

## BLOCO 1 – ATIVIDADE 5

### 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-glicose e uma unidade de beta-D-frutose sequencialmente ligados como gal ( $\alpha$ 1-6) gal ( $\alpha$ 1-6) glucose ( $\alpha$ 1---2 $\beta$ ) frutose

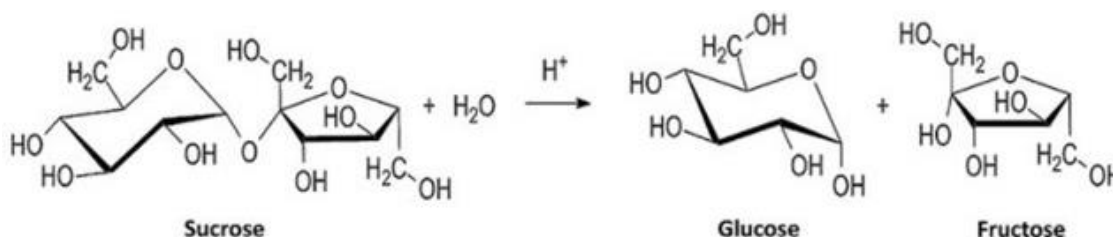


Fig. Mecanismo de ação da invertase

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 **Joke<sup>Diel</sup>**. 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<sub>2</sub>, 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<sub>2</sub> dentro da embalagem para aumentar a pressão interna e conservar a bebida.

### 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 poderíamos verificar se a enzima candidata cumpre com os requisitos necessários?
4. Como verificaríamos a atividade de uma invertase? Ou de forma geral de qualquer enzima que quisermos avaliar?

### Atividade Experimental

Usar o protocolo descrito no arquivo ("**5 - protocolo prática invertase.**"), com as adaptações apontadas pelo professor

### Apresentação e discussão de resultados

Os grupos apresentarão e discutirão os resultados obtidos; sua confiabilidade; seus limites; e suas possíveis interpretações.

Podemos ainda aprofundar em outras questões relacionadas neste caso à produção da enzima por exemplo:

- a. Qual é a natureza estrutural da enzima? É um monômero, dímero, tetrâmero?
  - b. Ela contém carboidratos (resíduos glicosilados) na sua estrutura?
  - c. A atividade da enzima acontece em qualquer dos seus arranjos estruturais?
  - d. Indagaremos os alunos sobre a importância dessas questões para fazer a produção da enzima recombinante.
5. Como poderíamos responder experimentalmente cada uma dessas questões?

Referências <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818119319188>

<https://super.abril.com.br/mundo-estranho/como-se-coloca-o-gas-nos-refrigerantes/>