. Seleção dos melhores derivados (suporte+ invertase)	49
4.2.13.2. Determinação de pH ótimo dos derivados	50
4.2.13.3. Determinação da temperatura ótima dos derivados	50
4.2.13.4. Estabilidade térmica dos derivados	50
4.2.13.5. Capacidade de reutilização dos derivados	51
4.2.13.6. Incubação dos derivados em diferentes concentrações de sacarose	51

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO **52**

5.1. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DAS ENZIMAS LIVRES	53
5.1.1. ATIVIDADE ENZIMÁTICA	53
5.1.2. DETERMINAÇÃO DO PH DA REAÇÃO	54
5.1.3. ESTABILIDADE EM DIFERENTES VALORES DE PH	55
5.1.4. TEMPERATURA DAS INVERTASES	55
5.1.5. CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO	57
5.1.6. ESTABILIDADE TÉRMICA	59
5.1.7. IMOBILIZAÇÃO DA INVERTASE EM SUPORTES DE BAGAÇO DE CANA E SABUGO DE MILHO	60
5.1.8. Purificação em Resina DEAE-Sephacel	60
5.1.7.2. Acompanhamento do processo de imobilização	62
5.1.7.3. Rendimento de imobilização e eficiência catalítica dos derivados	65
5.1.7.4. Caracterização enzimática dos derivados obtidos com enzima extraída e comercial de <i>S. cerevisiae</i> .	67
5.1.7.5. Determinação do pH ótimo dos derivados	68
5.1.7.5.1. Derivados invertase comercial	68
5.1.7.5.2. Derivados invertase extraída	69
5.1.7.6. Determinação da temperatura ótima dos derivados	71

5.1.7.6.1. Derivados da invertase comercial	71
5.1.7.6.2. Derivados da invertase extraída	73
5.1.7.7. Estabilidade térmica	75
5.1.7.7.1. Derivados da invertase comercial	75
5.1.7.7.2. Derivados da invertase extraída de <i>S. cerevisiae</i>	78
5.1.8. REUTILIZAÇÃO DOS DERIVADOS DA INVERTASE COMERCIAL E EXTRAÍDA	80
5.1.9. INCUBAÇÃO DOS DERIVADOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE	81
6. CONCLUSÕES	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Reação de hidrólise da sacarose e rotação óptica de substrato e produtos	22
Figura 2.	Classificação dos métodos de imobilização de enzimas	26
Figura 3.	Imagens de microscopia óptica do sabugo de milho	29
Figura 4.	Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do sabugo de milho	29
Figura 5.	Pó de sabugo de milho utilizado como suporte para imobilização de enzimas	30
Figura 6.	Produção brasileira de cana-de-açúcar	30
Figura 7.	Imagens de microscopia óptica do bagaço-de-cana	31
Figura 8.	Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do bagaço-de-cana	32
Figura 9.	Pó de bagaço-de-cana utilizado como suporte para imobilização de enzimas	32
Figura 10.	Reação catalisada por enzimas	33

Figura 11.	Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima	34
Figura 12.	Equação proposta por Michaelis-Menten	34
Figura 13.	Gráfico dos duplos recíprocos de Lineweaver-Burk	35
Figura 14.	Efeito do pH sobre a atividade da enzima invertase livre extraída e comercial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
Figura 15.	Efeito da estabilidade da invertase livre extraída e comercial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em diferentes valores de pH	56
Figura 16.	Efeito da temperatura sobre a atividade da invertase livre extraída e comercial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
Figura 17.	Gráfico de Arrhenius da enzima comercial e extraída.	58
Figura 18.	Curva de Michaelis – Menten. Efeito da variação da concentração de substrato sacarose das enzimas invertases extraída e comercial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
Figura 19.	Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk da invertase extraída e comercial	60
Figura 20.	Estabilidade da invertase livre extraída e comercial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , durante a estocagem por 2 horas, em diferentes valores de temperatura	61

Figura 21.	SDS – PAGE. Perfil de purificação parcial da invertase extraída através de resina de troca iônica DEAE-Sephacel	62
Figura 22.	Acompanhamento do ensaio de imobilização da enzima invertase comercial e extraída de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em suportes pó SM e pó BC ativados a glioxil	64
Figura 23.	Acompanhamento do ensaio de imobilização da enzima invertase comercial e extraída de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em suportes pó SM e pó BC ativados a amino	65
Figura 24.	Acompanhamento do ensaio de imobilização da enzima invertase comercial e extraída de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em pó SM e pó BC ativados a glutaraldeído	66
Figura 25.	Efeito do pH sobre a atividade dos derivados da invertase comercial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtidos com: pó BC e pó SM ativados a amino, ensaiados em diferentes pHs comparados com a invertase livre	70
Figura 26.	Efeito do pH sobre a atividade dos derivados da invertase comercial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtidos com: pó BC ativado glioxil e pó SM ativado a glutaraldeído, ensaiados em diferentes pHs, comparados com a invertase livre	70
Figura 27.	Efeito do pH sobre a atividade do derivado da invertase extraída de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtido com pó BC ativado a amino, ensaiado em diferentes pHs, comparados com a invertase livre	71

Figura 28.	Efeito do pH sobre a atividade dos derivados da invertase extraída de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtidos com: pó BC e pó SM ativados a glutaraldeído ensaiados em diferentes pHs, comparados com a invertase livre	72
Figura 29.	Efeito da temperatura sobre a atividade dos derivados da invertase comercial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtidos com: pó BC e pó SM ativados a amino, ensaiados em diferentes temperaturas comparados com a invertase livre	73
Figura 30.	Efeito da temperatura sobre a atividade dos derivados da invertase comercial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtidos com: pó BC ativado a glioxil e pó SM a glutaraldeído ensaiados em diferentes temperaturas, comparados com a invertase livre	73
Figura 31.	Efeito da temperatura sobre a atividade dos derivados da invertase extraída de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtido com pó BC ativado a amino ensaiados em diferentes temperaturas, comparados com a invertase livre	75
Figura 32.	Efeito da temperatura sobre a atividade dos derivados da invertase extraída de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtidos com: pó BC e pó SM a glutaraldeído ensaiados em diferentes temperaturas comparados com a invertase livre	75
Figura 33.	Estabilidade térmica do derivado da invertase comercial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtido com pó BC ativado a amino	77
Figura 34.	Estabilidade térmica do derivado da invertase comercial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtido com pó SM ativado a amino	77

Figura 35.	Estabilidade térmica dos derivados da invertase comercial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtidos pó BC ativado a glioxil	78
Figura 36.	Estabilidade térmica dos derivados da invertase comercial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtidos com pó SM ativado a glutaraldeído	79
Figura 37.	Estabilidade térmica dos derivados da invertase extraída de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtidos com pó BC ativado a amino	79
Figura 38.	Estabilidade térmica dos derivados da invertase extraída de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtidos com pó BC ativado a glutaraldeído	80
Figura 39.	Estabilidade térmica dos derivados da invertase extraída de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtidos com pó SM ativado a glutaraldeído	80
Figura 40.	Reutilização dos derivados de invertase comercial obtido com pó de sabugo de milho e pó bagaço-de-cana	81
Figura 41.	Reutilização dos derivados de invertase extraída obtido com pó de sabugo de milho e pó de bagaço-de-cana	82
Figura 42.	Influência da glicose e frutose na atividade do derivado de invertase comercial obtida pelo pó de SM amino ensaiado em diferentes concentrações de sacarose	83
Figura 43.	Influência da glicose e frutose na atividade do derivado de invertase extraída obtida pelo pó de SM glutaraldeído ensaiado em diferentes concentrações de sacarose	83

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1.	Propriedades das invertases externa e interna	23
Tabela 2.	Fatores que influenciam o desempenho de um sistema de enzima imobilizada	25
Tabela 3.	Comparação entre os métodos de imobilização	27
Tabela 4.	Caracterização física e química do bagaço-de-cana e sabugo de milho	32
Tabela 5.	Atividades específicas das invertases	55
Tabela 6.	Purificação parcial do extrato cru de invertase extraída de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	62
Tabela 7.	Comparação dos derivados de invertase extraída obtidos com suportes pó bagaço de cana e pó sabugo de milho	67
Tabela 8.	Comparação dos derivados de invertase comercial obtidos com suporte pó bagaço	68

de cana e pó sabugo de milho

Tabela 9.	Seleção dos melhores derivados da invertase extraída e comercial	68
Tabela10.	Comparação da energia de ativação dos derivados da invertase comercial obtidos com pó de bagaço de cana e pó de sabugo de milho	74
Tabela11.	Comparação da energia de ativação dos derivados da invertase extraída obtidos com pó de bagaço de cana e pó de sabugo de milho	76

RESUMO

Invertase ou β -D frutofuranosidase (EC 3.2.1.26) é uma enzima que catalisa a hidrólise do terminal não redutor do resíduo β - frutofuranosídeos. A imobilização em suportes lignocelulósicos como resíduos bagaço de cana (BC) e resíduos de sabugo de milho (SM) são favoráveis, pois são suportes de baixo custo. A invertase comercial e extraída de *Saccharomyces cerevisiae* e os derivados foram caracterizadas enzimaticamente. O pH ótimo encontrado para os derivados foram bem próximas da encontrada para as invertases livres, em torno de pH 4,5 a 5,5. Os derivados apresentaram estabilidade térmica superior a das invertases livres e alguns derivados tiveram acréscimos na temperatura, como os derivados da invertase extraída obtido com pó BC e SM glutaraldeído e derivados da invertase comercial obtido com pó SM e BC amino e BC glioxil. A energia de ativação encontrada para a maioria dos derivados apresentou-se na faixa de 12 a 29 kJ/ mol, valores inferiores ao encontrados para as formas livres de invertase, sendo 32.02 kJ/ mol para invertase comercial e 34.94 kJ/ mol para invertase extraída. O derivado da invertase comercial obtido com pó sabugo de milho amino e o derivado invertase extraída obtido com pó de sabugo de milho glutaraldeído foram os derivados mais estáveis, apresentando capacidade de serem reutilizados em cinco ciclos subseqüentes. Estes derivados foram ensaiados em concentrações variadas de sacarose e os resultados mostraram que a invertase imobilizada apresenta inibição pelo produto glicose/frutose após 6 horas de ensaio. A utilização de resíduos da agroindústria como suportes para imobilização da invertase apresentou-se promissora para a aplicação em escala industrial.

Palavras-chave: invertase comercial e extraída de *Saccharomyces cerevisiae*; imobilização; sabugo de milho; bagaço de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

Invertase or β - D fructofuranosidase (EC 3.2.1.26) it is an enzyme that catalyzes hydrolysis of the non reducing terminal of the residue β - fructofuranosidase in fructofuranosideos. Immobilization on lignocellulosic supports as residue sugarcane bagasse and residues of corn cobs are favorable, therefore they are matrices of low cost commercial invertase and extracted of *Saccharomyces cerevisiae* and the derivatives had been enzymatically characterized. The optimum pH found for the derivatives had been well next to the found one for free invertases, around pH 4.5 the 5.5. The derivatives had presented superior thermal stability of free invertases and some derivatives had additions in the temperature, as the derivatives of extracted invertase gotten with dust sugarcane bagasse and corn cobs glutaraldehyde and derivatives of commercial invertase gotten with dust corn cobs and sugarcane bagasse amine and sugarcane bagasse glyoxyl. The energy of activation found for the majority of the derivatives were between 12 the 29 kJ/mol, less values to the found ones for the free forms of invertase, being 32.02 kJ/mol for commercial invertase and 34.94 kJ/mol obtained with extracted invertase. The derivative of commercial invertase gotten with dust corn cobs amine and the derivative extracted invertase gotten with dust of corn cobs glutaraldehyde had been the derivatives most stable, presenting capacity to be reused in five subsequent cycles. These derivatives had been assayed in concentrations of varied sucrose. The results with derivates shown that invertase presented inhibition for the product glucose/ fructose after 6 hours of test. The use of residues of the agribusiness as supports for immobilization of invertase presented promising for the application in industrial scale.

Keywords: commercial Invertase and extracted from *Saccharomyces cerevisiae*; immobilization; corn cobs; sugarcane bagasse.

1. Introdução

As enzimas estão presentes em todas as células vivas, onde exercem a função de catalisadores das reações que compõe as vias catabólicas e anabólicas do metabolismo celular. Os microrganismos são as principais fontes de enzimas industriais e especiais devido à grande variedade de atividades catalíticas, à possibilidade da produção das enzimas por processos fermentativos em grande escala com a regularidade necessária e à simplicidade dos requerimentos nutricionais (BON et al., 2008). O aumento da preocupação com as questões ambientais, com a qualidade dos produtos e com o consumo de energia vem incentivando vários setores industriais a buscar tecnologias “limpas”, mais sofisticadas e de baixo custo. Neste contexto, a tecnologia enzimática surgiu como uma alternativa para a substituição gradual de processos químicos por processos biocatalisadores (BON e PEREIRA, 1999).

As duas principais preocupações de condução de um processo em escala industrial são a forma de reduzir os custos unitários e a de aumentar a produção para os produtos obtidos a partir de uma reação enzimática. O primeiro passo para alcançar estes objetivos é a imobilização da enzima que permite o reuso da enzima, reduzindo assim os custos de produção (DAVID et al., 2006). A enzima invertase foi a pioneira no campo da imobilização, sendo imobilizada primeiramente em 1916 (KOTWAL e SHANKAR, 2009). A imobilização de invertase é bastante reportada em diferentes suportes, como: a quitosana (KOTWAL e SHANKAR, 2009), DEAE-celulose (SUSUKI et al., 1966), agarose (GOULART, 2007). A imobilização da invertase e sua aplicação em processos contínuos são atraentes, cujo objetivo é a obtenção de um produto final de elevada pureza sem ocasionar problemas de águas residuais muito comum nos processos químicos (HUSAIN et al., 1996).

Atualmente, materiais lignocelulósicos ganharam importância como suporte para imobilização de enzimas e células, tendo em conta a sua disponibilidade econômica como subprodutos agro-industriais (D’SOUZA e GODBOLE, 2002). Na maioria das vezes, muitos materiais utilizados para imobilização são sintéticos e não biodegradáveis, gerando consequências para o meio ambiente após sua utilização. Outros, por sua vez, são tóxicos ou podem apresentar propriedades indesejáveis tais como cor, sabor e aroma, tornando impróprios para imobilização, principalmente na indústria de alimentos (HUSAIN et al., 1996).

A celulose é um abundante recurso orgânico renovável com reconhecidas propriedades para diversas aplicações, e pode ser convenientemente funcionalizada como suporte estável. Recentemente, Mohmoud (2007) estudou a aplicabilidade dos resíduos de madeira como suporte para a imobilização de invertase. Foram analisadas diferentes formas de resíduos de madeira (aparas, cavacos e serragens), constatando que a absorção máxima ocorria em serragens. A alta capacidade de imobilização em serragem foi explicada com base na sua área de superfície aumentada. Além disso, serragens de madeira autoclavadas apresentaram maior capacidade que as não-autoclavadas. Esta, por sua vez, foi correlacionada com a remoção parcial da lignina, resultando em um aumento da área de superfície da celulose.

Estudos utilizando resíduos agro-industriais como suportes para imobilização de enzimas são importantes, pois podem diminuir custos dos processos de catálise enzimática.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Invertase

Invertases ou β -D frutofuranosidases (EC 3.2.1.26) é uma enzima que catalisa a hidrólise da ligação glicosídica da sacarose em β -frutofuranosidase em frutofuranosídeos (MARQUEZ et al., 2007). Seu nome comum, invertase, deve-se ao fato de que a hidrólise da sacarose leva à inversão da rotação óptica do meio reacional, basicamente em consequência do surgimento de frutose, quando observado em polarímetro. O produto de hidrólise da sacarose, o xarope de glicose-frutose, como ilustrado na Figura 1, é conhecido como “açúcar invertido”, o qual apresenta diversas características interessantes em relação ao xarope de sacarose: maior poder edulcorante (devido à presença da frutose), maior possibilidade de concentração (os monossacarídeos formados são mais solúveis que o dissacarídeo original), ponto de ebulição mais alto e ponto de congelamento mais baixo (em virtude da maior pressão osmótica do produto) (KOBLOITZ, 2008).

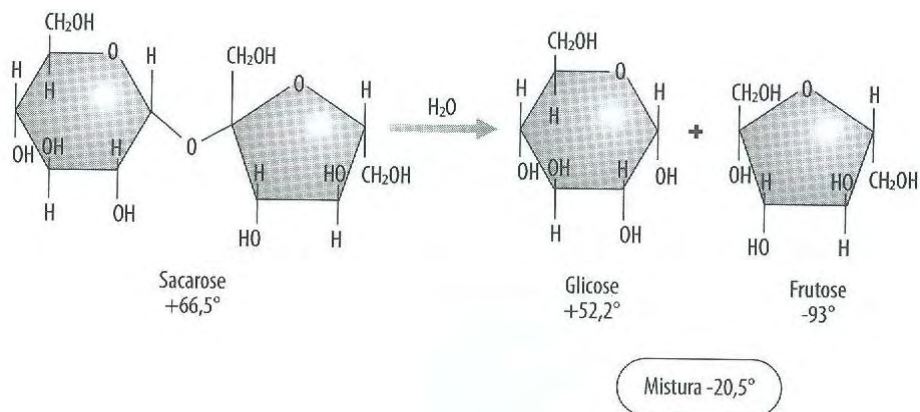


Figura 1: Reação de hidrólise da sacarose e rotação óptica de substrato e produtos.

A hidrólise enzimática da sacarose é preferível à hidrólise ácida, uma vez que não resulta na formação indesejável de sabor, assim como impurezas coloridas (KOTWAL e SHANKAR, 2009). O açúcar invertido é utilizado em confecções de balas, prevenindo a cristalização do açúcar, o que proporcionaria uma textura desagradável com característica arenosa ao produto e indesejável ao consumidor. Outra aplicação interessante e em maior escala, em nível mundial, é na indústria de refrigerantes.

A invertase é classificada na família GH32 de glicosídeos hidrolases, que inclui mais de 370 elementos, sendo relatados em vegetais (aspargo, beterraba,

cebola, chicória, entre outras) (KOBELITZ, 2008), bactérias, leveduras (*Saccharomyces* sp.) e fungos filamentosos (*Aspergillus* sp.) (ALEGRE et al., 2009). Leveduras (*Saccharomyces* sp.) produzem diferentes tipos de invertases: intracelulares, ligadas à parede, e, mais raramente, extracelulares. As enzimas ligadas à parede apresentam uma grande fração glicídica através da qual acredita-se que se liguem a mananas da parede celular. Sua temperatura ótima de atuação é 55 °C para soluções diluídas de sacarose e de 65 °C a 70 °C para soluções com concentração superior a 10%. Soluções acima de 20% de sacarose apresentam taxas decrescentes de hidrólise em virtude da reduzida disponibilidade de água no meio reacional (KOBELITZ, 2008). A termoestabilidade da invertase pode ser devido à estrutura terciária da proteína, a qual contém interações carboidrato – proteína, com ligações cruzadas na cadeia polipeptídica (MARQUEZ et al., 2007). Algumas das propriedades da invertase externa e interna estão apresentadas na Tabela 1 (GÁSCON et al., 1981).

Tabela 1: Algumas das propriedades das invertases externa e interna de *Saccharomyces cerevisiae*.

Propriedades	Invertase externa	Invertase interna
Massa molecular (kDa)	270000	135000
% Carboidrato	50	3
Atividade específica (U/mg de proteína)	2700	2900
Km (mM sacarose)	26	25
pH- estabilidade	3,0-7,5	6,0-9,0
pH- ótimo	3,5-5,5	3,5-5,5

Fonte: GÁSCON et al., 1981.

2.2. Imobilização de enzimas

As enzimas têm, intrinsecamente, excelentes propriedades, como: atividade, seletividade e especificidade. Estas características permitem o desenho de processos de síntese de produtos muito complexos em condições ecossustentadas. Mas, apesar do elevado potencial de aplicação das enzimas, devido à pressão dos consumidores, elas têm de ser otimizadas, de modo a cumprirem suas funções

biológicas com eficácia e eficiência. A catálise de reações em processos metabólicos complexos pode ser regulada em vários níveis e, assim, algumas reações passam a ter as características para serem aplicadas em processos industriais (BON et al., 2008).

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e a estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (VECCHIA et al., 2004).

Na seleção de um suporte para uma determinada aplicação, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como as relativas à possibilidade de regeneração. A Tabela 2 apresenta alguns fatores que podem influenciar no desempenho da imobilização (BON et al., 2008).

Tabela 2: Fatores que influenciam o desempenho de um sistema de enzima imobilizada

Enzima	<p>Propriedades Bioquímicas: Massa molar, grupos funcionais da superfície protéica, pureza (funções de inativação ou proteção das impurezas)</p> <p>Parâmetros Cinéticos: Atividade específica, perfil de pH e temperatura, parâmetros cinéticos para a ativação e inibição, estabilidade térmica, pH, solventes, contaminantes e impurezas</p>
Suporte	<p>Características Químicas: Composição e base química, grupos funcionais, estabilidade química, contribuições da superfície do suporte, tais como os microefeitos (pH, carga da superfície, natureza hidrofóbica e hidrofílica, efeito redutor e a presença de íons metálicos)</p>
Enzima imobilizada	<p>Método de Imobilização: Fixação de proteína, eficiência da enzima ativa, parâmetros cinéticos intrínsecos</p> <p>Efeitos de transferências de massa: Partição (diferente concentração do soluto dentro e fora das partículas do catalisador), difusão interna (poros) e externa</p> <p>Estabilidade: Operacional (expressa em tempo de meia-vida sob condições operacionais), estabilidade de estocagem</p>

Segundo Vecchia et al. (2004), a imobilização pode ocorrer através da adsorção (física ou iônica) ou da ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica. A Figura 2 apresenta esquematicamente a classificação dos métodos utilizados para imobilização das enzimas. A Tabela 3 apresenta a comparação entre os métodos de imobilização.

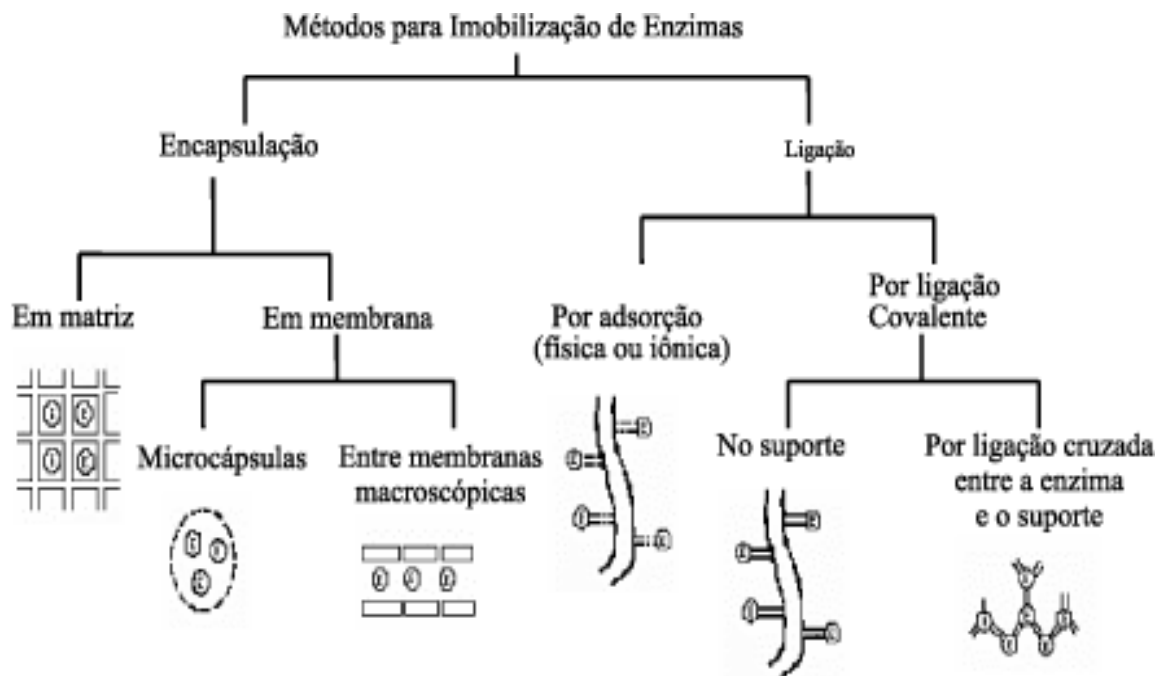


Figura 2: Classificação dos métodos de imobilização de enzimas. (Fonte: VECCHIA et al., 2004).

Tabela 3: Comparação entre os métodos de imobilização

Características	Ligações cruzadas	Adsorção Física	Ligação Iônica	Ligação Metálica	Ligação Covalente	Oclusão
Preparação	Intermediário	Simples	Simples	Simples	Difícil	Difícil
Força da ligação	Forte	Fraca	Intermediária	Intermediária	Forte	Intermediário
Atividade	Baixa	Intermediária	Alta	Alta	Alta	Baixa
Recuperação do suporte	Impossível	Possível	Possível	Possível	Rara	Impossível
Custo	Intermediário	Baixo	Baixo	Intermediário	Alto	Intermediário
Estabilidade	Alta	Baixa	Intermediário	Intermediário	Alta	Baixa
Aplicabilidade geral	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Proteção microbiana	Intermediário	Não	Não	Não	Não	Sim

Fonte: CHIBATA, 1978; KENNEDY e CABRAL, 1987.

A imobilização multipontual de uma enzima consiste na formação de várias ligações covalentes entre uma molécula de enzima e vários grupos ativos do suporte (BON et al., 2008). A ligação da enzima ao suporte dá-se entre grupos amino da enzima e grupos aldeído alifáticos pequenos do suporte. A imobilização multipontual covalente da enzima pode melhorar fortemente a estabilidade, a atividade e a seletividade da enzima. Muitas enzimas industriais têm sido altamente estabilizadas por ligação covalente multipontual. Obviamente, a promoção de ligações deste tipo, quando adicionadas intensamente em diferentes regiões da superfície da enzima, pode promover diversos efeitos funcionais da enzima, como a inativação enzimática (GRAZÚ et al., 2010).

2.2.1. Vantagens da Imobilização de Enzimas

Do ponto de vista comercial, as principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas, em relação às enzimas solúveis são, praticamente, as relativas à catálise heterogênea (BON et al., 2008), como:

- Aproveitar a atividade catalítica por um maior período de tempo, uma vez que a enzima não deve ser desnaturada ao final do processo em batelada.
- Facilitar a separação do catalisador e do produto da reação, já que a enzima imobilizada não é solúvel no meio da reação, e esta é retirada no interior do biorreator, e o substrato não convertido e o produto são retirados sem contaminação do biocatalisador.
- Reduzir o volume de reação, porque a enzima imobilizada e retida no biorreator permite alta concentração enzimática em menor volume de reator, isto é, alta atividade por unidade de volume, muito superior à que seria obtida com a enzima livre.
- Alterar, em alguns casos, as propriedades catalíticas da enzima em relação a sua forma solúvel, como, por exemplo, conferir-lhe maior estabilidade ao pH e à temperatura, reduzir os efeitos de inibição pelo substrato e produto que são removidos continuamente do biorreator.

2.2.2. Suportes alternativos para imobilização

O sabugo de milho possui partes centrais da espiga na qual os grãos estão presos, é o resíduo gerado após ser debulhado o milho. Para cada 100 kg de espigas de milho, aproximadamente 18 kg (70% base úmida), são formados pelo sabugo (TSAI et al., 2000). De acordo com o Ministério da Agricultura, em 2005 o Brasil produziu 35134 mil toneladas de milho, resultando em 6,32 mil toneladas de sabugo de milho.

Estruturalmente, o sabugo é formado por quatro partes distintas: palha fina, palha grossa, anel lenhoso e medula. A palha fina constitui aproximadamente 4,1% do sabugo de milho em peso; a palha grossa 33,7%; o anel lenhoso 60,3% e a medula, 1,9%. As Figuras 3 e 4 apresentam a estrutura fibrosa do sabugo de milho e a Figura 5 mostra o pó de sabugo de milho utilizado como suporte. Devido às características de dureza e resistência à abrasão, os componentes do sabugo serviram de base ao início de suas aplicações nas indústrias (ZIGLIO et al., 2007).

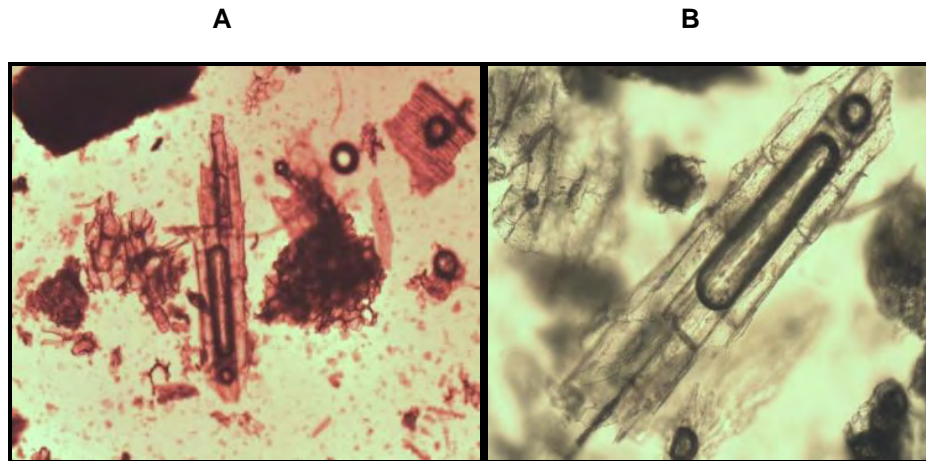


Figura 3: Imagens de microscopia óptica do sabugo de milho. **(A):** Panorâmica; **(B)** Objetiva (aumento 10x) (Fonte: **BENEDETTI, 2009**).

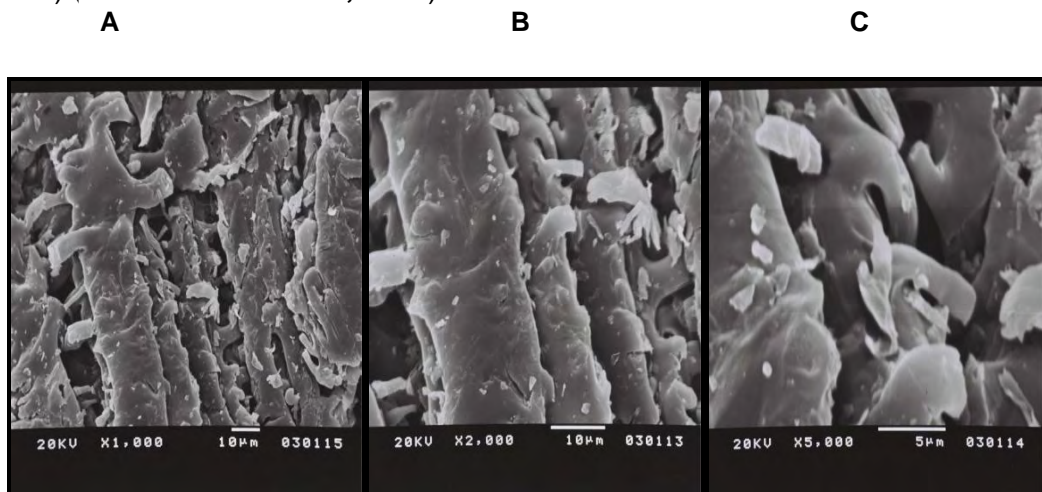


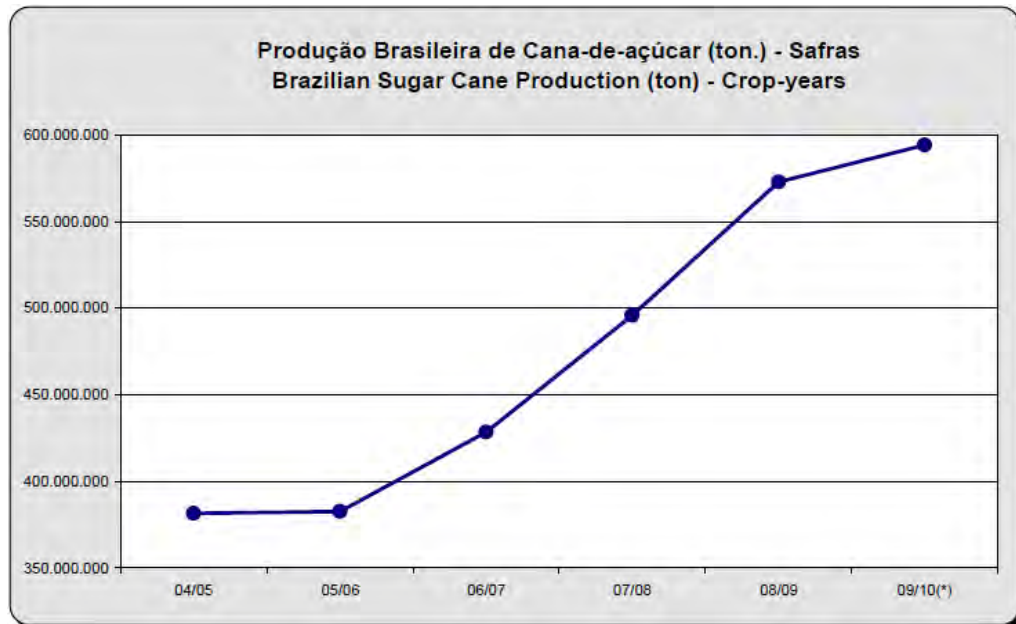
Figura 4: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do sabugo de milho – **(A)**1.000 X, **(B)** 2.000 X, **(C)** 5.000 X (Fonte: **BENEDETTI, 2009**).



Figura 5: Pó de sabugo de milho utilizado como suporte para imobilização de enzimas.

Outro subproduto mais abundante e proveniente de material renovável é o bagaço de cana-de-açúcar, uma vez que o Brasil é o maior produtor de cana de açúcar do

mundo. No ano de 2009 foram produzidas 593 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, de acordo com a secretária de Produção e Agronegócio do Ministério da Agricultura (Figura 6).



(*) Posição em 01/03/2010

Figura 6: Produção Brasileira de Cana de açúcar (Fonte: Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2010).

Segundo Sun et al., (2004), uma usina sucroalcooleira produz cerca de 280Kg de bagaço por tonelada de cana moída, desta forma a estimativa de produção de bagaço para (2009) foi de 165 milhões de toneladas. O bagaço contém em torno de 40-50% de celulose, 25-35% de hemicelulose, 20-22% de lignina e de 8-10% de outros compostos (CUNHA, 2006). As Figuras 7 e 8 mostram a estrutura fibrosa do bagaço de cana e a Figura 9 mostra o pó de bagaço de cana utilizado como suporte.

As fibras lignocelulósicas apresentam hidroxilas reativas acessíveis, podendo reagir com outros grupos funcionais polares, como, por exemplo, os presentes nas resinas fenólicas (TITA et al., 2002). Pelo fato de o bagaço de cana e o sabugo de milho apresentarem hidroxilas livres reativas, podem ser ligados braços químicos para a imobilização das enzimas, produzindo suportes glioxil-bagaço de cana e/ ou sabugo de milho, amino bagaço de cana e/ ou sabugo de milho, ou glutaraldeído

bagaço de cana e/ ou sabugo de milho (GUISÁN, et al., 1997). A Tabela 4 compara as características químicas e físicas do bagaço de cana e sabugo de milho.

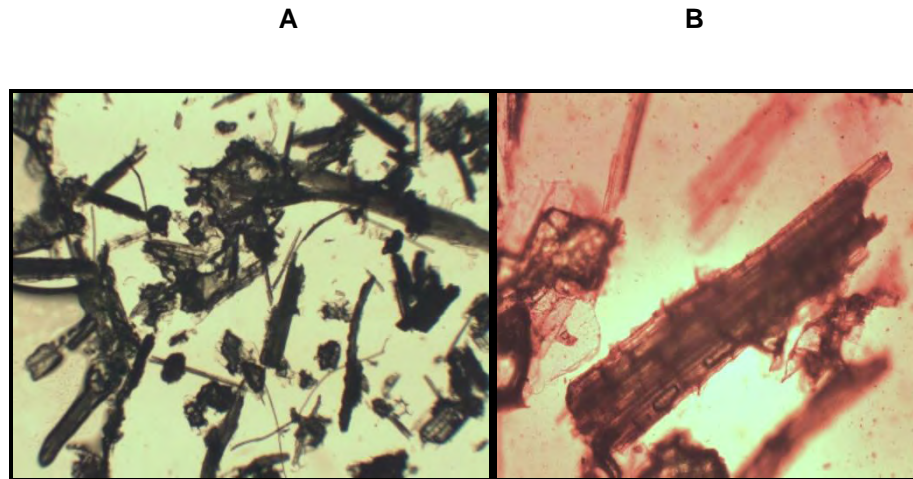


Figura 7: Imagens de microscopia óptica do bagaço de cana. **(A):** Panorâmica; **(B)** Objetiva (aumento 10x) (Fonte: **BENEDETTI, 2009**).

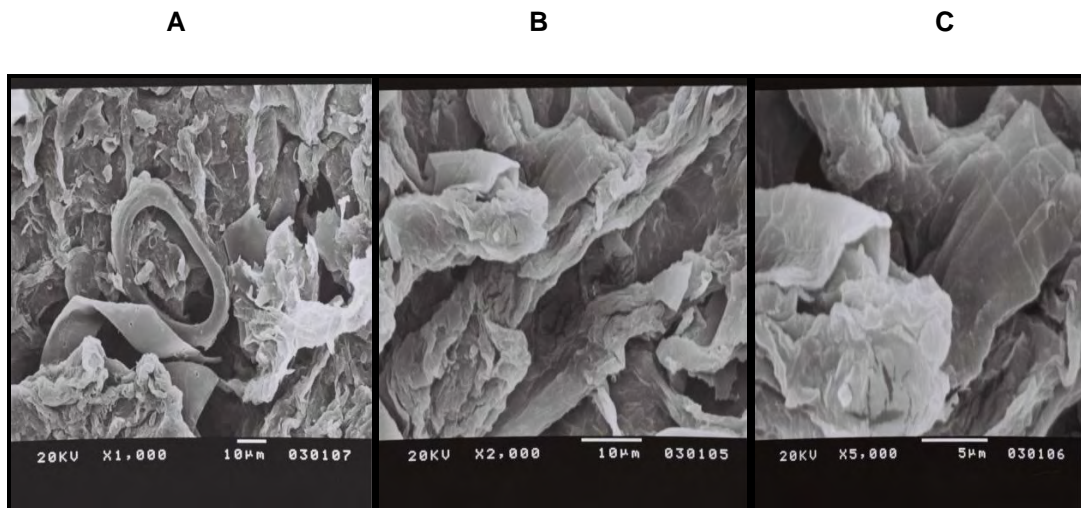


Figura 8: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do bagaço de cana **(A)**1.000 X, **(B)** 2.000 X, **(C)** 5.000 X (Fonte: **BENEDETTI, 2009**).



Figura 9: Pó de bagaço de cana utilizado como suporte para imobilização de enzimas.

Tabela 4: Caracterização física e química do bagaço de cana e sabugo de milho (BRANDÃO, et al., 2004).

Material	U dag kg ⁻¹	ρ_p g cm ⁻³	ρ_g g cm ⁻³	P cm ³ cm ⁻³	pH em H ₂ O
Bagaço de cana	13,62	0,51	0,10	0,80	6,03
Sabugo de milho	13,31	0,97	0,34	0,65	6,14

U - umidade do material, ρ_p – massa específica das partículas, ρ_g - massa específica global, P. porosidade.

2.3. Catálise enzimática

Praticamente todas as reações químicas que conformam o metabolismo celular são mediadas por enzimas, as quais são proteínas catalisadoras extremamente eficiente e de alta seletividade que aumentam a velocidade das reações, sem sofrerem alterações no processo global (CHAMPE et al., 2006). A catálise enzimática ocorre no interior do limites de uma cavidade na enzima chamada sítio ativo. A superfície do centro ativo é contornada com resíduos de aminoácidos cujos grupos substituintes se ligam ao substrato e catalisam a sua transformação (NELSON e COX, 2006). Uma vez que a função das enzimas é a catálise de reações químicas, todo o estudo da atividade dessa função deve ser baseado em medidas quantitativas da velocidade da reação catalisada.

Considerando a teoria proposta por Michaelis-Menten, em todas as reações enzimáticas, a enzima (E) se combina rápida e reversivelmente com o substrato (S)

para formar um complexo (ES) (NELSON e COX, 2006). Apenas se considera um passo relevante do ponto de vista cinético entre o complexo ES e a liberação de produto (P) com regeneração da molécula de enzima, sendo que o passo da formação de produto é irreversível, como descrito na Figura 10.

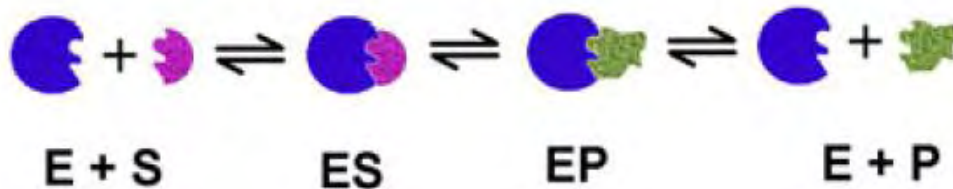


Figura 10: Reação catalisada por enzimas (Fonte: SCHEFFER e GONZÁLEZ, 2003).

Em concentrações relativamente baixas de substrato, V_0 (velocidade inicial) aumenta quase que linearmente com o aumento da $[S]$ (concentração de substrato). Já em altas $[S]$, V_0 aumenta cada vez menos em resposta aos aumentos da $[S]$. Por fim, é alcançado um ponto acima do qual ocorrem aumentos insignificantes de V_0 , à medida que a $[S]$ aumenta (Figura 11). Esse patamar atingido para tais valores de V_0 é muito próximo da velocidade máxima, $V_{m\acute{a}x}$ (NELSON e COX, 2006).

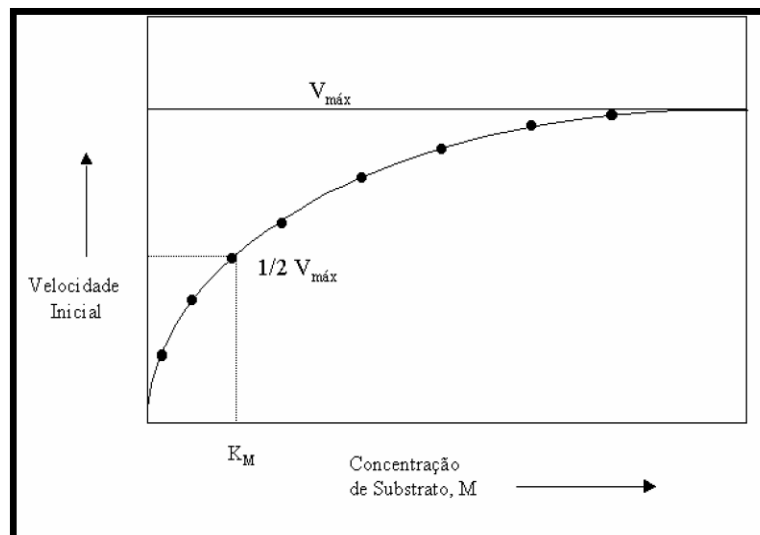


Figura 11: Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima (Fonte: ALMEIDA, 2007).

A equação matemática que define a relação quantitativa entre a velocidade de uma reação enzimática e a concentração do substrato, é a equação de Michaelis-Menten (Figura 12). O K_m é definido como a concentração de substrato necessária para que a velocidade da reação enzimática seja a metade da máxima ($V_{m\acute{a}x}$). O valor de K_m varia, consideravelmente, de uma enzima para outra e em uma enzima particular com diferentes substratos. Em alguns casos, mudanças nas condições de reação, como pH ou temperatura, podem ter influencia no valor de K_m (COPELAND, 2000).

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

Figura12: Equação proposta por Michaelis-Menten (**Fonte:** NELSON e COX, 2006).

Através da equação de Michaelis-Menten é possível a transformação em gráfico dos duplos recíprocos ou Lineweaver-Burk, o gráfico de $1/V_0$ versus $1/[S]$ é representado por uma linha reta. Essa linha tem uma inclinação de $K_m/V_{m\acute{a}x}$, um intercepto de $1/K_m$ no eixo de $1/[S]$. O gráfico dos duplos recíproco para velocidade de reações enzimáticas é muito útil na diferenciação de diferentes mecanismos de reação enzimática e na análise de inibidores de enzimas (NELSON e COX, 2006).

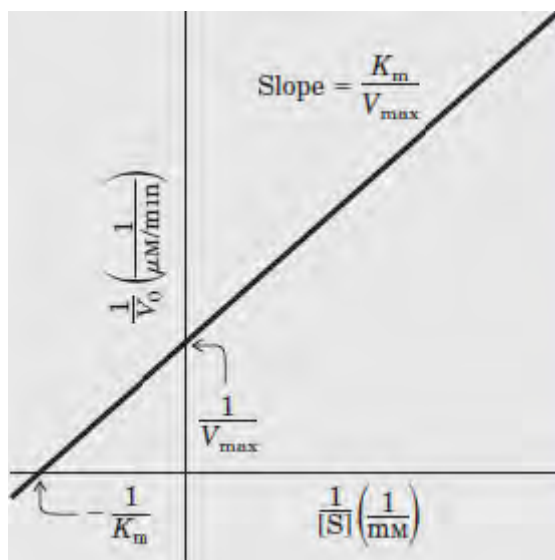


Figura13: Gráfico dos duplos recíprocos de Lineweaver-Burk (**Fonte:** NELSON e COX, 2006).

2.3.1. Inibição da atividade enzimática

Qualquer substância que possa diminuir a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima é chamada de inibidor. Inibidores reversíveis (podem ser competitiva, incompetitiva ou mista) ligam-se à enzima por meio de ligações não-covalente. A diluição do complexo enzima-inibidor resulta na dissociação do inibidor reversivelmente ligado e na recuperação da atividade enzimática. A inibição irreversível ocorre quando uma enzima inibida não recupera sua atividade quando o complexo enzima-inibidor é diluído (CHAMPE et al., 2006).

2.3.1.1. Inibição competitiva

Esse tipo de inibição ocorre quando o inibidor compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima. Enquanto o inibidor (I) ocupar o centro ativo da enzima, ele impedirá a ligação do substrato. Os inibidores competitivos são compostos cujas estruturas moleculares frequentemente lembram a do substrato e que se combina com a enzima para formar um complexo EI. Nesse tipo de inibição ocorre aumento de k_m aparente.

2.3.1.2. Inibição Incompetitiva

Esse tipo de inibição pode ser reconhecido por seu efeito característico de alterar a variação de K_m e V_{max} . O inibidor se liga em um sítio diferente do sítio ativo do substrato, porém, diferentemente do inibidor competitivo, liga-se ao complexo ES.

2.3.1.3 Inibição mista

Esse inibidor também se liga a um sítio diferente do sítio ativo do substrato, mas ele pode se ligar tanto a E como a ES. Um inibidor misto afeta tanto o K_m como o $V_{máx}$ (NELSON e COX, 2006).

2.4. Fatores que influenciam a atividade enzimática

Em uma reação catalisada por enzimas, é fundamental determinar a velocidade da reação e verificar como esta é alterada em resposta às mudanças dos diversos parâmetros experimentais (NELSON e COX, 2006). As respostas enzimáticas a esses fatores fornecem informações valiosas sobre como funcionam as enzimas nas células vivas.

2.4.1. Concentração do substrato

Para uma enzima típica, à medida que a concentração de substrato aumenta a velocidade inicial se eleva até alcançar um valor máximo. Quando aumentos adicionais na concentração do substrato já não mais elevam a velocidade inicial diz-se que a enzima está saturada pelo substrato (MURRAY, et al., 2007).

2.4.2. Concentração de enzimas

Em uma faixa finita, o gráfico de velocidade *versus* concentração de enzima ([E]) deve gerar uma reta. A faixa sobre a qual essa reta deverá se manter dependente da habilidade de se medir a verdadeira velocidade inicial da reação, variando-se a concentração enzimática. Quando se adiciona mais enzima, a velocidade pode aumentar até o ponto em que quantidade significativa da concentração total de substrato está sendo diminuída durante o ensaio. Como resultado, obtém-se um gráfico de v *versus* [E], que é linear à baixa [E], mas que inicia uma curva decrescente, quando passa a ocorrer uma saturação, à alta [E]. Uma terceira situação pode acontecer quando há um equilíbrio inadequado da enzima. Nesse caso, o gráfico de v *versus* [E] também fornece uma curva mais crescente (COPELAND, 2000).

2.4.3. pH

As enzimas têm um pH ótimo (ou um intervalo de pH) no qual a sua atividade é máxima. Em um pH maior ou menor, a atividade diminui. As cadeias laterais dos

aminoácidos do centro ativo podem atuar como ácidos e bases fracas com funções críticas que dependem da manutenção de certos estados de ionização e, em algum lugar de proteína, as cadeias laterais ionizadas podem desempenhar um papel essencial nas interações que mantêm a estrutura da proteína (LEHNINGER, 1977).

No estudo das enzimas, torna-se extremamente importante determinar no início da investigação, o pH ótimo e a extensão de seu platô. A mistura de reação pode então ser cuidadosamente controlada com tampões de capacidade tamponante adequada (CONN e STUMPF, 1975).

2.4.4. Temperatura

A velocidade de reação aumenta com a temperatura, até o pico de velocidade ser atingido. Esse aumento é devido ao aumento do número de moléculas com energia suficiente para atravessar a barreira de energia e formar os produtos da reação. Uma elevação maior da temperatura resulta em redução na velocidade de reação, como resultado da desnaturação da enzima, induzida pela temperatura (CHAMPE et al., 2006).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Imobilizar enzima invertase comercial e extraída de *Saccharomyces cerevisiae* em suportes alternativos de sabugo de milho e bagaço de cana, selecionando os derivados mais ativos e estabilizados.

3.2. Objetivos Específicos

- Extração e purificação parcial da enzima invertase de *S. cerevisiae*;
- Ativação e funcionalização dos diferentes suportes;
- Imobilização em pó de bagaço de cana e de sabugo de milho;
- Obtenção dos derivados mais ativos e estabilizados;
- Comparação dos derivados estabilizados com as enzimas livres de *S. cerevisiae* e comercial;
- Determinação das propriedades físicas - químicas dos melhores derivados selecionados, comparando-os com as enzimas livres.

4. Material e Métodos

4.1. Material

4.1.1. Enzima

O material utilizado neste trabalho foram enzimas produzidas por leveduras *Saccharomyces cerevisiae*: invertase comercial (Sigma; I9253, lote 120H02061) e invertase extraída de fermento de panificação (Fleischmann).

4.2. Métodos

4.2.1. Extração da enzima invertase

A levedura de panificação foi macerada em almofariz contendo areia, éter e água, em banho de gelo, para a ruptura das células e liberação da enzima intracelular e do espaço periplasmático. Após intenso processo de maceração mecânica, o extrato foi deixado em repouso por 30 minutos e centrifugado a 4°C por 20 minutos a 7.552 g. O sobrenadante foi quantificado quanto ao volume e dialisado.

4.2.2. Cromatografia em Resina DEAE-Sephacel

Extrato bruto contendo a enzima invertase livre extraída foi dialisado contra água por 24 horas e submetido à cromatografia em resina trocadora de íons DEAE-Sephacel em “batch” com cargas iônicas equilibradas em tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 para purificação parcial da invertase e posteriormente imobilização desta enzima em suportes alternativos.

4.2.3. SDS-PAGE

A eletroforese em condições desnaturante foi realizada em gel de poliacrilamida-SDS, de acordo com o método de LAEMMLI (1970), usando-se acrilamida 12%. As bandas protéicas foram visualizadas com corante Brilliant G-colloidal concentrate, conforme NEUHOFF et al (1987).

4.2.4. Determinação protéica

As concentrações de proteínas foram determinadas pelo método de Lowry (1951) modificado por Hartree (1972), utilizando soroalbumina bovina como padrão, com leituras das absorvâncias em λ igual a 660nm. A absorvidade utilizada foi de 3, 5019 (mg/0,5mL) cm^{-1} .

4.2.5. Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática das enzimas invertases foi determinada através da quantificação de açúcares redutores produzidos, utilizando o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), segundo o método de Miller (1959). Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de açúcar redutor por minuto. Utilizou-se uma curva de calibração de glicose e frutose, cujo coeficiente de extinção molar determinado foi 0, 4117 (μ mol/0,25mL) cm^{-1} .

4.2.6. Atividade enzimática específica

A atividade específica das invertases foi calculada através da relação entre o número de unidades por miligrama de proteína.

4.2.7. Caracterização enzimática da invertase livre comercial e extraída

4.2.7.1. Concentração de substrato

As invertases livres foram ensaiadas a partir de uma solução de sacarose. Os valores de concentração de sacarose para invertase extraída foram: 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65 e 75 mmol L^{-1} e para invertase comercial foram: 10, 30, 50, 70, 90, 110, 130 e 150 mmol L^{-1} . Utilizaram-se quantidades de 160 μ l de invertase (diluída 30 vezes em água) para uma solução final de 8mL, completados com tampão acetato de sódio (50 mmol L^{-1} pH 5,0). Após a reação na temperatura ótima (40 $^{\circ}$ C para invertase comercial) e (50 $^{\circ}$ C para invertase extraída). Os valores das constantes aparentes de Michaelis-Menten (K_m) e da velocidade máxima (V_{max})

foram calculadas a partir da velocidade inicial de cada ensaio utilizando-se o gráfico de Lineweaver-Burk.

4.2.7.2. Determinação de pH ótimo

Para determinação do pH ótimo na reação, as invertases livres foram incubadas em tampões de Mcllvaine (fosfato de sódio 200mmol L⁻¹ e citrato de sódio 100 mmol L⁻¹) com diversos valores: pH 3, pH 4,0, pH4,5, pH 5,0, pH5,5, pH 6,0, pH 7,0, pH 8,0. Este sistema foi utilizado por apresentar ampla faixa de pHs ajustáveis na faixa de pH 3,0 – 8,0.

4.2.7.3. Estabilidade frente ao pH

As invertases livres foram incubadas em tampões de Mcllvaine com diversos valores: pH 3, pH 4,0, pH 4,5, pH 5,0, pH5,5, pH 6,0, pH 7,0, pH 8,0. Para pH 9,0 e pH 10,0, utilizou-se tampão tetraborato de sódio 200mmol L⁻¹. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente (26^oC) por 40 e 60 minutos, sendo realizadas dosagens de atividade nestes intervalos de tempo no pH ótimo.

4.2.7.4. Determinação da temperatura ótima

As invertases livres foram ensaiadas em tampão correspondente ao seu pH ótimo em diferentes temperaturas (4, 22, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90 °C) . Com estes dados, construiu-se o gráfico de Arrhenius, ou seja, $\ln V_{\max}$ em função do inverso da temperatura (em Kelvin). Em seguida, traçou-se a reta tangente nos pontos em que ocorreu acréscimo da atividade enzimática, podendo-se calcular o valor da energia da ativação:

$$\text{Inclinação da reta} = \frac{-E_a}{R}$$

Sendo: E_a = energia de ativação

$$R \text{ (constante universal dos gases)} = 8,31475 \text{ KJ/ mol}$$

4.2.7.5. Estabilidade térmica da enzima livre

As enzimas livres foram diluídas em água e mantidas incubadas, em temperaturas de (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80°C). Foram retiradas alíquotas em 1 e 2 horas, colocadas em banho de gelo para interromper o efeito da temperatura e, a seguir, determinou-se a estabilidade térmica das enzimas, na temperatura e pH ótimos.

4.2.8. Obtenção dos suportes

4.2.8.1. Suporte alternativo de resíduo agroindustrial- Sabugo de milho (SM)

O material residual (sabugo de milho) testado como matriz alternativa de imobilização, obtido junto à agroindústria da região, foi fragmentado e lavado abundantemente em água corrente. Ao final da última lavagem, foi utilizada água destilada e determinados os açúcares redutores. Retirado o excesso de água, o material foi seco em estufa de circulação forçada por 24 horas. Após a secagem, o material foi triturado em moinho de faca e em liquidificador e tamisado em malhas de 125 mesh. O pó fino assim obtido foi utilizado no processo de imobilização.

4.2.8.2. Suporte alternativo de resíduo agroindustrial-Bagaço de cana (BC)

O resíduo de bagaço de cana foi moído em máquina picadeira. Em um recipiente cilíndrico de PVC envolto por camadas de gaze na extremidade (técnica desenvolvida no laboratório), adicionou-se o resíduo de bagaço de cana, onde foi lavado abundantemente em água corrente por aproximadamente 6 horas, para eliminação das impurezas. Em seguida, o conteúdo foi despejado em bandeja plástica com água destilada e após a decantação retirou-se uma alíquota para determinação de açúcares redutores. Eliminado o excesso de água, o material foi seco em estufa com circulação de ar a 100°C por 24 horas. O bagaço seco foi triturado em liquidificador e tamisado em malhas de 125mesh. O pó fino assim obtido foi utilizado no processo de imobilização.

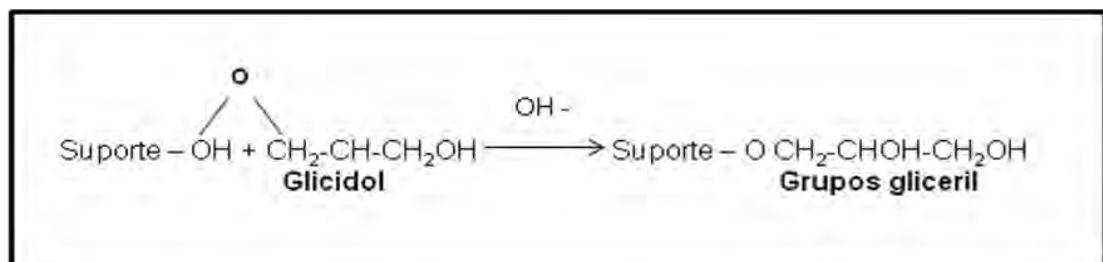
4.2.9. Tratamento dos suportes

4.2.9.1. Descompressão explosiva térmica dos suportes alternativos

Os suportes obtidos conforme descritos anteriormente foram submetidos à autoclavagem por 15 minutos a 120°C em presença de álcool 70%, após este período a autoclave foi desligada, e a válvula aberta rapidamente, deixando o vapor sair com conseqüente queda na pressão interna da autoclave. Os materiais assim “explodidos” foram filtrados sob vácuo e o pó armazenado à 4°C em frascos apropriados. Este método consiste na expansão de materiais lignocelulósicos do pó de sabugo de milho e do pó de bagaço de cana, aumentando a superfície de contato destes suportes.

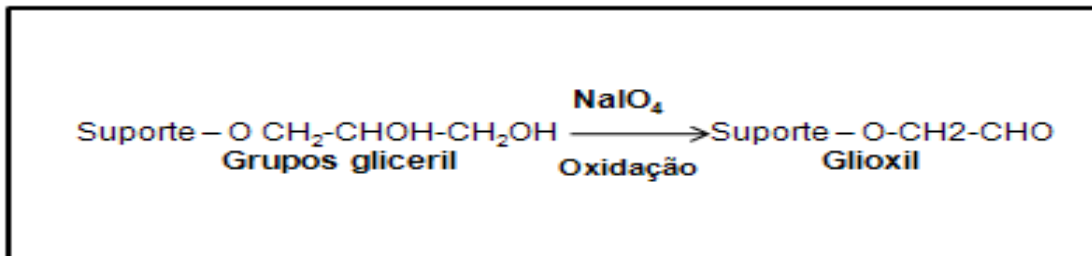
4.2.9.2. Ativação dos suportes

A ativação dos resíduos agroindustriais devidamente fragmentados foi realizada em passos consecutivos. Para 50g de suportes foram adicionados 1L de NaOH 2,0 mol. L⁻¹, mantidos sob agitação suave por 24 horas, após este período foram filtrados sob vácuo e lavados abundantemente com água destilada. A partir deste passo utilizou o mesmo protocolo usado para o suporte agarose, descrito por GUISÁN (2006). A uma alíquota de cada resíduo, em banho de gelo, foi adicionado água destilada, NaOH 1,7mol. L⁻¹ (gelado), NaBH₄ (boridreto de sódio) e, sob agitação suave, glicidol (2,3- epóxi-propanol). A solução foi mantida 18 horas sob agitação suave. Em seguida o material foi filtrado e lavado sob vácuo abundantemente com água destilada, obtendo assim as matrizes ativadas. Desta maneira, as matrizes ativadas passam a apresentar grupos ativos gliceril em sua estrutura, como na reação a seguir.



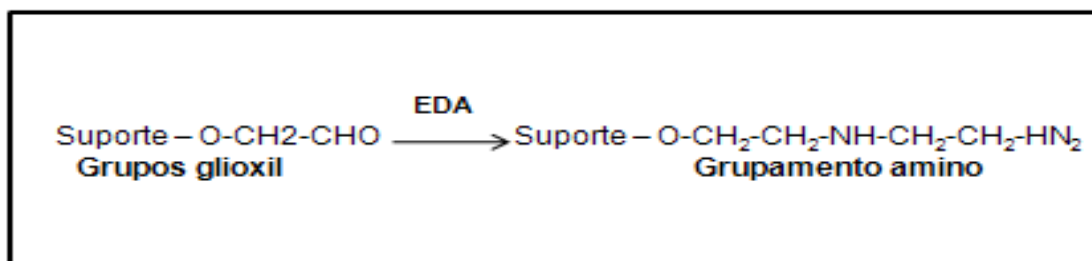
4.2.9.3. Suporte glioxil

As matrizes ativadas foram submetidas à oxidação na presença de periodato de sódio (NaIO_4) 100 mmol. L^{-1} , sob agitação suave, por 90 minutos, quando ocorre ruptura dos grupos gliceril formando grupos glioxil. Transcorrido esse tempo, o resíduo funcionalizado foi filtrado e lavado sob vácuo abundantemente com água destilada. A reação a seguir descreve o procedimento.



4.2.9.4. Suporte amino

Os suportes glioxil-SM e glioxil-BC previamente preparados sofreram reação com etilenodiamina (EDA) $2,0 \text{ mol. L}^{-1}$, em pH 10,0 por 2 horas, sob agitação suave. Após este período, adicionou-se NaBH_4 , mantendo os resíduo por mais 2 horas em agitação suave. Posteriormente, os suportes foram lavados abundantemente com tampão acetato de sódio 200 mmol. L^{-1} pH 4,0 e tampão borato de sódio 100 mmol. L^{-1} pH 9,0. Ao fim, sucessivas lavagens com água e filtrado sob vácuo em funil. A reação a seguir descreve o procedimento.



4.2.9.5. Suporte glutaraldeído

Os suportes amino-SM e amino-BC funcionalizados sofreram reação com glutaraldeído. A um volume dos suportes amino-SM e amino-BC funcionalizados foram adicionados tampão fosfato de sódio 200 mmol. L⁻¹ em pH 7,0. Em seguida, adicionado glutaraldeído 25% (v/v) lentamente a estas suspensões, mantendo-se o pH em 7,0. Após 14 horas sob agitação suave, as matrizes foram filtradas e lavadas sob vácuo abundantemente com água. Estes suportes devem ser utilizados nas primeiras 14 horas.

4.2.10. Preparo de derivados enzimáticos

4.2.10.1. Derivados de glioxil- SM e BC

Foram utilizados 32 mL de solução de enzima (extraída) ajustado a pH 10 com sal de carbonato de sódio e 3,70 mL de solução de enzima (comercial) diluída em tampão carbonato de sódio 100 mmol. L⁻¹ pH 10, para 4g de cada suporte.

As suspensões foram mantidas a 25⁰C sob agitação constante, em intervalos regulares de tempo foram retiradas alíquotas do sobrenadante (filtrado da suspensão), juntamente com alíquota de parte reservada da solução enzimática (utilizada como controle), para acompanhamento das atividades enzimáticas. Após processo de imobilização foi acrescentado boroidreto de sódio (1mg/mL de suspensão), mantido por 30 minutos sob agitação suave, para redução dos grupos remanescentes do suporte após a ligação da enzima. Em seguida, foram lavados com água destilada e tampão acetato de sódio 200 mmol. L⁻¹ pH 5,0 sob vácuo em funil.

4.2.10.2. Derivado amino – SM e BC

Utilizou-se 32 mL de solução de enzima (extraída) ajustado a pH 7 com sal de fosfato de sódio dibásico e 3,70mL de solução de enzima (comercial) diluída em tampão fosfato de sódio 100 mmol. L⁻¹ pH 7 para 4g de cada suporte. As suspensões foram mantidas sob agitação constante a 25⁰C. Em intervalos

regulares de tempo foram retiradas alíquotas do sobrenadante (filtrado da suspensão), juntamente com alíquota de parte reservada da solução enzimática (utilizada como controle), para acompanhamento das atividades enzimáticas. Após a imobilização o derivado foi lavado com água e tampão acetato de sódio 200 mmol L⁻¹ pH 5,0 sob vácuo em funil.

4.2.10.3. Derivado glutaraldeído- SM e BC

Repete-se o processo de imobilização em amino, porém com o suporte funcionalizado com o grupo glutaraldeído. Ao final do processo de imobilização o derivado foi filtrado para remoção das proteínas não imobilizadas e então uma solução de boroidreto de sódio (1mg/mL de suspensão) diluído em tampão carbonato de sódio 100 mmol L⁻¹ pH 10 foi adicionado e mantido sob agitação suave por 30 minutos, após este tempo, ocorre a redução do derivado. No final do procedimento, o derivado foi lavado com água e tampão fosfato de sódio 200 mmol L⁻¹ pH 7,0 sob vácuo em funil.

4.2.10.4. Ensaio enzimático dos derivados

Após o procedimento de imobilização o derivado (suporte-enzima) assim originados foram submetidos a ensaios enzimáticos, utilizando 100mg de derivado e 5mL de sacarose 2% (enzima comercial), 0,02 g de derivado e 1mL sacarose 2% (enzima extraída) como substrato em tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH5,0.

Os derivados+substrato, permaneceram incubado por 30 minutos a 50 °C, e ao final dos ensaios, as amostras foram diluídas 60 vezes em 1 mL de água e 250µl foram colocados em 250µl de solução de ácido-3,5' dinitrosalicílico (DNS). Após a fervura adicionou-se 2,5mL de água destilada, realizando leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540_{nm}.

4.2.11. Rendimento de imobilização

Para determinar a quantidade percentual de enzima imobilizada ao suporte, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$R\% = \frac{AI - AF}{TAI} \times 100$$

Onde: R= rendimento de imobilização

AI= atividade inicial

AF= atividade final

TAI = total de atividade inicial

4.2.12. Eficiência Catalítica

Para determinar a eficiência catalítica dos derivados ensaiados foi utilizado a seguinte fórmula:

$$EF\% = AD / AL \times 100$$

Onde: EF= eficiência catalítica

AD= atividade do derivado

AL = atividade da enzima livre

4.2.13. Caracterização enzimática dos derivados de invertase comercial e extraída

4.2.13.1. Seleção dos melhores derivados (suporte+ invertase)

Os melhores derivados foram selecionados através da utilização do cálculo de rendimento de imobilização. Dos 12 derivados obtidos, 7 foram selecionados.

Estes derivados foram ensaiados e comparados com a invertase livre comercial e extraída.

4.2.13.2. Determinação de pH ótimo dos derivados

Para determinação do pH ótimo na reação, os derivados foram incubados em tampões de Mcllvaine com diversos valores: pH 3,2 pH 4,2, pH4,5, pH 5,0, pH5,5, pH 6,0, pH 7,0, pH 8,0. Este sistema foi utilizado por apresentar ampla faixa de pHs ajustáveis na faixa de pH 3,0 – 8,0.

4.2.13.3. Determinação da temperatura ótima dos derivados

As derivados foram ensaiados em tampão correspondente ao seu pH ótimo (tampão Mcllvaine na faixa de 4,5-5,5) em diferentes temperaturas (4, 22, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90 °C). Com estes dados, construiu-se o gráfico de Arrhenius, ou seja, $\ln V_{\max}$ em função do inverso da temperatura (em Kelvin). Em seguida, traçou-se a reta tangente nos pontos em que ocorreu acréscimo da atividade enzimática, podendo-se calcular o valor da energia da ativação:

$$\text{Inclinação da reta} = \frac{-E_a}{R}$$

Sendo: E_a = energia de ativação

$$R \text{ (constante universal dos gases)} = 8,31475 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$$

4.2.13.4. Estabilidade térmica dos derivados

Os derivados foram diluídos em água e mantidos incubados em temperaturas de (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80°C). Foram retirada alíquotas em 1 e 2 horas, determinando assim, a estabilidade enzimática dos derivados, comparando- os com a invertase livre.

4.2.13.5. Capacidade de reutilização dos derivados

Os melhores derivados ativos e estabilizados foram submetidos a ensaios de reutilização. Os derivados foram colocados em soluções de sacarose 2 %, incubados por 30 minutos a 50⁰C. As alíquotas das amostras incubadas foram retiradas ao final da reação e dosado açúcares redutores. Em seguida, os derivados foram lavados abundantemente com água e tampão acetato de sódio 50 mmol. L⁻¹ pH 5. Após as lavagens, os derivados foram incubados em uma nova solução de sacarose 2% e todo o procedimento descrito anteriormente foi repetido. Este procedimento foi realizado por seis vezes.

4.2.13.6. Incubação dos derivados em diferentes concentrações de sacarose

Os melhores derivados ativos e estabilizados foram ensaiados na presença de sacarose em concentrações que variaram de 5,8, 10, 20, 30, 110 mmol. L⁻¹. As amostras foram incubadas a 50⁰C, retirando-se alíquotas de amostras em diferentes tempos de reação, sendo em 0,5, 1, 6 e 22 horas. Este ensaio teve como objetivo verificar a possível inibição da atividade invertásica pelo produto de hidrólise.

5. Resultados e Discussão

O presente estudo foi desempenhado com o desígnio de obter a caracterização enzimática e cinética da enzima invertase comercial e extraída de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, para posterior imobilização e obtenção de derivados ativos e estáveis, aptos para hidrolisar a sacarose, utilizando suportes residuais da agroindustrial. Os suportes pó de sabugo de milho e pó de bagaço de cana não foram caracterizados quanto à estrutura e propriedades químicas, mas, através de levantamentos bibliográficos, é certo que esses materiais celulósicos apresentem grupamentos de hidroxilas livres em suas estruturas.

Possivelmente, a fragmentação do material através de explosão térmica, por exemplo, aumenta a área de superfície e facilita o acesso da enzima nos grupos reativos, levando a afinidade da enzima a este suporte, propondo a adequação destes suportes. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas, diminuindo a probabilidade de erros experimentais. Os resultados dos experimentos com as invertases livres e derivados obtidos foram comparados e descritos a seguir.

5.1. Caracterização enzimática das enzimas livres

5.1.1. Atividade enzimática

As enzimas foram obtidas conforme descrito em “Material e Métodos” e tiveram suas concentrações de proteínas e atividades específicas determinadas. A Tabela 5 mostra os resultados de atividade das invertases. Observa-se que o extrato comercial, comparado ao extrato cru enzimático de *Saccharomyces cerevisiae*, apresenta maior atividade específica, devido ao teor reduzido de proteína. Após a diálise, o extrato de *S. cerevisiae* apresenta maior atividade específica, devido à diminuição do teor protéico, ou até mesmo proteólise. Esta diminuição deve-se a remoção de impurezas presentes no extrato. Para determinação das características enzimáticas das enzimas livres, foi utilizada invertase extraída dialisada e extrato comercial não dialisado.

Tabela 5: Atividades específicas das invertases comercial e extraída de *S. cerevisiae*.

Fonte	Proteína (mg/mL)	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$
Invertase extraída	3,20	46,51	14,93
Invertase extraída diálisada	0,273	41,44	151,79
Invertase comercial	1,35	126,84	93,95

5.1.2. Determinação do pH da reação

A ação catalítica de uma reação enzimática é alcançada dentro de limites muito estreitos de pH. Cada reação tem um pH ótimo que, para a maioria das enzimas se situa entre 4,5 e 8,0 e no qual a enzima apresenta a sua atividade máxima (BOBBIO e BOBBIO,1995). A Figura 14A mostra o pH ótimo da invertase extraída livre igual a 5,0, em 4,0 e 4,5 mantém cerca de 80% e em pH 5,5 conserva 70% da atividade, porém, acima de pH 6,0 ocorre perda gradativa da atividade. O pH ótimo de hidrólise da invertase comercial livre foi 5,0, entretanto, de 4,0 a 6,0 a enzima mantém em torno de 90% de sua atividade, e acima de pH 7,0 ocorre perda significativa da atividade (Figura 14B). De acordo com Almeida et al. (2005), a invertase de levedura apresenta pH ótimo no intervalo de 3,5-6,0.

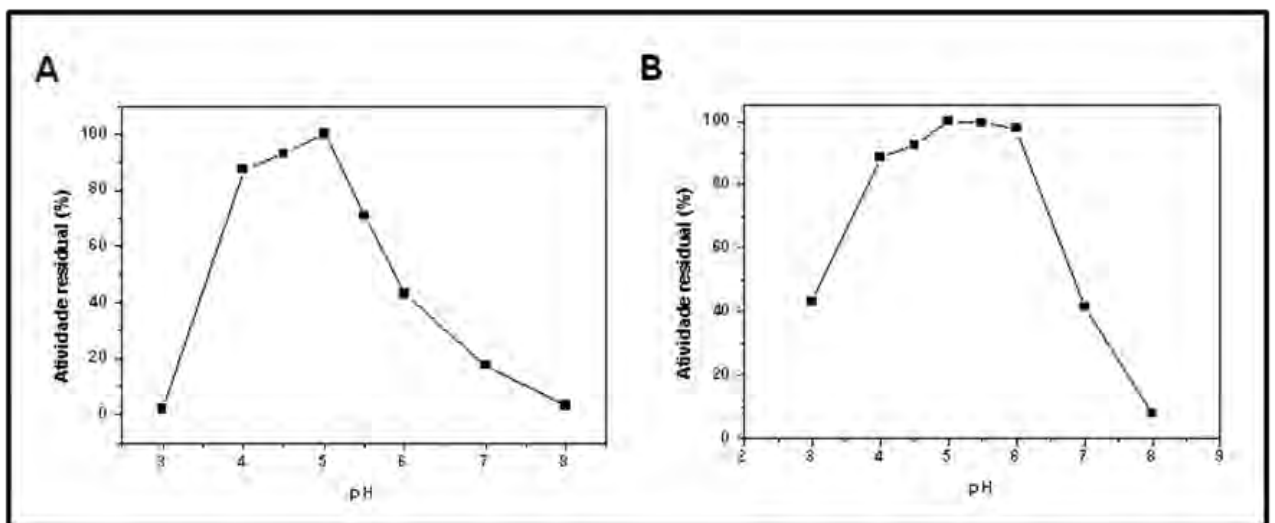


Figura 14. Efeito do pH sobre a atividade da enzima invertase livre extraída e comercial de *Saccharomyces cerevisiae*. (A) invertase extraída (B) invertase comercial.

5.1.3. Estabilidade em diferentes valores de pH

Na Figura 15A pode-se observar que a invertase extraída livre conservou atividade máxima por 1 hora quando mantida em uma faixa de pH 5,0 a 7,0. À medida que o pH se afasta desse valor, observa-se diminuição da atividade enzimática. Já a invertase comercial livre manteve-se relativamente estável em uma faixa de pH 4,5 a 5,5 durante 1 hora. A partir deste pH a atividade diminuiu lentamente, mantendo em 60% a atividade enzimática até pH 10 (Figura 15B).

Gascón et al. (1968) observaram que a invertase intracelular de cepas de *Saccharomyces* apresenta estabilidade na faixa de pH 6,0 a 9,0 por até 2 horas. Os dados obtidos neste trabalho contrariam os encontrados pelo autor, mostrando que a enzima tem um comportamento menos estável a esses pHs. Isso pode ser decorrente de diferenças nos procedimentos para a obtenção do extrato, tampões e diálise.

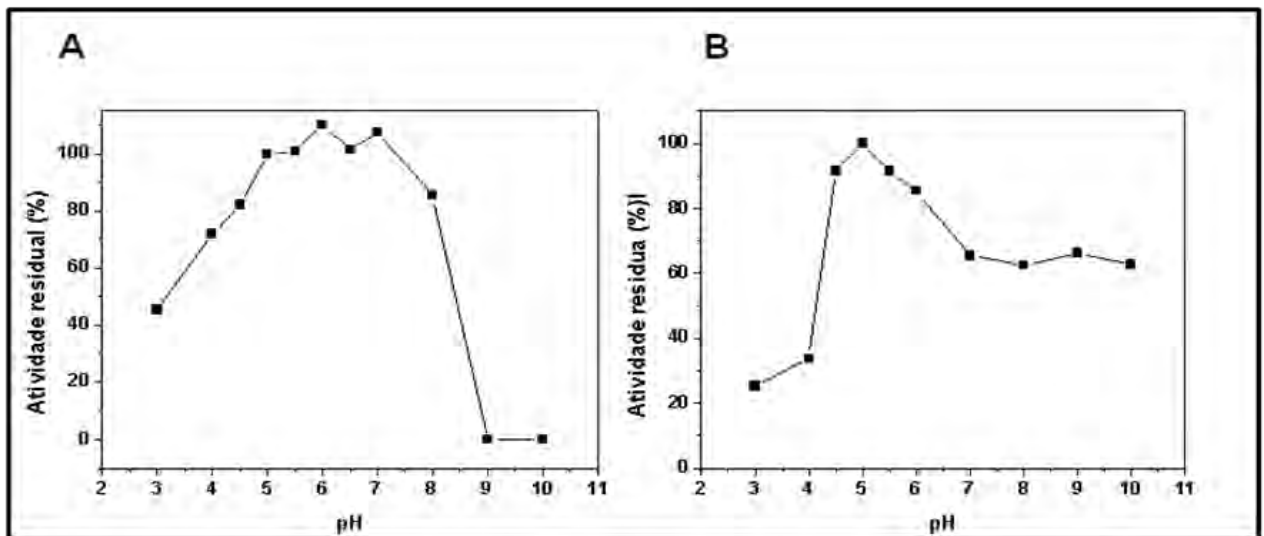


Figura 15. Efeito da estabilidade da invertase livre extraída e comercial de *Saccharomyces cerevisiae*, em diferentes valores de pH. (A) invertase extraída (B) invertase comercial.

5.1.4. Temperatura das invertases

A temperatura exerce uma grande influência na atividade e estabilidades das enzimas. Um aumento desta causa maior energia cinética às moléculas dos

reagentes ocasionando maior número de colisões produtivas por unidades de tempo (SEGEL, 1979). No entanto, o aumento da temperatura acima de um determinado valor afeta consideravelmente a estrutura terciária da enzima, bem como a estabilidade do complexo enzima-substrato (CABRAL et al., 2003).

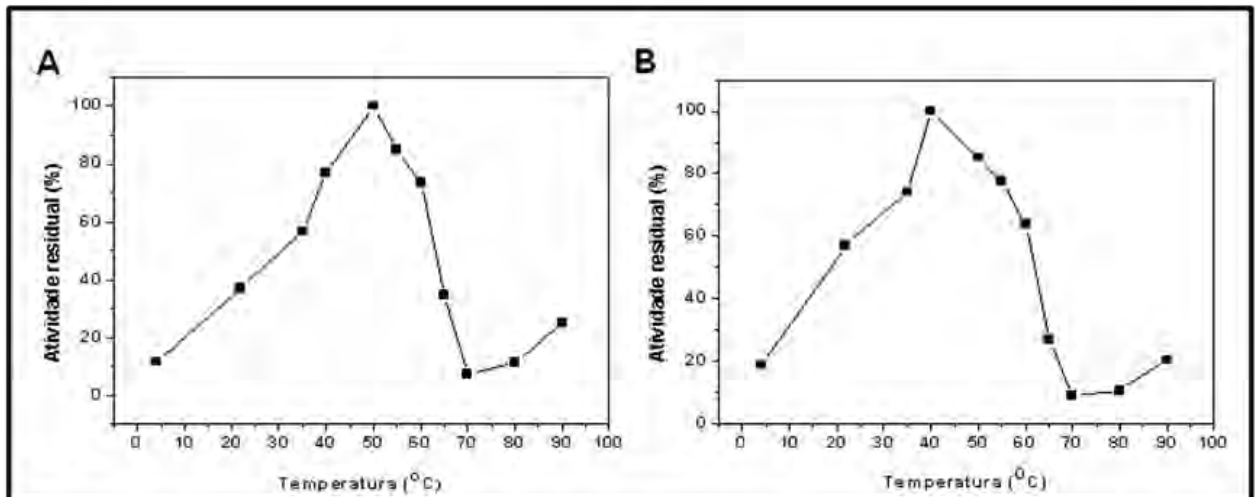


Figura 16: Efeito da temperatura sobre a atividade da invertase livre extraída e comercial de *Saccharomyces cerevisiae*. (A) invertase extraída (B) invertase comercial.

Na Figura 16A, observa-se que a temperatura ótima da invertase extraída livre foi de 50°C, entretanto, mantém-se com atividade acima de 50% entre as temperaturas de 35-60°C, porém em temperaturas acima de 65°C, ocorre perda significativa da atividade. Para invertase comercial livre foi encontrada temperatura ótima de 40°C, no entanto, mantém-se com atividade acima de 50% entre as temperaturas de 35-60°C, porém em temperaturas acima de 65°C, ocorre perda significativa da atividade. Resultados estes semelhantes à enzima extraída (Figura 16A). Goulart (2007) obteve temperatura ótima de 40°C para invertase comercial livre, o que condiz com o resultado encontrado para invertase comercial neste trabalho.

A energia de ativação foi de 34,94KJ/mol ou 8,35Kcal/mol para invertase extraída livre (Figura 17A). Para invertase comercial livre, o cálculo da energia de ativação foi de 32,02 KJ/mol ou 7,65 Kcal/mol (Figura 17B). Concordando com nossos resultados, Milovanovic et al. (2007), encontraram valor de 32,0 KJ/mol para invertase de *Saccharomyces cerevisiae*.

De acordo com Bergamasco et al. (2000), a energia de ativação normalmente observada para enzimas invertases estão na faixa de 4 a 20 kcal/mol. Os valores encontrados neste trabalho estão dentro da faixa relatado pelos autores.

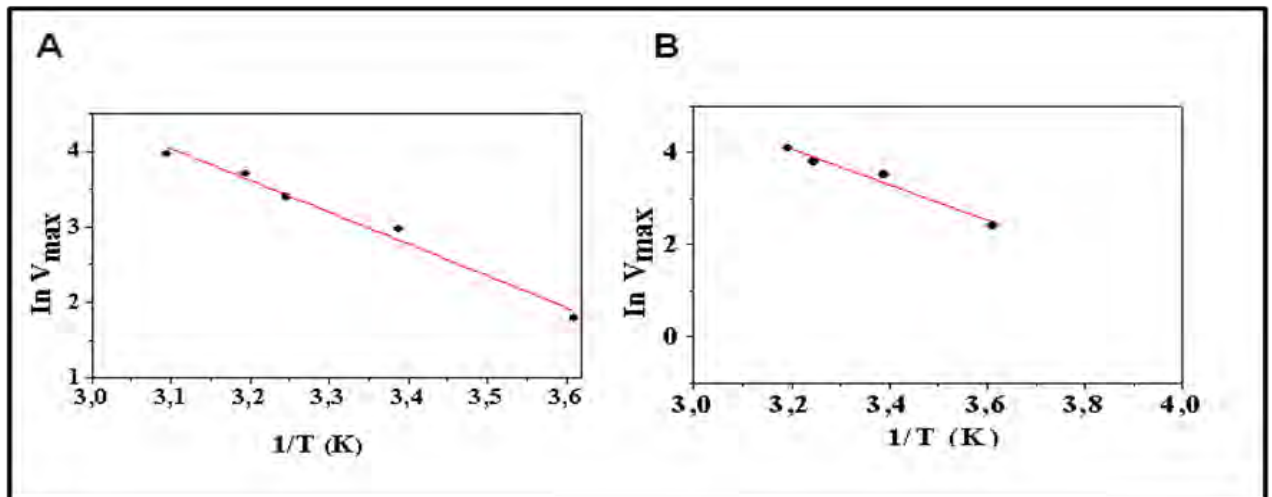


Figura 17: Gráfico de Arrhenius. Equação da reta tangente nos pontos em que há aumento da atividade: (A) invertase extraída $y = -4,20278 \cdot x + 17,06177$ (B) invertase comercial $y = -3,8517 \cdot x + 16,3885$.

5.1.5. Concentração de substrato

As Figuras 18A e 18B mostram a atividade da invertase em relação à concentração de substrato. Ao utilizar uma concentração fixa de enzima e uma solução crescente de substrato resultará de início numa rápida ascensão da velocidade de reação. Assim, à medida que a concentração do substrato começa a crescer, entretanto, o aumento na velocidade de reação começa a diminuir até que, com uma grande concentração de substrato, nenhuma mudança posterior na velocidade é observada. Observando-se o comportamento da atividade enzimática em relação ao aumento da concentração do substrato, pode-se afirmar que as invertases obedecem à cinética michaeliana.

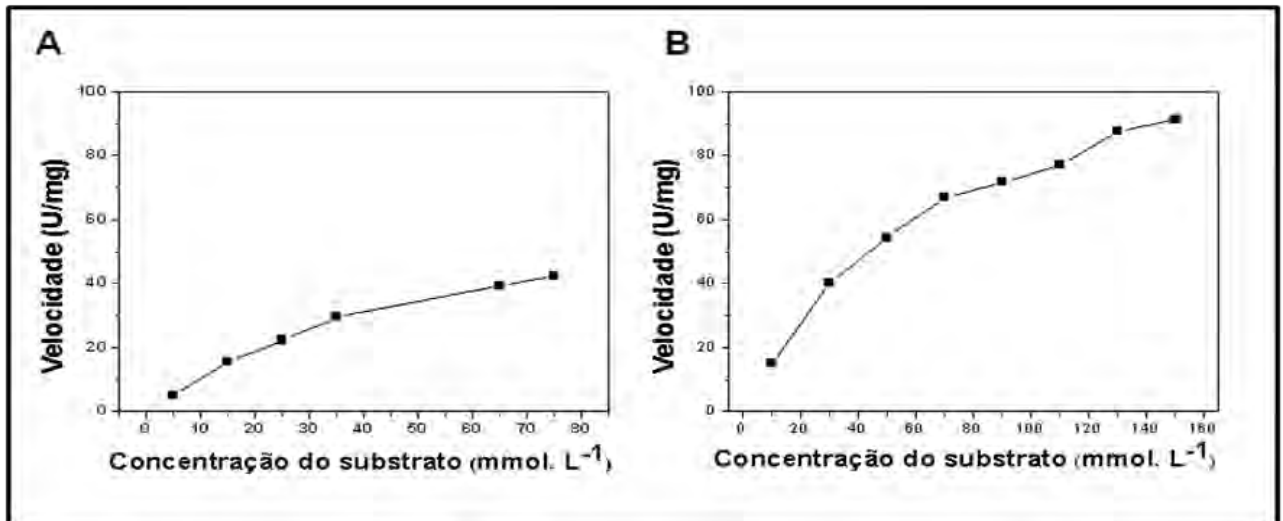


Figura 18: Curva de Michaelis-Menten. Efeito da variação da concentração de substrato sacarose das enzimas invertases extraída e comercial de *Saccharomyces cerevisiae*. (A) invertase extraída (B) invertase comercial.

Os valores de K_m e V_{max} foram estimados usando sacarose como substrato em pH 5,0 a 50^oC. A invertase extraída apresentou cinética michaeliana típica com K_m 132,0 mM e V_{max} 164,0 U/mg (Figura 19A). Para invertase comercial livre foi encontrado K_m 90,9 mM e V_{max} 153,8 U/mg (Figura 19B).

Gascón et al. (1968) encontraram para invertase de cepas de *Saccharomyces* K_m de 26mM. Segundo Arica e Bayramoglu (2006) foi determinado para invertase de *Saccharomyces cerevisiae* K_m 17mM e V_{max} de 148U/mg. Os valores de K_m encontrados pelos autores citados acima não condizem com os resultados encontrados neste trabalho, levando a crer que as enzimas testadas apresentam baixa afinidade pelo substrato. O valor de V_{max} citado acima pelo autor foi bem próximo aos encontrados neste trabalho.

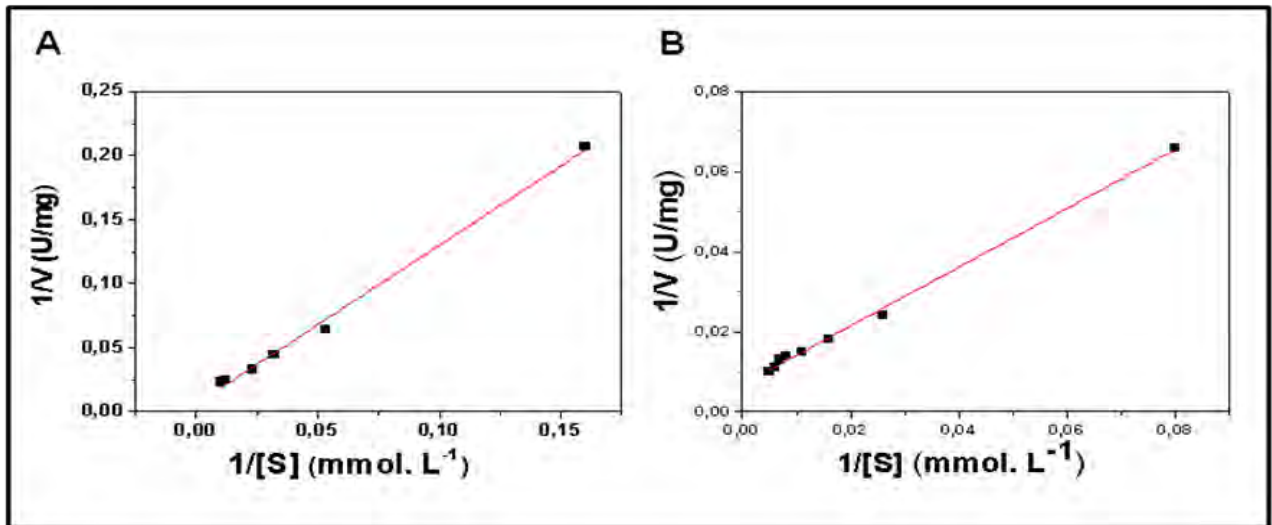


Figura 19: Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk. Equação da reta entre os pontos: (A) invertase extraída $y = 0,0679 \cdot x + 0,73371$ ($R = 0,9965$) (B) invertase comercial $y = 0,00608 \cdot X + 1,23964$ ($R = 0,99452$).

5.1.6. Estabilidade térmica

Os extratos enzimáticos foram incubadas à diversas temperaturas (de 25^oC a 80^oC), por 2 horas. As Figuras 20A e 20B exibem o gráfico de estabilidade térmica da invertase extraída e invertase comercial. Observa-se que a invertase extraída apresenta-se estável por uma hora até 45^oC, a partir dessa temperatura a atividade enzimática começa a diminuir gradativamente. Em duas horas, a atividade enzimática diminuiu quase 50% desde a temperatura inicial do ensaio (25^oC), ao passo que cresce a temperatura, a atividade enzimática é diminuída. Já para invertase comercial, a atividade enzimática apresenta-se estável até 50^oC, diminuindo com o acréscimo da temperatura. Na estocagem por 2 horas a 50^oC, a enzima mantém cerca de 60% da atividade, entretanto a partir de 55^oC a enzima perde atividade.

Segundo Sanjay e Sugunan (2004), relataram que invertase de *Saccharomyces* sp, mantém apenas 10% de atividade enzimática inicial quando incubadas por 90 minutos a 60^oC. Os resultados encontrados neste trabalho mostram discrepâncias aos descritos por aqueles autores.

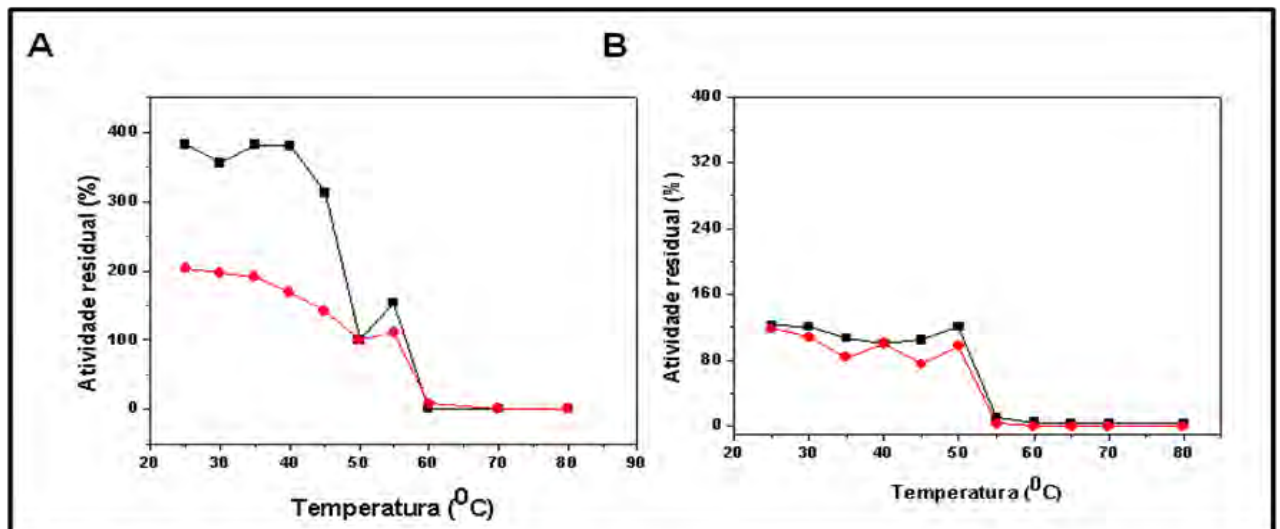


Figura 20: Estabilidade térmica da invertase livre extraída e comercial de *Saccharomyces cerevisiae*, durante a estocagem por 2 horas, em diferentes valores de temperatura. (A) invertase extraída (B) invertase comercial. Símbolos: (■) 1 h; (●) 2 h.

5.1.7. Imobilização da invertase em suportes de Bagaço de cana e Sabugo de milho

5.1.8. Purificação em Resina DEAE-Sephacel

Para o processo de imobilização, o extrato de invertase livre de *Saccharomyces cerevisiae*, após ser dialisado, foi parcialmente purificado em resina DEAE- Sephacel. Observam-se, na Tabela 6, os resultados obtidos com a purificação parcial do extrato enzimático. O fator de purificação neste processo faz com que a proteína total se reduza, removendo o máximo possível de proteínas inespecíficas, sendo que a perda desta proteína é muito maior que a perda de atividade; portanto, a atividade específica aumenta mesmo que diminua a atividade total (LEHNINGER, 1977). A Figura 21 mostra a purificação parcial do extrato enzimático, observando um número menor de bandas protéicas através da eletroforese desnaturante (SDS-PAGE).

Tabela 6: Purificação parcial do extrato cru de invertase extraída de *S. cerevisiae*

Passos de purificação	Volume final (mL)	Teor de proteína (mg/mL)	Atividade total (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de purificação (Nº de vezes)
Extrato cru	850	3,20	46,51	14,53	100	1,00
Diálise	800	0,273	41,44	151,79	89,10	10,44
DEAE Sephacell	370	0,076	40,50	692,63	87,07	47,66
Diálise	370	0,051	40,00	784,31	86,00	53,97

Obs: diálise contra água destilada a 8°C durante 24 horas, com 4 trocas.

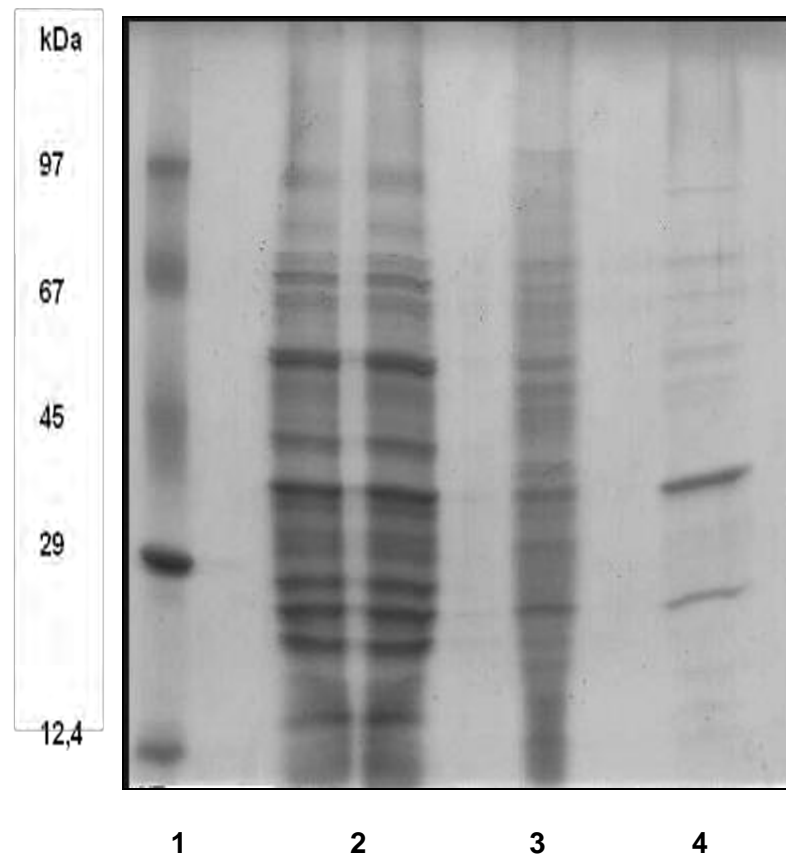


Figura 21: SDS-PAGE. Perfil de purificação parcial da invertase extraída através de resina de troca iônica DEAE-Sephacel: (1) padrão massa molecular, (2) extrato cru inicial, (3) extrato dialisado, (4) extrato parcialmente purificado.

5.1.7.2. Acompanhamento do processo de imobilização

As enzimas, como descrito em “Material e Métodos”, foram imobilizadas em suportes pó de sabugo de milho (SM) e pó de bagaço-de-cana (BC) ativados a glioxil. Para a determinação do procedimento de imobilização (enzima - suporte) é necessário o acompanhamento deste processo, onde alíquotas do sobrenadante da solução de imobilização e do controle são retiradas em intervalos de tempo. Através da relação da atividade enzimática do sobrenadante pelo controle, é possível quantificar a ligação da enzima ao suporte, pois no controle a atividade enzimática permanece na maioria das vezes estável, enquanto a atividade enzimática no sobrenadante diminui gradativamente com o decorrer do tempo. Este é um indicativo de que a enzima está imobilizando ao suporte.

As soluções de enzima comercial e extraída na concentração de 5mg de proteína/ mL de suporte em pH 10,0 foram adicionadas aos suportes pó BC e pó SM previamente ativados a glioxil. A Figura 22A mostra o acompanhamento de imobilização da invertase extraída. Neste procedimento, o controle apresentou uma leve diminuição da atividade enzimática, cerca de 10%. No procedimento de imobilização foi em 24 horas, observa-se que no sobrenadante da solução da imobilização com pó SM restou cerca de 80% de atividade enzimática e no sobrenadante com pó BC 40%.

Na Figura 22B observa-se queda de 25% de atividade enzimática no controle e tempo de imobilização muito menor quando comparado à imobilização da invertase extraída, pois em 4 horas o sobrenadante da solução de imobilização com pó SM apresentou 30% de atividade e 24% no sobrenadante com pó BC. A diminuição da atividade enzimática no controle é possível, devido ao pH utilizado no procedimento, pois a enzima é pouco estável a pH 10,0. Com estes resultados não é seguro afirmar que a enzima está imobilizada ao suporte, pois pode ter ocorrido a perda de atividade enzimática durante o ensaio. Para determinar a imobilização da invertase aos suportes, foi utilizado cálculos de rendimento de atividade e eficiência catalítica, descritos à frente.

Os suportes ativados a glioxil orientam as moléculas de enzima através da área mais rica em resíduos de lisinas. A forma de união ocorre através da formação

de bases de Schiff entre os grupos glioxil do suporte e os grupos amino das lisinas (GUISÁN, 1988; BLANCO et al., 1989).

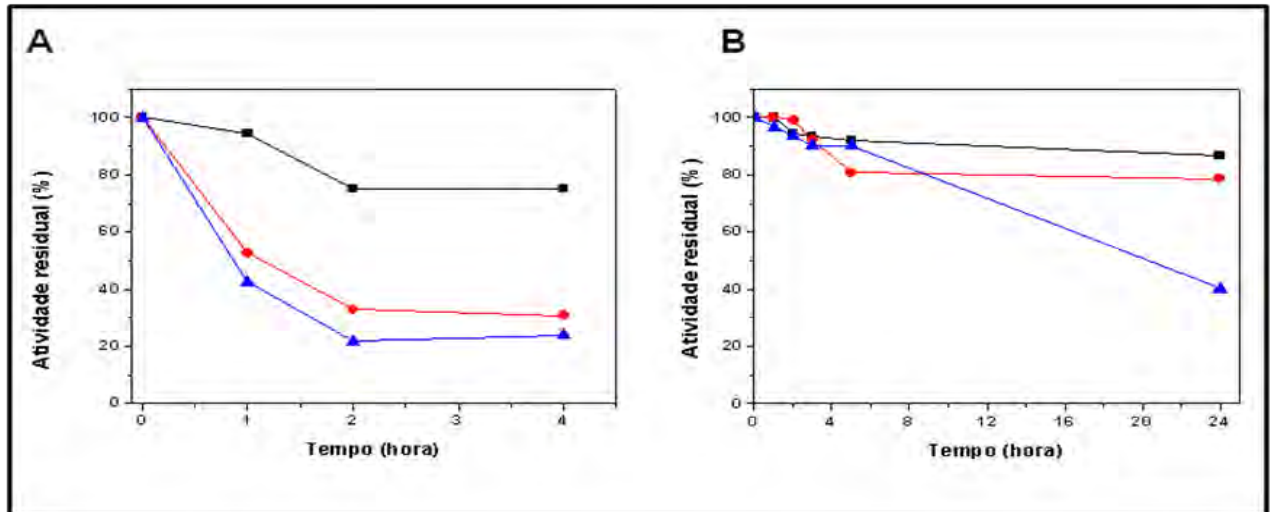


Figura 22: Acompanhamento do ensaio de imobilização da enzima invertase comercial e extraída de *Saccharomyces cerevisiae* em suportes pó SM e pó BC ativados a glioxil. (A) Invertase extraída (B) invertase comercial. Símbolos: (■) Controle, (●) Sobrenadante da imobilização com pó sabugo de milho e (▲) Sobrenadante da imobilização com pó bagaço de cana.

As soluções de enzima comercial e extraída na concentração de 5mg/mL em pH 7,0 foram adicionadas aos suportes pó BC e pó SM previamente ativados a amino. Este tipo de suporte orienta a imobilização da enzima através da área de superfície com maior densidade de carga negativa. Esta área geralmente corresponde à área mais rica em aminoácidos com grupo ácido como radical (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1993). A Figura 23A mostra o acompanhamento de imobilização da invertase extraída. Observa-se que o controle permanece estável durante 120 minutos. A atividade enzimática do sobrenadante da solução de imobilização do pó SM obteve cerca de 50%, enquanto para pó BC a imobilização foi total, após 30 minutos.

A Figura 23B mostra o acompanhamento de imobilização da invertase comercial. Pode-se dizer que o controle permanece praticamente estável durante todo o procedimento de imobilização em 120 minutos. A atividade enzimática do sobrenadante da solução de imobilização do pó SM e do pó BC foi igual a 62%.

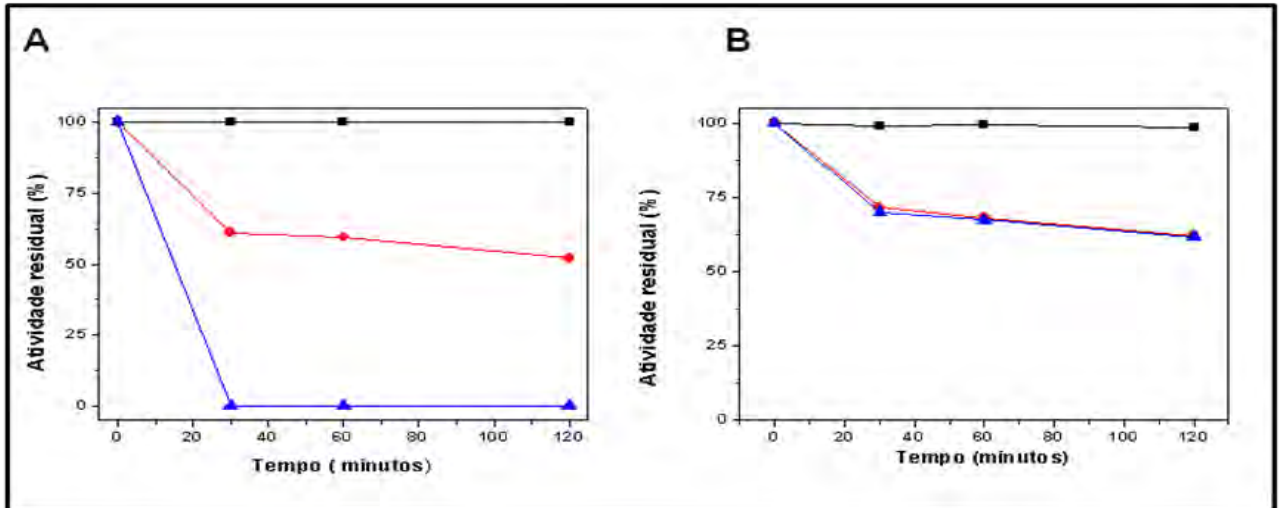


Figura 23: Acompanhamento do ensaio de imobilização da enzima invertase comercial e extraída de *Saccharomyces cerevisiae* em suportes pó SM e pó BC ativados a amino. (A) invertase extraída (B) invertase comercial Símbolos: (■) Controle, (●) Sobrenadante da imobilização com sabugo de milho e (▶) Sobrenadante da imobilização com bagaço de cana.

As soluções de enzima comercial e extraída na concentração de 5mg de proteína/mL de suporte em pH 7,0 foram adicionadas aos suportes pó BC e pó SM previamente ativados a glutaraldeído. Estes suportes têm por finalidade orientar a molécula de enzima a imobilizar através dos grupos amino de mais baixo pK. Estes grupos correspondem aos aminos terminais. Com este método a lisina da proteína não se ligará devido a realização da imobilização em pH próximo da neutralidade e os grupos amino das lisinas não se encontram protonadas (GUISÁN et al., 1997).

Nas Figuras 24A e 24B, pode-se observar que o controle para ambas as invertases permanecem estáveis. No ensaio de imobilização da invertase extraída, ao final de 180 minutos a atividade do sobrenadante da solução de imobilização do pó SM foi igual a 7,9% já no pó BC a imobilização foi total (Figura 24A). A Figura 24B mostra que ao final de 80 minutos a atividade enzimática no sobrenadante pó SM e pó BC foram praticamente às mesmas, perto de 25%.

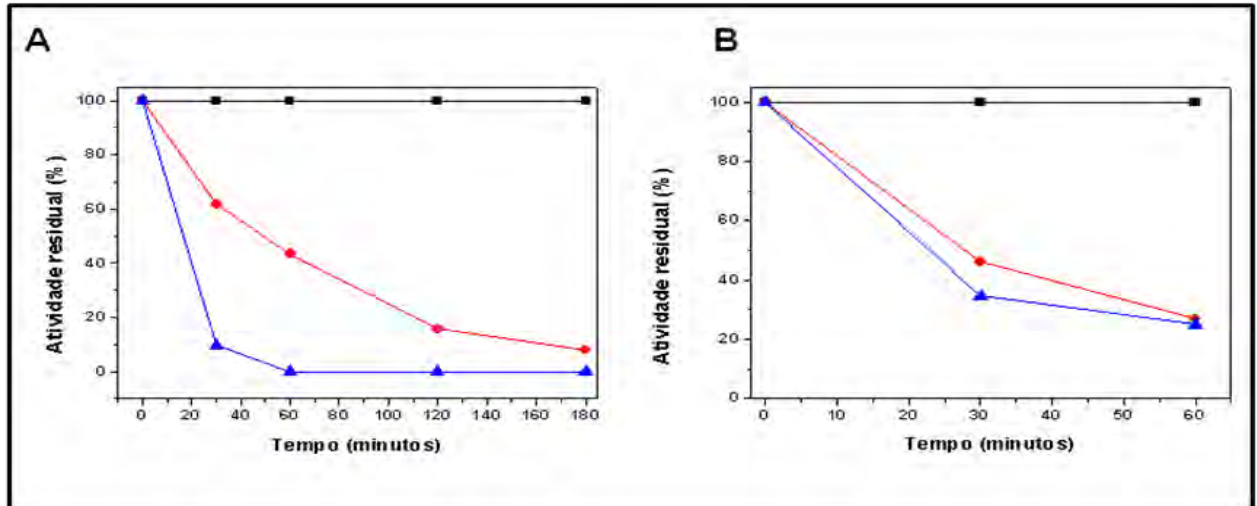


Figura 24: Acompanhamento do ensaio de imobilização da enzima invertase comercial e extraída de *Saccharomyces cerevisiae* em pó SM e pó BC ativados a glutaraldeído. (A) invertase extraída (B) invertase comercial. Símbolos: (■) Controle, (●) Sobrenadante da imobilização com sabugo de milho e (▶) Sobrenadante da imobilização com bagaço de cana.

5.1.7.3. Rendimento de imobilização e eficiência catalítica dos derivados

A partir da relação entre a atividade enzimática da enzima imobilizada para a atividade enzimática da enzima livre foi possível determinar a percentagem de eficiência catalítica. E, através da relação da atividade enzimática inicial para a atividade final no processo de imobilização, calculou-se a quantidade de proteína que se uniu ao suporte. Observa-se, na Tabela 7, que os derivados da invertase extraída obtidos com derivados pó BC e pó SM glioxil, a eficiência catalítica e atividade enzimática, quando comparados com os derivados pó BC e pó SM amino são inferiores. Este fato se deve à instabilidade da invertase a pH 10,0. Apesar destes resultados, o derivado pó BC glioxil apresenta aceitável rendimento de imobilização e eficiência catalítica de 23%, o que é considerável, pois a enzima está ligada covalentemente ao suporte. Este tipo de ligação ocorre para suportes ativados a glioxil, formando ligações covalentes entre a proteína e o suporte. Observa-se que os derivados pó BC e pó SM glutaraldeído apresentam relativamente bom rendimento de imobilização e diferente eficiência catalítica e atividade enzimática. Esse fator possivelmente ocorre devido à grande quantidade de proteínas imobilizadas ao suporte BC glutaraldeído. Isso faz com que o substrato

tenha acesso limitado ao centro ativo da enzima e, em conseqüência, menor atividade enzimática, ou seja, provocado por efeito difusionais da enzima imobilizada.

O derivado pó BC amino apresenta rendimento de 100%, eficiência e atividade muito melhor quando comparado ao suporte pó SM amino que apresenta 37% de atividade. Este fato provavelmente deve-se à diferença na estrutura dos suportes. É importante lembrar que os resíduos estudados apresentam algumas diferenças, como estrutura, área de superfície e porosidade, portanto, são esperadas diferenças como estas apresentadas acima, mesmo que a ativação dos suportes sejam idênticas.

Tabela 7: Comparação dos derivados de invertase extraída obtidos com suportes pó bagaço de cana e pó sabugo de milho.

Suportes	Ativação	Rendimento de imobilização (%)	Eficiência catalítica	Atividade (U/mL de derivado)
Bagaço de cana	Glioxil	59,83	23,17	9,60
	Amino	100	88,50	36,67
	Glutaraldeído	100	35,71	14,80
Sabugo de milho	Glioxil	21,40	4,92	2,04
	Amino	36,80	36,03	14,93
	Glutaraldeído	92	61,54	25,50

Na Tabela 8, podem-se observar as características dos derivados de invertase comercial obtida com pó BC e pó SM. Os derivados do pó BC e pó SM ativado a glioxil e glutaraldeído apresentam um bom rendimento de imobilização, mas menor eficiência catalítica e atividade enzimática. Estes resultados levam ao entendimento de que houve a imobilização de outras proteínas que não é a invertase, uma vez que a enzima comercial não é purificada. Em amino, apesar do baixo rendimento de imobilização os derivados BC e SM ofereceram ótima atividade enzimática e eficiência catalítica.

Tabela 8: Comparação dos derivados de invertase comercial obtidos com suporte pó

Suporte	Ativação	Rendimento de imobilização (%)	Eficiência catalítica (%)	Atividade (U/mL de derivado)
Bagaço de cana	Glioxil	76,11	11,42	14,49
	Amino	38,5	19,72	25,02
	Glutaraldeído	75	3,35	4,26
Sabugo de milho	Glioxil	69,25	6,44	8,17
	Amino	37,70	17,58	22,30
	Glutaraldeído	73,07	4,75	6,03

bagaço de cana e pó sabugo de milho.

5.1.7.4. Caracterização enzimática dos derivados obtidos com enzima extraída e comercial de *S. cerevisiae*.

Os derivados obtidos no procedimento de imobilização descrito anteriormente foram selecionados para realização de ensaios de caracterização enzimática e reutilização, para posterior comparação com a forma livre da invertase comercial e extraída. O critério para a seleção dos derivados foi com base nos resultados encontrados para rendimento de imobilização e eficiência catalítica. Os melhores derivados selecionados da invertase extraída e comercial estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9: Seleção dos melhores derivados da invertase extraída e comercial.

	Invertase comercial	Invertase extraída
Derivados	SM glutaraldeído	SM glutaraldeído
	SM amino	BC glutaraldeído
	BC amino	BC amino
	BC glioxil	

5.1.7.5. Determinação do pH ótimo dos derivados

5.1.7.5.1. Derivados invertase comercial

O efeito do pH sobre a atividade dos derivados de invertases obtidos com pó de bagaço de cana e pó de sabugo de milho foi ensaiado em diferentes valores de pHs.

As Figuras 25A, 25B, 26A e 26B mostram o pH ótimo encontrado para cada derivado, comparando com a invertase comercial livre. A Figura 25A mostra o pH ótimo do derivado pó BC amino igual a 5,5, mantendo cerca de 50% de atividade entre os pHs 4,0 a 7,0, e acima deste pH ocorre perda gradativa da atividade enzimática. Na Figura 25B, o pH ótimo encontrado para SM amino foi de 5,0, permanecendo-se estável com 75% de sua atividade total entre os pHs 4,5 a 6,5, quando ocorre perda significativa de atividade. O derivado BC glioxil apresenta pH ótimo de 4,5, permanecendo-se estável entre os pHs 4,5 a 6,5 com 85% de atividade enzimática, perdendo atividade gradativamente após o pH 7,0 (Figura 26A). O derivado SM glutaraldeído apresenta pH igual a 5,0, mantendo-se relativamente estável até pH 7,0 conservando 60% de atividade enzimática. Após, a atividade diminui gradativamente (Figura 26B).

Os derivados SM amino e SM glutaraldeído, apresentaram o mesmo pH ótimo encontrado para invertase livre igual a pH 5,0. No entanto, o derivado BC amino tendeu a ficar mais básico e BC glioxil mais ácido. A enzima livre apresentou atividade inferior em pH 7,0 quando comparado com os derivados, exceto para SM amino. Estas diferenças podem estar relacionadas com pequenas alterações da estrutura tridimensional da proteína, as quais podem ocorrer durante o processo de imobilização.

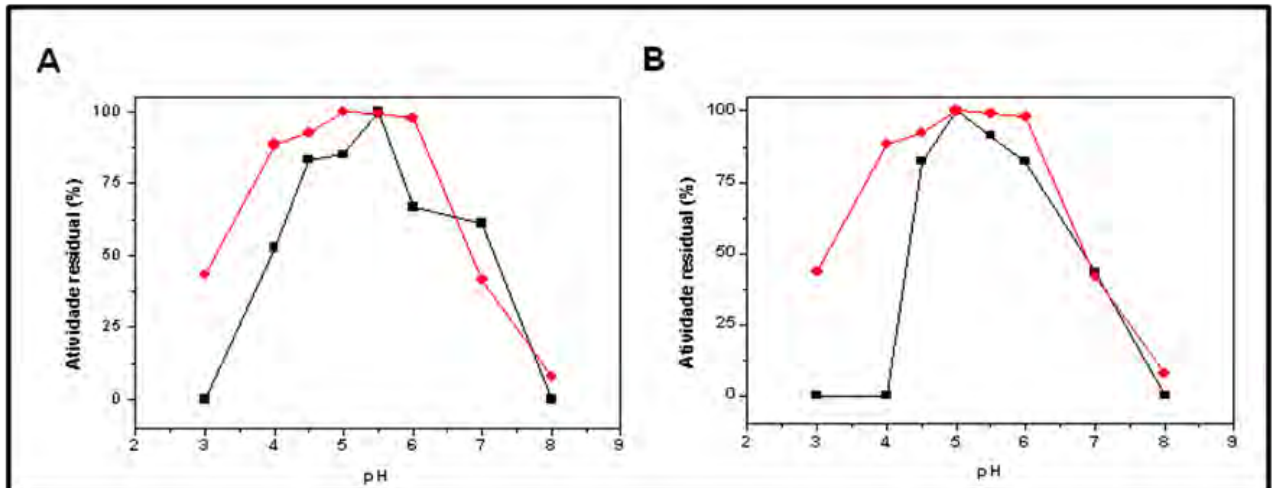


Figura 25: Efeito do pH sobre a atividade dos derivados da invertase comercial de *Saccharomyces cerevisiae* obtidos com: (A) pó BC (B) pó SM ativados a amino, ensaiados em diferentes pHs comparados com a invertase livre. Símbolos: (●) invertase comercial livre (■) derivado.

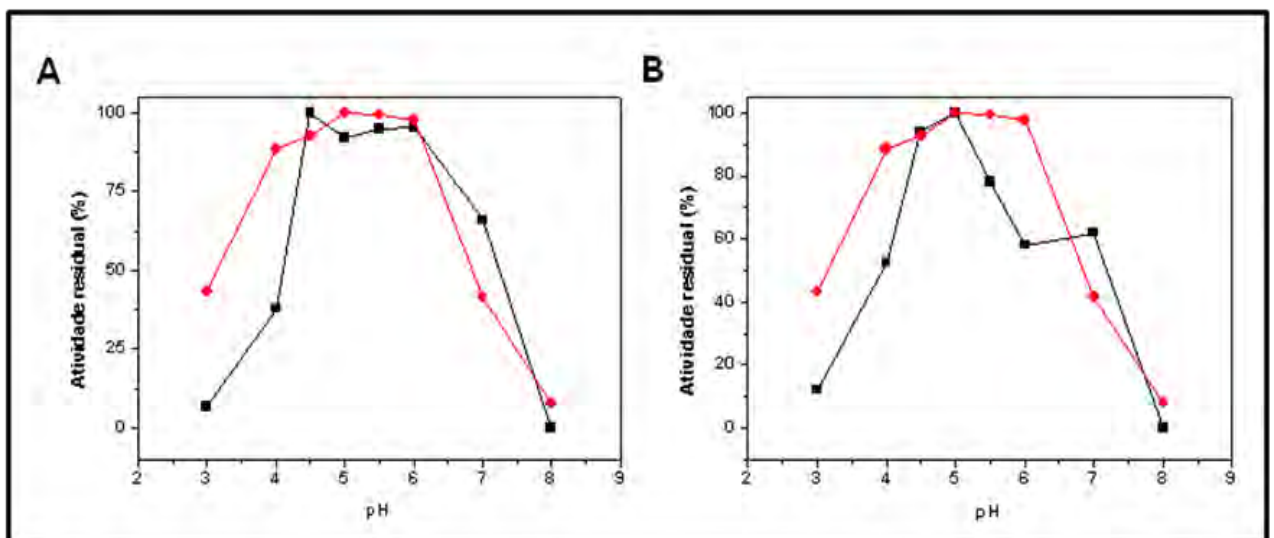


Figura 26: Efeito do pH sobre a atividade dos derivados da invertase comercial de *Saccharomyces cerevisiae* obtidos com: (A) pó BC ativado glicoxil (B) pó SM ativado a glutaraldeído, ensaiados em diferentes pHs, comparados com a invertase livre. Símbolos: (●) invertase comercial livre (■) derivado.

5.1.7.5.2. Derivados invertase extraída

Os derivados da invertase extraída obtidos com suporte pó bagaço de cana e pó sabugo de milho foram ensaiados em diferentes valores de pHs. As Figuras 27, 28A e 28B mostram o pH ótimo encontrado para os derivados ensaiados

comparando-os com a invertase extraída livre. Na figura 27, observa-se o pH ótimo do derivado pó BC amino igual a 5,0, mantendo 70% de atividade enzimática até pH 7,0, perdendo ligeiramente atividade a partir deste pH. Para o derivado pó BC glutaraldeído o pH ótimo encontrado foi de 4,5 conservando 60% de atividade até pH 7,0, após este pH a atividade diminui drasticamente (Figura 28A). Em derivado pó SM glutaraldeído (Figura 28B) foi encontrado pH igual a 5,0, onde permaneceu estável até pH 7,0 com cerca de 70% de atividade enzimática, perdendo atividade após esse pH. Os derivados pó BC amino e SM glutaraldeído apresentam pH ótimo semelhante ao encontrado para invertase livre (pH 5,0). No entanto, o derivado pó BC glutaraldeído apresentou máxima atividade em pH mais ácido. De um modo geral, os derivados imobilizados apresentaram-se mais estáveis a pHs básicos quando comparados a enzima livre.

De acordo com Susuki et al. (1996), invertase de levedura *S. cerevisiae* imobilizada em resina DEAE-celulose, apresentou pH ótimo ácido. Segundo Sanhay e Suguna, (2004), uma aparente resposta ao pH pode mudar quando a enzima está em um ambiente heterogêneo imobilizados em matrizes orgânica ou inorgânica.

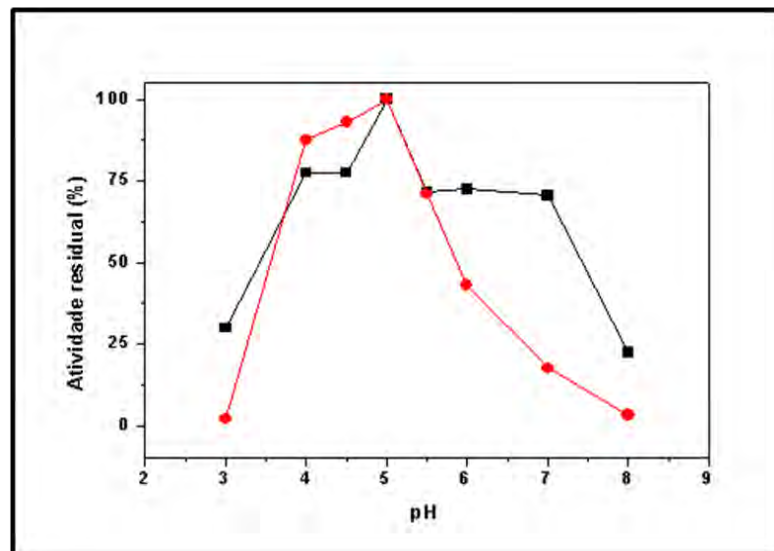


Figura 27: Efeito do pH sobre a atividade do derivado da invertase extraída de *Saccharomyces cerevisiae* obtido com pó BC ativado a amino, ensaiado em diferentes pHs, comparados com a invertase livre. Símbolos: (●) invertase comercial livre (■) derivado.

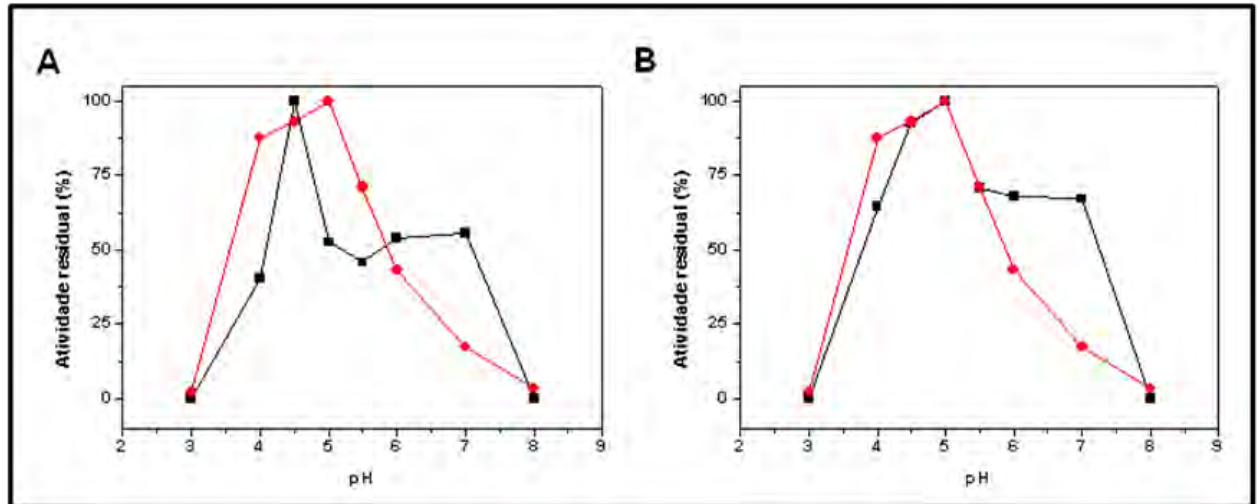


Figura 28: Efeito do pH sobre a atividade dos derivados da invertase extraída de *Saccharomyces cerevisiae* obtidos com: (A) pó BC (B) pó SM ativados a glutaraldeído ensaiados em diferentes pHs, comparados com a invertase livre. Símbolos: (●) invertase extraída livre (■) derivado.

5.1.7.6. Determinação da temperatura ótima dos derivados

5.1.7.6.1. Derivados da invertase comercial

Foi determinada a temperatura ótima dos derivados obtidos com pó de bagaço de cana e pó sabugo de milho. As Figuras 29A, 29B, 30A e 30B mostram a temperatura ótima encontrada para cada derivado, comparando-as com a invertase livre. Observa-se, nas Figuras 29A e 29B, que a temperatura ótima de hidrólise encontrada para os derivados pó BC e SM amino foi igual a 65°C, trazendo aumento de 25°C na temperatura ótima quando comparados a invertase livre, que obteve temperatura ótima de 40°C. No derivado BC glioxil, observa-se temperatura ótima de hidrólise igual a 55°C, trazendo aumento de 15°C na temperatura ótima comparado com a enzima livre (Figura 30A). A Figura 30B mostra a temperatura ótima encontrada para o derivado SM glutaraldeído igual a 55°C, favorecendo aumento 15°C na temperatura ótima. Estes resultados mostram que a enzima imobilizada apresenta excelente estabilidade térmica quando comparados a forma livre.

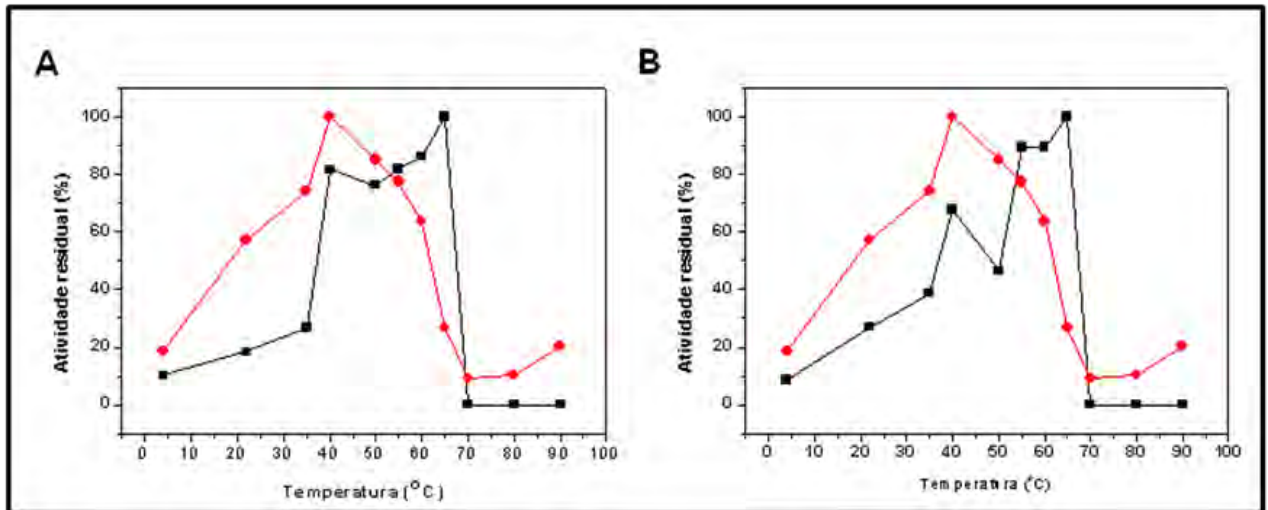


Figura 29: Efeito da temperatura sobre a atividade dos derivados da invertase comercial de *Saccharomyces cerevisiae* obtidos com (A) pó BC (B) pó SM ativados a amino, ensaiados em diferentes temperaturas comparados com a invertase livre. Símbolos: (●) invertase extraída livre (■) derivado.

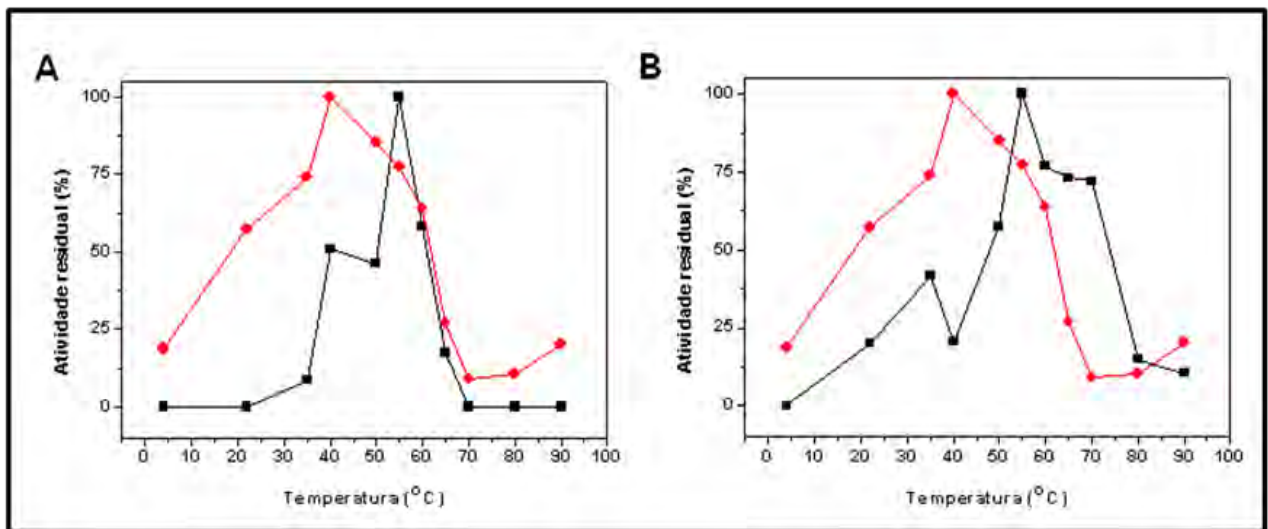


Figura 30: Efeito da temperatura sobre a atividade dos derivados da invertase comercial de *Saccharomyces cerevisiae* obtidos com (A) pó BC ativado a glioxil (B) pó SM a glutaraldeído ensaiados em diferentes temperaturas, comparados com a invertase livre. Símbolos: (●) invertase extraída livre (■) derivado.

Observam-se, na Tabela 10, os valores de energia de ativação em KJ/mol e Kcal/mol. Os valores encontrados para os derivados foram inferiores daquele encontrado para invertase comercial livre (32,02 KJ/mol ou 7,65 Kcal/mol), exceto pelo BC glioxil que obteve valor consideravelmente alto. Com esses valores é possível esclarecer que a imobilização trouxe um grande benefício na catalise enzimática da

invertase imobilizada, pois quanto mais alto a energia livre de ativação, menor será a probabilidade de o sistema evoluir de reagentes a produtos e, portanto, mais lenta a reação. Essas barreiras de energia são responsáveis pela maior ou menor estabilidade das moléculas (BON et al., 2008).

Tabela 10: Energia de ativação dos derivados da invertase comercial obtidos com pó de bagaço de cana e pó de sabugo de milho.

Invertase comercial	*Ea (KJ/mol)	*Ea (Kcal/mol)
Enzima livre	32,02	7,65
SM amino	27,85	6,65
BC amino	29,60	7,07
BC glioxil	104,75	25,02
SM glutaraldeído	12,30	2,94

*Energia de ativação

5.1.7.6.2. Derivados da invertase extraída

Os derivados da invertase extraída obtidos com pó de sabugo de milho e pó de bagaço de cana foram submetidos a ensaios de temperatura ótima de hidrólise. As Figuras 31, 32A e 32B mostram a temperatura ótima encontrada para cada derivado, comparando-as com a invertase livre. A Figura 31 mostra a temperatura ótima de hidrólise do derivado pó BC amino igual 50°C. Esta temperatura foi a mesma encontrada para invertase livre (50°C). Para o derivado pó BC glutaraldeído foi encontrada temperatura ótima de 65°C, trazendo 15°C de aumento na temperatura ótima (Figura 32A). Na Figura 32B, observa-se que a temperatura ótima do derivado pó SM glutaraldeído foi igual a 55°C, aumentando 5°C da temperatura ótima. Os derivados pó BC e SM glutaraldeído mostraram-se mais estáveis comparados a forma livre de invertase. A estabilidade térmica destes derivados será mostrada e discutida em breve.

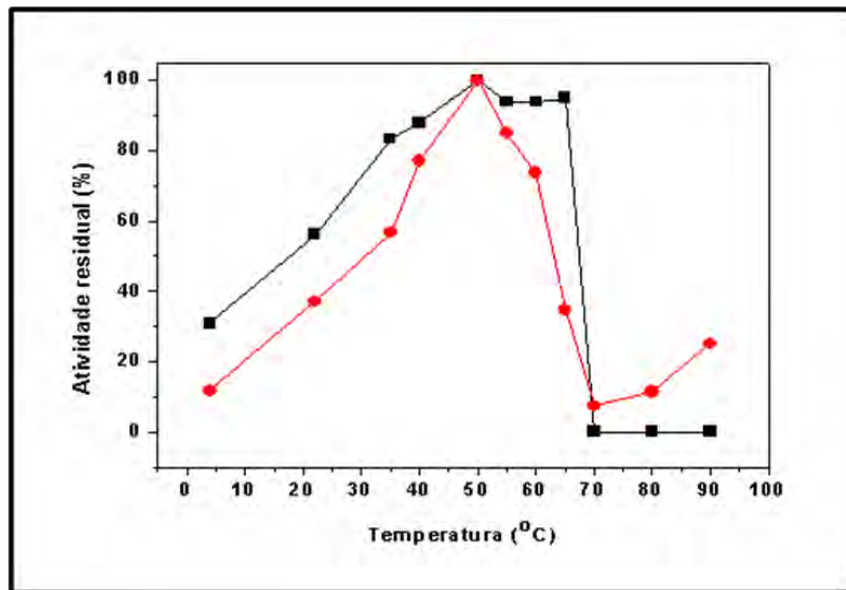


Figura 31: Efeito da temperatura sobre a atividade dos derivados da invertase extraída de *Saccharomyces cerevisiae* obtido com pó BC ativado a amino ensaiados em diferentes temperaturas, comparados com a invertase livre. Símbolos: (●) invertase extraída livre (■) derivado.

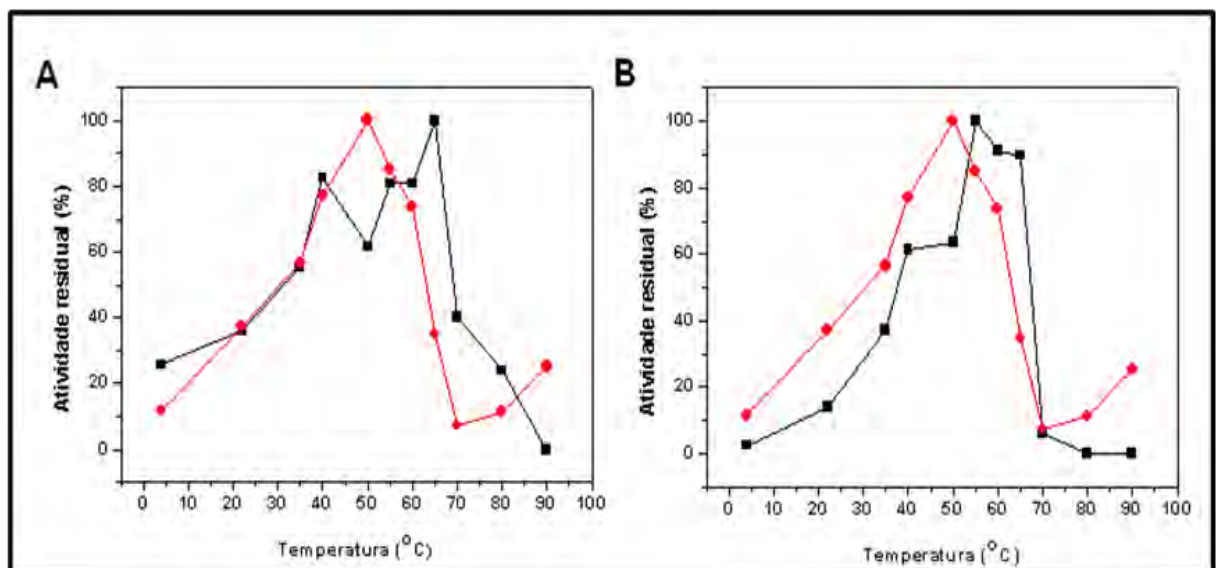


Figura 32: Efeito da temperatura sobre a atividade dos derivados da invertase extraída de *Saccharomyces cerevisiae* obtidos com (A) pó BC e (B) pó SM a glutaraldeído ensaiados em diferentes temperaturas comparados com a invertase livre. Símbolos: (●) invertase extraída livre (■) derivado.

Os valores de energia de ativação encontrados para os derivados foram inferiores daqueles encontrado para invertase extraída livre (34,94KJ/mol ou

8,35Kcal/mol), exceto pelo derivado pó SM glutaraldeído que obteve valor relativamente alto. Com esses valores é possível esclarecer que a imobilização trouxe um grande benefício na catalise enzimática da invertase extraída imobilizada (Tabela 11).

Tabela 11: Comparação da energia de ativação dos derivados da invertase extraída obtidos com pó de bagaço de cana e pó de sabugo de milho.

Invertase livre	Ea (KJ/mol)	Ea (Kcal/mol)
Invertase livre	34,94	8,35
BC amino	21,62	5,16
BC glutaraldeído	17,12	4,09
SM glutaraldeído	54,72	13,07

5.1.7.7. Estabilidade térmica

5.1.7.7.1. Derivados da invertase comercial

Os derivados da invertase comercial obtidos foram submetidos a ensaios de estabilidade térmica. Utilizou-se temperaturas na faixa de 45°C- 85°C. A atividade residual foi calculada utilizando como controle a atividade ótima (100%) para cada enzima livre e derivado previamente determinada. Nas Figuras 33A e 33B, observa-se a estabilidade térmica do derivado pó BC amino em 1 e 2 horas. Nas temperaturas de 70°C, 80°C e 85°C o derivado BC amino apresentou-se mais estável quando comparado a enzima livre. Observa-se que em 2 horas, o derivado apresenta atividade enzimática superior a enzima livre em todas as temperaturas ensaiadas, mantendo-se com 100% até 85°C.

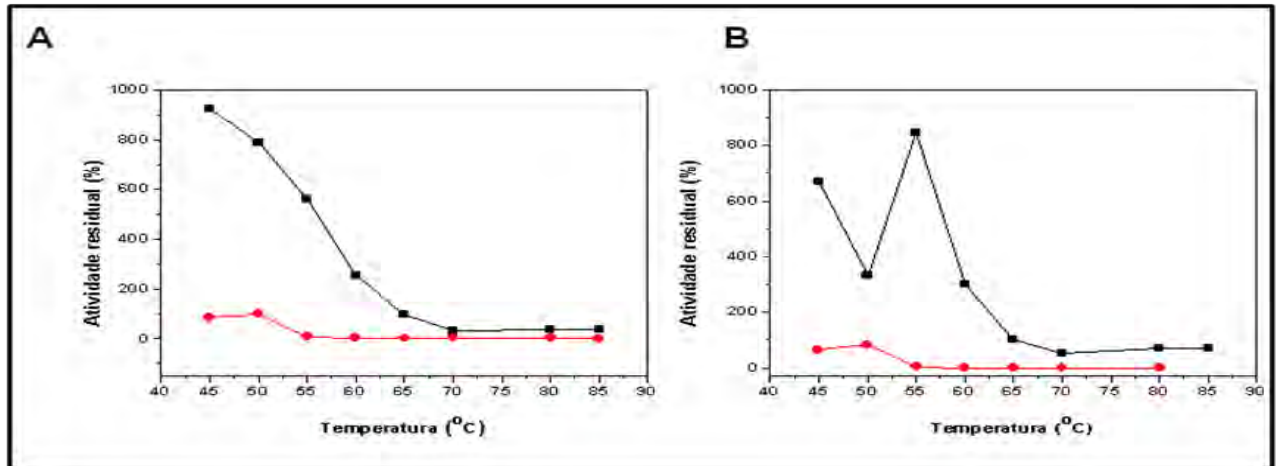


Figura 33: Estabilidade térmica do derivado da invertase comercial de *Saccharomyces cerevisiae* obtido com pó BC ativado a amino. (A) ensaio em 1h e (B) ensaio em 2h. Símbolos: (■) derivado; (●) invertase livre.

Na Figura 34A, pode-se observar que o derivado pó de SM amino permanece estável até 85°C favorecendo a manutenção da atividade enzimática acima de 100%, em contrapartida, a enzima livre perde total atividade a partir de 55°C. No tempo de 2 horas (Figura 34B), o derivado mantém-se estável em relação à enzima livre até a temperatura de 65°C. E nas temperaturas 70°C, 80°C e 85°C manteve-se com cerca de 50% de atividade. Analisando os resultados de estabilidade térmica do SM amino por 1 e 2 horas, verificou-se que em 1 hora o derivado apresenta resultados mais satisfatórios do que em 2 horas.

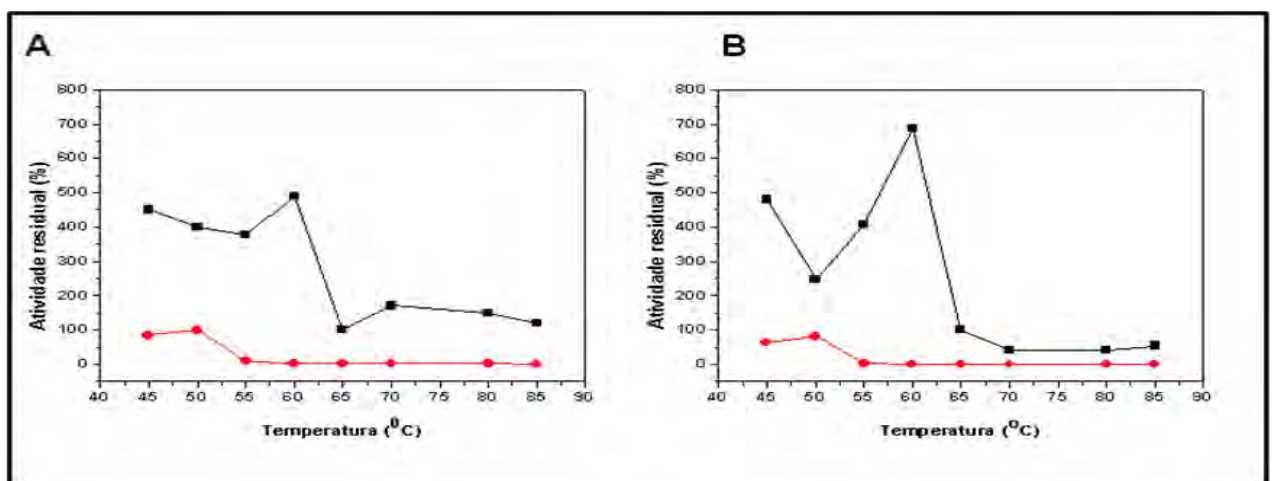


Figura 34: Estabilidade térmica do derivado da invertase comercial de *Saccharomyces cerevisiae* obtido com pó SM ativado a amino. (A) ensaio em 1h e (B) ensaio em 2h. Símbolos: (■) derivado; (●) invertase livre.

A Figura 35A expõe a estabilidade térmica em 1 hora do derivado pó BC glioxil. Observa-se que este derivado poderia ser utilizado até 55°C, sendo que nas demais temperaturas, observa-se perda total de atividade semelhante a enzima livre. Entretanto com 2 horas este mesmo derivado apresenta um diferente perfil, já a 60°C a enzima imobilizada sofre uma ativação (Figura 35B).

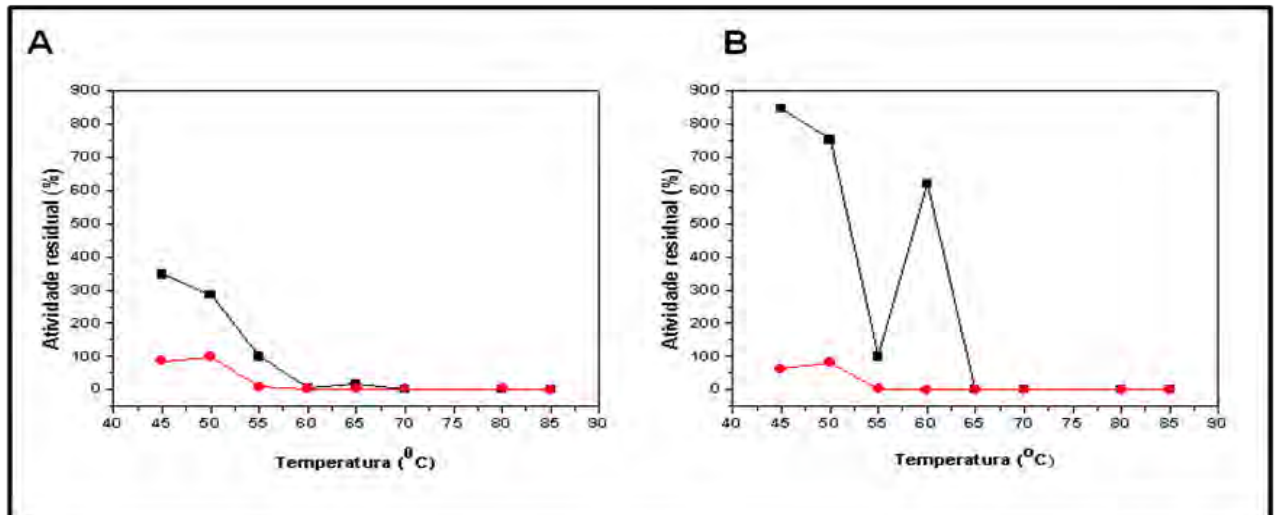


Figura 35: Estabilidade térmica dos derivados da invertase comercial de *Saccharomyces cerevisiae* obtidos pó BC ativado a glioxil. (A) ensaio em 1h e (B) ensaio em 2h. Símbolos: (■) derivado (●) invertase livre.

A Figura 36A e 36B mostra que o derivado pó SM glutaraldeído permanece com maior estabilidade em relação a enzima livre em todas as temperaturas ensaiadas. O derivado não foi estável em elevadas temperaturas. Segundo Husain (1996), a invertase solúvel comercial perde cerca de 95% da atividade em 2 horas a 60°C. Este resultado condiz com o encontrado neste trabalho.

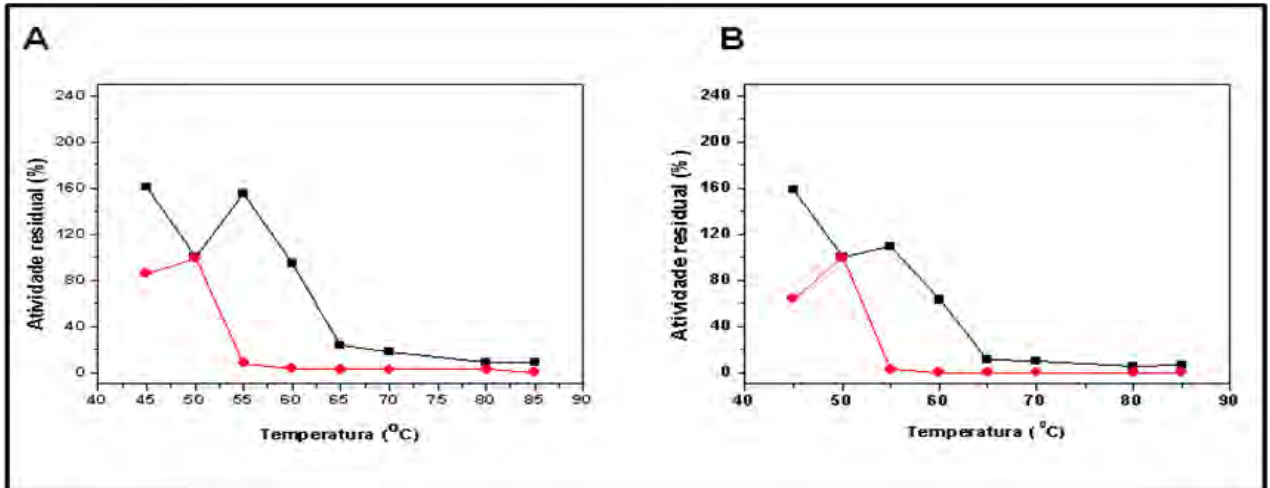


Figura 36: Estabilidade térmica dos derivados da invertase comercial de *Saccharomyces cerevisiae* obtidos com pó SM ativado a glutaraldeído. (A) ensaio em 1h e (B) ensaio em 2h. Símbolos: (■) derivado (●) invertase livre.

5.1.7.7.2. Derivados da invertase extraída de *S. cerevisiae*

Assim como os derivados da invertase comercial, os derivados da invertase extraída foram submetidos a ensaios de estabilidade térmica em diferentes temperaturas 45°C - 85°C concomitantemente com a enzima livre. Na Figura 37A e 37B, observa-se que a estabilidade do derivado pó BC amino foi idêntica a encontrada para invertase livre, permanecendo estável somente até 55°C, com aproximadamente 80% de atividade.

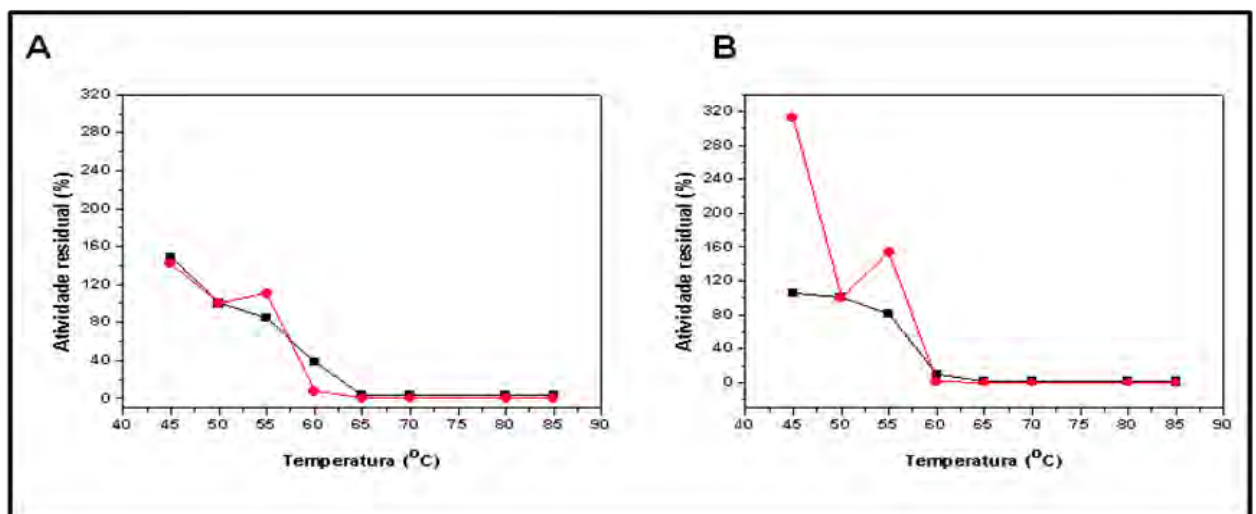


Figura 37: Estabilidade térmica dos derivados da invertase extraída de *Saccharomyces cerevisiae* obtidos com pó BC ativado a amino. (A) ensaio em 1h e (B) ensaio em 2h. Símbolos: (■) derivado (●) invertase livre.

Na Figura 38A e 38B, foi utilizado como controle (100%) a temperatura ótima a 65°C a qual foi obtida anteriormente para este derivado. Comparando os resultados entre 1 e 2 horas, verificou-se que com 2 horas de ensaio, este derivado comporta-se com maior estabilidade frente a enzima livre até temperatura de 65°C.

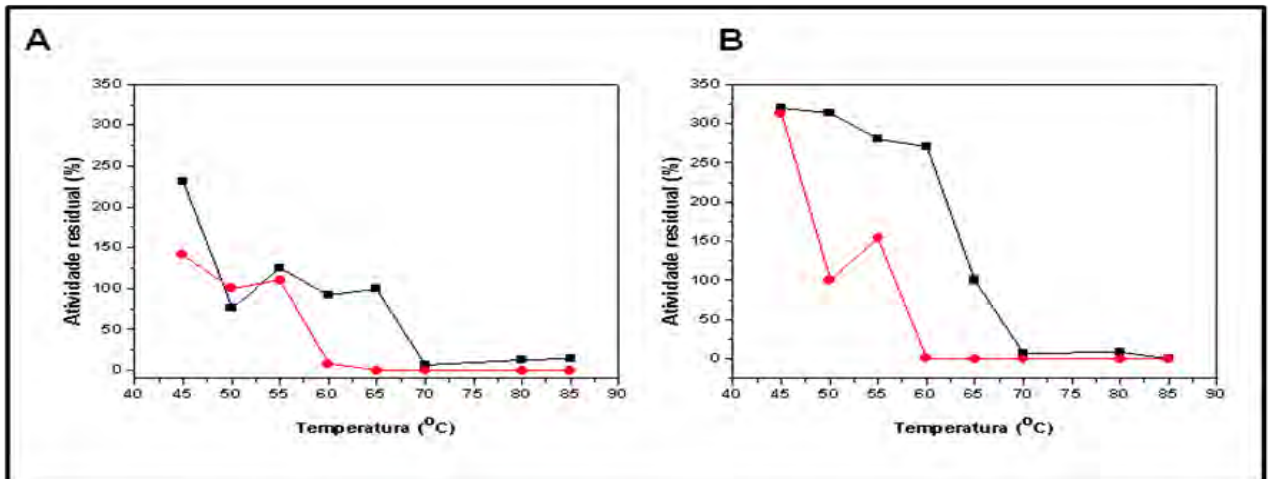


Figura 38: Estabilidade térmica dos derivados da invertase extraída de *Saccharomyces cerevisiae* obtidos com pó BC ativado a glutaraldeído. (A) ensaio em 1h e (B) ensaio em 2h. Símbolos: (■) derivado (●) invertase livre.

Nas Figuras 39A e 39B o derivado SM glutaraldeído apresenta comportamento semelhante nos tempos de 1 e 2 horas. No entanto, em 2 horas a atividade residual manteve-se maior que a 1 hora e maior que a enzima solúvel.

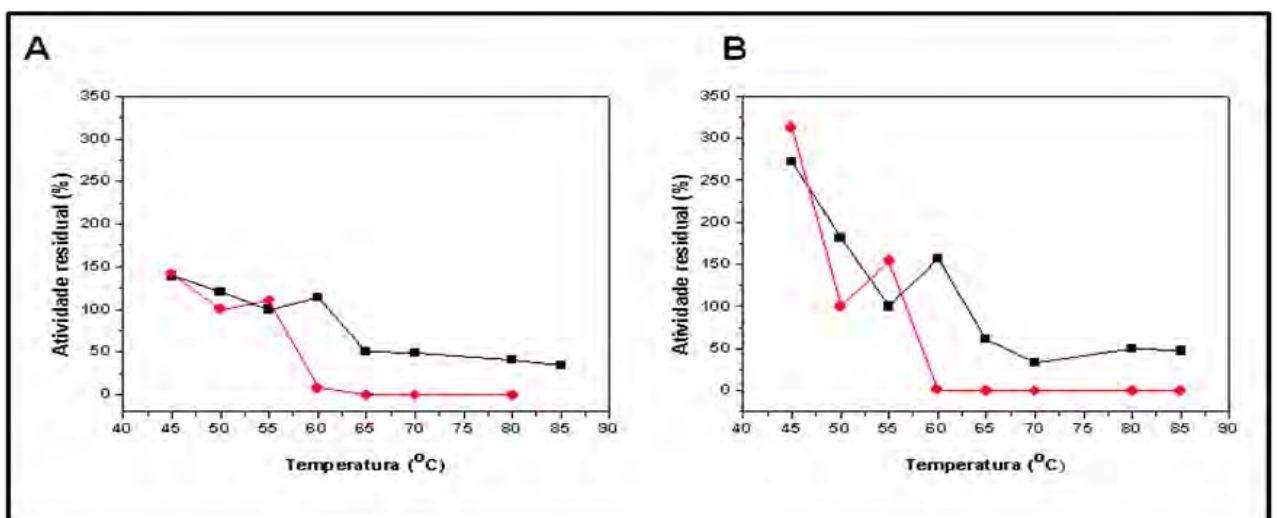


Figura 39: Estabilidade térmica dos derivados da invertase extraída de *Saccharomyces cerevisiae* obtidos com pó SM ativado a glutaraldeído. (A) ensaio em 1h e (B) ensaio em 2h. Símbolos: (■) derivado (●) invertase livre.

Bayramoglu et al. (2009) relataram que invertase de levedura imobilizada conservou atividade inicial a 50°C durante um período de incubação de 120 minutos, enquanto que a enzima livre perdeu a sua atividade inicial em cerca de 23% a 60°C. A invertase imobilizada foi inativada a uma taxa muito mais lenta do que a forma livre e a 70°C as enzimas livres e imobilizadas tiveram sua atividade retida a um nível de 17 e 62% respectivamente.

5.1.8. Reutilização dos derivados da invertase comercial e extraída

Todos os derivados da invertase comercial e extraída foram submetidos a ensaios de reutilização, como descrito em “Material e Métodos”. Na Figura 40, observa-se que todos os quatros melhores derivados apresentaram a possibilidade de reutilização. No entanto, o derivado pó SM amino apresentou a melhor atividade relativa do segundo ao quinto reuso, conservando 40% de atividade enzimática. Goulart (2007) verificou reuso de três vezes da invertase comercial de *S. cerevisiae* imobilizada em amino-agarose. Os resultados encontrados neste trabalho foram o dobro do encontrado pelo autor.

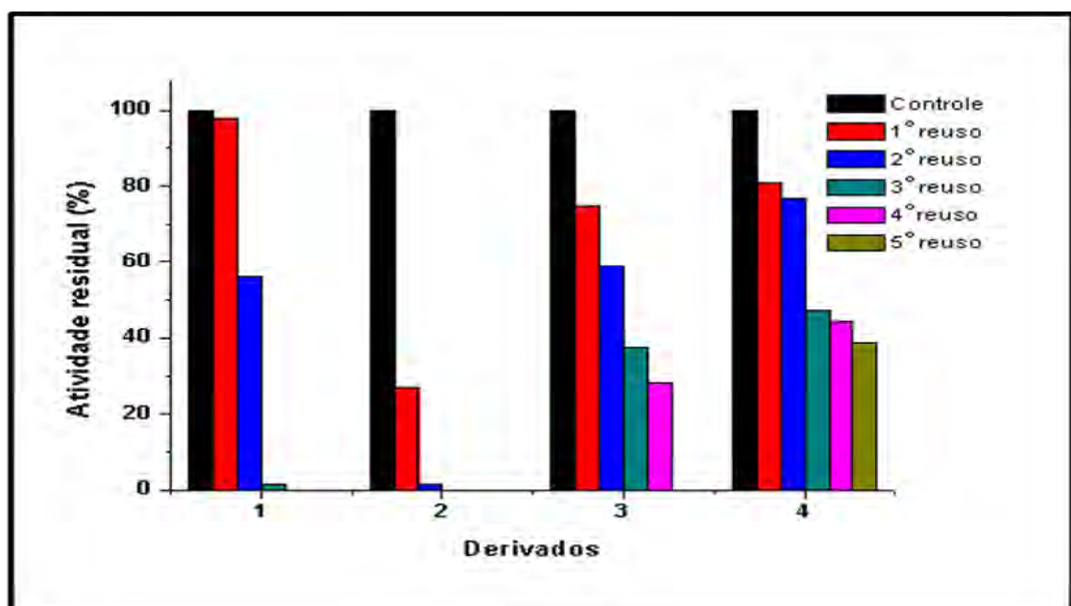


Figura 40: Reutilização dos derivados de invertase comercial obtido com pó de sabugo de milho e pó bagaço-de-cana. (1) BC amino; (2) BC glioxil; (3) SM glutaraldeído; (4) SM amino.

A Figura 41 mostra a reutilização dos derivados da invertase extraída obtidos com pó de bagaço de cana e pó de sabugo de milho. Todos os melhores derivados ensaiados apresentaram a possibilidade de reutilização. O maior número de reuso foi encontrado para o pó SM glutaraldeído, o qual apresentou, a partir do terceiro reuso, a melhor atividade enzimática e, ao final do último reuso, conservou em média 30% de atividade. Goulart (2007) verificou, para invertase comercial imobilizada em glutaraldeído-agarose, dois reusos subsequentes, resultado bem diferente ao encontrado neste trabalho, pois o derivado pó SM glutaraldeído foi reutilizado por cinco vezes.

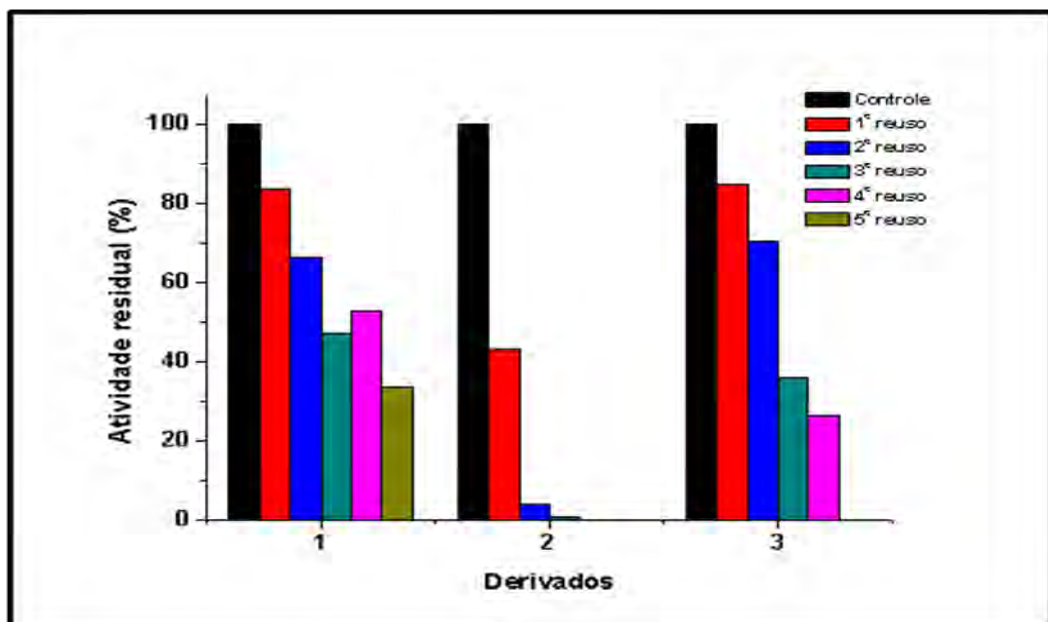


Figura 41: Reutilização dos derivados de invertase extraída obtido com pó de sabugo de milho e pó de bagaço-de-cana. (1) SM glutaraldeído; (2) BC amino; (3) BC glutaraldeído.

5.1.9. Incubação dos derivados em diferentes concentrações de sacarose

O derivado de invertase comercial obtido com pó SM amino e o derivado de invertase extraída obtido com pó SM glutaraldeído foram escolhidos entre os derivados ensaiados anteriormente por apresentarem melhor estabilidade térmica. Os derivados foram ensaiados em concentrações diferentes de sacarose durante

um período de 22 horas. Observa-se, nas Figuras 42 e 43, que os derivados apresentaram comportamento semelhante ao decorrer do tempo de reação de hidrólise. A atividade diminui bruscamente a partir de 6 horas em todas as concentrações de sacarose. Estes resultados indicam que ocorre a inibição dos derivados de invertase pelos produtos frutose e glicose.

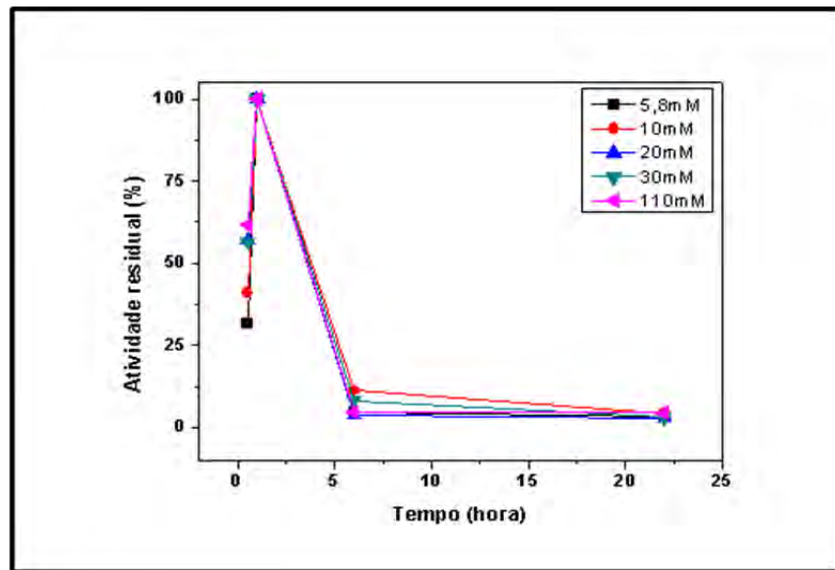


Figura 42: Incubação do derivado de invertase comercial obtida pelo pó de SM amino ensaiado em diferentes concentrações de sacarose.

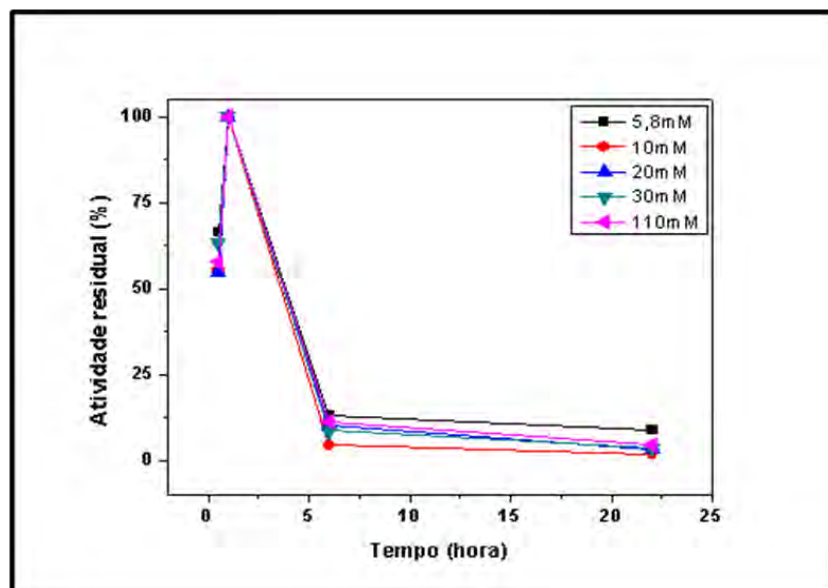


Figura 43: Incubação do derivado de invertase extraída obtida pelo pó de SM glutaraldeído ensaiado em diferentes concentrações de sacarose.

6. Conclusões

A invertase comercial e a extraída de *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram comportamento diferente na caracterização enzimática e na capacidade de imobilização. Apesar de serem invertases da mesma fonte, essas diferenças ocorrem devido ao método de extração, fermento de panificação, reagentes utilizados na extração e condições de armazenamento dos extratos.

Sabe-se que cada suporte tem suas características particulares, sendo importante a comparação com suportes estudados anteriormente, como a agarose, já que os suportes utilizados neste trabalho são inovadores e com base nos dados obtidos, podem ser considerados tão promissores quanto aqueles mais relatados na literatura. Por fim, os objetivos deste trabalho foram alcançados, pois foram produzidos derivados que apresentaram maior estabilidade ao pH, temperatura e estabilidade térmica, comparados à forma livre de invertase. Todos os derivados apresentaram, no mínimo, a capacidade de serem reutilizados duas vezes e, no máximo, cinco vezes. Os derivados mais estáveis e com a capacidade máxima de reutilização foram os derivados da invertase comercial obtido com sabugo de milho amino e invertase extraída obtido com sabugo de milho glutaraldeído.

Em conjunto, as informações adquiridas pelo presente estudo indicam que foi possível a imobilizar esta enzima em suportes alternativos de baixo custo. Além disso, os dados coletados serão importantes na continuidade de outros trabalhos, visando à imobilização de diferentes enzimas.

7. Referências Bibliográficas

ALEGRE, A. C. P.; POLIZETI, M. L. M.; TEREZI, H. F. JORGE, J.A.; GUIMARÃES, L. H. S. Production of thermostable invertases by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n^o 3, 2009.

ALMEIDA, A. C. S. Estudo do processo contínuo para produção de açúcar invertido por via enzimática. 2003. 85 f. Dissertação de mestrado (mestrado em engenharia química) – Centro de Tecnologia e Geociência, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

ALMEIDA, A. C. S.; ARAÚJO, L. C.; ABREU, C. A. M.; LIMA, M. A. G. A.; PALHA, M. L. A. P. F. Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, p 55-62, 2005.

ARICA, M. YAKUP.; BAYRAMOGLU, G. Invertase reversibly immobilized onto polyethylenimine- grafted poly (GMA-MMA) beads for sucrose hydrolysis. **Journal molecular catalysis**, v. 38, p. 131-138, 2006.

BAYRAMOGLU, G.; KARAKISLA, M.; ALTINTAS, B.; METIN, A.U.; SCAK, ARICA.; M. Y. Polyaniline grafted polyacrylonitrile conductive composite fibers for reversible immobilization of enzymes: Stability and catalytic properties of invertase. **Process Biochemistry**, p. 880-885, 2009.

BENEDETTI, A.C.E.P. Isolamento de fungo produtor de enzimas xilanolíticas: produção e caracterização de xilanase. 2009. 109f. Tese doutorado (Doutorado em Ciências dos Alimentos)- Faculdade de ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2009.

BERGAMASCO, R.; BASSETTI, MORAES. F. J.; ZANIN, F. F.G. M. Characterization of free and immobilized invertase regarding activity and energy of activation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.17 p.4- 7, 2000.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de Alimentos**. São Paulo: Varela, 1995. cap 3. p. 12.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. cap. 6. p.124 - 147.

BON, E.P.S.; PEREIRA, N. Tecnologia Enzimática. Rio de Janeiro, 1999. cap. 2. p 17.

BLANCO, R.M.; GUISÁN, J.M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose- aldehyde gels. Borohydrite reduction of trypsin-agarose derivates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11. p. 360-366, 1989.

BRANDÃO, V.S.; MATOS, A.T.; MARTINEZ, M. A.; FONTES, M. P. P. Tratamento de águas residuais da suinocultura utilizando-se filtros orgânicos. Revista brasileira de engenharia e agrícola e ambiental. v. 4, p. 327-333, 2000.

CABRAL, J.M.S.; BARROS, M.R.A.; GAMA, M. **Engenharia Enzimática**. Lisboa: Lidel, 2003. p. 47-57.

CONN, E.E.; STUMPF, P.K. **Introdução à Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 1975. cap 8 . p. 139-152.

COPELAND, R. A. **Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism and data analysis**. 2 ed. New York: Wiley-VCH, 2000. p. 397.

CHIBATA, I. Immobilized Enzyme- Research and Development. Tokyo:Kadansha Ltd, 1978.

CHAMPE, P.C.; HARVEY. R. A.; FERRIER, D.R. **Bioquímica Ilustrada**. 3 ed. São Paulo: Artmed, 2006.cap 5. p. 54-63.

CUNHA, M.A.A. Bioprodução de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em sistemas com células de *Candida guilliemondii* imobilizadas em hidrogéis de álcool polivinílico. 2006. 120f. Tese de doutorado (Doutorado em Biotecnologia Industrial) Escola de engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo, Lorena, 2006.

DAVID, A.E.; WANG, N.S.; YANG, V.C.; YANG, A.J. Chemically surface modified gel (CSMG): an excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes. **Journal Biotechnol**, vol.125, pg. 395–407, 2006.

D'SOUZA, S.F.; GODBOLE, S.S. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. **Journal. Biochemical and Biophysical Methods**, v.52, p.59-62, 2002.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R .; ROSELL, C.M.; RODRIGUEZ, V.; SANTANA, C.; SOLER, G.; BASTIDA, A.; GUISÁN, J.M. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 546-550, 1993.

FONTANA, I. D.; GEBARA, M.; BLUMEL, M.; SCHNEIDER, H.; MACKENZIE, C. R.; JONHSON, K.G. α - 4-0-Methyl-D-glucuronidase component of xylanolytic complexes. **Methods in Enzymology**, v.160, p. 560-571, 1988.

GÁSCON, S.; NEUMANN, N.P.; LAMPEN, J. O. Comparative study of properties of purified internal and external invertases from yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 243, p. 1573-1577, 1968.

GOULART, A.J. Imobilização multipontual de invertase e inulinase em suportes sólidos: caracterização físico-cinética dos derivados estabilizados. 2007. 128 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

GUISÁN, J.M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p 375-382, 1988.

GUISÁN, J.M.; PENZOL, G.; ARMISEN, P.; BASTIDA.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GARCÍA-JUCEDA, E. Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrates. In: BICKERSTAFF, G.F. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa: Humana Press, 1997. c. 30, p. 261-275.

GUISÁN, J.M. Immobilization of enzymes as the 21st century begins: an already solved problem or still an exciting challenge? In: GUISÁN, J.M. (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa: Humana Press, 2006. Cap.1, p. 1-13.

GRAZÚ, V.; GALLEGRO, F.L.; MONTES, T.; ABIAN, O., GONZÁLEZ, R.; HERMOSO, J.A., GARCIA, J.L., MATEO, C.; GUISÁN, J.M. Promotion of multipoint covalent immobilization through different regions of genetically modified penicillin G acylase from *E. coli*. **Journal Process Biochemistry**, v. 45, p.390-398, 2010.

HARTREE, E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry Method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, England, v.48, p.422-427, 1972.

HUSAIN, S.; JAFRI, F.; SALEEMUDDIN, M. Effects of chemical modification on the stability of invertase before and after immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 275-280, 1996.

KENNEDY, J.F.; CABRAL, J.M.S. Enzyme Immobilization. **Journal Biotechnology**, v.7a, p.347-404,1987.

KOBLITZ, M.G.B. **Bioquímica de alimentos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap 2, p. 62-68.

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

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

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

MARQUEZ, L.D.S.; CABRAL, B.V., FREITAS, F.F., CARDOSO, V. L., RIBEIRO, E. J. Otimização da imobilização de invertase por adsorção em resina de troca iônica para a hidrólise de sacarose, **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, p. 86-92, 2007.

MILANOVIC, A.; BOZIC, N.; VUJCIC. Cell Wall Invertase Immobilization Within Calcium Alginate Beads, **Food Chemistry**, v.104, p. 81-86, 2007.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-429, 1959.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – Produção anual de cana de açúcar. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>> Acesso em 14 de abril. 2010.

MOHMOUD, D.A.R. Immobilization of invertase by a new economical method using wood sawdust waste. **Journal Australian Basic and Applied**, vol. 1, p 364-372, 2007.

MURRAY, R.K.; GRANNER, K.D.; RODWEL. V. W. HARPER: **Bioquímica Ilustrada**. 27 ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2007. cap 7. p. 60-64.

NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4^o ed. São Paulo: Savier, 2006. p. 190- 237.

NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v.9, p.255-62, 1988.

SANJAY, G.; SUGUNAN, S. Invertase immobilized on montmorillonite: reusability enhancement and reduction in leaching. **Catalysis Communications**, v. 6, p. 81-86, 2004.

SEGEL, I.H. Bioquímica, Teoria e Problemas. Traduzido Grassiano, D. M. Rio de Janeiro: Livros técnico e científicos, 1979.

SCHEFFER, J.F.; GONZÁLEZ, F.H.D. Enzimologia clínica em medicina veterinária. 2003 21f. Monografia em clínica veterinária. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2003.

SUN, J.X.; SUN, X.F.; SUN, R.C.; SU, Y.Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 195-204, 2004.

SUZUKI, H., OZAWA, Y.; MAEDA H. Studies on the water-insoluble enzyme hydrolysis of sucrose by insoluble yeast invertase. **Agricultural and Biological Chemistry**, vol.30, p. 807–812, 1966.

TITA, S.P.S.; PAIVA, J.M.F.; FROLLINI, E. Resistência ao impacto e outras propriedades de compósitos lignocelulósicos: matrizes termofixas fenólicas reforçadas com fibras de bagaço de cana-de-açúcar. **Ciência e Tecnologia**, vol. 12, nº 4, p. 228-239, 2002.

TSAI, W.T.; CHANG, C.Y.; WANG, S.Y.; CHANG,C.F.; CHIEN, S.F.; SUN, H.F. Preparation of actividade carbons form corn cob catalyzed by potassium salts and subsequent gasification. **Bioresouce Technology**, vol. 78, p. 203-208, 2000.

UHLIG, H. **Industrial enzymes and their applications**. New York: John Wiley, p.454, 1998.

VECCHIA, R.D.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Jornal Química Nova**, vol. 27, p. 623-630, 2004.

ZIGLIO, B.R.; BEZERRA, J.R.M.V.; BRANCO, I.G.; BASTOS, R.; RIGO, M. Elaboraões de pães com sabugo de milho. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, vol. 9, p. 117-128, 2007.