

EFEITO DA PRESSÃO OSMÓTICA NA EXTRAÇÃO DA INVERTASE DE LEVEDURA EM PURÊ DE PÊSSEGO

MARCELA VEGA FERREIRA¹; CLOÉ SCHIAVON PICH²; ALINE ROSSLER³;
RICARDO PERAÇA TORALLES⁴; WALTER RUIZ⁵; CÉSAR ROMBALDI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – marchii20@yahoo.es

²Instituto Federal Sul-rio-grandense campus Pelotas – cloespich@gmail.com

³Instituto Federal Sul-rio-grandense campus Pelotas – alinerossler@yahoo.com.br

⁴Instituto Federal Sul-rio-grandense campus Pelotas – toralles@pelotas.ifsul.edu.br

⁵Universidade Federal do Rio Grande – dqmw@furg.edu.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – cesarvrf@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Já foram identificados mais de 160 tipos de microrganismos em diferentes etapas do processamento de polpa de pêssego, destacando-se as espécies *Bacillus badius*, *Penicillium sp.* e *Saccharomyces cerevisiae* (LOPES et al., 2014).

A invertase ou β -D-frutofuranosidase é a principal enzima utilizada na indústria alimentícia para a hidrólise da sacarose. (MARQUEZ, 2007). Pode ser encontrada em leveduras, sobretudo na espécie *Sacharomyces cerevisiae*, invertebrados, vertebrados, algas verdes, bactérias, vegetais e fungos (NOVAKI, 2009).

Um método de obtenção da invertase é através da fermentação em estado sólido da levedura. Ao final da fermentação, a enzima não se encontra homogeneamente distribuída no fermentado, necessitando, portanto de um processo de extração. O processo de extração, também denominado autólise, consiste na ruptura da parede celular por osmose e consequente liberação da invertase externa, que é encontrada na parede celular da levedura, ou entre está e a membrana citoplasmática. Por outro lado, a invertase interna é localizada nos vacúolos e de difícil acesso (MANAZZU et al., 1998)

Neste processo, vários fatores são importantes e interferem na eficiência da extração, que é mensurada pela atividade enzimática em termos de comprimento de onda absorvidos. Entre os vários fatores destacam-se a influência da temperatura, da agitação, da pressão osmótica, do agente autolisante, da concentração de substrato, entre outros (VITOLLO, 1979, ILLANES, 1985).

O objetivo desse trabalho foi estudar o efeito da pressão osmótica na extração de invertase de levedura de pêssego.

2. METODOLOGIA

Os microrganismos usados nesta investigação foram isolados do purê de pêssego a 22 °C da cultivar Jubileu e contados conforme Siqueira (1995). A contagem inicial, 22×10^2 UFC. mL⁻¹, foi feita após 5 dias de incubação a 25°C em BDA.

As culturas de leveduras foram cultivadas em frascos Erlenmeyer em 1000 mL de meio a 150 rpm, a 30 °C, pH 5 por 24 horas. O meio continha 20 g.L⁻¹ de cultura estoque em BDA, 20 g.L⁻¹ de glicose, (NH₄)₂SO₄ 1 g.L⁻¹; KH₂PO₄ 2 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 0,5 g.L⁻¹; FeSO₄ 0,5 g.L⁻¹ e peptona 5 g.L⁻¹. Nesta suspensão, a contagem total final foi cerca de 10⁸ UFC.mL⁻¹. As culturas foram mantidas a 4 °C e reativadas a cada 30 dias.

Os extratos enzimáticos foram obtidos usando o método de extração com NaHCO_3 , conhecido como autólise. Para cada 100g de extrato, são utilizados 300mL de solução de NaHCO_3 em diferentes concentrações a 40 °C.

A pressão osmótica foi calculada segundo a equação:

$$p = (n/V)RTi$$

onde p é a pressão osmótica (atm), C é a concentração molar do sal, R é a constante universal dos gases ($0,082 \text{ atm.L.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$), T é a temperatura (K) e i é o fator de Van't Hoff.

A atividade enzimática da invertase foi determinada por estimativa colorimétrica da glicose usando 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e sacarose como substrato. A hidrólise foi conduzida 25 °C e pH de 5 como definido por Toralles et al. (2014). A concentração final de sacarose no meio reacional foi de 300 mM. Todas medidas foram conduzidas em triplicatas. No branco, foi utilizado água deionizada no lugar do substrato. A transmitância resultante dessa reação foi medida a 490nm, utilizando um espectrofotômetro Varian UV/VIS. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que causa o incremento de $1\mu\text{g}$ de glicose. min^{-1} . Também se realizou a análise para quantificação de proteína pelo método Lowry.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações de glicose foram determinadas a partir da Figura 1 — curva padrão da glicose usando DNS. A constante de proporcionalidade (A) entre a absorbância e a concentração de glicose e coeficiente linear da reta (B) foram calculadas por regressão linear. Os valores de A e B foram ambos significativos ($p \leq 0,01$) sendo, respectivamente, A igual 1,57 e B igual a - 0,15. Os Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) iguais a $181,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $356,2 \text{ mg.mL}^{-1}$.

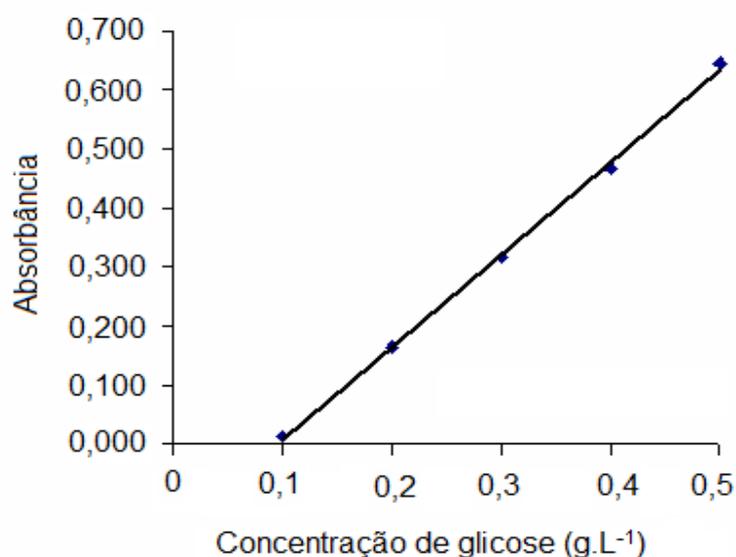


Figura 1. Curva padrão de glicose (g.L⁻¹)

Na tabela 1 tem-se os resultados do efeito da pressão osmótica na extração da invertase de purê de pêssego. Para suspensão e o sobrenadante, os teores de glicose (mg.mL^{-1}) ficaram acima do LQ. Por outro lado, para os precipitados tratados com bicarbonato, os valores encontrados foram menores.

Quanto a atividade enzimática, a suspensão ($195,1 \text{ U.mL}^{-1}$), foi significativamente superior as demais ($p \leq 0,05$), seguido da amostra de sobrenadante ($63,25 \text{ U.mL}^{-1}$), em ambas, a invertase foi secretada pela levedura, pois não sofreram extração por autólise.

Dos extratos que foram submetidos a autólise com bicarbonato de sódio, a amostra com uma pressão osmótica de 10,27 atmosferas foi que apresentou maior atividade com teor de proteína de $918 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Segundo Vitolo (1979), trabalhando com invertase de levedura de pão, encontrou maior atividade para invertase em 8 atm com $1,30 \text{ mg AR.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e $3,09 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Tabela 1: Efeito da pressão osmótica na extração da invertase de levedura de purê de pêssego

Amostra	Tratamento com NaHCO_3 (mol.L^{-1})	Pressão osmótica (atm)	Concentração de glicose (mg.mL^{-1})	Atividade enzimática (U.mL^{-1})	Proteína ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Suspensão	0	-	1951	195,1 a	-
Sobrenadante	0	-	632,5	63,25 b	678
Precipitado	0,10	5,13	254,1	25,41 c	1081
Precipitado	0,20	10,27	292,4	29,24 d	918
Precipitado	0,30	15,40	204,5	20,45 e	837

*Valores médios com diferentes letras são significativos a $p \leq 0,05$.

Neste trabalho testamos apenas a pressão osmótica em termos de um único agente autolisante. Os resultados superiores para atividade encontrados para as amostras de suspensão e sobrenadante indicam um grande potencial de obtenção de invertase no autolisado, bastando otimizar as condições de extração. Já estamos testando outros fatores para melhorar o rendimento da extração em termos de invertase do autolisado, tais como: temperatura e natureza do agente autolisante.

4. CONCLUSÕES

A pressão osmótica do agente autolisante influenciou significativamente na liberação da invertase de levedura de purê de pêssego, sendo que a melhor condição foi usando uma pressão osmótica de cerca de 10 atm que corresponde a um tratamento com bicarbonato de sódio na concentração $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$. O conhecido método colorimétrico para determinar a concentração de glicose usando DNS mostrou-se prático e preciso, para acompanhar a atividade de invertase extraída de levedura de purê de pêssego.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LOPES, A. M.; TORALLES, R. P.; ROMBALDI, C.V. Thermal inactivation of polyphenoloxidase and peroxidase in Jubileu clingstone peach and yeast isolated from its spoiled puree. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 34, n. 01, p. 150-156, 2014.

MARQUEZ, L. D. S. **Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resinas**. 2007. 137f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia.

NOVAKI, L. **Produção, purificação e caracterização parcial da invertase obtida por fermentação em estado sólido de soja com *Aspergillus caseiellus***. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

MANNAZZU, I; GUERRA, E ; STRABBIOLI, R ; PEDICONI, D ; FATICHENTI, F. The vanadate-tolerant yeast *Hansenula polymorpha* undergoes cellular reorganization during growth in, and recovery from, the presence of vanadate. **Microbiology**, England, Vol.144, n. 9, p. 2589-97, 1998.

VITOLO, M. **Extração de invertase solúvel a partir de levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*)**. 1979. Dissertação (Mestrado em Tecnologia das Fermentações) - Universidade de São Paulo.

ILLANES, A.; GORGOLLÓN, Y. Kinetics of extraction of invertase from autolysed bakers' yeast cells. **Enzyme Microbiology Technology**, Valparaiso, v. 08, p. 81-84, 1986.

TORALLES, R. P.; KUHN, C.R.; SÁ P.S.; RUIZ, W.A. Extração e caracterização de invertase de levedura de purê e resíduo de pêssego. **Revista Brasileira de tecnologia Agroidustrial**, Paraná, v.08, n. 2, p. 1399-1415, 2014.