

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

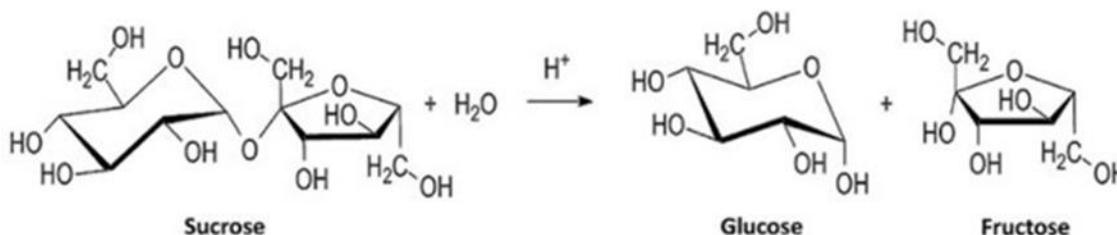


Fig. Mecanismo de ação da invertase

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 íons Co e de EDTA remove esse efeito deletério. Assim, a variação da atividade da enzima na presença de vários íons revela que esta é uma metaloenzima.

Problema

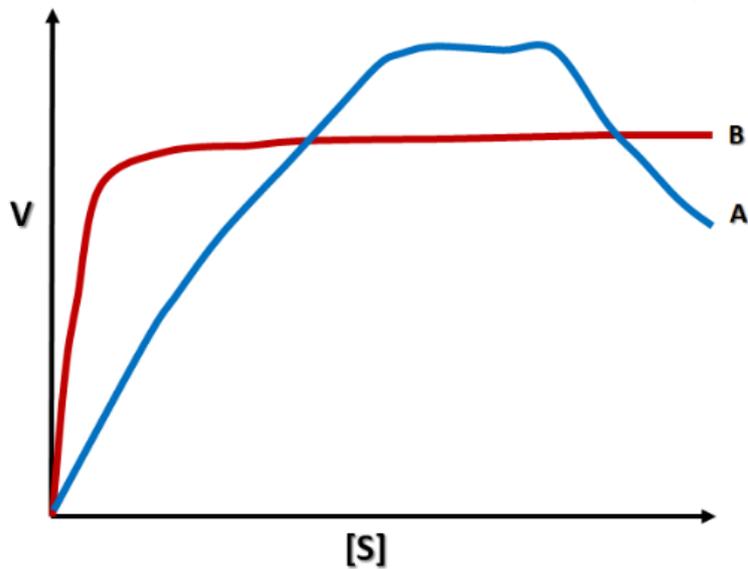
Uma indústria de refrigerantes procura diminuir custos de produção e aumentar a palatabilidade do seu produto. Para tal pretende selecionar uma invertase adequada com boas propriedades catalíticas que possa ser expressa em um hospedeiro recombinante e que possa ser imobilizada em coluna para assim exercer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

Lembremos que os 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 para 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.

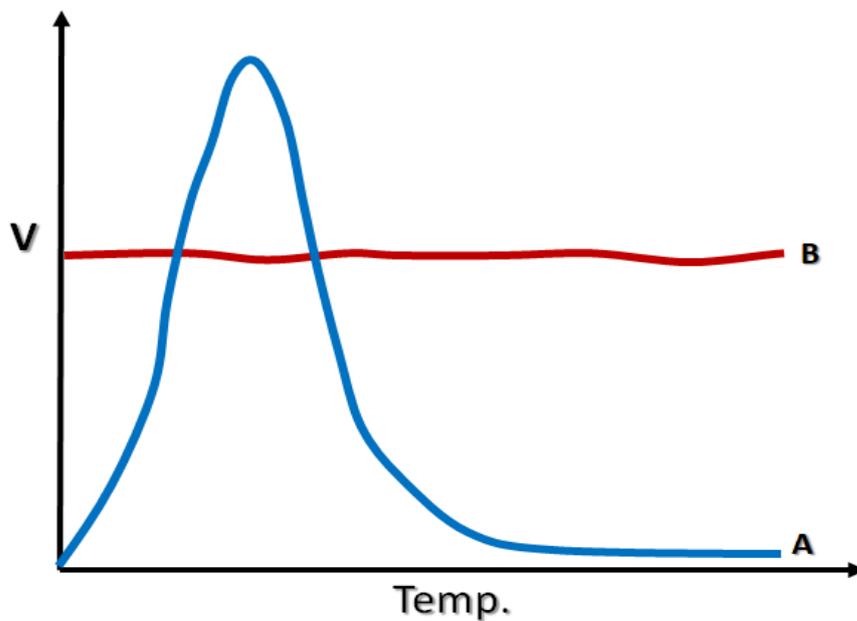
Velocidade da atividade enzimática versus concentração de substrato.



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.

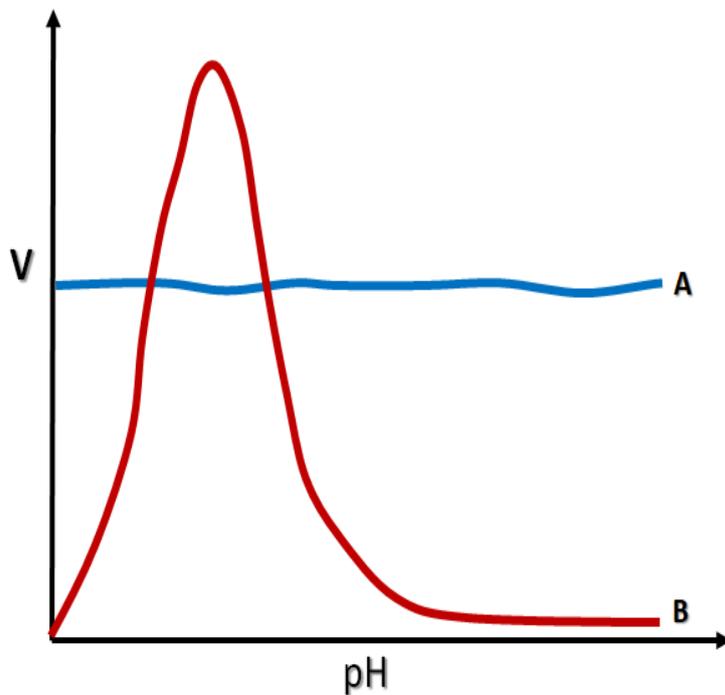
Velocidade da atividade enzimática versus temperatura.



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.

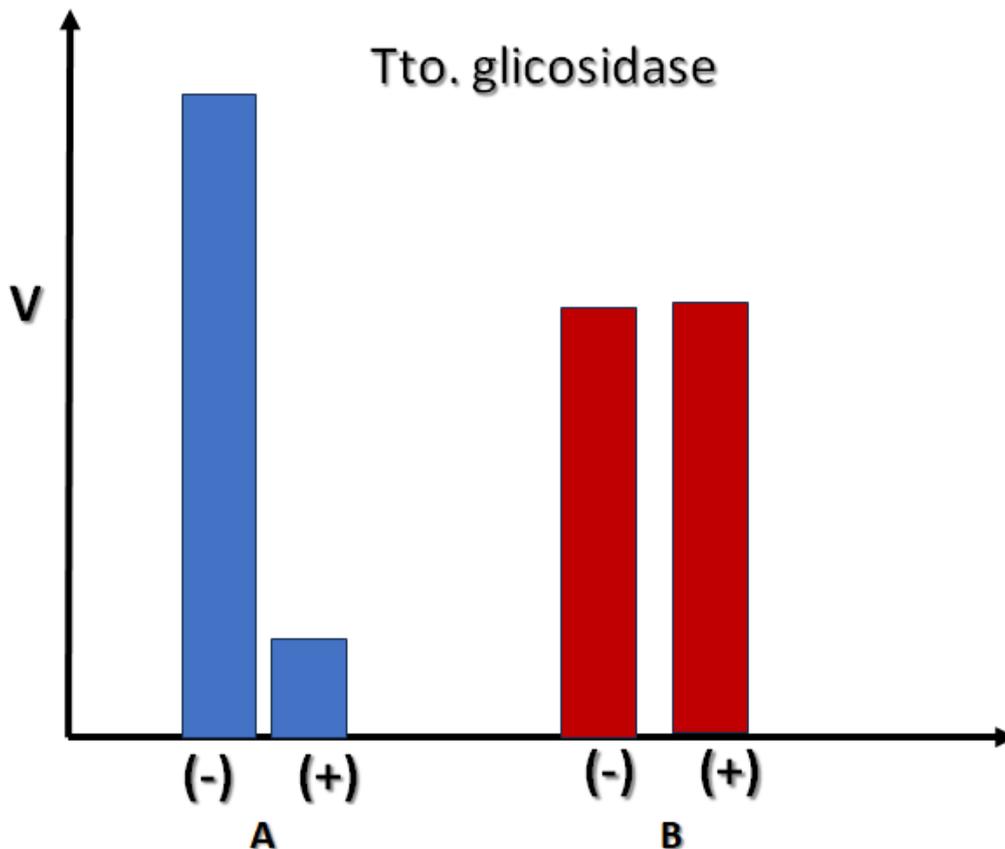
Velocidade da atividade enzimática versus pH.



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.

