

Imobilização de Invertase em Partículas de Quitosana

Joana Silva ALVES, Sheila Garziera VALERIO, Plinho Francisco HERTZ, Jeverson FRAZZON

Laboratório de Enzimologia – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ UFRGS

Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15090, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil



INTRODUÇÃO

A Invertase ou β -D-frutofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) tem como substrato prioritário a sacarose e devido à sua atividade hidrolítica é capaz de produzir uma mistura equimolar de açúcares redutores. Esta, também conhecida como açúcar invertido, é amplamente empregada na indústria alimentícia. Enzimas livres geralmente apresentam alto custo e instabilidade. Neste contexto, as técnicas de imobilização consistem em ferramentas importantes para a recuperação do biocatalisador e possível melhora de parâmetros enzimáticos, reduzindo esses custos. Quitosana é um polímero biocompatível, biodegradável e atóxico, sendo um suporte bastante indicado para a imobilização.

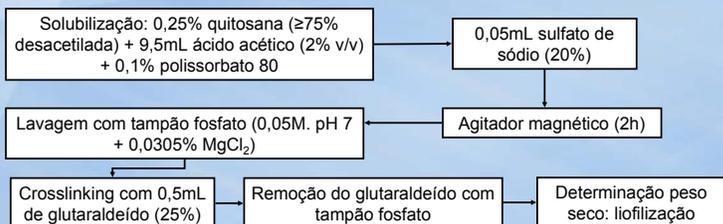
OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de imobilização covalente unipontual da invertase proveniente da *S. cerevisiae* (Maxinvert L 10000, batelada AG2379) em partículas de quitosana. Em testes posteriores foram avaliados a estabilidade operacional e térmica da enzima imobilizada.

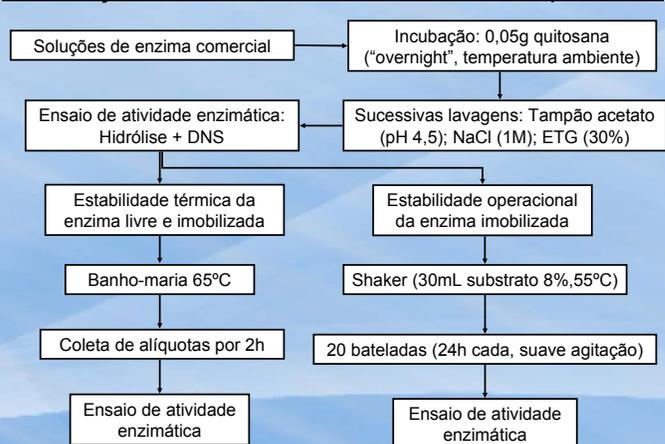
MATERIAIS E MÉTODOS

Produção do suporte

Método de gelificação ionotrópica (BERTHOLD et al. 1996) modificado.



Imobilização, estabilidade térmica e estabilidade operacional



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Imobilização

Tabela 1: Diferentes soluções enzimáticas e a capacidade do suporte

Amostra	Atividade da enzima livre (U ^a)	Atividade da enzima imobilizada (U)	Rendimento da imobilização ^b (%)	Eficiência da imobilização ^c (%)
1	25200	7836	96,88	32,12
2	12240	5040	86,52	47,59
3	7920	4119	89,47	58,13
4	6300	3690	88,95	65,85
5	3060	1920	90,01	69,64
6	1296	780	90,97	66,16
7	504	84	76	22

^a Uma unidade de atividade enzimática é capaz de produzir 1 μ mol de açúcares redutores.mL⁻¹.min⁻¹

^b U_{imobilizada teórico} / U_{ofertado}

^c U_{imobilizada real} / U_{imobilizada teórico}

Os resultados indicam altos rendimentos para a imobilização, entretanto a eficiência demonstra perfil inverso, já que quanto mais enzima foi oferecida ao suporte, menos atividade foi quantificada no mesmo pós-imobilização. Para a avaliação da estabilidade térmica foi escolhida a amostra 3 por apresentar valores intermediários de rendimento e eficiência. Para a estabilidade operacional foi escolhida a amostra 7, que apresenta valores reduzidos dos mesmos parâmetros, na tentativa de avaliar o perfil do biocatalisador mesmo em pequenas concentrações.

Estabilidade térmica

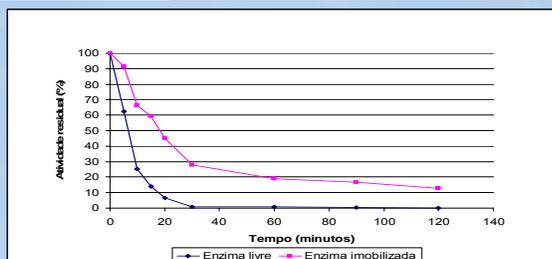


Figura 1. Estabilidade térmica (65°C)

Nos primeiros 30' a enzima livre perdeu totalmente sua atividade enquanto que para o mesmo tempo a enzima imobilizada manteve sua atividade em 30% e mesmo após o término das 2h apresentou atividade residual de 15%. O t_{1/2} da enzima imobilizada foi ligeiramente superior ao da enzima livre, possivelmente devido às ligações covalentes enzima-suporte promoverem proteção ao biocatalisador.

Estabilidade operacional

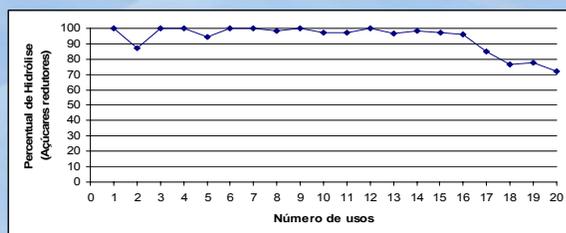


Figura 2. Percentual de hidrólise de sacarose 8% via enzima imobilizada durante 20 ciclos (24h cada) a 55°C

A atividade manteve-se próxima de 100% até o 16º reuso. O posterior decaimento da atividade pode ser decorrente da diminuição da resistência mecânica do suporte.

CONCLUSÃO

As partículas de quitosana demonstraram ser um atraente suporte e seu protocolo foi de fácil execução. Os resultados de estabilidade térmica e operacional podem ser melhorados pelo uso da técnica de ligação covalente multipontual e pela redução do tempo da batelada, por exemplo. De modo global, a invertase imobilizada atingiu resultados interessantes, principalmente quanto à possibilidade de reutilização o que a torna mais atrativa para, após outros estudos, ser utilizada em escala industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Berthold, A.; Cremer, K.; Kreuter, J. (1996), Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for anti-inflammatory drugs. *Journal of Controlled Release*, v. 39, p. 17-25.
- Miller, G. L.; (1959), Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428
- Mateo, C.; Palomo, J. M.; Lorente, G. F.; Guisan, J. M.; Lafuente, R. F. (2007), Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, v.40, p. 1451-1463.