

AValiação DE PROTEÍNA DE SOJA COMO AGENTE ESPAÇADOR NA PRODUÇÃO CLEAS DE INVERTASE

M. B. BELTRAME¹, A. C. O. MAFRA¹, M. P. A. RIBEIRO^{1,2}, A. C. BADINO^{1,2} e P. W. TARDIOLI^{1,2}

¹ Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Rodovia Washington Luiz, km 235, 13565-905, São Carlos, SP, Brasil

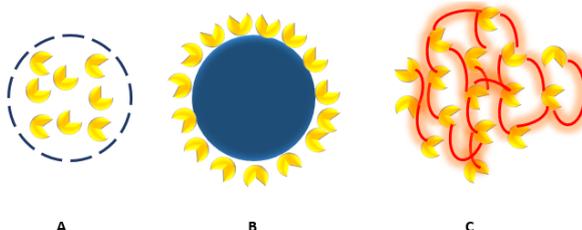
² Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química, Rodovia Washington Luiz, km 235, 13565-905, São Carlos, SP, Brasil
E-mail para contato: pwtardioli@ufscar.br

RESUMO – A enzima invertase (INV, EC 3.2.1.26) é capaz de inverter a sacarose em frutose e glicose, produtos de interesse para as indústrias alimentícia e farmacêutica. Neste trabalho, estudou-se a imobilização da invertase de *S. cerevisiae* utilizando a técnica de auto-agregação/intercruzamento (CLEAs), avaliando três agentes precipitantes (terc-butanol, dimetoxietano e sulfato de amônia), duas cargas enzimáticas e duas quantidades de agente espaçador (proteína de soja), variando a concentração de agente intercruzante (glutaraldeído). Os melhores derivados apresentaram rendimento de imobilização da ordem de 65%, utilizando *terc*-butanol e dimetoxietano como agentes precipitantes.

1. INTRODUÇÃO

A maioria das enzimas é solúvel em água e estão presentes em baixa concentração no meio reacional, tornando-se assim difíceis de serem recuperadas e reutilizadas (Dutta, 2008). Uma alternativa para contornar esse problema é o uso de enzimas imobilizadas. A imobilização enzimática consiste na restrição da proteína em uma região definida, quer seja na superfície ou no interior do agente imobilizador (Tampion e Tampion, 1988). Há três principais métodos para imobilizar enzimas: aprisionamento em matrizes porosas, ligação a superfícies e auto-agregação, como mostra a Figura 1 (Gerbsch e Bucholz, 1995).

Figura 1 – Métodos de imobilização enzimática: (A) aprisionamento em matrizes, (B) ligações a superfícies e (C) auto-agregação.

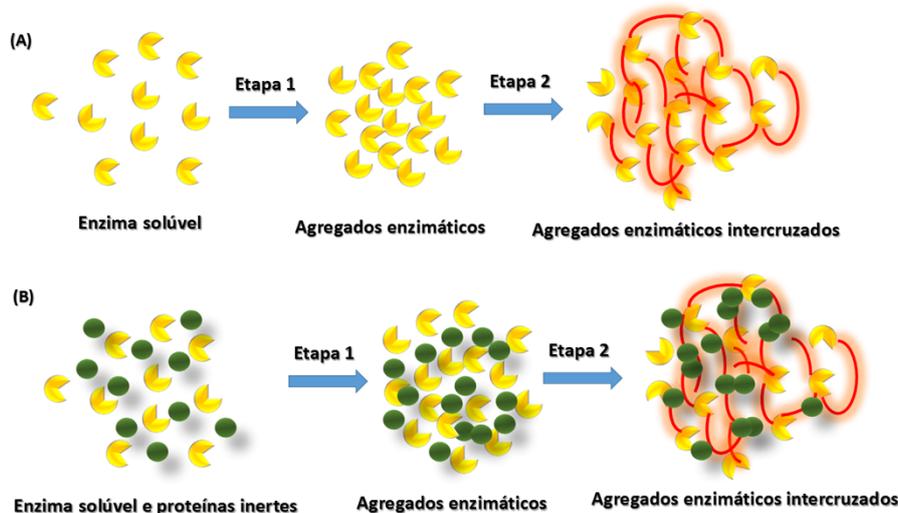


A principal vantagem da imobilização de enzimas é a sua reutilização em vários ciclos reacionais, pois a enzima pode ser facilmente separada do meio reacional através de filtração ou centrifugação (Dutta, 2008). Além disso, enzimas imobilizadas podem apresentar maior

estabilidade operacional, sendo menos sensíveis a variações de pH e temperatura durante o processo. Esses fatores podem contribuir para a redução de custos do processo, tornando esses biocatalisadores atrativos do ponto de vista industrial.

Na imobilização por auto-agregação/reticulação ou mais conhecida como CLEAs (do inglês Cross Linked Enzyme Aggregates) não há a necessidade do uso de suporte de imobilização, pois esse método envolve a agregação e precipitação das enzimas de maneira natural ou artificialmente induzida (Groboillot et al.,1994). Para isso, as enzimas são precipitadas promovidas por um agente precipitante e em seguida ocorre o inter cruzamento utilizando um agente bifuncional (por ex. glutaraldeído ou aldeído dextrana) (Cao et al.,2000), como mostra a Figura 2. O glutaraldeído é frequentemente utilizado como agente inter cruzante por ter baixo custo e alta reatividade na formação de bases de Schiff (-C=N-, reação entre os terminais aldeído do glutaraldeído e ϵ -amino de lisinas da proteína). A concentração do agente inter cruzante é sempre um parâmetro a ser otimizado, pois em excesso pode causar a inativação da enzima e em baixa concentração pode promover um baixo inter cruzamento (Sheldon et al., 2007b).

Figura 2 – Representação da preparação dos CLEAs (A) e Combi-CLEAs com proteínas inertes (B). Na primeira etapa, a enzima solúvel (e a proteína inerte, no caso B) é agregada por ação do agente precipitante. Na segunda etapa, ocorre o inter cruzamento pela adição do agente inter cruzante no meio reacional.



A invertase (beta-fructofuranosidase, EC 3.2.1.26) é uma hidrolase que catalisa a hidrólise da sacarose, formando quantidades equimolares de glicose e frutose. Essa enzima está presente em invertebrados, vertebrados, algas verdes, bactérias, vegetais e fungos, mas principalmente é encontrada na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Bobbio e Bobbio, 1985). Vitolo e colaboradores (1999) e Tanriseven & Dogna (2001) imobilizaram invertase de *S. cerevisiae* em matrizes porosas de alginato de cálcio e obtiveram 60% e 87% de rendimento na imobilização, respectivamente. Sugunan & Sanjay (2005) imobilizaram invertase de *S. cerevisiae* em resina montmorillonite K-10 por adsorção e ligação covalente, obtendo 29% e 36% de atividade recuperada respectivamente. Entretanto, ambos biocatalisadores apresentaram limitação difusional interna à transferência de massa. Hsieh e colaboradores (2000) obtiveram biocatalisadores com 91% de recuperação de atividade para a invertase de *S. cerevisiae* imobilizada em quitosana. Talekar e colaboradores (2012) propuseram a

imobilização de invertase de *S. cerevisiae* por CLEAs na presença de amido como agente porogênico, o qual é eluído do biocatalisador por hidrólise com alfa-amilase solúvel e sucessivas lavagens. O uso do amido foi proposto pois CLEAs de invertase sem agente porogênico apresentaram severa limitação difusional à transferência de massa. Os biocatalisadores preparados com o agente porogênico apresentaram 100% de atividade recuperada e sem limitações difusionais internas à transferência de massa. Entretanto, ainda não foram reportadas imobilizações de invertase por agregação/reticulação na presença de proteínas espaçadoras inertes, as quais são reticuladas juntamente com a enzima de interesse, formando-se assim os Combi-CLEAs, conforme estão apresentados nas Figuras 2A-B. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da proteína de soja como agente espaçador em CLEAs de invertase, preparados usando três agentes precipitantes (terc-butanol, dimetoxietano e sulfato de amônia saturado) e duas concentrações de agente inter cruzante (glutaraldeído).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Invertase (INV, EC 3.2.1.26) de *Saccharomyces cerevisiae* (doação da LNF -Latino Americana[®]). Proteína concentrada de soja – SOY (Casa dos Cereais[®], 90%), glutaraldeído (solução 25% m/v, Vetec[®]), terc-butanol (Vetec[®]), sulfato de amônia (Synth[®]) e dimetoxietano (Huka[®]). Açúcar cristal (Caravelas[®]) foi obtido em comércio local. Os demais reagentes empregados eram de grau analítico.

2.2. Métodos

Medida de atividade enzimática: A atividade enzimática da invertase foi quantificada a 30°C pelo método das velocidades iniciais, acompanhando-se a formação de açúcares redutores totais (ART) a partir de uma solução de sacarose 200 mM, pH 4,8 (tampão acetato de sódio 25mM). ART foram quantificados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico – DNS (Miller, 1959).

Medida de proteína: A concentração de proteína da enzima invertase foi determinada pelo método de Follin-Ciocalteu-Lowry (Lowry et al., 1951). A concentração de proteína foi quantificada espectrofotometricamente a 750nm usando como padrão proteína de soro bovina (BSA).

Preparação dos CLEAs de invertase: O protocolo geral de imobilização por CLEAs consiste na precipitação de proteínas (invertase e proteína de soja) contidas em 1 mL de solução enzimática preparada em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0, promovida pela adição de 1 mL de agente precipitante (dimetoxietano - DME, terc-butanol - TBA ou sulfato de amônio - SA). Sequencialmente, adiciona-se o glutaraldeído (GLU), mantendo a suspensão agitada por 3 h a 4°C e 200 rpm. Após este período de tempo, os CLEAs de invertase foram lavados com tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0) e resuspenso em 2 mL do mesmo tampão para medidas de atividade enzimática. Todas as imobilizações foram realizadas seguindo o planejamento descrito na Tabela 1, tendo-se como variável resposta o rendimento global de imobilização (RI) percentual, calculada pela Eq. 1.

$$RI(\%) = \frac{A_f \times 100}{A_i} \times f \quad (1)$$

Onde A_f é a atividade enzimática dos CLEAs de invertase, A_i é a atividade enzimática oferecida para imobilização e f é o fator de diluição do CLEAs (igual a 2).

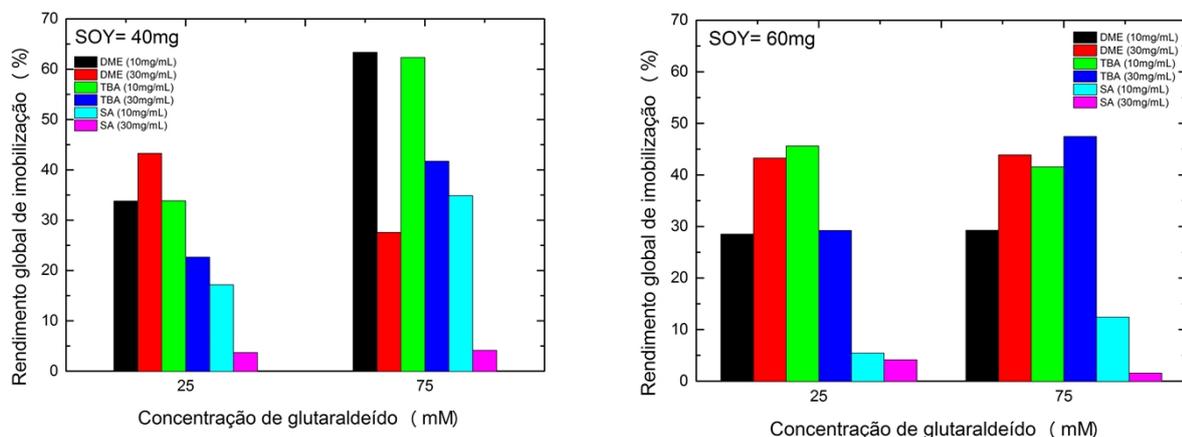
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os rendimentos obtidos na preparação de CLEAs de invertase (10 e 30 mg/mL) usando proteína de soja (SOY) como agente espaçador (40 e 60 mg/mL) em função da concentração de glutaraldeído (25 e 75 mM) são mostrados na Figura 3. Nesses ensaios foram utilizados três agentes intercruzantes, dimetoxietano (DME), terc-butanol (TBA) e sulfato de amônio (AS).

Tabela 1 - Planejamento de experimentos de imobilização da invertase de *Saccharomyces cerevisiae* usando a técnica de CLEAs.

Exp.	[GLU] mM	INV (mg _{prot} /mL)	SOY (mg _{prot} /mL)	Precipitante
1	25	10	40	DME
2	75	10	40	
3	25	30	40	
4	75	30	40	
5	25	10	60	
6	75	10	60	
7	25	30	60	
8	75	30	60	
9	25	10	40	TBA
10	75	10	40	
11	25	30	40	
12	75	30	40	
13	25	10	60	
14	75	10	60	
15	25	30	60	
16	75	30	60	
17	25	10	40	AS
18	75	10	40	
19	25	30	40	
20	75	30	40	
21	25	10	60	
22	75	10	60	
23	25	30	60	
24	75	30	60	

Figura 3 - Rendimento global de imobilização variando em função da concentração de glutaraldeído (25 e 75 mM) e da concentração de enzima (10 e 30 mg/mL) para 40 mg/ml (a) e 60 mg/mL (b) de proteína de soja na solução inicial de imobilização.



Observa-se na Figura 3 que os parâmetros que renderam CLEAs de invertase mais ativos (aproximadamente 65% de rendimento global) foram concentração de agente espaçador (SOY) de 40 mg/mL e concentração de glutaraldeído de 75 mM, usando como agente precipitante dimetoxietano e *tert*-butanol na concentração enzimática de 10 mg/mL. Provavelmente, com 25 mM de glutaraldeído e 40 mg/mL de SOY o intercruzamento foi ineficaz, podendo ter ocorrido eluição de enzima dos CLEAs. O mesmo comportamento pode ser supostamente atribuído na preparação de CLEAs usando 60 mg/mL de SOY. Neste caso, ambas concentrações de glutaraldeído foram insuficientes para um intercruzamento eficaz, podendo ter ocorrido perda de enzima durante a etapa de lavagem do CLEA. Entretanto, esse é um estudo preliminar e essas variáveis serão ainda investigadas.

4. CONCLUSÕES

A proposta de utilização de uma proteína inerte como agente espaçador mostrou-se promissora, pois em um estudo preliminar obtiveram-se biocatalisadores com aproximadamente 65% de rendimento global. Esses biocatalisadores, em condições otimizadas, podem ser mais vantajosas que aqueles preparados com um agente porogênico (por exemplo, amido como reportado por Talekar e colaboradores, 2012), pois esses requerem uma etapa adicional de processo que é a hidrólise do amido com uma alfa-amilase. Isso pode acarretar em aumento do custo final do biocatalisador.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao PPGEQ/UFSCar, CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo nº 2014/21510-0. Os autores também agradecem a LNF Latino Americana® pela doação da enzima invertase de *Saccharomyces cerevisiae* (Novozymes®).

6. REFERÊNCIAS

- BOBBIO, F. O. e BOBBIO, P. A. *Introdução a química de alimentos*. Campinas: Fundação Cargill, 1985.
- CAO, L., VAN RANTWIJK, F., SHELDON, R. Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase. *Org. Lett.*, v. 2, p. 1361-1364, 2000.
- DUTTA, R. *Fundamentals of Biochemical Engineering*. Springer, India, 2008.
- GERBSCH, N.; BOCHHOLZ, R. New process and actual trends in biotechnology. *FEMS Microbiology Reviews*, v.16, p,259-269,1995.
- GROBOILLOT, A.; BOADI, D. K.; PONCELET, D.; NEUFELD, R.J. Immobilization of cells for application in the food industry. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.14, p.75-107,1994.
- HSIEH, H. J.; LIU, P. C.; LIAO, W. J. Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability. *Biotechnology Letters*, v.22, n.18, p. 1459–64, 2000.
- SUGUNAN, S.; SANJAY, G. Invertase immobilized on montmorillonite: reusability enhancement and reduction in leaching. *Catalysis Communications*, v. 6, n.1, p.81-86, 2005.
- SHELDON, R. A.; SORGEDRAGER, M.; JANSSEN, M. H. A. Use of Cross-linked Enzyme aggregates (CLEAs) for performing biotransformations. *Chemistry Today*, v.1, n.25, p.48-52, 2007b.
- TALEKAR, S.; SHAH, V.; PATIL, S.; NIMBALKAR, M. Porous cross linked enzyme aggregates (p-CLEAs) of *Saccharomyces cerevisiae* invertase. *Catalysis Science Technology*, v. 2, n.8, p.1575–1579, 2012.
- TAMPION, J.;TAMPION, M. D. *Immobilized cells: principles and applications*. Cambridge University Press. 257p.,1988.
- TANRISEVEN, A.; DOGAN, S. Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochemistry*, v. 36, n.11, p. 1081–1083, 2001.
- VITOLO, M.; ARRUDA, L. M. O. Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v.81, n.1, p. 23-33, 1999.