

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

INVÉRTASES SOLÚVEL E INSOLÚVEL:
SUAS PROPRIEDADES E CINÉTICA

Iacy dos Santos Draetta
Química

*Tese apresentada à Faculdade de Tecnologia
de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de
mestre em Ciência de Alimentos.*

Orientador: Dr. Yong K. Park
Professor da F.T.A. - UNICAMP

1973

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

CONTEÚDO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Propriedades da invertase	4
2.2. Obtenção de invertase	5
2.3. Especificidade	7
2.4. Mecanismo da reação	7
2.5. Determinações enzimicas	10
2.6. Inibidores	10
2.7. Cinética	13
2.8. Aplicação	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Invertase	20
3.2. Substrato	20
3.3. Obtenção de invertase solúvel e insolúvel	20
3.4. Determinação de atividade enzimica	20
3.5. Unidade de invertase	20
3.6. Efeito da autólise	21
3.7. Cinética: efeito da concentração do substrato	21
3.8. Efeito do pH	21
3.9. Efeito da temperatura	21
3.10. Ação de inibidores	21
3.11. Tempo de incubação	22
3.12. Inversão da sacarose pela invertase	23
4. RESULTADOS	24
4.1. Efeito da autólise	24
4.2. Concentração do substrato: cinética da reação	24
4.3. Efeito do pH	24
4.4. Efeito da temperatura	24
4.5. Ação de inibidores	24
4.6. Efeito do tempo de incubação	32
4.7. Inversão da sacarose	32
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÕES	38
7. LITERATURA CONSULTADA	39
8. AGRADECIMENTOS	44

RESUMO

Invértase (β -d-fructofuranosido-fructosídase E.C.3.2.1.26) foi obtida por autólise prolongada de leveduras, em presença de acetato de etila. Obtêm-se, dessa maneira, duas formas de invértases — solúvel e insolúvel — as quais foram separadas por centrifugação a 1.200 g.

A cinética da hidrólise enzimica de sacarose pela invértase tem sido estudada com ênfase, principalmente em altas concentrações de substratos. A velocidade da reação foi determinada pela produção de açúcares redutores diretamente em função do tempo. Os dados revelam que a velocidade de hidrólise de soluções de sacarose pela invértase diminui quando as concentrações de substrato aumentam.

Os efeitos do pH, da temperatura e da ação de inibidores foram experimentalmente estudados, com os respectivos resultados incorporados, sempre que possível, em equações cinéticas.

A relação entre a velocidade de inversão e a concentração de sacarose, para aplicação comercial de preparações de açúcar invertido, também foi um dos propósitos deste trabalho.

ABSTRACT

Invertase (β -d-fructofuranoside-fructohydrolase, E.C.3.2.1.26) was obtained by extensive autolysis of baker's yeast in the presence of ethyl acetate. Two forms of the enzyme were obtained by centrifugation at 1200 g.

The kinetics of the enzymatic hydrolysis of sucrose by invertase has been examined, with emphasis on high substrate concentration. Initial rate of reaction was determined by the production of reducing sugar, directly, as function of time. The data shows that the rate of hydrolysis by invertase of sucrose solutions decrease as the substrate concentrate increase.

The effect of pH, temperature and inhibitors were experimentally studied and the results incorporated into kinetics equations.

The relation between the rate of invertase and the sugar concentration for the commercial application of inverted sugar preparations, was one of the objectives of our paper.

1. INTRODUÇÃO

A invertase já é conhecida desde longa data e muitas investigações de importância fundamental para o desenvolvimento da enzimologia têm sido realizadas com a ajuda desse enzima.

Na indústria de alimentos, ele é muito utilizado, principalmente porque a hidrólise enzimica de soluções concentradas de sacarose dá origem a xaropes mais solúveis e, conseqüentemente, mais difíceis de se cristalizarem. A aplicação de invertase na indústria de bombons tem por base essa propriedade.

Esse enzima tem sido produzido industrialmente a partir de *Saccharomyces cerevisiae* ou *Saccharomyces carlsbergensis*. O enzima que predomina na preparação é um fructosídase (β -d-fructofuranosido-fructosídase, E.C.3.2.1.26).

Existem duas formas de invertase comercial isoladas de células, a solúvel e a insolúvel, sendo que somente as propriedades da invertase purificada foram estudadas anteriormente. A ação catalisadora e cinética da forma insolúvel não é muito conhecida.

Neste trabalho, procurou-se isolar as duas formas de invertase e estudar as suas propriedades, a ação cinética da invertase imobilizada natural e a inversão da sacarose pelas formas solúvel e insolúvel do enzima.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Propriedades da invertase

Desde 1860, a invertase vem sendo estudada por diversos pesquisadores, cujos trabalhos têm contribuído grandemente para o desenvolvimento da enzimologia. A invertase foi um dos enzimas empregados por Sorensen em 1909 (66), na determinação da concentração do íon hidrogênio e a relação entre a atividade enzimática e o pH do meio reativo. Michaelis e Menten (44), em suas pesquisas sobre a atividade de invertase de levedura e sua dependência da concentração de substrato, foram os primeiros a tratar da interação entre enzima e substrato de acordo com os conceitos modernos de equilíbrio químico.

A invertase (β -D-fructofuranosídeo-fructosídase, E.C.3.2.1.26), também conhecida como sacarase ou sacarase, catalisa a hidrólise de sacarose da cana-de-açúcar em glicose e frutose. A mistura resultante destes dois monossacarídeos apresenta um sabor mais acentuado que o da sacarose e é conhecida como açúcar invertido. A presença deste enzima tem sido observada em leveduras, fungos, bactérias e em outros microrganismos capazes de formar esporos, bem como em plantas, invertebrados e mesmo animais (52). Na obtenção deste enzima costuma-se empregar entre outros fungos, o *Aspergillus oryzae*, *A. niger* e *A. verrucaria* e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* ou *S. carlsbergensis*. Somente o enzima obtido de leveduras é importante para a produção industrial de invertase. Este enzima é predominantemente uma fructosídase (61).

O substrato típico de ação da invertase, a sacarose, sendo ao mesmo tempo um β -fructofuranosídeo e um α -glicosídeo, pode ser hidrolisado por dois tipos diferentes de enzimas: β -fructofuranosídase (β -fructosídase) e certas α -glicosídases (glicosídeo-invertase), que atacam a molécula de sacarose nos terminais da frutose e glicose, respectivamente (61). A caracterização dos dois tipos foi baseada originalmente na habilidade do enzima hidrolisar, além de sacarose, a rafinose ou melezitose (28, 29, 37). Rafinose, possuindo um resíduo β -fructofuranosil insubstituível, é hidrolisado pela β -fructofuranosídase. Glicosídeo-invertase não ataca este açúcar, mas hidrolisa a melezitose.

A primeira explanação teórica sobre a curva de atividade-pH da invertase de levedura foi proposta por Hudson em 1910 (26). Segundo ele,

essa curva se deve à formação de "complexos" entre o enzima e o ácido ou a base do meio reativo. A interpretação de Hudson foi ampliada por Michaelis e Davidsohn (43), que demonstraram ser essa curva semelhante àquela de dissociação de um anfólito, cuja parte alcalina pode ser explicada como sendo a dissociação de um ácido fraco, com um pK_a em torno de 7. Kuhn (36) demonstrou, posteriormente, que essa parte da curva não depende da concentração do substrato, isto é, o grupo "ácido" do enzima não está envolvido na ligação com o substrato, e portanto, existe o mesmo valor de pK , tanto para o enzima como para a ligação enzima-substrato (16). O decréscimo de atividade da invertase abaixo de pH 4,0, foi explicado por Hudson (27), e Michaelis (45), como sendo a dissociação de um grupo "básico" do enzima. Josephson (32, 33), em continuação aos trabalhos desses pesquisadores, demonstrou que a afinidade da invertase para seu substrato em meio ácido é mais baixa do que no valor de pH ótimo. Isto levou Myrback (49) à conclusão de que a parte ácida da curva pode ser determinada por um grupo de moléculas do enzima com um pK_b em torno de 3, e que, ao contrário do grupo alcalino, este grupo se envolve na ligação do substrato.

2.2. Obtenção de invertase

A invertase de levedura foi descoberta por Persoz em 1833 (60). Em 1860, foi purificada pela primeira vez por precipitação em álcool por Berthelot (10). Desde então, esse enzima vem sendo estudado por vários pesquisadores, cujos trabalhos foram revistos por Neuberg e Roberts em 1946 (57). Myrback, em 1960, (52), sumariou os mais recentes resultados, principalmente quanto ao isolamento, às propriedades cinéticas e à ação de inibidores.

As células de leveduras contendo altas concentrações de invertase podem ser rompidas e desidratadas com diferentes solventes orgânicos. Com essa finalidade, Albert e Buchner (35) empregaram a acetona, enquanto Neuberg e Roberts (57) utilizaram o dioxano, obtendo-se, dessa maneira, células desidratadas e aparentemente inativas. A invertase dessas preparações, apesar de se encontrar ligada à estrutura insolúvel das células, pode, contudo, atuar sobre soluções de sacarose, se nelas for dispersada.

A fim de se obter preparações purificadas de invertase, é preciso separar o enzima das células. Para esse fim, Hudson (24, 25) propôs o método de autólise rápida em presença de solvente orgânico. Para isso, lique-

faz-se a levedura com toluol (ou clorofórmio ou acetato de etila) e mistura-se com igual volume de água. Dessa maneira, as células são rompidas e as suas protéases internas começam a atuar libertando a invértase. A velocidade da autólise depende da temperatura usada, sendo a mais favorável a 30°C. Pode ser acelerada pela adição de papaína (72).

Myrback (51). em continuação às experiências de Hudson, chegou à conclusão de que a quantidade de enzima obtida por aquele método é relativamente pequena, sendo necessário uma autólise mais prolongada a fim de se solubilizar a invértase. Conseguiu libertar o máximo de invértase, somente após 20 horas de autólise à temperatura ambiente.

Cahib (13), em 1952, demonstrou por cromatografia, a presença de várias formas de invértase obtidas do fermento. Gascon e Ottolenghi (21) encontraram duas formas desse enzima em leveduras: uma de alto peso molecular, na membrana extra-plamática; outra de baixo peso molecular, no interior da célula. Essas duas formas já foram isoladas e purificadas, apresentando as seguintes propriedades: a extracelular contém 50% de carboidratos, enquanto a intracelular não apresenta carboidratos e cistina. As formas purificadas apresentaram atividades específicas similares, bem como um valor semelhante de Km para sacarose e rafinose (20, 58). A atividade ótima foi encontrada entre os valores de pH 3,5 a 5,5 (52).

A invértase de levedura ainda não foi obtida na forma cristalizada. Isso se deve, provavelmente ao fato de no autolisado das células o enzima estar excessivamente contaminado por polimanasas, as quais se aderem ao enzima durante o processo de purificação (52).

Vários autores (4, 18, 19), entre os quais Sumner e Howell (67), vêm tentando obter invértase na sua forma purificada. Uma comparação exata do grau de pureza das preparações desse enzima obtidas por esses pesquisadores é impossível. Preparações altamente ativas, possivelmente contendo 50% ou mais de invértase, foram obtidas por Willstatter (71) e Euler (15). O conteúdo de N nas preparações varia de autor para autor. A preparação de Euler e Josephson (15), contém de 10 a 12% de N, enquanto a de Adams e Hudson (1) contém cerca de 14,8% de N. Essas diferenças se devem, provavelmente, ao tipo de levedura, método de autólise e processo de purificação empregado com a finalidade de remover proteínas e carboidratos.

2.3. Especificidade

Para poder ser hidrolisado pela invértase de levedura, o substrato deve possuir um terminal insubstituível, que é o resíduo β -d-fructofuranosílico (52). Outros resíduos, tais como α -fructofuranósides, fructopiranosósides, β -l-sorbofuranósides, β -d-xilocetofuranósides, não são atacados. A substituição do resíduo β -fructofuranosílico anula a reação; melezitose resiste à hidrólise, o mesmo sucedendo com planteose e lignose (18, 19).

A natureza "afructônica" da metade de um β -fructofuranósido, comparativamente pouco representa para a atividade de invértase. A substituição da glicose na molécula de sacarose não anula a ação da invértase. Não apenas a rafinose, mas também a conhecida "família da rafinose" de açúcares,, (estaquiose, verbascose, etc.), são substratos susceptíveis; no entanto, a facilidade de hidrólise diminui com o aumento do número de resíduos galactosídicos. A gentianose também pode ser hidrolisada. A substituição na metade glicosídica por outros radicais além de açúcares, como fosfato ou sulfato, não inibe a reação (52).

Whelan e Tones (70) demonstraram que o substrato de invértase não precisa ser necessariamente uma substância não redutora. O açúcar redutor 6- β -fructofuranosilglicose é hidrolisado, bem como seu produto não redutor, o 6- β -fructofuranosil-d-sorbitol.

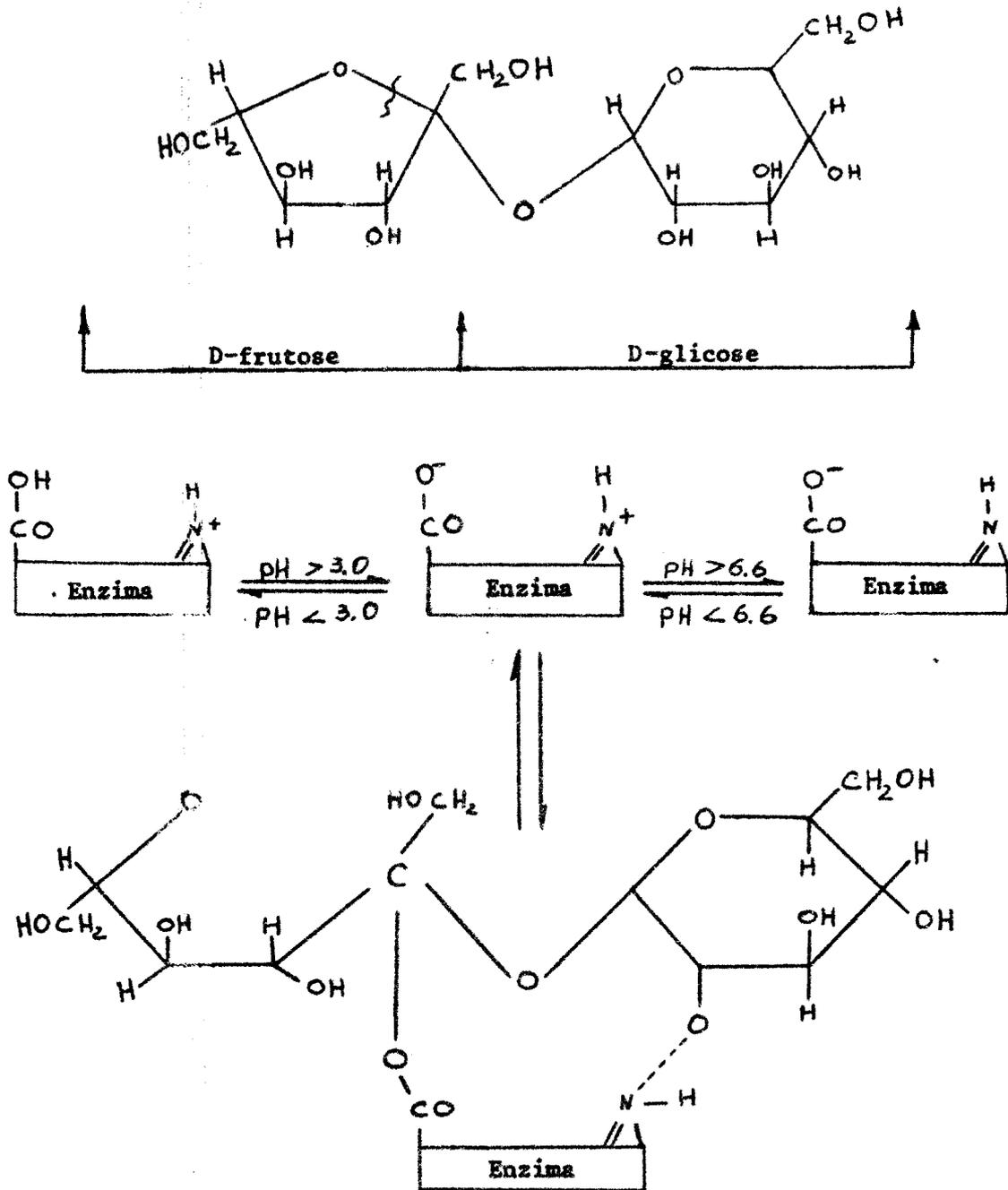
Dissacárides do tipo da sacarose contendo xilose ou galactose em lugar da glicose são atacados pela invértase. Esse enzima hidrolisa também β -fructofuranosil-fructoses (7, 23) e grandes moléculas de oligo-sacárides contendo ou β -fructofuranose exclusivamente ou um número variável de resíduos β -fructofuranosílicos e um grupo terminal α -glicopiranosílico (14). A velocidade de reação diminui com o aumento dos resíduos de fructose.

2.4. Mecanismo da reação

A especificidade da invértase de levedura mostra que um resíduo β -d-fructofuranosil insubstituível é exigido como substrato. O grupo hidroxila do resíduo furanosílico serve como intermediário para a formação do complexo invértase-substrato, interagindo com o hidrogênio do grupo hidrofílico correspondente situado na superfície ativa do enzima (45, 48).

Koshland (34), em sua experiência com água pesada, mostrou que a invertase rompe a ligação glicosídica do substrato da frutose. Isso explica porque é mantida na sacarose a configuração anomérica do carbono da glicose. Ademais confirmou-se o fato de que o grupo "afrutônico" do substrato apresenta, comparativamente, pequena influência na atividade enzimática.

Laidler (38, 39), em complementação às experiências de Koshland, propôs o seguinte mecanismo da reação entre invertase e seu substrato:

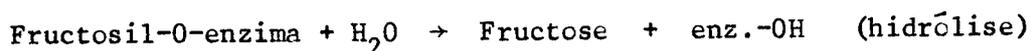
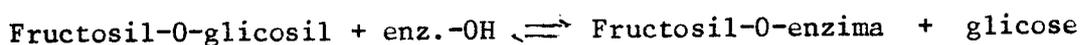


Nesse esquema, propôs que o enzima possui dois centros ativos, um ácido e outro básico, possibilitando a formação do complexo enzima-substrato em ambos os pontos por uma reação de simples troca.

A atuação da invertase de levedura como uma transferase já foi determinada independentemente por Bacon & Edelman (9) e por Blanchard & Albon (11), quando propuseram inicialmente a formação intermediária de oligossacarídes durante a hidrólise da sacarose. Posteriormente, ficou esclarecido que a reação consiste de uma transferência dos resíduos β -fructofuranosílicos do substrato (sacarose, rafinose, etc.) para certos receptores por eles designados como co-substratos. Durante a reação da invertase, a quantidade de produtos de transferência aumentam a um máximo (geralmente, perde-se menos de 10% dos açúcares totais), para depois diminuir a zero. A velocidade da passagem dos produtos de transferência aos produtos de hidrólise aumenta com a concentração do substrato.

Os métodos para a determinação da invertase como uma transferase foram propostos por Bacon (8), embora uma técnica electroforética tenha sido descrita por Gross (23). Vários produtos de transferência têm sido isolados na sua forma purificada, cristalizada, e a sua estrutura determinada por métodos clássicos. Esses pesquisadores também mostraram que a invertase de levedura transfere fructose somente a grupos de álcoois primários, em presença de álcoois simples, açúcares, etc. Dessa maneira, metil- β -fructofuranoside é formado em presença de metanol e etil- β -fructofuranoside, a partir de etanol. A fructose e glicose livres atuam como receptoras. Pela transferência à glicose tem lugar a formação de uma 6- β -fructofuranosilglicose e, pela transferência à fructose, formam-se dois dissacarídes: 1- β e 6- β -fructofuranosil-fructose. A sacarose e outros dissacarídes atuam como receptores para formar trissacarídes.

Edelman (14) propôs o seguinte esquema para explicar as reações de hidrólise ou de transferência, que podem ocorrer durante a transformação do substrato pela invertase:



dependendo do grau de afinidade do enzima por seus receptores (água ou álcool), podem ocorrer reações de hidrólise, como invertases de leveduras, ou de transferência, como certas invertases extraídas de fungos.

2.5. Determinações enzimáticas

Para determinar-se a atividade enzimática de um enzima é necessário medir sua ação catalisadora nas condições ótimas de reação em relação ao pH, concentração de substrato, presença de ativadores, etc. O substrato da invertase é um dissacáride que apesar de apresentar uma ligação glicosídica entre o carbono 1 da aldose e o carbono 2 da cetose, não é redutor. Somente após a hidrólise ocorre a inversão em glicose e frutose, ou seja, uma mistura de açúcares redutores com um alto grau adocicante devido a presença de frutose (4). A determinação quantitativa desses açúcares formados caracteriza a extensão da inversão, ou seja, a atividade enzimática da invertase (42). O Quadro 1 mostra os métodos utilizados por diferentes pesquisadores na determinação da atividade enzimática.

Como se pode observar, o método mais empregado é o polarimétrico, seguido do método de redução do cobre e do colorimétrico. Todos os trabalhos acima relacionados empregam valores de pH entre 4,5 e 5,0, ou seja, na faixa de pH ótimo. As temperaturas variam entre 15 e 40°C e, entre as soluções de tampão, a de fosfato tem sido a mais empregada.

A maneira mais simples de expressar os resultados obtidos é em mg de açúcares redutores formados, como foi proposto por Summer e Howell (67). No entanto, a maneira mais preferida é a de expressar a atividade pela velocidade de reação (42), empregando-se a constante K da equação de reação monomolecular ou de primeira ordem. Multiplicando-se o valor de K pelo fator de diluição da solução enzimática, obtém-se unidades de atividade de acordo com Wallerstein (69) e A.O.A.C. (5). Embora todos os métodos do Quadro 1 mostrem um panorama real da atuação das preparações enzimáticas de invertase, para a sua aplicação prática, contudo, são necessárias novas adaptações.

2.6. Inibidores

Entre os pesquisadores que se devotaram ao estudo da invertase, Myrback (46) se destaca, principalmente, por haver se dedicado à ação de inibidores e sua cinética de reação. Demonstrou, assim, que íons de metais pesados (Cu^{++} , Pb^{++} , Cd^{++} , Zn^{++} e especialmente Ag^+) representam fortes inibidores da invertase. A inibição por esses íons é completamente reversível e não-competitiva, isto é, os grupos da molécula enzimática que

Quadro 1. Métodos para determinação de atividade da invertase

Autores	pH	Tampão	Concentração de sacarose %	Temperatura °C	Tempo de inversão (min)	Métodos de determinação	Atividade
O'Sullivan & Thompson (59)	4,5-5,0	Fosfato	16,75	15,5	-	Polarimetria	Tempo (min)
Willstatter & Racke (72)	4,5	Fosfato	16,75	15,5	60-180	Polarimetria	Tempo (min) ou $MZQ = \frac{g \text{ Enzima}}{t \text{ (min)}}$
Euler & Laurin (17)	4,5	Fosfato	7,48	18	20-180	Polarimetria	If = $\frac{K \cdot g \text{ açúcar}}{g \cdot \text{enzima}}$
Weidenhagen (69)	4,65	Acetato	4,75	30	-	Polarimetria	$F_r W = \frac{I}{I_{50} \cdot g \text{ enzima}}$
Summer & Howell (67)	4,5	Acetato	5,42	20	5,0	Colorimetria	Mg. de açúcar invertido formado
A.O.A.C. (5)	4,6	Ácido acético	9,09	20	15,0	Polarimetria	K . fator de diluição
Wallerstein Laboratories (68)	4,5-4,6	Fosfato	9,09	40	30	Polarimetria	K . fator de diluição ou redução de cobre

se unem ao íon metálico não são atingidos pelo substrato. A inibição da invertase pelos íons mencionados, depende fortemente do pH do meio. Isto parece ser devido à competição entre o íon metálico e o grupo H^+ do enzima num valor de pH aproximadamente igual a 7,0. Presume-se que este grupo seja o imidazol da histidina, uma vez que na formação do complexo de Ag^+ e histidina apresenta a mesma dependência de pH que na formação do complexo Ag^+ e invertase.

Euler e Josephson, (15) em 1922, e Myrback (51), mais tarde em 1957, verificaram que o efeito do iodo na invertase de levedura apresenta propriedades incomuns. Se uma pequena quantidade de iodo é adicionada a uma solução de invertase, a atividade do enzima diminui até atingir cerca de 55% do valor original. Se o iodo é adicionado em excesso, a rápida inativação é seguida de um decréscimo mais lento da atividade enzimática. Assim, a inativação da invertase pelo iodo é causada por duas reações diferentes: uma, muito rápida, forma um derivado "I-invertase", com uma atividade cerca de 45% mais baixa que a do enzima natural; outra, mais lenta, transforma o complexo I-invertase num derivado completamente inativo.

O efeito de sais de mercúrio (I) e mercúrio (II) foi verificado, pela primeira vez, por Gemmil & Bowman (22), em 1950, e, posteriormente, por Myrback (51) e Smalt (64), em 1957. Esses sais representam fortes inibidores de invertase, mas com uma reação completamente reversível. A inibição na faixa de pH entre 4,0 e 7,0 não depende deste. Derivados orgânicos de mercúrio, como o acetato de fenil mercúrio, o p- e m-benzoato de mercúrio e outros, representam fortes inibidores e atuam melhor que cloreto de mercúrio.

O enzima é fortemente inibido por amina aromática primária, tais como anilina (47). A inibição é completamente reversível e não-competitiva, isto é, as amina reagem com determinados grupos na molécula de invertase, os quais não estão envolvidos na ligação com o substrato. A inibição pela anilina depende fortemente do pH da solução, o que não é de se surpreender, uma vez que a anilina com $pK \sim 4,5$ troca sua carga elétrica na faixa de pH 3 a 8. Presume-se que a anilina inibe o enzima pela formação de uma base livre com o grupo carbonila da invertase. Neste caso o agente inibidor deveria ser uma amino-base livre e, se a inibição é calculada numa concentração determinada de anilina básica, ela não depende do pH. A substituição de núcleos aromáticos apresenta uma grande influência na

inibição. As bases fortes inibem mais que as bases fracas e, geralmente, as aminas que apresentam "meta" derivados inibem melhor do que aquelas com "para" e "orto" derivados.

2.7. Cinética

Para a utilização adequada de enzima no processo químico industrial é necessário conhecer suas propriedades e cinética, ou seja, correlacionar a função e a estrutura enzimica de tão notáveis catalisadores. A determinação da função enzimica tem início com a formulação de um modelo cinético, o qual é capaz de descrever os dados cinéticos observados e esclarecer o mecanismo da ação catalítica do enzima em particular.

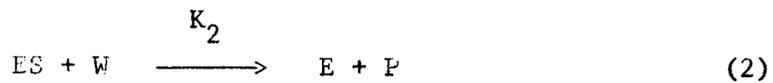
Vários modelos cinéticos foram propostos para descrever a hidrólise da sacarose em presença de invertase. Todos os modelos são derivados do modelo proposto por Michaelis-Menten (44), modificados pela introdução dos efeitos de concentração da água, viscosidade do meio ou inibição pelo substrato. De acordo com as experiências realizadas por diversos pesquisadores (3, 54, 62), o efeito de cada fator isolado não resulta em modelo cinético satisfatório, sendo necessário combinar, por exemplo, os efeitos da inibição do substrato e a concentração da água (4, 12, 44).

É freqüente encontrar-se "desvios" de equação de Michaelis-Menten e, em alguns casos, uma explicação pode ser dada. Assim, às vezes, com um aumento da concentração de substrato a velocidade da reação aumenta, porém, a partir de certo ponto, ela passa a diminuir. Se se imaginar que o substrato se combina ao enzima por dois pontos de sua molécula, sem o que não pode haver reação, verifica-se que, com um excesso de substrato, aumenta-se a probabilidade de duas moléculas de substrato reagirem independentemente nos dois pontos da molécula do enzima. Este fenômeno também pode ser verificado pela ação da invertase no seu substrato.

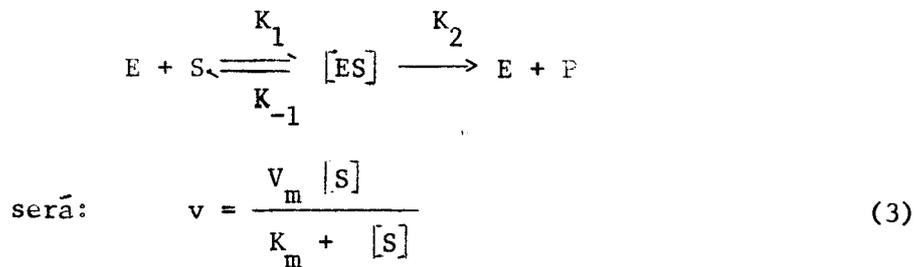
Sabe-se que a velocidade de hidrólise da sacarose pela invertase aumenta com a concentração de substrato apenas até cerca de 6% de solução de sacarose. Acima desta concentração, a velocidade de reação não segue a teoria de Michaelis-Menten, mas, ao contrário, ela invariavelmente diminui. Nelson & Schubert (54), examinando essa reação, sugerem que o decréscimo na concentração de água é o responsável pela queda brusca da sua velocidade. Quando se locam em gráfico os dados de velocidade em fun-

ção das concentrações de água, obtém-se uma curva semelhante àquela de velocidade em função da concentração de sacarose. Com isso, chegaram à conclusão que a concentração de água é o fator que determina a grandeza da velocidade de hidrólise da sacarose pela invertase.

O seguinte mecanismo de reação foi proposto por Bowski & Saini (12) para demonstrar o teste de limitação da água:



onde W representa água. A equação cinética para a reação de acordo com a teoria de Michaelis-Menten, quando



onde: E representa o enzima; S, o substrato; [ES], o complexo enzima-substrato; e P, o produto. E, ainda: V, representa a velocidade inicial da reação; [S], a concentração do substrato; Km, a constante de Michaelis; e Vm, a velocidade máxima da reação.

Portanto, para a reação (2), a equação cinética (3) se torna:

$$v = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} \cdot [W] \quad (4)$$

onde [W] é a concentração total da água.

Os resultados obtidos por Bowski & Saini mostraram que o efeito do decréscimo da concentração da água reduz a velocidade do modelo cinético proposto por Michaelis-Menten para altas concentrações de sacarose, mas não são suficientes para provar os dados experimentais.

Outro modelo cinético proposto para explicar o desvio da equação de Michaelis-Menten foi apresentado por MacLaren (41), com base na limitação difusional da sacarose em relação ao centro ativo do enzima. De acordo com a equação de Stokes-Einstein (12) para difusão de solutos em líquidos,

$$\frac{D_L}{T} = f \frac{1}{\eta} \quad (5)$$

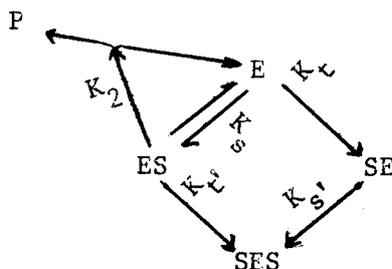
pode-se relacionar η - (viscosidade da solução), T- (a temperatura) e D_L (a constante de difusão).

MacLaren (41) propôs que a velocidade inicial da reação é proporcional à fluidez relativa do meio reacional. Assim, o modelo empírico apresentado por MacLaren pode ser escrito:

$$v = \frac{1,2 v_m [S]}{K_m + [S]} \eta_0/\eta \quad (6)$$

onde η_0 é a viscosidade da água a 25°C; η a viscosidade da solução de sacarose; e 1,2 é a constante associada utilizada para corrigir o modelo cinético de Michaelis-Menten com os dados experimentais.

O modelo cinético para inibição pelo substrato, conforme descrito por Laidler (38), pode ser formulado pela seguinte rede de reações:



onde ES representa um complexo ativo cujo substrato está corretamente ligado ao centro ativo do enzima, enquanto que SE e SES são postulados complexos inativos formados pela incorreta ligação do substrato. Esse tipo de mecanismo tem sido usado para explicar também a cinética de outros enzimas, tais como fumarase, uréase, carboxipeptidase e outros, cujos resultados são interpretados em termos de inibição pelo substrato.

O modelo cinético para inibição pelo substrato, no caso da inversão da sacarose, pode ser escrito como:

$$v = \frac{K_2 K_s [E_0] [S]}{1 + (K_s + K_t) [S] + K_s K_t' [S]} \quad (7)$$

Os três grupos de constantes nessa equação podem ser determinados por uma análise linear regressiva dos dados experimentais.

De acordo com Laidler (38, 39), eles equivalem a:

$$K_2 K_s [E_0] = 0,0103 \text{ moles de glicose/moles de sacarose} \quad (8)$$

$$K_s + K_t = 6,27 \text{ litros/moles de sacarose} \quad (9)$$

$$K_s \cdot K_t' = 7,26 \text{ litros}^2 / (\text{moles de sacarose})^2 \quad (10)$$

As constantes (8) e (9) foram obtidas de dados experimentais da região de baixas concentrações de substrato e a constante (10) daquelas de altas concentrações de substrato. Na equação (7), multiplicando-se os valores obtidos por um fator constante igual a 1,19, obtém-se os dados corrigidos do modelo cinético de Michaelis-Menten.

Analisando-se os resultados obtidos por Bowski & Saini (12), ao combinar o efeito da inibição pelo substrato e concentração de água, verifica-se que os valores teóricos da concentração de água livre, calculados na base de 7 moles de hidrogênio da água ligados a cada mol de glicose, são mais baixos que os valores experimentais encontrados. Isso significa que, a altas concentrações de substrato, uma molécula de sacarose pode estar incompletamente hidratada pela água. O que sugere a possibilidade de moléculas de hidrogênio da sacarose estarem ligadas umas a outras, de tal modo que formem um aglomerado de moléculas, tornando-as inacessíveis ao centro ativo do enzima.

Reunindo-se todos esses conceitos, pode-se representar, esquematicamente, os vários processos capazes de explicar a cinética da hidrólise de sacarose por invertase, de acordo com o esquema da Figura 1.

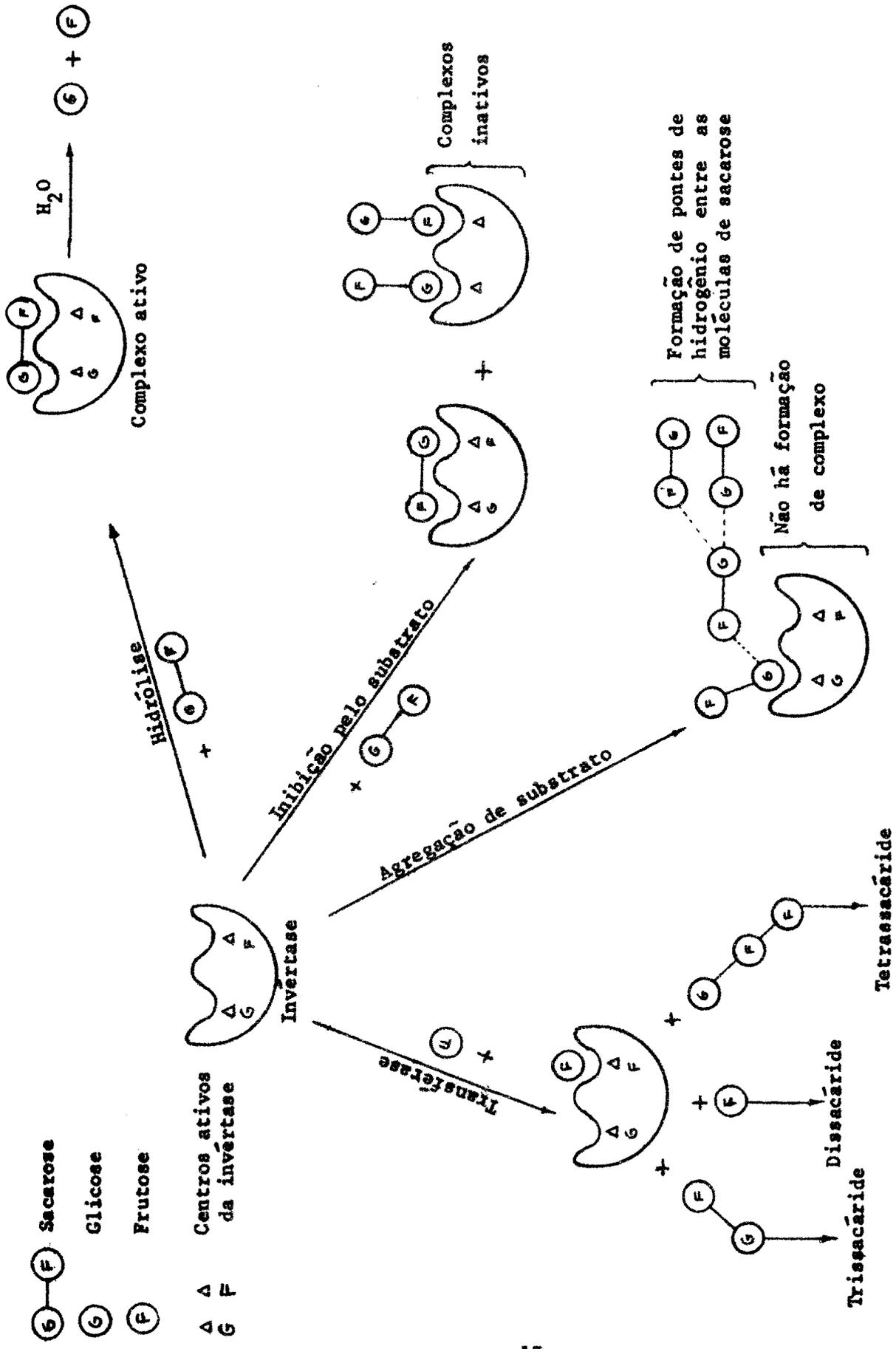


Figura 1. Métodos de hidrólise da sacarose pela invertase.

2.8. Aplicações da invertase

A invertase é de grande importância na indústria de alimentos. A hidrólise de soluções concentradas de sacarose resulta na formação de xaropes mais doces, devido ao alto poder adoçante da frutose. O ponto de ebulição do açúcar invertido é mais alto e o ponto de congelamento é mais baixo devido ao aumento da pressão osmótica na inversão. Os monossacarídeos formados pela ação da invertase são mais solúveis e, conseqüentemente, não se cristalizam tão facilmente, mesmo quando em soluções de xaropes altamente concentrados.

A invertase é aplicada analiticamente na análise de sacarose ou de cana-de-açúcar. Zerban e seus pesquisadores (73, 63), mostraram que a hidrólise ácida da sacarose resulta na formação de produtos de reversão, os quais causam erros na análise polarimétrica. Afirmaram que a inversão por invertase constitui o único método que fornece resultados corretos. Industrialmente, é aplicado para efetuar a inversão de xarope de cana-de-açúcar, para o que o método de hidrólise ácida, apesar de ser mais barato, não é aceito. Em tais casos, um xarope de 55-60° Brix é tratado com uma preparação na forma solúvel ou insolúvel de invertase de pH 4,5 e à temperatura de 55°C. O transcurso da reação pode ser facilmente acompanhado por meio da equação de primeira ordem da velocidade de reação. No ponto em que é exigida uma inversão limitada, a reação pode ser detida ou filtrando-se a preparação insolúvel do enzima, ou aquecendo-se em ebulição durante 5 minutos (42), quando se empregou a preparação solúvel.

O maior emprego da invertase é na indústria de confeitaria para a produção de recheios de bombons, doces e frutas. Em tal caso, seu uso tem por base o desejo de obter-se um líquido que, além de doce pastoso e consistente, não permita a fermentação. Xaropes de açúcar invertido, contendo mais de 79% de açúcar preenche ambas as exigências. No entanto, esses xaropes sendo líquidos não podem ser facilmente manuseados e tampouco cobertos com chocolate. É necessário, portanto, iniciar com um açúcar que seja suficientemente firme para a cobertura e que mais tarde possa ser convertido e liquefeito pela invertase (61, 30, 31).

Os "Fondant" empregados na produção de recheios de cremes consiste de uma fase sólida de açúcar e uma fase líquida xaroposa, contendo uma concentração de sacarose que varia de 67 a 68% à temperatura ambiente. A adição de invertase em tal sistema resulta na hidrólise da sacarose da

fase líquida em glicose e frutose. Os monossacáridos são altamente solúveis e a sacarose adicional da fase sólida é dissolvida e, por sua vez, hidrolisada pelo enzima. Esse processo continua até que seja atingido o limite de solubilidade do açúcar invertido, isto é, quando o xarope tenha alcançado a densidade de cerca de 82-83%. Nos xaropes que apresentam densidades acima de 79%, não ocorre fermentação e a massa não endurece (30, 31).

Na prática, os recheios dos bombons não são preparados unicamente com soluções supersaturadas de sacarose. Podem ser preparados, por exemplo, de uma mistura contendo xarope de milho e açúcar invertido; ou então, de xarope de milho, sacarose e água; ou ainda, de xarope de milho, açúcar invertido e ovoalbumina. Esses xaropes são misturados e preparados de tal forma que a concentração de açúcar na fase líquida é de cerca de 74-75%. Evidentemente, esta é a maior densidade que se pode obter com essas soluções de sacarose, devido a presença de algum açúcar invertido. Não se é possível aumentar a concentração dos monossacáridos, tornando-se indispensável, desse modo, a aplicação de invertase ao sistema (61).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Invértase

No decurso do estudo foram sempre empregadas soluções aquosas do enzima, preparadas a partir de fermento prensado (*Sacharomyces cerevisiae*). A invértase foi liberada das células por autólise em presença de solvente orgânico.

3.2. Substrato

A sacarose (Merck & Co Inc.) empregada neste trabalho, apresenta va alto grau de pureza, sem vestígios de quaisquer outros carboidratos. Foram empregadas soluções de substrato diluídas em tampão acetato 0,01 M.

3.3. Obtenção de invértase solúvel e insolúvel

Quinhentos gramas de fermento tipo Fleischmann foram misturados a 50 ml de acetato de etila. Essa mistura foi autolizada durante 24 horas a 30°C, para logo em seguida ser diluída com igual volume de água e centrifugada a 1.200 g durante 10 minutos. O sobrenadante constitui a fração solúvel e o resíduo a invértase insolúvel. O resíduo foi lavado várias vezes com água e em cada vez centrifugado a 1.200 g. Finalmente, foi ressuspenso em água e guardado a 2°C.

3.4. Determinação da atividade enzimica

A mistura de 10 ml de solução de sacarose preparada a 10% em tampão acetato 0,01 M de pH 4,5 e de 1 ml de solução diluída de invértase foi incubada durante 10 minutos a 40°C. Logo após, 2,5 ml de uma solução de carbonato de sódio 0,01 M foram adicionados, a fim de deter a reação. Os açúcares redutores formados foram dosados a partir de 5 ml da mistura de reação pelo método alcalino de redução do cobre (65).

3.5. Unidade de invértase

Uma unidade de atividade enzimica foi definida como sendo a quantidade de invértase que produz açúcares redutores equivalentes a 1,0 mg de glicose durante 10 minutos a 45°C.

3.6. Efeito da autólise

Duzentos gramas de fermento prensado e 20 ml de acetato de etila foram encubados a 30°C durante 24 horas. De 2 em 2 horas, retiraram-se alíquotas de 5 ml e adicionou-se igual volume de água. Essa mistura foi centrifugada a 1.200 g durante 10 minutos, a fim de se separarem as duas frações de invertase. A seguir, foi determinada a atividade enzimica do sobrenadante como em 3.4. O precipitado foi lavado diversas vezes com tampão (acetato 0,01 M de pH 4,6) e água, alternadamente, até que o sobrenadante não apresentasse mais a fração solúvel. Finalmente, o resíduo foi dissolvido em 10 ml de tampão e sua atividade foi dosada como descrito anteriormente.

3.7. Cinética: concentração do substrato

Foram preparadas soluções de sacarose em tampão acetato 0,01 M, pH 4,6, desde 0,029 M até 1,461 M. A atividade enzimica foi determinada com 10 ml de cada solução como em 3.4. A velocidade de reação foi expressa em moles de glicose obtidos por 1 litro por minuto.

3.8. Efeito do pH

Prepararam-se soluções de tampão 0,01 M nos seguintes valores de pH: 3,0, 4,0, 5,0 (tampão citrato), 6,0, 7,0 e 8,0 (tampão fosfato). O substrato foi preparado a 10% a partir de cada solução tamponada. A velocidade de hidrólise da sacarose pela invertase foi determinada como em 3.4.

3.9. Efeito da temperatura

Amostras contendo 1,0 ml das duas formas de invertase foram incubadas durante 30 minutos a temperaturas de 40, 45, 50, 55 e 60°C. A seguir, foram adicionados 10 ml de substrato e determinou-se a atividade como descrito anteriormente.

3.10. Ação de inibidores

Foi examinada em presença de cloreto de mercúrio e ácido iodo-acético nas concentrações descritas nos Quadros 2 e 4. Um ml de cada uma das formas solúvel e insolúvel de invertase, foi incubado com 1,0 ml de inibidor

e 10 ml de substrato, durante 10 minutos e a 40°C. Logo em seguida, adicionaram-se 2,5 ml de carbonato de sódio e determinaram-se os açúcares redutores obtidos, como já foi descrito. As concentrações de substrato empregadas foram de 2 a 6% em tampão acetato 0,01 M de pH 4,5.

Quadro 2. Efeito da concentração do substrato na velocidade de reação.

Substrato		Insolúvel		Solúvel	
S (M)	$\frac{1}{S}$	v (Moles/litro/min)	$\frac{1}{v}$	(Moles/litro/min)	$\frac{1}{v}$
0,029	34,40	$3,20 \times 10^{-5}$	$3,1 \times 10^4$	$3,30 \times 10^{-5}$	$3,00 \times 10^4$
0,058	17,30	$4,55 \times 10^{-5}$	$2,2 \times 10^4$	$4,88 \times 10^{-5}$	$2,10 \times 10^4$
0,088	11,40	$5,40 \times 10^{-5}$	$1,85 \times 10^4$	$5,60 \times 10^{-5}$	$1,80 \times 10^4$
0,116	8,60	$5,80 \times 10^{-5}$	$1,71 \times 10^4$	$6,00 \times 10^{-5}$	$1,66 \times 10^4$
0,146	6,80	$6,32 \times 10^{-5}$	$1,58 \times 10^4$	$6,27 \times 10^{-5}$	$1,59 \times 10^4$
0,175	5,70	$6,51 \times 10^{-5}$	$1,53 \times 10^4$	$6,60 \times 10^{-5}$	$1,52 \times 10^4$
0,204	4,80	$6,55 \times 10^{-5}$	$1,50 \times 10^4$	$6,75 \times 10^{-5}$	$1,48 \times 10^4$
0,234	4,25	$6,70 \times 10^{-5}$	$1,49 \times 10^4$	$6,80 \times 10^{-5}$	$1,47 \times 10^4$
0,263	3,80	$6,80 \times 10^{-5}$	$1,47 \times 10^4$	$6,85 \times 10^{-5}$	$1,46 \times 10^4$
0,292	3,42	$6,75 \times 10^{-5}$	$1,46 \times 10^4$	$6,88 \times 10^{-5}$	$1,45 \times 10^4$
0,321	3,12	$6,60 \times 10^{-5}$	$1,52 \times 10^4$	$6,70 \times 10^{-5}$	$1,49 \times 10^4$
0,351	2,84	$6,50 \times 10^{-5}$	$1,53 \times 10^4$	$6,66 \times 10^{-5}$	$1,50 \times 10^4$
0,380	2,63	$6,30 \times 10^{-5}$	$1,59 \times 10^4$	$6,56 \times 10^{-5}$	$1,52 \times 10^4$
0,438	2,29	$6,20 \times 10^{-5}$	$1,61 \times 10^4$	$6,50 \times 10^{-5}$	$1,54 \times 10^4$
0,584	1,71	$5,90 \times 10^{-5}$	$1,69 \times 10^4$	$6,20 \times 10^{-5}$	$1,61 \times 10^4$
0,876	1,14	$5,20 \times 10^{-5}$	$1,92 \times 10^4$	$5,50 \times 10^{-5}$	$1,82 \times 10^4$
1,169	0,861	$4,60 \times 10^{-5}$	$2,18 \times 10^4$	$4,70 \times 10^{-5}$	$2,12 \times 10^4$
1,401	0,681	$3,70 \times 10^{-5}$	$2,70 \times 10^4$	$4,30 \times 10^{-5}$	$2,32 \times 10^4$

3.11. Tempo de incubação

A fim de se examinar a relação entre atividade enzimica e o tempo de incubação, amostras contendo 1,0 ml das duas formas de invertase foram incubadas a 60°C. A intervalos de 10 minutos foram retiradas para incubar novamente com 10 ml de substrato e determinar a atividade, como descrito em 3.4.

3.12. Inversão da sacarose pela invertase

Duzentos mililitros de solução de sacarose a 60% e 10 ml de solução enzimica foram incubados a 55 e 60°C. A determinados intervalos de tempo, alíquotas de 1,0 ml foram retiradas e adicionadas a 2,5 ml de uma solução 0,01 M de carbonato de sódio. Os açúcares redutores obtidos foram dosados como anteriormente.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da autólise

Procurou-se determinar a quantidade de invertase solúvel liberada e a quantidade de invertase insolúvel remanescente nas células, em função do tempo de autólise. Essa determinação permitiu traçar os gráficos da Figura 2, pela locação dos valores de atividade enzimica contra o tempo de incubação.

4.2. Concentração do substrato: cinética da reação

Na Figura 3 e no Quadro 2, encontram-se os dados cinéticos obtidos para as duas formas do enzima. Os valores teóricos de K_m e V_m foram determinados graficamente pelo método de Lineweaver-Burk (40), ao se colocarem os resultados experimentais sob a forma de $1/S$. Esse gráfico (Figura 4) é linear para concentrações de sacarose abaixo de 0,29 M e mostra os valores de $K_m = 0,043$ M para a forma insolúvel, $K_m = 0,039$ M para a forma solúvel e $V_m = 7,95 \times 10^{-5}$ M por litro por minuto para as duas formas de invertase.

4.3. Efeito do pH

A relação entre a atividade enzimica das duas formas de invertase e diferentes valores de pH foi examinada e os resultados podem ser observados na Figura 5.

4.4. Efeito da temperatura

Na Figura 6 estão relacionadas a perda de atividade enzimica em % e a temperatura de incubação da invertase solúvel e insolúvel.

4.5. Ação de inibidores

Na Figura 7 e nos Quadros 3 e 4, encontram-se os resultados obtidos quando se empregaram cloreto de mercúrio e ácido iodo-acético como inibidores da hidrólise enzimica da sacarose. Com o cloreto de mercúrio, foram determinadas as velocidades de reação (moles de glicose por minuto) em soluções de sacarose a 2 e 6% de concentração em tampão acetato 0,01 M de pH 4,6.

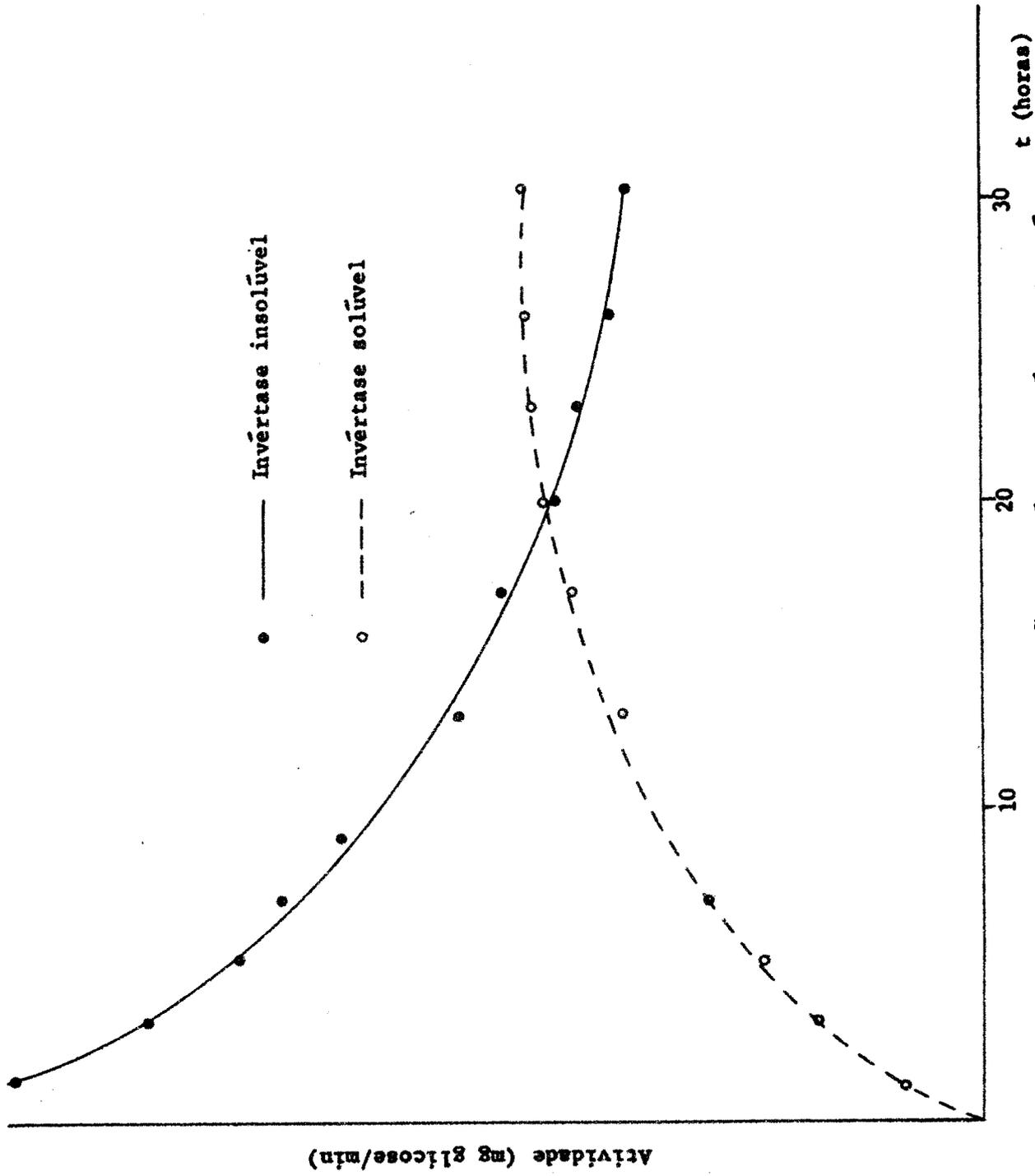


Figura 2. Efeito da autólise na obtenção de invertase solúvel e insolúvel. *O. D. A. P. 21.7.73*

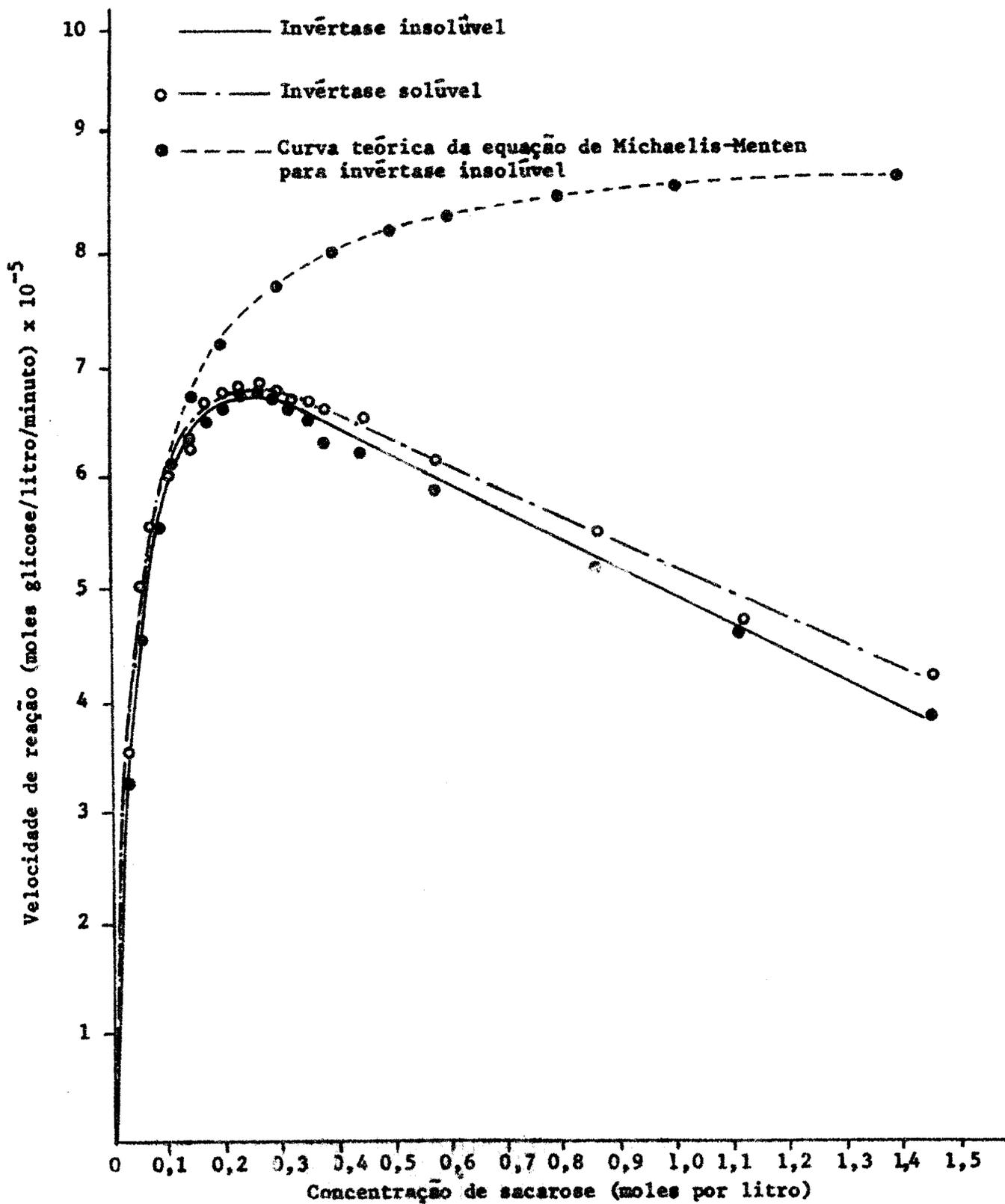


Figura 3. Velocidade de hidrólise de várias concentrações de sacarose por invertase solúvel e insolúvel.

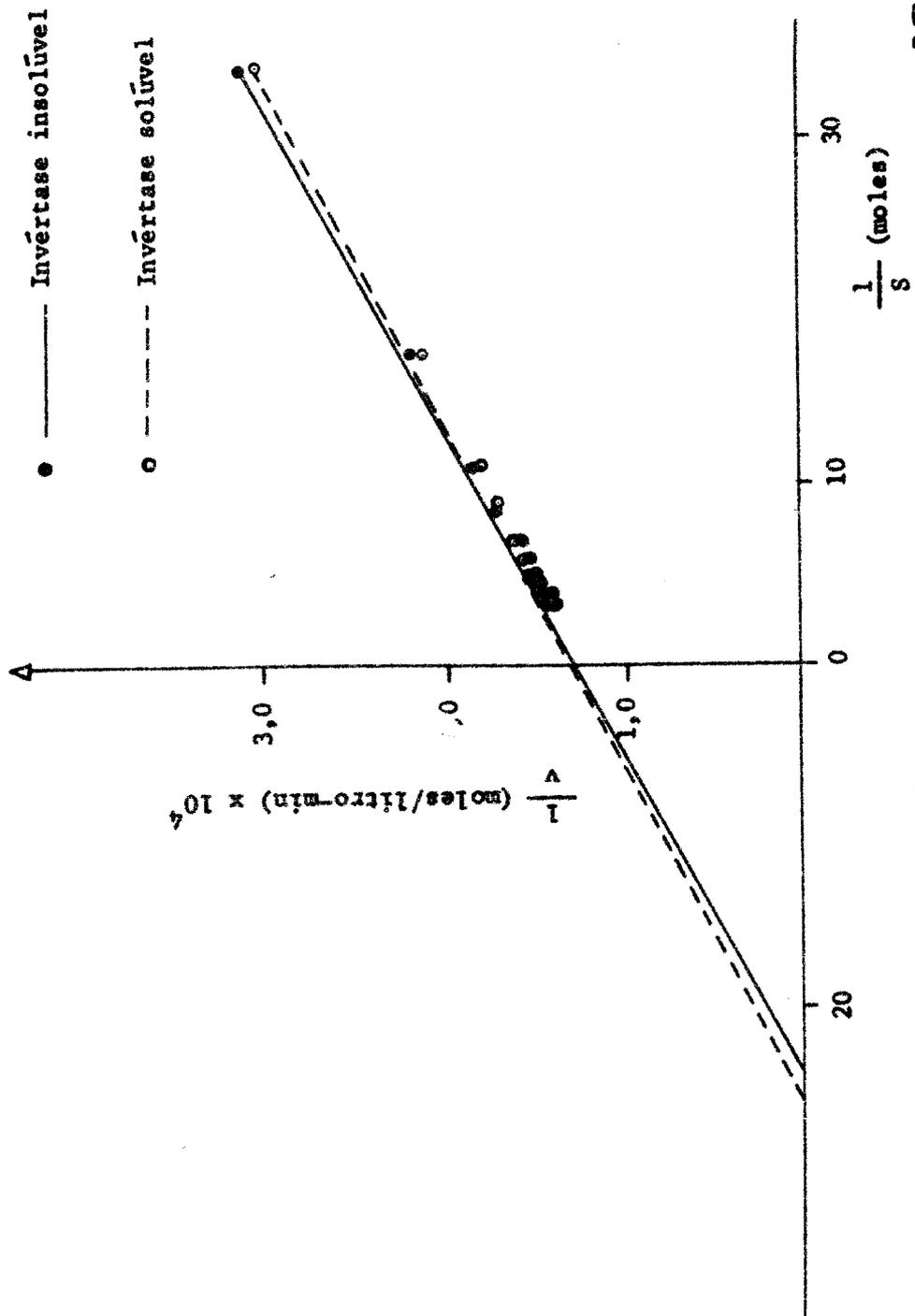


Figura 4. Determinação de Km e Vm

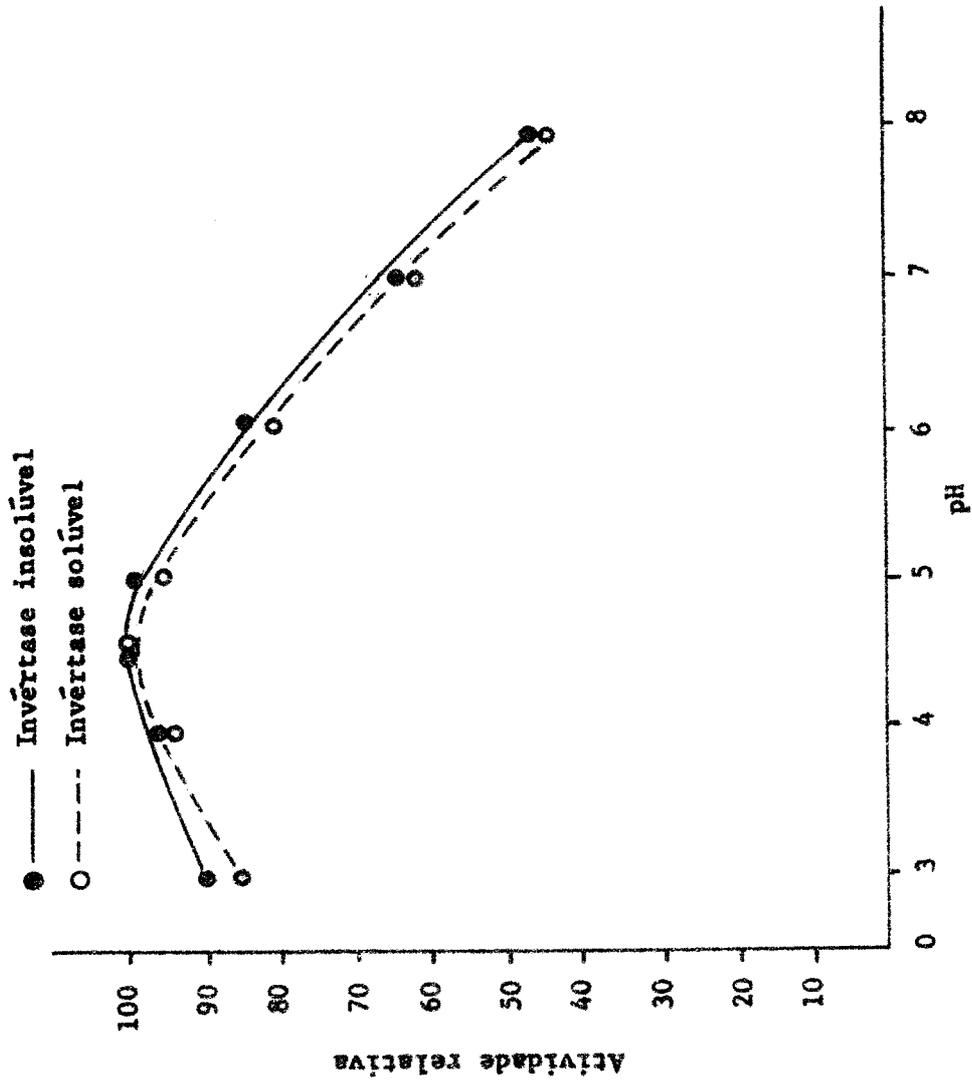


Figura 5. Relação entre atividade da invertase e pH.

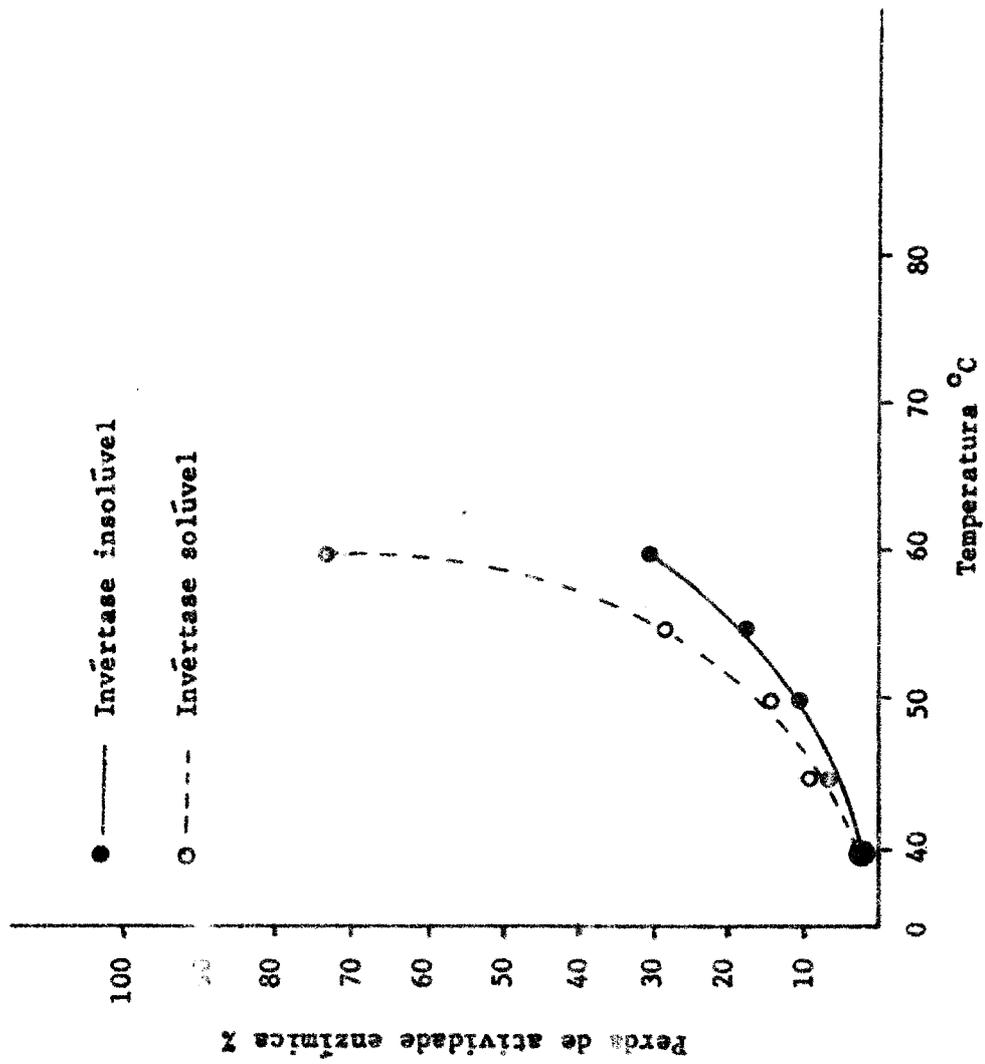


Figura 6. Relação entre atividade enzimática e temperaturas

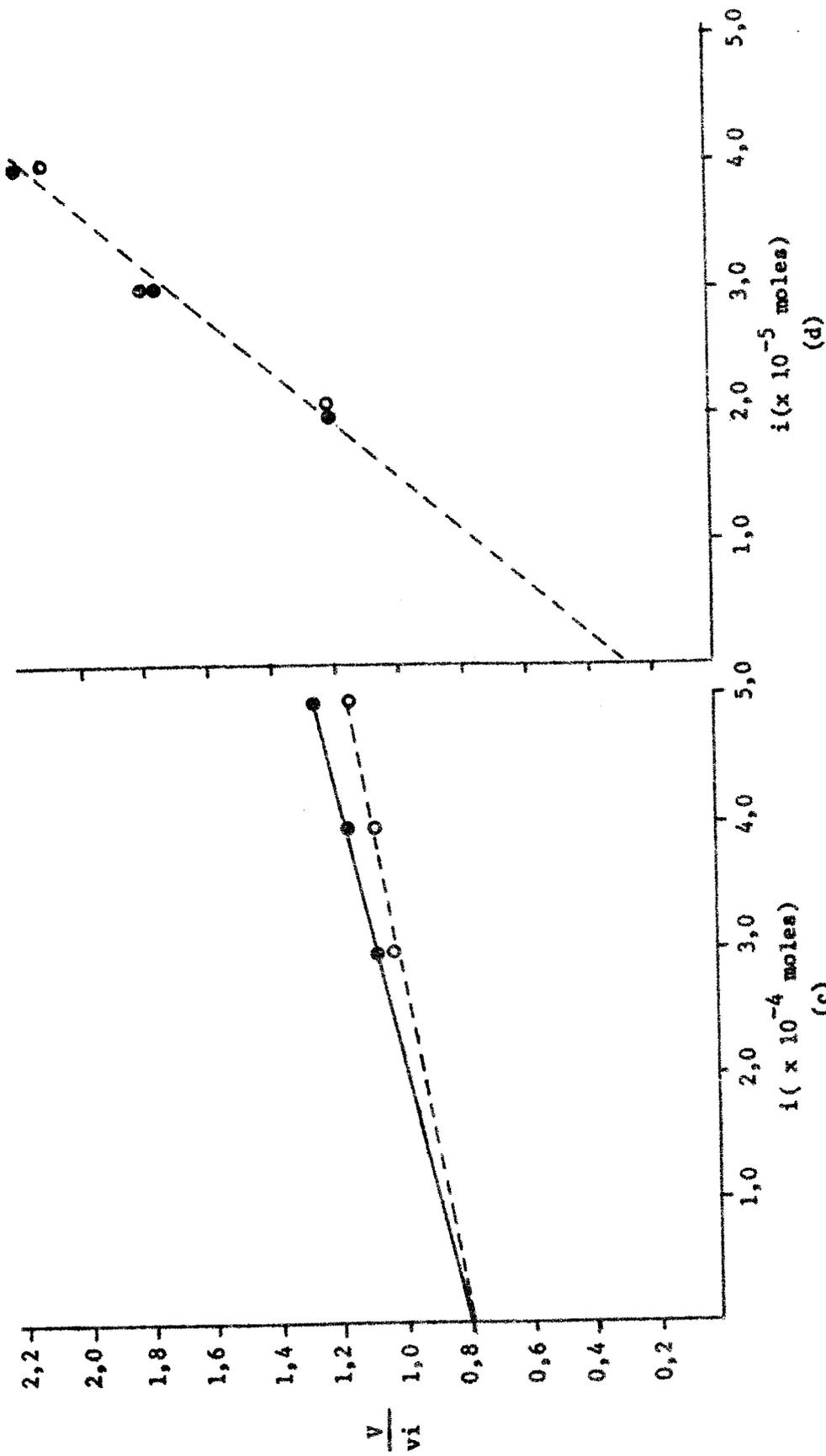


Figura 7. Ação do inibidor. V =velocidade de reação da invertase sem inibidor; v_i =velocidade de reação da invertase com inibidor; i =inibidor, cloreto de mercúrio; $0=6\%$ de solução de sacarose; $a=2\%$ de solução de sacarose; c (à esquerda)=curva da reação competitiva entre invertase solúvel e inibidor; d (à direita)=curva da reação não-competitiva entre invertase insolúvel e inibidor.

Quadro 3. Efeito de cloreto de mercúrio na velocidade de reação

Concentração do inibidor (mol)	Velocidade de hidrólise (moles de glicose/min)	
	Forma solúvel	
	2% de sacarose	6% de sacarose
0,0	$6,2 \times 10^{-5}$	$8,8 \times 10^{-5}$
$5,0 \times 10^{-5}$	$6,8 \times 10^{-5}$	$9,5 \times 10^{-5}$
$3,0 \times 10^{-4}$	$5,7 \times 10^{-5}$	$8,6 \times 10^{-5}$
$4,0 \times 10^{-4}$	$5,3 \times 10^{-5}$	$8,1 \times 10^{-5}$
$5,0 \times 10^{-4}$	$4,8 \times 10^{-5}$	$7,5 \times 10^{-5}$
	Forma insolúvel	
0,0	$5,3 \times 10^{-5}$	$7,5 \times 10^{-5}$
$2,0 \times 10^{-5}$	$4,4 \times 10^{-5}$	$6,2 \times 10^{-5}$
$3,0 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^{-5}$	$4,2 \times 10^{-5}$
$4,0 \times 10^{-5}$	$2,4 \times 10^{-5}$	$3,6 \times 10^{-5}$

Quadro 4. Efeito do ácido iodo-acético na velocidade de reação

Concentração do inibidor (mol)	Solúvel	Insolúvel
	% de atividade	% de atividade
$1,0 \times 10^{-1}$	54	16
$5,0 \times 10^{-2}$	78	33
$2,5 \times 10^{-3}$	94	44
$1,0 \times 10^{-4}$	100	96
0,0	100	100

4.6. Efeito do tempo de incubação

Os resultados referentes ao efeito do tempo de incubação e à atividade enzimica das duas formas de invertase quando aquecidas a 60°C, podem ser observadas na Figura 8.

4.7. Inversão da sacarose

Os dados cinéticos obtidos pela inversão da sacarose pelos dois tipos de invertase encontram-se na Figura 9. Os gráficos foram determinados ao se localizar a atividade enzimica sob a forma de $\log S/(S-P)$ contra o tempo (em minutos) de duração da hidrólise, onde S representa a concentração inicial de sacarose e P- a concentração de sacarose invertida. As temperaturas de incubação empregadas foram 55°C-gráfico (a) e 60°C gráfico (b).

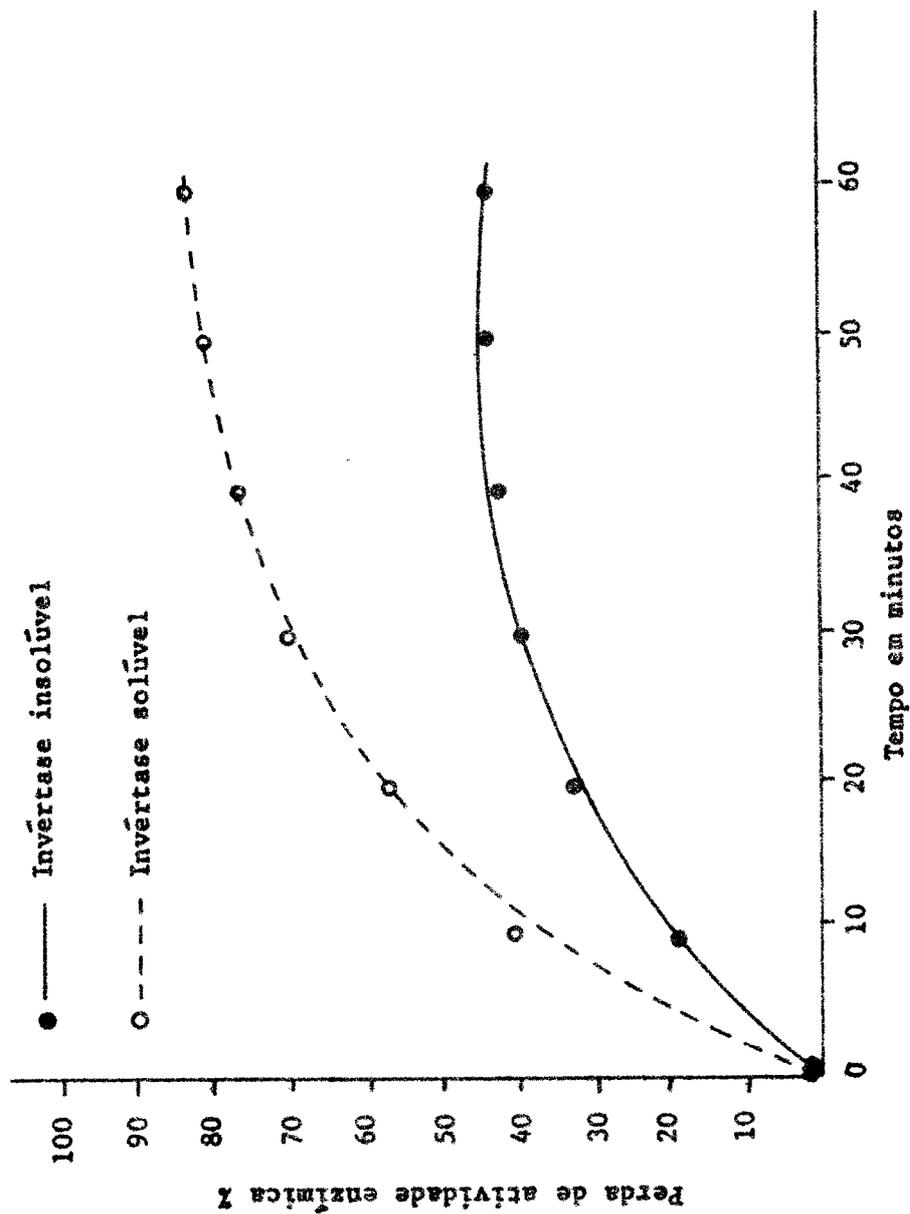


Figura 8. Relação entre atividade enzimica e tempo de incubação a 60°C.

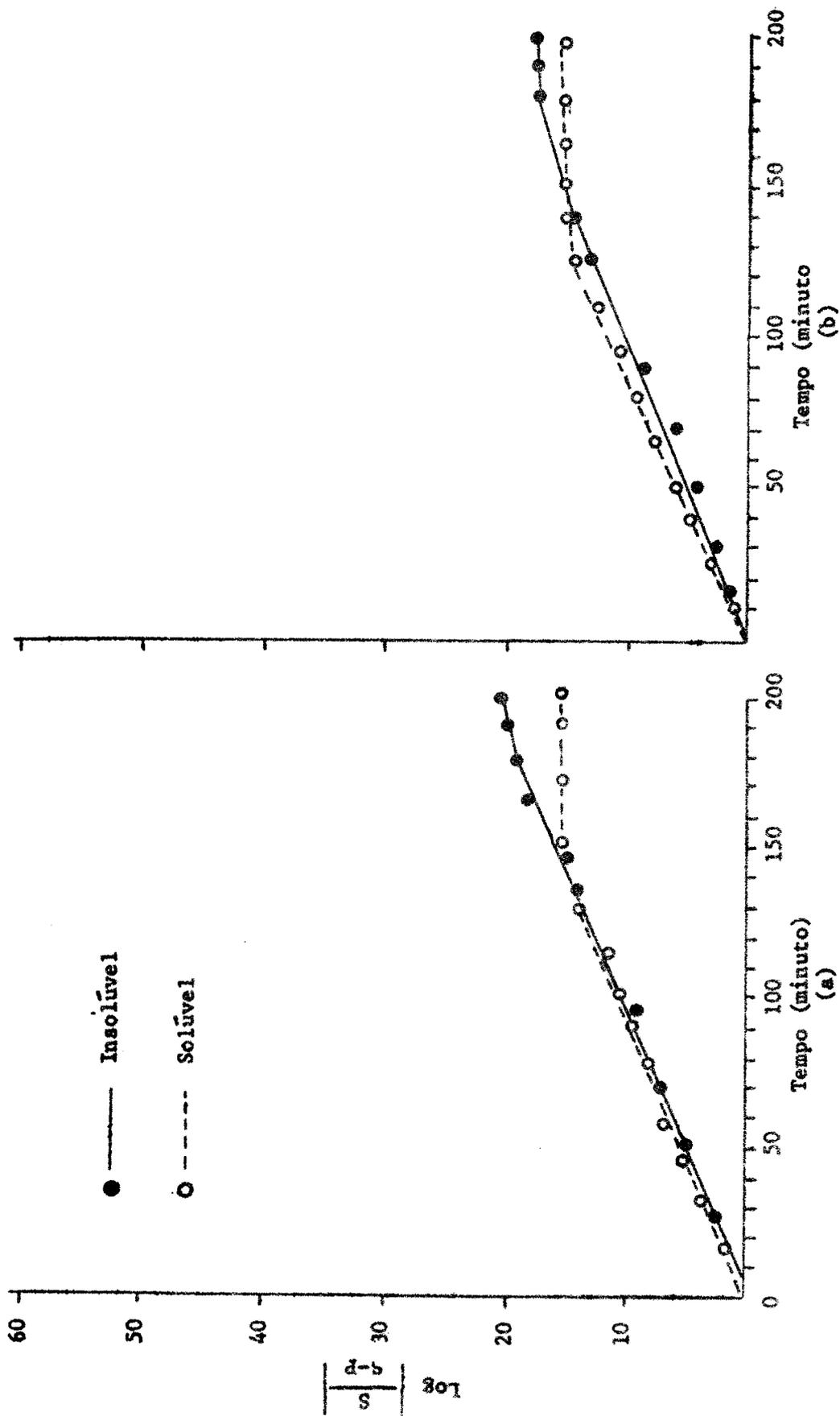


Figura 9. Relação entre tempo e inversão de sacarose pela invertase.

S=concentração inicial de sacarose; P=concentração de sacarose invertida;

(a)=temperatura de incubação 55°C; (b)=temperatura de incubação 60°C.

5. DISCUSSÃO

Sabe-se que uma autólise extensiva é exigida a fim de se extrair a invertase das células de levedura. O enzima está firmemente ligado à estrutura insolúvel da célula e parece que somente reage pela ação de enzimas proteolíticos. Com esse propósito, o fermento foi inicialmente dissolvido em acetato de etila e depois misturado com o mesmo volume de água. Dessa maneira, parte da levedura foi destruída, seus enzimas proteolíticos internos tornaram-se ativos e a invertase foi liberada. Por centrifugação, a fração solúvel foi separada da invertase insolúvel.

Na análise enzimica, não se determina a quantidade de enzima, porém mede-se sua ação sobre um composto químico adequado ou seja o substrato. Para a determinação da atividade da invertase, trabalhou-se com um substrato cristalino e quimicamente definido, a sacarose, a qual por hidrólise se pode dividir em dois compostos químicos já conhecidos, a glicose e a frutose. A formação destes dois compostos define os métodos empregados para a dosagem de invertase. Em nossas experiências, adotamos o método alcalino de redução do cobre por ser o mais simples. A atividade enzimica, portanto, foi expressa em mg de açúcares redutores formados nas condições descritas para cada experiência.

Ao verificarmos a ação catalisadora das formas solúvel e insolúvel de invertase, procuramos utilizar soluções diluídas de tal modo que elas apresentassem a mesma atividade enzimica. Isso foi observado durante a autólise do fermento, cujos resultados são apresentados na Figura 2.

Como pode ser ali visto, a quantidade de invertase solúvel obtida está relacionada com o tempo gasto na autólise. O resíduo depois de centrifugado e lavado pode ser ressuspenseo em água e guardado por vários meses, sem posterior liberação de invertase solúvel. As duas formas assim obtidas apresentaram as mesmas características quanto à atividade enzimica em função do pH e cinética de reação. Com a liberação da forma solúvel, sua atividade aumenta gradualmente. Obviamente, a atividade enzimica da forma insolúvel diminui com o tempo de incubação. As duas formas de enzima utilizadas neste trabalho foram diluídas a um volume determinado, de tal modo que apresentassem a mesma atividade enzimica correspondente ao mesmo valor encontrado na interseção dos dois gráficos.

Na determinação da curva cinética da invertase, Figura 3, observa-se que a velocidade de hidrólise da sacarose aumentou até atingir uma concentração de 0,20 moles por litro de substrato, para a forma solúvel, e de 0,26 moles por litro, para a forma insolúvel. Aumentando-se as concentrações de sacarose acima desses valores, a velocidade de hidrólise sofre um decréscimo. Esse desvio da curva teórica de Michaelis-Menten já foi observado para a forma solúvel de invertase por diversos pesquisadores (54, 2, 3). Nossos resultados conferem com os dados experimentais encontrados por Bowski (12) e Rutchti (62), acrescidos dos parâmetros cinéticos obtidos pela reação de hidrólise da sacarose pela forma insolúvel de invertase. Portanto, durante a hidrólise do substrato pelas duas formas de invertase, a equação cinética de ordem zero para altas concentrações de substrato não foi obedecida, ou seja, não foi obtida a curva teórica proposta por Michaelis-Menten. A explicação para essa discordância foi apresentada recentemente (41), ao se estabelecer o método para o estudo da cinética dessa reação levando em conta o efeito de difusão do substrato, a viscosidade da solução, a concentração de água e a inibição pelo substrato (12). Pela Figura 3, observa-se também que tanto a invertase solúvel, como a insolúvel, apresentaram a mesma ação cinética.

A curva da atividade enzimática em função do pH para as duas formas do enzima está entre pH 3,0 e pH 5,0, sendo também esses os valores nos quais elas se apresentam com maior estabilidade. Como se pode observar, essa curva não depende do grau de pureza da preparação enzimática, uma vez que tanto a forma solúvel, como a insolúvel, apresentaram a mesma curva de atividade-pH. Esses dados comprovam as explicações de Hudson (26) e Myrback (50), ao estudarem a natureza dissociativa da invertase diante de diferentes valores de pH. O máximo de atividade encontrada foi em pH 4,5.

Os primeiros ensaios sobre o efeito da temperatura na atividade da invertase foram apresentados pela primeira vez por Neuberg (55, 56) e, posteriormente, por Myrback (53). Esses pesquisadores comprovaram a termoestabilidade das preparações secas de invertase. As soluções de invertase são rapidamente inativadas quando incubadas a temperaturas superiores a 60°C. Em nossas experiências, a forma insolúvel apresentou maior termoestabilidade que a fração insolúvel. Isso se deve ao fato de que a forma insolúvel pode ser considerada um enzima impuro e, como tal, contém colóides protetores que envolvem sua molécula, tornando-o mais resistente que a forma solúvel.

Como pode ser observado pelos resultados apresentados no Quadro 2 e na Figura 7, o cloreto de mercúrio na concentração de $5,0 \times 10^{-5}$ M atua como ativador da invertase solúvel; nas concentrações entre $3,0 \times 10^{-4}$ M a $5,0 \times 10^{-4}$ M, inibe competitivamente a invertase solúvel; e nas concentrações de $2,0 \times 10^{-5}$ M a $4,0 \times 10^{-5}$ M, inibe não-competitivamente a invertase insolúvel.

Com o ácido iodo-acético (Quadro 3), não foi verificada a ação cinética, mas apenas a inibição do enzima, e verificou-se que para invertase solúvel a atividade era de 96% quando a concentração do inibidor atingiu $1,0 \times 10^{-4}$ M; para a forma insolúvel, a atividade foi de 94% quando a concentração do inibidor era de $2,5 \times 10^{-3}$ M.

A Figura 8 mostra os resultados obtidos quando se relacionou a perda de atividade enzimica e o tempo de incubação. Aqui também pode ser visto que a fração insolúvel mostrou maior estabilidade que a forma solúvel.

Quando se hidrolisam 60% de substrato pelos dois tipos de invertase e quando se determina periodicamente as substâncias reductoras formadas, têm-se os elementos para estabelecer a curva de reação enzimica. Essa reação é monomolecular e mostra, dessa maneira, a cinética de reações de primeira ordem.

Ao se locar a atividade enzimica da invertase sob a forma de $\log S/(S-P)$ contra o tempo em minutos de hidrólise, obtêm-se os gráficos da Figura 9. Por esses gráficos, verificou-se que a 55°C a forma solúvel gastou 150 minutos para completar a hidrólise, e a forma insolúvel, 190 minutos. A 60°C , a invertase solúvel levou 180 minutos para estabilizar-se, enquanto que a insolúvel, 125 minutos. Esses resultados comprovam, mais uma vez, que a forma insolúvel da invertase é mais termoresistente que a forma solúvel.

6. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos, pode-se chegar às seguintes conclusões:

* No estabelecimento da cinética da hidrólise de sacarose, tanto pela invertase solúvel como pela forma insolúvel, verificou-se que havia um decréscimo da atividade enzimica quando eram utilizadas altas concentrações de substrato. Portanto, para ambas as formas do enzima, a cinética da reação não segue a equação de Michaelis-Menten.

* Foram determinados os valores de K_m e V_m para concentrações de substrato abaixo de 0,29 M.

$K_m = 0,043$ M para a forma insolúvel, $K_m = 0,039$ M para forma solúvel e $V_m = 7,95 \times 10^{-5}$ M por litro por minuto, para as duas formas de invertase.

* O pH ótimo para ambas as formas do enzima foi de 4,5 e a faixa onde elas se apresentam com maior estabilidade foi de pH 3,0 a pH 5,0.

* Verificou-se que a invertase insolúvel é mais termoestável que a sua forma solúvel.

* Na determinação da cinética do inibidor, observa-se que o cloreto de mercúrio na concentração de $5,0 \times 10^{-5}$ M atua como ativador da invertase solúvel, e nas concentrações de $3,0 \times 10^{-4}$ M a $5,0 \times 10^{-4}$ M, este reagente inibe competitivamente a forma solúvel. Em baixas concentrações, o cloreto de mercúrio não atua como ativador e inibe não-competitivamente a forma insolúvel.

* A cinética da reação de primeira ordem para a forma insolúvel mostrou um tempo mais prolongado do que a invertase solúvel.

7. LITERATURA CITADA

1. ADAMS, M. & HUDSON, C.S. New methods for the purification of invertase and some properties of resulting products. *J. Am. Chem. Soc.*: 65, 1359-1368, 1943.
2. ALBERT, R., BUCHNER, E. & RAPP, R. Herstellung von Dauerhefe mittels Aceton. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 35, 2376-2382, 1902.
3. ANDERSEN, B. Purification of external invertase from brewers' yeast. *Acta Chem. Scand.* 23 (7): 2270-2276, 1969.
4. _____, THIESEN, N. & BROE, P.E. Transferring activity of fructofuranosidase. *Acta Chem. Scand.* 23 (7): 2367-2374, 1969.
5. A.O.A.C. Official Methods of Analysis of the Assoc. of the Assoc. of Agric. Chem. p.539. 8th ed. The Association, Washington 1955.
6. AUDEN, A.H. & DAWSON, E.R. The hydrolysis of concentrated sugar solutions by invertase. *Biochem. J.* 25: 1909-1916, 1931.
7. BACON, D.S.J. The oligosachacarides produced by the action of yeast invertase preparations on sucrose. *Biochem. J.* 57: 320-328, 1954.
8. _____, Methods for measuring transglycosylase activity of invertases. *In Methods in Enzimology*, Academic Press, N.Y., vol.I, p. 258-262, 1955.
9. _____, & EDELMAN, J. The action of invertase preparations. *Arch. Biochem.* 28: 467-468, 1950.
10. BERTHELOT, M. Sur la fermentation glucosique du sucre de canne. *Comp. rend. Acad. Sci.* 50: 980-984, 1860.
11. BLANCHARD, P.H. & ALBON, N. The inversion of sucrose: a complication. *Arch. Biochem.* 29: 220-222, 1950.
12. BOWSKI, L.; SAINI, R., RYU, D.Y. & VIETH, W.R. Kinetics modeling of the hydrolysis of sucrose by invertase. *Biotech. Bioeng.* 13: 641-656, 1971.
13. CAHIB, E. Paper chromatography of some enzymes and the plasma proteins. *Biochem. Biophys. Acta* 8: 607-614, 1952.
14. EDELMAN, J. Transfer reactions catalyzed by some sucrase preparations. *Biochem. J.* 57: 22-33, 1954.
15. EULER, H. von & JOSEPHSON, K. The activity of invertase. *Arkiv. Kimi Miner. Geol.* 9 (4) 6pp 1923.

16. EULER, H. von & JOSEPHSON, K. & MYRBACK, K. Zur Berechnung der Aktivitäts-pH Kurve der Succharase. Z. Physiol. Chem. 134, 39-49, 1924.
17. _____, & LAURIN, I. Über die Temperaturkoeffizienten der Saccharasewirkung. Z. Physiol. Chem. 110: 55-61, 1920.
18. FRENCH, D., Wild, G.M., YOUNG, B. & JAMES, W.J. Constitution of planteose. J. Am. Chem. Soc. 75: 709-712, 1953.
19. _____, _____, & JAMES, W.J. Constitution of stachiose. J. Am. Chem. Soc., 75: 3664-3666, 1953.
20. GASCON, S. & LAMPEN, J.O. Purification of the internal invertase of yeast. J. Biol. Chem. 243, 1567-1572, 1968.
21. _____, & OTTOLENGNI, P. Invertase isozymes and their localization in yeast. Comp. rend. Trav. Lab. Calsberg, 36: 85-93, 1967.
22. GEMMIL, C.L. & BOWMAN, E.M. Effect of mercurial compounds on invertase. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 100: 244-249, 1950.
23. GROSS, D. Paper eletrophoresis of the oligossaccharides synthesized from sucrose by yeast invertase. Nature, 173: 487-489, 1954.
24. HUDSON, C.S. The inversion of cane sugar by invertase (I) J. Am. Chem. Soc. 30: 1160-1166, 1908.
25. _____, A review of discoveries on the mutarotation of the sugars. J. Am. Chem. Soc. 32: 889-895, 1910.
26. _____. Inversion of sucrose by invertase, VI. J. Am. Soc. 32: 1220-1222, 1910.
27. _____. Kinetics of the inversion of sucrose by invertase. Orig. Com. 8th Intern. Congr. Appl. Chem. (appendix) 25:375, 1914.
28. _____, & HARDING, T.S. Preparation of raffinose. J. Am. Chem. Soc. 36: 2110-2114. 1914.
29. _____, & SHERWOOD, S.F. Occurrence of melezitose in honey. J. Am. Chem. Soc. 42: 116-125, 1920.
30. JANSSEN, F. The evolution of rolled creams. M. Confectioner, 40 (2), 25-28, 1960.
31. _____. Invertase and cast cream centers. M. Confectioner, 40 (4), 41-44, 1960.
32. JOSEPHSON, K. The purification of yeast invertase. Ark. Kemi Mineral. Geol. 8 (26), 21pp 1923.
33. _____. The afinity of sucrose for various sugars. Z. Phisiol. Chem. 134: 50-67, 1924.

34. KOHLAND, D.E. & STEIN, S.S. Correlation of bond breaking with enzyme specificity. Cleavage point of invertase. *J. Biol. Chem.*, 208: 139-148, 1954.
35. KUHN, R. Uber Spezifitat der Enzyme. II-Saccharase und Raffinasewirkung des Invertins. *Z. physiol. Chem.*, 125: 28-31, 1923.
36. _____. Uber Spezifitat der Enzyme. III-Die Affinitat der Enzyme zu stereoisomeren Zuckern. *Z. physiol. Chem.* 127: 234-238, 1923.
37. _____, & GRUNDHERR, G.E.V. Constitution of melezitose and turanose. *Ber Deutsh. Chem. Ges.* 59: 1955-1964, 1926.
38. LAIDLER, K.J. Kinetic laws for surface reaction in flow systems. *Can. J. Chem.*, 36: 1081-1088, 1958.
39. _____. Eletron-transfer process in aqueous solutions. *Can. J. Chem.*, 37: 137-147, 1959.
40. LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determinations of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56: 658-666, 1934.
41. MACLAREN, A.D. IV-Kinetics of yeast β -fructofuranosidase activity. *Enzimol.* 26: 1-13, 1963.
42. MEISTER, H. Yeast Invertase-An elusive but useful enzyme. *Wallerstein Laboratories Communications*, 28: (95), 7-15, 1965.
43. MICHAELIS, L. & DAVIDSOHN, H. Action of hydrogen ions on invertase. *Biochem. Z.* 35: 386-412, 1911.
44. _____, & MENTEN, M.L. Kinetics of invertase action. *Biochem. Z.* 49: 333-369, 1913.
45. _____, & ROTHSTEIN, M. Theory of invertase action. *Biochem. Z.* 110: 217-233, 1920.
46. MYRBACK, K. The inactivation of invertase by heavy metals. *Ark. Kimi Mineral. Geol.*, 8 (29), 37pp 1923.
47. _____. The inactivation of invertase by amines. *Ark. Kimi Mineral. Geol.* 8 (32), 11pp 1923.
48. _____. The properties of a highly active invertase preparation. *Ark. Kimi Mineral. Geol.* 9 (2), 6pp 1923.
49. _____. Compounds of some enzymes with inactivation substances. *A. Physiol. Chem.*, 158: 160-301, 1926.
50. _____. Activity and stability of yeast invertase in acid solutions. *Soc. Biol. Chemists India* 204-210, 1955.
51. _____. Studies on yeast invertase. *Arch. Biochem. Biophys.* 69: 138-148, 1957.

52. MYRBACK, K. Invertases-"The Enzymes": 379-396 ed. by BOYER & LARDY & MYRBACK 2nd edit. Academic Press, N.Y. 1960.
53. _____, & SCHILLING, W. Studies on yeast β -fructofunases. *Enzimol.*, 29: 306-314, 1965.
54. NELSON, J.M. & SCHUBERT, P.M. Water concentration and the rate of hydrolysis of sucrose by invertase. *J. Am. Chem. Soc.* 50:2188-2193, 1928.
55. NEUBERG, C. The biochemistry of yeast. *Ann.Rev.Biochem.* 15: 435-474, 1946.
56. _____, & MANDL, I. Invertase-"The Enzymes" 517-526, 1st edit.vol.I. Edited by BOYER, LARDY & MIRBACK, Academic Press N.Y. 1950.
57. _____, & ROBERTS, S.I. "Invertase-A Monograph" Scientific Report Serie n^o 4, 1-9, ed. by Sugar Research Foundation, Inc. N.Y. 1946.
58. NEUMANN, N.P. & LAMPEN, J.O. Purification and properties of yeast invertase. *Biochem.* 6: 468-475, 1967.
59. O'SULLIVAN, C. & THOMPSON, F.W. Invertase, a contribution to the history of an enzyme or unorganised ferment. *J. Chem. Soc.* 57: 834-931, 1890.
60. PAYEN, A. & PERSOZ, J. Memoire sur la diastase les principaux produits de ses reations et leurs applications aux arts industriels. *Ann. Chim. Phys.* 53: 73-90, 1833.
61. REED, G. Invertase In *Enzymes in Food Processing*: 102-108, 370-372 edit. by ANSON, MRAK, CHICHESTER & STEWART. Academic Press, N.Y. 1966.
62. RUCHTI, J. & MACLAREN, A.D. Kinetics of yeast β -fructofuranosidase activity in viscous media. *Enzimol.* 27: 186-198, 1964.
63. SATTLER, L. & ZERBAN, F.W. The nature of glicose Sugar, 39(2),28-29, 1944.
64. SMALT, S.M.A., KREKE, W.C. & COOK, J.E.S. Inibition of enzymes by Phenylmercury compounds. *J. Biol. Chem.*, 224: 999-1004, 1957.
65. SOMOGYI, M. A new reagent for the determenation of sugars. *J. Biol. Chem.* 160: 61-68, 1945.
66. SOROSEN, S.P.L. Enzymes Studies II. *Biochem. Z.* 160: 61-68, 1945.
67. SUMNER, J.B. & HOWELL, S.F. A method for determenation of invertase activity. *J. Biol. Chem.* 108: 51-54, 1935.
68. WALLERSTEIN, L. Invertase preparation from yeast. U.S. Patent 1 919 675, july, 25: 1933.

69. WEIDENHAGEN, R. Determination of the activity of commercial invertase preparation. Z. Ver. deut. Zuckerind, 82: 992-999, 1932.
70. WHELAN, W.J. & JONES, D.M. D-methyl fructoside as a substrate in transfructosylation. Biochem. J. 54-XXXIV 1953.
71. WILLSTATTER, R., SCHNEIDER, K. & BAMANN, E. Zur Kenntnis des invertins. Z. Physiol. Chem. 147: 248-274, 1925.
72. _____, & RACKE, F. Zur Kenntnis des invertins. Ann. Chem. 425: 1-135, 1921.
73. ZERBAN, F.W. & GAMBLE, C.A. Effect of reversion products and amino compounds on sucrose determination in cane products. Ind. Eng. Chem. Anal. Edit. 5: 34-35, 1933.

AGRADECIMENTOS

Somos profundamente gratas ao Dr. Yong K. Park, pelo seu apoio como orientador desta tese.

Os meus agradecimentos são extensivos a todos aqueles que, direta ou indiretamente, prestaram sua colaboração para que este trabalho pudesse ser realizado.

Iacy S. Draetta