

BLOCO 1 – ATIVIDADE 6

ATIVIDADE ENZIMÁTICA – INVERTASE

Autoria: Jaime Paba Martinez (Departamento de Bioquímica, UFPR)

Aspectos gerais

A Invertase é uma enzima capaz de hidrolisar a ligação alfa 1-4 entre a D-glucose e D frutose, convertendo assim sacarose em glucose e frutose. Oligossacarídeos como kestose, rafinose e estaquiose presentes em alguns vegetais são também hidrolisados pela enzima. Ela é produzida por bactérias, plantas, fungos e alguns animais.

Kestose é um fruto-oligosacarídeo resultante da ligação de frutose a moléculas de sacarose. Encontrada nos vacúolos de células vegetais

Rafinose é um trissacarídeo vegetal composto de galactose, frutose e glicose.

Estaquiose. É um tetrassacarídeo vegetal formado de duas unidades de alfa-D-galactose, uma unidade de alfa-D-glucose e uma unidade de beta-D-frutose sequencialmente ligados como gal (α 1-6) gal (α 1-6) glucose (α 1-2 β) frutose

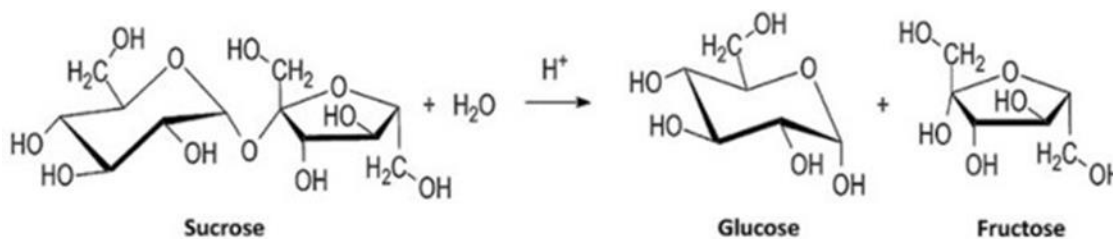


Fig. Mecanismo de ação da invertase

O uso da invertase é popular na indústria de alimentos pois a frutose livre é mais doce que a sacarose; e porque a taxa de cristalização da frutose é mais prolongada. Desta maneira a presença da frutose diminui a necessidade de adoçantes adicionais; altera as propriedades organolépticas do alimento conferindo um aumento na textura (ou viscosidade) e também incrementa o tempo de prateleira dos produtos. O procedimento tradicional da quebra da sacarose pelo método da hidrólise ácida está longe do desejável devido à baixa eficiência da hidrólise e à formação de produtos não desejados. Em contraste o uso da invertase produzida por organismos através de métodos biotecnológicos é muito efetivo já que não gera produtos intermediários; é muito rápido e ainda permite a geração de outras enzimas de potencial industrial. A invertase é amplamente utilizada para melhorar a textura e sabor de alimentos como biscoitos, bolos, sorvetes, geleias, balas, sucos de frutas não integrais, refrigerantes e doces em geral.

Berthelot em 1860 teve sucesso no isolamento da invertase de levedura e publicou que o extrato de levedo da cerveja é capaz de decompor sacarose em frutose e glucose. Antes dele **Misterlich** em 1842 tinha reportado uma substância capaz de mudar o açúcar da cana de caráter dextrorrotatório em um açúcar levorotatório, atividade esta

responsável pelo nome original (invertase). Finalmente, em 1847, o produto resultante era descrito com uma mistura de glucose e frutose por [Dubrunfaut](#).

As Invertases são classificadas de acordo a sua localização subcelular e pH. Estas podem ser ácidas (pH 4.5-5.5), neutras e alcalinas (pH 6.5-8.0). As invertases bacterianas geralmente são ativas em uma ampla faixa de pH mantendo sempre uma alta atividade catalítica. As enzimas secretadas e as que ficam no citoplasma apresentam algumas diferenças. Estas últimas com frequência não possuem carboidratos na sua estrutura como as primeiras.

A invertase de *Saccharomyces cerevisiae* é formada por dímeros que se agrupam formando um octâmero finalmente, ou de forma mais exata um tetrâmero de dímeros. A dimerização determina a especificidade pelo substrato porque cria uma restrição espacial que limita o acesso de oligossacarídeos de mais de 4 unidades no sítio ativo. Os dímeros localizados nos vértices de uma estrutura retangular podem se encontrar no estado “aberto” ou “fechado” sendo o primeiro mais estável.

Uma das características mais importantes da enzima é sua termoestabilidade, que é um critério básico para aplicações industriais já que os processos de preparo de alimento usualmente incluem a exposição a altas temperaturas. Particularmente a adição covalente de glicídeos aumenta a termoestabilidade da enzima.

A atividade da enzima é diminuída na presença de cátions como Hg^{+2} , Ag^{+2} , Ca^{+2} e Cu^{+2} . Em Algumas invertases de plantas a adição de íons Cu, Zn, Mg ou Br inibe sua atividade, de outro lado a presença de ions Co e de EDTA remove esse efeito deletério. Assim, a variação da atividade da enzima na presença de vários ions revela que esta é uma metaloenzima.

Problema

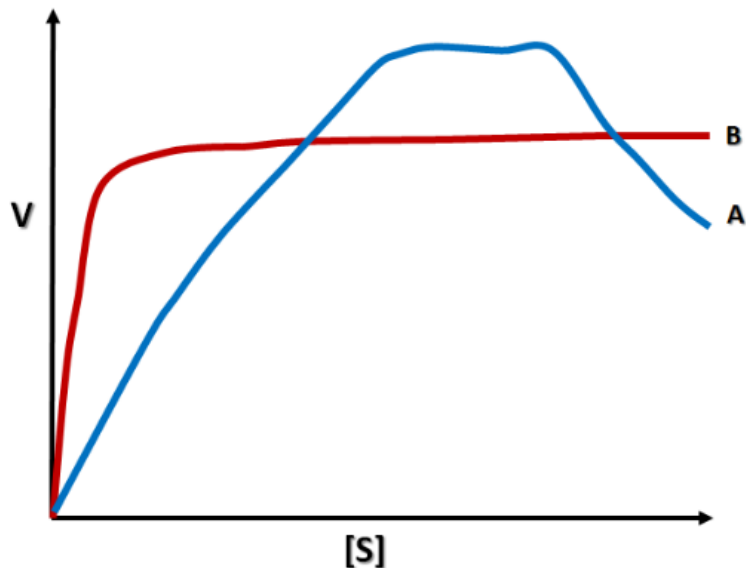
Uma indústria de refrigerantes procura diminuir custos de produção e aumentar a palatabilidade do seu produto. Para tal pretende selecionar uma invertase adequada com boas propriedades catalíticas que possa ser expressa em um hospedeiro recombinante e que possa ser imobilizada em coluna para assim exercer seu papel diretamente no refrigerante, evitando sua dissolução no mesmo.

Lembremos que s refrigerantes são formados por uma mistura de água, gás (no caso o gás carbônico, o CO_2) e algum tipo de xarope, que dá a cor e o gosto da bebida. Mas essas três coisas não são combinadas de uma vez. Primeiro, os fabricantes juntam a água e o gás, em um aparelho chamado carbonizador. Quando esses dois ingredientes se misturam, a água dissolve o CO_2 , dando origem a uma terceira substância, o ácido carbônico. Depois, acrescenta-se o xarope a esse ácido. O último passo é inserir uma dose extra de CO_2 dentro da embalagem par aumentar a pressão interna e conservar a bebida.

Grupo A- Questões a resolver

1. Por que o uso da invertase assim como sua aplicação de forma imobilizada reduziria custos na produção do refrigerante?
2. Que fatores deveríamos avaliar nas enzimas candidatas em relação a suas propriedades para o uso?
3. Como verificaríamos a atividade de uma invertase? Ou de forma geral de qualquer enzima que quisermos avaliar?
4. Duas enzimas invertases, A e B, pertencentes a diferentes microrganismos são candidatas a utilização no processo industrial de produção de refrigerantes (veja gráfico a seguir). O grupo deve elencar vantagens e desvantagens para usar cada uma delas. Prepare para compartilhar com a turma.

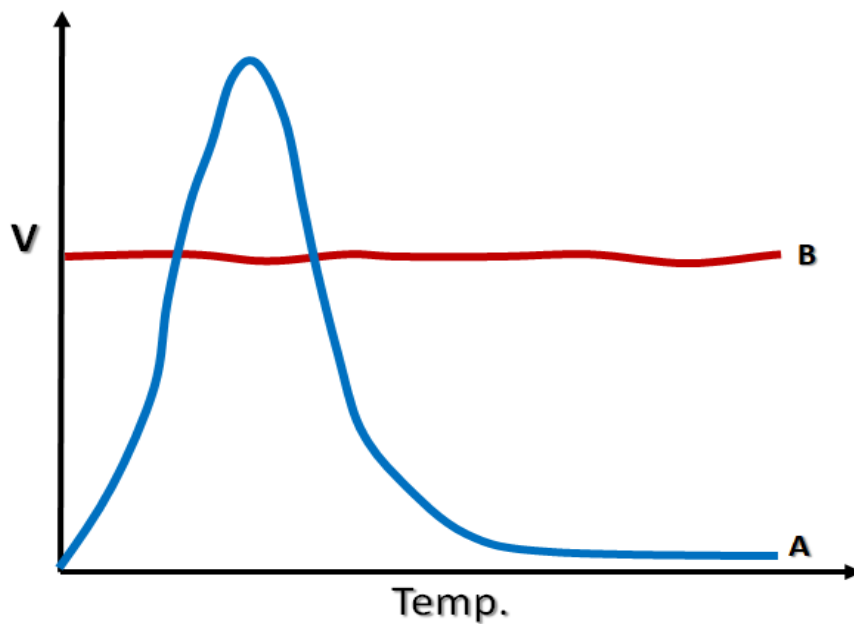
Velocidade da atividade enzimática versus concentração de substrato.



Grupo B- Questões a resolver

1. Por que o uso da invertase assim como sua aplicação de forma imobilizada reduziria custos na produção do refrigerante?
2. Que fatores deveríamos avaliar nas enzimas candidatas em relação a suas propriedades para o uso?
3. Como verificaríamos a atividade de uma invertase? Ou de forma geral de qualquer enzima que quisermos avaliar?
4. Duas enzimas invertases, A e B, pertencentes a diferentes microrganismos são candidatas a utilização no processo industrial de produção de refrigerantes (veja gráfico a seguir). O grupo deve elencar vantagens e desvantagens para usar cada uma delas. Prepare para compartilhar com a turma.

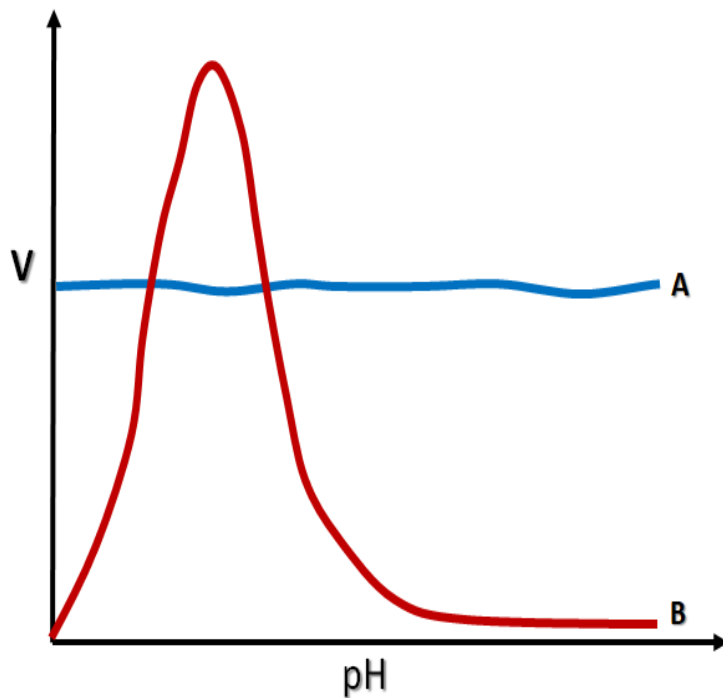
Velocidade da atividade enzimática versus temperatura.



Grupo C- Questões a resolver

1. Por que o uso da invertase assim como sua aplicação de forma imobilizada reduziria custos na produção do refrigerante?
2. Que fatores deveríamos avaliar nas enzimas candidatas em relação a suas propriedades para o uso?
3. Como verificaríamos a atividade de uma invertase? Ou de forma geral de qualquer enzima que quisermos avaliar?
4. Duas enzimas invertases, A e B, pertencentes a diferentes microrganismos são candidatas a utilização no processo industrial de produção de refrigerantes (veja gráfico a seguir). O grupo deve elencar vantagens e desvantagens para usar cada uma delas. Prepare para compartilhar com a turma.

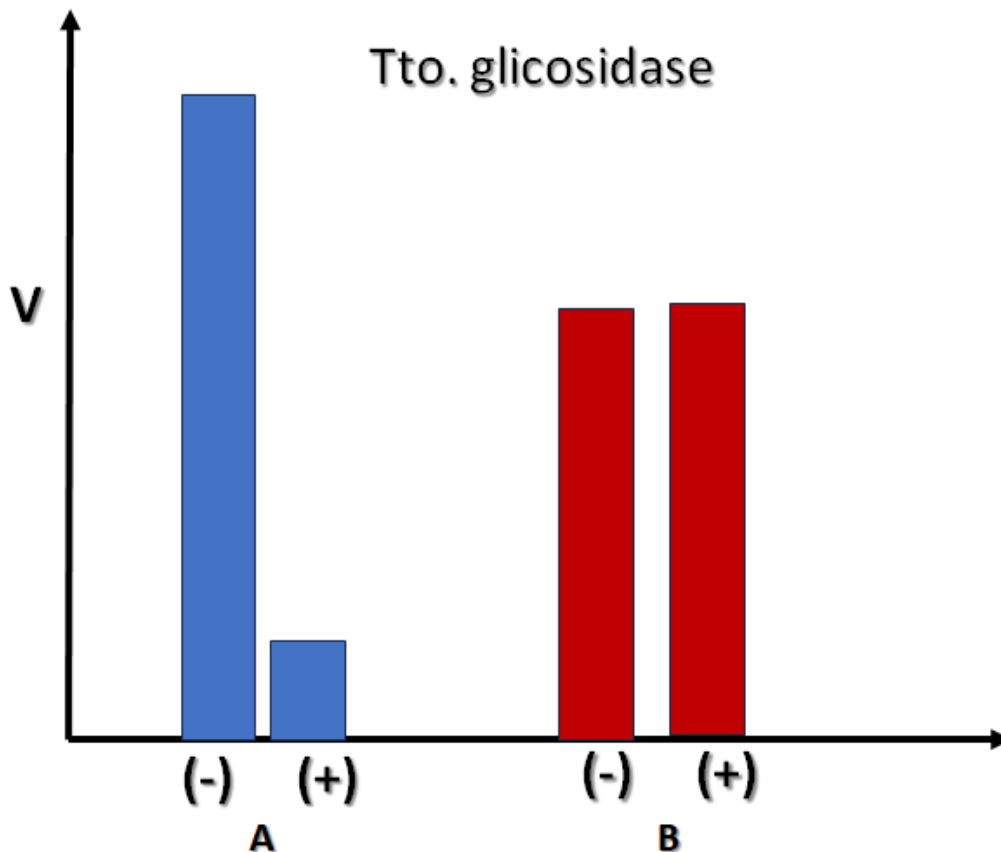
Velocidade da atividade enzimática versus pH.



Grupo D- Questões a resolver

1. Por que o uso da invertase assim como sua aplicação de forma imobilizada reduziria custos na produção do refrigerante?
2. Que fatores deveríamos avaliar nas enzimas candidatas em relação a suas propriedades para o uso?
3. Como verificaríamos a atividade de uma invertase? Ou de forma geral de qualquer enzima que quisermos avaliar?
4. Duas enzimas invertases, A e B, pertencentes a diferentes microrganismos são candidatas a utilização no processo industrial de produção de refrigerantes (veja gráfico a seguir). O grupo deve elencar vantagens e desvantagens para usar cada uma delas. Prepare para compartilhar com a turma.

Velocidade da atividade enzimática após o tratamento com glicosidase.



Grupo E- Questões a resolver

1. Por que o uso da invertase assim como sua aplicação de forma imobilizada reduziria custos na produção do refrigerante?
2. Que fatores deveríamos avaliar nas enzimas candidatas em relação a suas propriedades para o uso?
3. Como verificaríamos a atividade de uma invertase? Ou de forma geral de qualquer enzima que quisermos avaliar?
4. Duas enzimas invertases, A e B, pertencentes a diferentes microrganismos são candidatas a utilização no processo industrial de produção de refrigerantes (veja figura a seguir). O grupo deve elencar vantagens e desvantagens para usar cada uma delas. Prepare para compartilhar com a turma.

Imagem do resultado de um gel de eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) sem e com tratamento com agente desnaturante.

