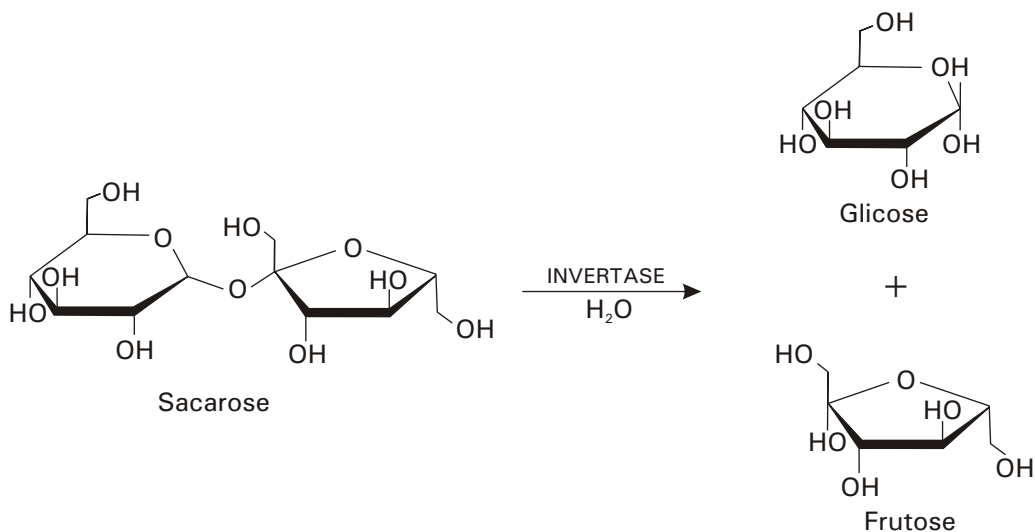


Determinação da Atividade de Invertase em Extratos Enzimáticos



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria Tropical
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

Documentos 108

Determinação da Atividade de Invertase em Extratos Enzimáticos

*Cynthia Ladyane Alves de Moura
Gustavo Adolfo Saavedra Pinto
Sueli Rodrigues*

Embrapa Agroindústria Tropical
Fortaleza, CE
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria Tropical

Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici

CEP 60511-110 Fortaleza, CE

Caixa Postal 3761

Fone: (85) 3299-1800

Fax: (85) 3299-1803

Home page: www.cnpat.embrapa.br

E-mail: negocios@cnpat.embrapa.br

Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente: *Francisco Marto Pinto Viana*

Secretário-Executivo: *Marco Aurélio da Rocha Melo*

Membros: *Janice Ribeiro Lima, Andréia Hansen Oster, Antonio Teixeira Cavalcanti Júnior, José Jaime Vasconcelos Cavalcanti, Afrânio Arley Teles Montenegro, Ebenézer de Oliveira Silva*

Supervisor editorial: *Marco Aurélio da Rocha Melo*

Revisor de texto: *José Ubiraci Alves*

Normalização bibliográfica: *Ana Fátima Costa Pinto*

Fotos da capa: *Maria Auxiliadora Coêlho de Lima, Tatiana Mourão Dantas, José Luiz Mosca*

Editoração eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*

1ª edição

1ª impressão (2007): 200 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Agroindústria Tropical**

Moura, Cynthia Ladyane Alves de.

Determinação da atividade de invertase em extratos enzimáticos / Cynthia Ladyane Alves de Moura, Gustavo Adolfo Saavedra Pinto, Sueli Rodrigues. – Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, 2007.

18 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 108).

ISSN 1677-1915

1. Invertase. I. Pinto, Gustavo Adolfo Saavedra. II. Rodrigues, Sueli. III. Título. IV. Série.

CDD 634.41

© Embrapa 2007

Autores

Cynthia Ladyane Alves de Moura

Engenheira de Alimentos, B. Sc., Bolsista de Apoio
Técnico da Embrapa Agroindústria Tropical

Gustavo Adolfo Saavedra Pinto

Químico Tecnológico, D. Sc. em Tecnologia de
Processos Químicos e Bioquímicos, Pesquisador da
Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE,
gustavo@cnpat.embrapa.br

Sueli Rodrigues

Engenheira Química, D. Sc. em Engenharia Química,
Professora do Departamento de Tecnologia de
Alimentos da Universidade Federal do Ceará - UFC

Apresentação

As enzimas são biomoléculas responsáveis pela catálise de diferentes reações em sistemas biológicos. Através da diminuição da energia de ativação reacional, elas possibilitam que a vida possa ocorrer em condições amenas de temperatura e pressão. Industrialmente, esse fato vem despertando muito interesse, pois permite a economia de energia a ser aportada aos processos de conversão, gera menos co-produtos e resíduos, sendo parte de um sistema ambientalmente amigável.

Contudo, uma das grandes dificuldades do trabalho com enzimas é como mensurá-las. Ao contrário de compostos químicos, para os quais os métodos analíticos fornecem uma concentração (como por exemplo: g.L^{-1} , Molar, etc.), as enzimas são mensuradas quanto a sua velocidade de conversão. Dessa forma, diferentes métodos ou, simplesmente, diferentes formas de se ver um mesmo método, podem levar a resultados, valores de atividade distintos, sem que efetivamente um esteja mais correto que o outro. Isso, muitas vezes, impossibilita a comparação entre valores absolutos de um trabalho com outro.

Os artigos científicos, na imensa maioria dos casos, não explicita como a análise é feita, ou como se calcula a atividade, apenas cita como ela é expressa. Assim, este trabalho teve como apresentar aos leitores os detalhes da análise de invertase, seus pontos problemáticos e a forma de cálculo da atividade desta enzima, a fim de possibilitar a fácil reprodução do método por qualquer pessoa interessada.

Lucas Antônio de Sousa Leite
Chefe-Geral
Embrapa Agroindústria Tropical

Sumário

Introdução	9
Materiais Necessários	10
Preparo de Soluções	11
Curva-Padrão de Glicose	13
Seqüência de Análise da Atividade	15
Referências	17

Determinação da Atividade de Invertase em Extratos Enzimáticos

Cynthia Ladyane alves de Moura

Gustavo Adolfo Saavedra Pinto

Sueli Rodrigues

Introdução

A invertase (E.C. 3.2.1.26), ou β -D-fructo-furanosídio-frutohidrolase, ou sacarase, é a enzima responsável pela liberação do resíduo L-D-fructofuranosídio não-redutor, a partir da molécula de dissacarídeo (Gracida-Rodríguez et al., 2005). Seu substrato preferencial é a sacarose, resultando na sua hidrólise uma molécula de glicose e outra de frutose, porém, também, pode hidrolisar ramonose e estaquiose (Fiedurek et al., 2000).

Historicamente, esta enzima tem grande importância, uma vez que foi a primeira proteína a ser identificada como um biocatalisador. Também, foi a partir de estudos com invertase, que foram construídos os princípios fundamentais da enzimologia, como a hipótese de chave-fechadura para atividade enzimática (Brown, 1902), a equação de Michaelis-Menten (Michaelis & Menten, 1913), o conceito de ponto isoelétrico (Michaelis & Davidsohn, 1911; Michaelis & Rothstein, 1920) e a hipótese de Briggs & Haldane (1925), em que o complexo formado entre enzima e substrato não representa um equilíbrio, mas sim um estado estacionário.

A invertase está presente em diversas frutas e tubérculos, como por exemplo: mamão, manga, banana, peras, maçãs, batatas entre outras, tendo grande participação nos seus processos de amadurecimento e apodrecimento (Chapper et al., 2004; Torija et al., 1998).

Industrialmente, as invertases têm seu maior campo de aplicação na área de alimentos, especialmente na preparação de geléias, balas, doces e xapores (Gracida-Rodríguez et al., 2005). No processo de fabricação de xaropes, sua utilização tem vantagens significativas, uma vez que não apresenta a formação de subprodutos (Swain & Stephan, 2005). Pesquisas recentes apontam potenciais usos na produção de ácido láctico, a partir da fermentação de melaço de cana (Acosta et al., 2000); na produção de etanol, onde evitariam a formação de sorbitol durante o processo de bioconversão (Lee & Huang, 2000; Kirk & Doelle, 1993). Na sua forma imobilizada, essa enzima também apresenta potencial na fabricação de xaropes, o que permitiria sua utilização em várias bateladas ou de forma contínua (Almeida et al., 2005) e, também, na preparação de biosensores, que permitiriam a quantificação em tempo real, e dentro de bioreatores de concentração de sacarose em meios fermentativos (Park et al., 1991).

O objetivo deste trabalho é fornecer ao leitor uma descrição de todas as etapas necessárias para a determinação de atividade de invertase presente em extrato enzimático, de forma clara, fazendo observações sobre pontos de dúvida que possam induzir a erros.

Materiais Necessários

Reagentes

- Sacarose P.A.
- Glicose P.A.
- Ácido acético glacial
- Acetato de sódio P.A.
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)
- Hidróxido de sódio (NaOH)
- Tartarato duplo de sódio e potássio tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$)

Equipamentos e Materiais

- Balança analítica
- Banho termostático com circulação de água
- Agitador de todos de ensaio
- Pipetas graduadas (1 mL, 10 mL e 20 mL)
- Tubos de ensaio médios
- Balão volumétrico de 100 mL, 250 mL e 1000mL
- Bechers diversos
- Frascos ambar
- Cronômetro digital
- Espectrofotômetro Vis
- Cubetas de vidro

Preparo de Soluções

Solução de ácido acético 200 mM (1000 mL)

Transferir 11,6 mL de ácido acético glacial para balão de 1000 mL, já contendo 100 mL de água destilada. Homogeneizar, completar o volume e homogeneizar novamente. Transferir para um frasco de vidro devidamente etiquetado.

Armazenar em geladeira por tempo indeterminado.

Solução de acetato de sódio 200 mM (1000 mL)

Dissolver 16,4 g de acetato de sódio ($C_2H_3O_2Na$) ou 27,2 g de acetato de sódio triidratado ($C_2H_3O_2Na \cdot 3 H_2O$) em 500 ml de água destilada, transferir para um balão de 1000 mL e completar com água destilada, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro devidamente etiquetado.

Armazenar em geladeira por tempo indeterminado.

Tampão acetato 100 mM, pH 5,0 (1000 mL)

Misturar 148 mL da solução de ácido acético 200 mM com 352 mL da solução de acetato de sódio 200 mM, completar o volume para 1000 mL com água destilada e homogeneizar.

Verificar o pH do tampão.

Armazenar em geladeira por tempo indeterminado.

Solução padrão de glicose 1000 mg/L (1000 mL)

Pesar em balança analítica 1000 mg de glicose, em seguida dissolver em aproximadamente 200 mL de água destilada sob agitação constante, transferir analiticamente para um balão volumétrico 1000 mL, aferir o volume e homogeneizar vigorosamente.

Essa solução não pode ser armazenada!

Solução de sacarose 100 mM em tampão acetato 100 mM pH 5,0 (100 mL)

Pesar em balança analítica 3,420 g de sacarose, em seguida dissolver em 50 mL de tampão acetato 100 mM pH 5,0, transferir analiticamente para um balão volumétrico de 100 mL, aferir o volume com solução tampão e homogeneizar vigorosamente.

Transferir o conteúdo para frasco de vidro etiquetado e armazenar na geladeira por, **no máximo**, sete dias.

Reagente de DNS (250 mL)

Pesar 4,0 g de hidróxido de sódio e dissolver em 50 mL de água destilada.

Pesar 2,5 g de DNS e adicionar à solução de NaOH recém preparada.

Pesar 75,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio e dissolver, sob agitação constante, em 125 mL de água destilada.

Adicionar à solução de DNS a solução de tartarato, sob aquecimento, até dissolver completamente.

Deixar esfriar, transferir para balão volumétrico de 250 mL, completar o volume com água destilada e homogeneizar.

Esta solução deve ser armazenada à temperatura ambiente por tempo indeterminado.

Curva-Padrão de Glicose

Observação 1: diferentes grupos, laboratórios ou pessoas costumam preparar esta curva-padrão de modo distinto. Enquanto uns utilizam uma solução de glicose, outros utilizam uma mistura de glicose e frutose em quantidades iguais, ainda existem outros que usam uma solução de sacarose invertida com ácido clorídrico. Todos os três modos de preparação da curva-padrão foram testados no laboratório da Embrapa Agroindústria Tropical e produziram resultados coincidentes. Desse modo, optou-se pela simplicidade operacional: a curva-padrão baseada na solução de glicose.

Obtenção dos dados para curva-padrão

A partir da solução padrão de glicose, preparar em balões volumétricos de 100 mL, soluções com concentração variando de 100 mg/L a 900 mg/L de glicose, conforme a Tabela 1.

Transferir para tubos de ensaios 1,0 mL de cada solução preparada, incluindo a solução padrão. Adicionar 1,0 mL de solução de DNS e homogeneizar vigorosamente.

Levar os tubos para banho-maria com água em ebulição. Após 5 minutos, retirar os tubos do aquecimento e coloca-los em recipiente com água à temperatura ambiente.

Adicionar 8,0 mL de água destilada, homogeneizar vigorosamente e ler em espectrofotômetro a 540 nm.

O espectrofotômetro deve ser calibrado com amostra sem glicose, ou seja, 1,0 mL de solução corresponde a 1,0 mL de água destilada.

Tabela 1: Exemplo de preparo das soluções diluídas de glicose a partir da solução padrão de 1000 mg/L.

Solução de ácido gálico (mL)	Água destilada (mL)	Concentração final (mgL)
10	90	100
20	80	200
30	70	300
40	60	400
50	50	500
60	40	600
70	30	700
80	20	800
90	10	900

Construção da curva-padrão

Plotar, em planilha ou calculadora científica, a absorbância no eixo Y contra a concentração de glicose (mg/L) no eixo X (Figura 1). A partir do coeficiente angular da reta ajustada, calcula-se o fator de concentração (Eq. 1).

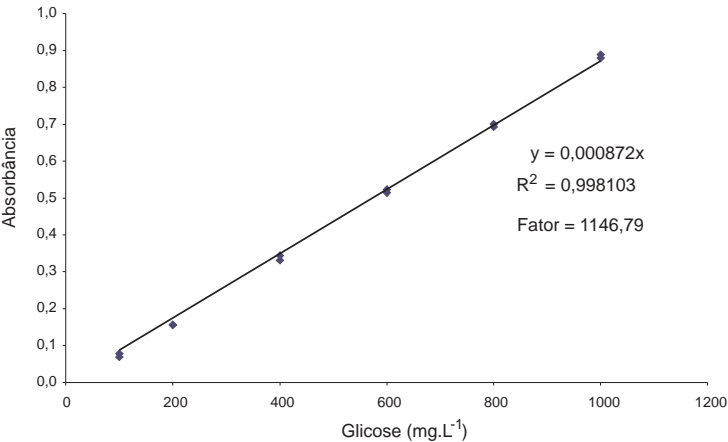


Fig. 1. Modelo de gráfico de curva padrão de glicose.

$$\boxed{Fator = \frac{1}{Coef.angular}} \quad (Eq. 1)$$

Seqüência de Análise da Atividade

Etapa I: Incubação das amostras

Em tubo de ensaio contendo 500 mL de solução de sacarose 0,1 M, adicione 400 mL de tampão acetato 100 mM, pH 5,0, homogeneize vigorosamente e leve para banho termostático a 30 °C por 10 minutos, para aclimação.

Adicione 100 mL da amostra enzimática, homogeneize e incube a 30 °C por 30 minutos. Para paralisar a reação, adicionar 1 mL do reagente de DNS e homogeneizar vigorosamente.

Observação 2: Caso seja necessário a amostra enzimática pode ser diluída. Para tanto, recomenda-se utilizar como diluente o tampão acetato 100 mM, pH 5,0, ao invés de água destilada.

Observação 3: O tempo de 30 minutos deverá ser medido com auxílio de um cronômetro digital, preferencialmente.

Observação 4: Normalmente, são realizadas análises de vários extratos enzimáticos simultaneamente. Deve-se, portanto, tomar precauções para que o intervalo de adição entre duas amostras, permita ao operador realizar todas as operações necessárias, como troca de pipeta ou ponteira, enchimento e esvaziamento da pipeta, agitação dos tubos, etc. Sugerem-se intervalos de 30 segundos ou 60 segundos, dependendo do treino do analista. Os intervalos devem ser uniformes.

Observação 5: O tempo de incubação de 30 minutos deve ser obedecido para cada tubo de ensaio em que esteja sendo adicionado extrato enzimático, e não apenas para o primeiro tubo da seqüência de análise.

Etapa II: Branco das amostras

Observação 6: As amostras enzimáticas podem, ou não, ter grupos redutores presentes, oriundos do meio de fermentação, por exemplo. Para se evitar uma super-estimativa da atividade da enzima, deve-se fazer, para cada amostra, um branco correspondente, visando descontar contribuição destes grupos redutores.

Em tubo de ensaio contendo 500 mL de solução de sacarose 0,1 M, adicione 400 mL de tampão acetato 100 mM, pH 5,0, homogeneize vigorosamente. Adicione 1 mL do reagente de DNS e torne a homogeneizar. Em seguida, adicione 100 mL da amostra enzimática.

Etapa III: Determinação dos grupos redutores

Levar os tubos com DNS para banho-maria com água em ebulição. Após 5 minutos, retirar os tubos do aquecimento e coloca-los em recipiente com água à temperatura ambiente.

Adicionar 8,0 mL de água destilada, homogeneizar vigorosamente e ler em espectrofotômetro a 540 nm.

Observação 7: O espectrofotômetro deve ser calibrado com amostra sem a presença de grupos redutores, ou seja, a 1,0 mL de DNS, adiciona-se 1,0mL de água destilada.

Etapa IV: Cálculo da atividade de invertase

Uma unidade (U) de atividade de invertase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1mmol de grupos redutores, medidos como glicose, por minuto, nas condições de reação utilizadas.

$$Invertase (U) = \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times Fator \times Diluição}{540} \quad (Eq. 1)$$

$Abs_{amostra}$ → Absorbância da amostra

Abs_{branco} → Absorbância do branco correspondente

Fator → Fator de concentração da curva-padrão de glicose (mg/L)

Diluição → Diluição do extrato enzimático

540 → Fator de conversão para atividade (u.m.a.⁻¹ x min⁻¹)

Referências

ACOSTA, N.; BELDARRAÍN, A.; RODRÍGUEZ, L.; ALONSO, Y. Characterization of recombinant invertase expressed in methylotrophic yeasts. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 32, p. 179-187, 2000.

ALMEIDA, A. C. S.; ARAÚJO, L. C.; COSTA, A. M.; ABREU, C. A. M.; LIMA, M. A. G. A; PALHA, M. A. P. F. Sucrose hydrolysis catalyzed by auto immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 1, 2005.

BRIGGS, G. E.; HALDANE, J. B. S. A note on the kinetics of enzyme action. **Biochemical Journal**, v. 19, p. 338-339, 1925.

BROWN, A.J. Enzyme action. **Journal of Chemical Society**, v. 81, p. 373-386, 1902.

CHAPPER, M.; BACARIN, M. A.; PEREIRA, A. S.; LOPES, N. F. Atividade amidolítica e de invertase ácida solúvel em tubérculos de batata armazenados sob duas condições de temperatura. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 3, p.597-601, 2004.

FIEDUREK, J.; PIELECKI, J.; SKOWRONEK, M. Direct methods for selecting mutants with increased production of invertase from mutagenised cultures of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 40, p. 111-118, 2000.

GRACIDA-RODRÍGUEZ, J.; FAVELA-TORRES, E.; PRADO-BARRAGÁN, A.; HUERTA-OCHOA, S. SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. Invertases. In: PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. (Ed.) **Enzyme Technology**. New Delhi: Asiatech Publishers, 2005. p. 449-464.

KIRK, L. A.; DOELLE, H. W. Rapid ethanol production from sucrose without by-product formation. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 9, p. 985-990, 1993.

LEE, W. C.; HUANG, C. T. Modelling of ethanol production using *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 grown on the media containing glucose and fructose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 217-227, 2000.

MICHAELIS, L.; DAVIDSON, H. The theory of isoelectric effect. **Biochemische Zeitschrift**, v. 30, p. 143-150, 1911.

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Kinetik der invertinwirkung. **Biochemische Zeitschrift**, v. 49, p. 333-369, 1913.

MICHAELIS, L.; ROTHSTEIN, M. Theory of invertase action. **Biochemische Zeitschrift**, v. 110, p. 217-233, 1920.

PARK, J. K.; RO, H.S.; KIM, H. S. A new biosensor for specific determination of sucrose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis* and invertase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, n. 3., p. 217-223, 1991.

SWAIN, R.; STEPHAN, J. **Enzyme treated maple syrup and shelf stable products containing enzyme treated maple syrup**. US Patent 6.936.290, 2005

TORIJA, E.; DÍEZ, C.; MATAALLANA, C.; CAMARA, M.; CAMACHO, E.; MAZARÍO, P. Influence of freezing process on free sugars content of papaya and banana fruits. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 315-319, 1998.



Agroindústria Tropical

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

