MICHELE VITOLO

Extração de invertase solúvel a partir de levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*).

Dissertação apresentada ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de mestre em Tecnologia das Fermentações.

Orientador:
Prof. Dr. Bruno Carlos de Almeida Cunha

São Paulo
1979

"Cada descoberta nova da ciência é uma porta nova pela qual encontro mais uma vez Deus".

(EINSTEIN)

Aos meus queridos pais

Ersilio e Enrichetta

minha gratidão.

Ao Prof.Adjunto

Dr. Bruno Carlos de Almeida Cunha,

cuja orientação segura e dedicação

tornaram possivel este trabalho.

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Dr. Eugênio Aquarone, a quem devo o convite para ingressar na Universidade de São Paulo, por todo o apoio que me tem dado.

- À Inês Imperatriz, pela revisão das referências bibliográficas.

- A todos aqueles que direta ou indiretamente me auxiliaram na execução deste trabalho.

ÍNDICE

Pág.

1. INTRODUÇÃO 1

1.1 Generalidades 1

1.2 Algumas informações sobre leveduras 2

1.2.1 Classificação sistemática 2

1.2.2 Dados gerais 2

1.3 Invertase de levedura de panificação 6

1.3.1 Breve histórico 6

1.3.2 Localização 6

1.3.3 Biossíntese 8

1.3.4 Extração e purificação 9

1.3.5 Determinação da atividade 10

1.3.6 Propriedades 10

1.4 Usos 13

1.5 Objetivos 15

2. MATERIAIS E MÉTODOS 17

2.1 Materiais 17

2.1.1 Equipamentos de laboratório 17

2.1.2 Matéria prima 17

2.1.3 Reagentes analíticos 17

2.1.4 Soluções reagentes 18

2.2 Métodos 20

2.2.1 Dosagem de proteína 20

2.2.2 Dosagem de açúcares redutores 21

Pág.

2.2.3 Medida da atividade enzimática 22

2.2.4 Preparação dos extratos enzimáticos.... 23

2.2.4.1 Secagem da levedura (conforme VILLELA et al (89)) 23

2.2.4.2 Obtenção do autolisado (conforme VILLELA et al (89))..... 23

2.2.4.3 Obtenção do pó acetônico (conforme HESTRIN et al (45)) 24

2.2.5 Efeito da agitação sôbre a liberação da invertase 24

2.2.6 Influência da temperatura de autólise sôbre o teor de atividade invertásica do autolisado 24

2.2.7 Efeito da pressão osmótica sôbre o teor de atividade invertásica do autolisado 25

2.2.8 Efeito de tensoativos sôbre a liberação da invertase na autólise 26

2.2.9 Efeito do EHL sôbre a eficiência da precipitação da invertase com acetona 26

2.2.10 Influência do agente autolisante sôbre a atividade invertásica do autolisado.. 26

2.2.11 Medida da viscosidade 27

2.2.12 Influência da viscosidade da solução substrato sôbre a atividade da invertase 28

Pág.

2.2.12.1 Soluções com diferentes concentrações de sacarose 28

2.2.12.2 Soluções com diferentes viscosidades e teor de sacarose constante 28

2.2.13 Determinação do Número de Reynolds ... 28

2.2.14 Medida do número de Froude 29

2.2.15 Medida da condutividade 29

2.2.16 Medida da densidade 30

2.2.17 Determinação gráfica de K_m e $V_{máx}$ 30

3. RESULTADOS 32

3.1 Tabelas 32

3.2 Figuras 40

4. DISCUSSÃO 87

4.1 Tipo de agitação 87

4.2 Determinação dos números de Reynolds e Froude 88

4.3 Efeito da temperatura 94

4.4 Efeito da pressão osmótica e natureza do sal sôbre o teor de atividade invertásica do autolisado 94

4.5 Possível uso de medidas condutimétricas para contrôle do processo 99

4.6 Efeito de tensoativos sôbre a liberação de invertase 102

4.7 Efeito do EHL sôbre a eficiência da precipitação da invertase com acetona 104

Pág.

4.8 Considerações sôbre os parâmetros cinéticos da invertase 108

4.9 Influência da viscosidade da solução substrato 116

5. CONCLUSÕES 121

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 124

1. INTRODUÇÃO

1.1 GENERALIDADES

A sacarose é um dissacarídeo não redutor, que por hidrólise libera uma molécula de glicose e uma de frutose. A solução original de sacarose é dextrógira. Contudo ao ser hidrolisada passa a ser levógira devido à liberação da frutose. A este fenômeno dá-se o nome de inversão da sacarose.

A hidrólise da sacarose pode ser catalisada por duas enzimas diferentes: a alfa-D-glicosidase (EC 3.2.1.20) e a beta-fructofuranosídeofrutohidrolase (EC.3.2.1.26). Embora em ambos os casos ocorra inversão, apenas a segunda delas recebeu o nome de invertase, sacarase ou invertina.

A invertase e a alfa-D-glicosidase são distinguidas pelo diferente mecanismo de catálise que apresentam, pois esta rompe a ligação osídica pelo lado da unidade de glicose, enquanto que aquela rompe-a pelo lado da frutose.

A principal fonte de invertase é uma espécie de levedura o *Saccharomyces cerevisiae* (76). Contudo esta enzima poderá também, ser encontrada em: invertebrados, principalmente nas abelhas (62),(63), (74); vertebrados (68); algas verdes (68); bactérias das espécies *E. coli* e *Thermobacterium mobile* (38), assim como em bactérias patogê-

nicas (92); fungos (79) e algumas espécies vegetais (1).

1.2 ALGUMAS INFORMAÇÕES SOBRE LEVEDURAS

1.2.1 Classificação sistemática

A levedura de panificação pertence ao grupo das leveduras ascosporogênicas da classe Ascomycetes, sub-classe Hemyascomycetes, ordem Endomycetales, família Saccharomycetaceae, sub-família Saccharomycoidae, gênero Saccharomyces Meyen emend. Reess e à espécie Saccharomyces cerevisiae Hansen 1883 (91).

1.2.2 Dados gerais

As leveduras foram observadas pela primeira vez por van Leeuwenhoek, sendo, contudo, mais tarde descritas por Cagnard de la Tour, como seres de forma arredondada e que se reproduzem por brotamento. Esta descrição simples, no entanto, engloba várias leveduras. Observações mais apuradas mostram que as formas e os tipos de reprodução são variados.

As leveduras apresentam a reprodução vegetativa, que pode ser de três tipos: a) gemulação, b) septação, c) gêmula-septação. No caso do S. cerevisiae verifica-se o tipo a.

Muitas vêzes as leveduras podem esporular, dependendo das condições ambientais em que se encontram.

As leveduras formam esporos tanto sexuados como assexuados (blastosporos, artrosporos e clamidosporos).

Quando a levedura forma esporos sexuados, apresenta uma metagênese nítida, com as fases diplóide e haplóide alternando-se. Disto resulta a possibilidade de se dividir as leveduras em dois grandes grupos, conforme o cariótipo da fase vegetativa: haplóides e diplóides.

Para a espécie S. cerevisiae, que é uma levedura de fase vegetativa diplóide, a metagênese ocorre do seguinte modo: os cromossomos homólogos da célula diplóide pareiam e ficam intimamente unidos. A seguir dividem-se longitudinalmente, formando a tétrade, que por sua vez se divide em duas díades. Neste ponto termina a primeira fase da meiose. Na segunda os centrômeros respectivos dividem-se, dando quatro cromossomos, constituindo cada um deles um núcleo haplóide. Por último o citoplasma se distribui ao redor de cada cromatídeo, começando a se formar a parede do esporo, que logo depois se consolida. O asco se rompe e um dos ascosporos divide-se vegetativamente algumas vêzes. A seguir ocorre a cariogamia, restabelecendo-se a fase diplóide.

A célula de levedura é constituída pelas seguintes estruturas: parede celular, membrana citoplasmática, núcleo, um ou mais vacúolos, mitocôndrias, glóbulos de gordura, grânulos de volutina e citoplasma (76).

A parede celular, que é responsável pela forma da célula de levedura, é constituida pelas seguintes substâncias: glucana (30 a 35%), manana (30%), proteínas (6 a 8%), lípides (8,5 a 13,5%), material inorgânico (1 a 7%) e quitina (1 a 2%) (76). As quantidades percentuais são expressas em relação ao peso seco da parede.

Na superfície da parede encontram-se uma ou mais "cicatrizes", que resultaram da separação do broto. Numa célula de S. cerevisiae podem ser encontrados de 9 a 43 pontos de brotamento, sendo em média 24. Na maioria das leveduras comuns, tais como às do gênero Saccharomyces, não se formam dois ou mais brotos no mesmo ponto.

Sob condições ideais uma célula de levedura pode duplicar-se num período compreendido entre 1 e 2 horas. Mas após a formação de muitos brotos, o tempo de geração aumenta, podendo chegar até 6 horas.

No gênero Saccharomyces não existe cápsula. Esta estrutura, porém, é encontrada em outros gêneros como Hansenula, Cryptococcus. Nas células em que aparece, a cápsula é constituída básicamente por fosfomanas, heteropolissacarídeos e substâncias análogas a esfingolipídeos.

A membrana citoplasmática localiza-se sob a parede celular desempenhando importante papel na permeabilidade seletiva da célula e no transporte de nutrientes. É composta de proteína, lípides e ácido ribonucleico.

O núcleo apresenta uma carioteca dupla com muitos poros, provàvelmente para facilitar a troca de substâncias intra e extranucleares. No seu interior encontram-se os cromossomos.

Durante a gemulação o núcleo divide-se através de um processo de constricção. A cromatina divide-se no interior do núcleo e se distribui entre os núcleos resultantes.

Existe um ou mais vacúolos de tamanhos variáveis, possuindo, ocasionalmente, grânulos de volutina.

A célula de levedura possui as mitocôndrias, cujo número varia entre 4 a 20. No caso do S. cerevisiae estas organelas respiratórias dispõem-se na periferia da célula.

Os glóbulos lipídicos nada mais são do que gorduras espalhadas no interior do citoplasma. Nas células do gênero Saccharomyces existem em pequeno número.

No citoplasma encontramos material granular, constituído por glicogênio, além de proteínas e ácido ribonucleico. A existência de retículo endoplasmático ainda não foi confirmada.

1.3 INVERTASE DE LEVEDURA DE PANIFICAÇÃO

1.3.1 Breve histórico

A invertase pode ser tida como a primeira das carboidrases a ser estudada.

Sua história se inicia por volta de 1828, quando DUMAS & BOULLAY (68) demonstraram que a fermentação da sacarose por leveduras ocorria, apenas, quando a água estava presente. Em 1833 PERSOZ descobriu a ação invertásica da levedura (68). Alguns anos após BERTHELOT(18) precipitou-a com etanol a partir de extratos de levedura.

Desde então a invertase motivou inúmeros pesquisadores. Cremos que o estabelecimento de vários conceitos básicos de bioquímica, provieram direta ou indiretamente dos estudos realizados sobre esta enzima. Como exemplo, pode-se citar o trabalho de MICHAELIS & MENTEN (58), no qual realizaram estudos sobre a ação da invertase, resultando a proposição de um modelo matemático que forneceu as grandezas K_S e $V_{máx}$. Estes parâmetros mostraram-se extremamente úteis para a caracterização cinética das enzimas.

1.3.2 Localização

Em geral a invertase produzida pela levedura não é liberada para o meio, mas fica retida na célula. Contudo WICKERHAM (93) cita algumas espécies de leveduras nas quais a invertase é extracelular.

DEMIS (30) baseado na similaridade entre os perfis das curvas de atividade x pH das invertases solúvel e insolúvel, bem como na distribuição da sacarose, glicose e frutose entre os meios intra e extracelular, concluiu que a invertase se localiza na superfície da célula.

PREISS (77) determinou a atividade invertásica de levedura após as células terem sido irradiadas com elétrons de baixa voltagem. Concluiu que a maior parte da invertase se estende radialmente a partir da face externa da parede numa faixa entre 500 e 1000 Å.

Uma prova direta da localização externa da invertase foi obtida por vários autores, através da observação de que protoplastos de levedura não possuiam atividade invertásica. A parede celular foi removida por meio da digestão das células com extrato de vísceras de caracol ou com preparados enzímicos microbianos (22), (34), (71), (85).

HOSHINO (47) e GASCON (39) lograram êxito em isolar e purificar uma forma de invertase, a qual se localiza no interior do citoplasma. O seu peso molecular é de 135000 e não está associada a carboidrato. A invertase extracitoplasmática, contudo, tem peso molecular próximo de 270000 e está unida à manana. As evidências indicam que a invertase intracelular se localiza nos vacúolos (53).

A invertase externa pode ser liberada de células de S. fragilis e S. mellis (mas não de S. ce-

revisiae) com compostos tiólicos (51). Isto sugere que nestas espécies de levedura a enzima está retida junto à parede de tal maneira que as ligações dissulfídicas desempenham relevante papel (51). Certamente no caso do S. cerevisiae a natureza da ligação que une a invertase à parede não envolve ligações sulfeto.

RODRIGUEZ (78), valendo-se de um método de fracionamento celular, o qual permitiu-lhe obter sub-frações celulares com alto grau de pureza, corroborou os resultados acima. Além disso discute a possibilidade de ambas as formas de invertase serem interdependentes, isto é, uma forma ser precursora da outra.

De tudo isto conclui-se que a invertase externa está ou dentro da parede celular ou entre esta e a membrana citoplasmática. E a natureza da ligação invertase-parede é diferente entre as várias espécies de leveduras.

1.3.3 Biossíntese

A formação de invertase pelas leveduras é controlada por hexoses através do mecanismo da repressão catabólica. Os efeitos dos vários níveis e tipos de açúcares, que exercem regulação foram extensivamente estudados (29),(31),(84).

Um fato interessante é que o nível de invertase interna varia muito pouco com as alterações dos níveis de glicose no meio (39),(78).

Contudo a relação biossintética entre a invertase interna e a externa permanece obscura.

1.3.4 Extração e purificação

Desde 1860, quando Berthelot obteve invertase através da precipitação etanólica, diversos métodos análogos foram empregados na obtenção de invertase a partir de leveduras. NELSON (64) fez uma excelente e completa revisão deste ítem até 1932.

Nos anos subsequentes os trabalhos relacionados ao tema utilizam técnicas bioquímicas bem mais refinadas: filtração em gel, cromatografia de troca iônica, eletroforese em gel e "electrofocusing" (5),(7),(13),(36),(39),(88),(90).

A tendência atual para a extração de invertase consiste na utilização de processos mecânicos para a ruptura das células. O objetivo é minimizar a degradação e o tempo de extração da enzima. Segundo NEUMANN (69) outra razão seria a de evitar a liberação de isoenzimas, que dificultariam a purificação da enzima.

FOLLOWS et al (37) conseguiu romper células de levedura em 90 min. pelo uso de um homogeneizador (Manton-Gaulin, Mod. 15 M- 8 BA), perdendo pouco da atividade enzimática inicial. As condições operacionais usadas foram: 460 Kgf/cm^2, 270 Kgf/cm^2 e 30^oC.

Apesar de todos os esforços, ainda, não se conseguiu preparar invertase cristalina e pura.

1.3.5 Determinação da atividade

A atividade invertásica tem sido avaliada através da medida dos produtos de hidrólise da sacarose.

Utilizam-se tanto métodos físicos, dentre os quais a polarimetria, como químicos, que consistem na determinação de açúcares redutores (45).

Recentemente tem-se usado o método da glicose oxidase para estimar a glicose formada (39),(27). Este método tem as vantagens de ser simples, automatizável e minimizar os êrros devido à ligeira atividade sintetásica que a invertase possui.

DARBYSHIRE (28) em recente trabalho preconiza o uso da cromatografia a gás para avaliar a atividade glicosiltransferásica de preparados enzimáticos.

1.3.6 Propriedades

NEUMANN *et al* (69)(70) e BERGGREN (12) concluiram que o peso molecular da invertase externa é de 270000 ± 11000 daltons e com constante de sedimentação igual a 10,4S. Segundo os mesmos autores existem aproximadamente trinta cadeias de manana ligadas à proteína através de ligações glicosamil-asparagina.

As invertases interna e externa além de diferirem quanto à localização celular, também diferem na estrutura primária. Possuem quantidades distintas de glicina, tirosina, cisteína e histidina (5),(39).

A invertase extracitoplasmática é muito estável, quando deixada em contato com os produtos da autólise. Ressalta-se que a estabilidade decresce à medida que a pureza da enzima aumenta (66), (67).

Conforme DRAETTA (33) a faixa ótima de pH está entre 4 e 5. Contudo em pH igual a 3 a invertase possui 80% da atividade caindo à metade em pH 8.

À temperaturas abaixo de 40°C a perda de atividade da invertase em solução é inferior a 5%. Porém para valores acima de 40°C a queda de atividade se acentua, até perder-se 80% da mesma à 60°C (33). Quando seca, contudo, a invertase é muito resistente ao calor, conforme se pode depreender dos dados de EYRING (35) e SIZER(81).

Há várias substâncias que inibem a invertase. Dentre as inorgânicas citam-se os íons: prata, mercúrio, zinco, cobre e iodeto; entre as orgânicas temos: anilina, o,m,p-toluidina, tri-cloro e tri-bromo anilinas, ácido aminobenzóico, ácido sulfanílico (68) e ácido iodoacético (33).

Com relação aos tipos de inibição que cada uma delas apresenta, ainda existem controvérsias. Contudo para os casos dos íons mercúrio e zinco, já foi bem estabelecido que aquele inibe reversível e competitivamente a invertase (33),(49), enquanto este reversível e não competitivamente (60). BERGGREN (13) postula que o íon mercúrio une duas moléculas de proteína enzimática, formando um dímero.

Para as substâncias orgânicas é conclusivo o trabalho de TRACEY (87) sobre a inibição não competitiva e reversível da anilina. DRAETTA (33) realça o efeito inibitório do ácido iodo acético, sem contudo identificar o tipo de inibição.

Além dos inibidores acima devem ser lembrados aqueles que ocorrem naturalmente, inclusive coexistindo com a enzima na fonte. Embora se conheça muito pouco sobre tais substâncias, vale a pena citar o recente trabalho de ANDERSON (9), que logrou êxito parcial na purificação de um composto, aparentemente de natureza protéica, a partir de tuber de batata.

O substrato para a invertase deve necessariamente possuir um resíduo beta-D-fructofuranosil não substituído (41). GOTTSCHALK (41) concluiu que a enzima combina-se, primáriamente, com este grupo através do oxigênio osídico e dos grupos hidroxila dos carbonos 6 e 3. Ainda segundo este autor, talvez haja alguma interação com a hidroxila do carbono 2 da glicose, visto ser a sacarose o substrato de preferência.

No momento é perfeitamente aceito o fato de que a ruptura da ligação osídica se dá pelo lado do grupo beta-fructofuranosil (52).

O mecanismo da catálise invertásica pode ser assim esquematizado (6),(8):

$$EH + GOF \rightleftarrows EF + GOH \qquad (1)$$

$$EF + HOH \rightleftarrows EH + FOH \qquad (2)$$

$$EF + XOH \rightleftarrows EH + XOF \qquad (3)$$

onde:

E = enzima

GOF = sacarose

GOH = glicose

FOH = frutose

XOH = qualquer receptor de grupo osídico

BERGGREN (15),(16),(17) demonstrou conclusivamente a existência de isoenzimas da invertase, apresentando, além disto,evidências de que são interconversíveis.

1.4 USOS

Dentre as várias aplicações preconizadas para a invertase destacam-se:

a) em produtos para higiene da cavidade oral, a fim de evitar a formação de placas dentais ou a remoção das mesmas (11),(50).

b) Na fabricação de melaço invertido (73), (10).

c) Na fabricação de xarope glicose-frutose (43),(44).

d) Em confeitaria para a fabricação de bombons com o miolo liquefeito (48),(56).

A fabricação de xarope glicose-frutose ou de açúcar invertido reveste-se de grande importância industrial, apresentando as vantagens de possuir um índice de dulçor superior ao de uma solução de sacarose e dos

seus constituintes não cristalizarem, quando usado em concentração elevada.

A inversão da sacarose pode ser feita quer por via ácida quer enzimática pelo uso da invertase.

Atualmente o método de hidrólise ácida é muito usado nos Estados Unidos enquanto que o enzimático é utilizado por alguns fabricantes europeus e japoneses (40).

Cada um dos métodos referidos possui vantagens e desvantagens. Assim para a hidrólise enzimática temos as vantagens: custo baixo do catalizador, alta percentagem de conversão, tempo de residência menor no reator em relação ao método químico, a solução do açúcar invertido se apresenta incolor e a temperatura do processo é mais baixa. Como desvantagens temos: ao se empregar a enzima na forma livre deve-se necessáriamente usar o processo de batelada, a enzima usada num lote não pode ser aproveitada no seguinte, alta sensibilidade à presença de inibidores.

A hidrólise ácida por sua vez tem as vantagens: custo baixo do catalisador, facilidade em se usar reator tubular em processo contínuo. As desvantagens são: percentagem de conversão mais baixa exigindo por isso um tratamento prévio da matéria prima, o tempo de residência no reator é elevado, a solução de açúcar invertido apresenta-se colorida e a temperatura do processo é mais alta.

Comparando-se ambos os processos, vemos que para o futuro a utilização de invertase tenderá a substituir o ácido, pois aquele só apresenta duas desvantagens. Acreditamos que o fator limitante, ainda seja a possibilidade de tornar o processo contínuo, visto que a presença de inibidores pode ser eliminada, se ao mosto for adicionado agente quelante (EDTA, por exemplo), pois os inibidores mais sérios seriam os íons de metais pesados

Para contornar o problema do tipo de processo (batelada ou contínuo) o desenvolvimento da tecnologia de enzimas imobilizadas, provávelmente possibilitará tornar o processo contínuo. Aliás, já existem estudos sobre a preparação de açúcar invertido por este método (40),(61).

1.5 OBJETIVOS

1 - Determinação de fatores de escala.

2 - Aprimorar o processo autolítico de extração da invertase a partir de células de levedura (*S. cerevisiae*), considerando os aspectos:

- tipo de agitação;
- regime de fluxo do fluido autolisante;
- temperatura de autólise;
- natureza do agente autolisante;
- efeito da pressão osmótica;

- efeito da presença de tensoativos não iônicos.

3 - Estudar a possibilidade do uso da condutometria como parâmetro de controle do processo.

4 - Aumentar o rendimento em invertase do pó acetônico obtido a partir do sobrenadante pícrico, variando o EHL do sistema.

5 - Comparar quatro métodos gráficos entre sí, para a determinação de K_m e $V_{máx}$.

6 - Verificar o efeito da viscosidade da solução substrato sobre a catálise da invertase.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

2.1.1 Equipamentos de laboratório

- Vidraria e materiais comuns de laboratório.
- Potenciômetro (Mod. E 520, Metrohm Herisau).
- Banho-maria com agitação e temperatura controladas (tipo rotatório; marca: Design, Co. Mod. OSW. 21).
- Banho-maria com agitação e temperatura controladas(tipo recíproco; marca: Fanem, Mod.144).
- Viscosímetro de Ostwald.
- Centrífuga refrigerada (Sorvall, Mod.RC2-B).
- Agitador helicoidal (Janke-Kunkel,Mod. RM-14).
- Espectrofotômetro (Coleman, Jr.).
- Condutímetro (Mod. E 518, Metrohm, A.G.).
- Tamis (abertura: 0,84 mm; ABNT 20; Granutest.).

2.1.2 Matéria prima

Levedura de panificação marca Fleischman.

2.1.3 Reagentes analíticos

- Carboximetilcelulose 7L1, baixa viscosidade (Hércules do Brasil).
- Tensoativos (Atlas): Tweens^R: 20,40,60 e 80; Spans^R: 40, 60 e 80.

- Albumina bovina, fração V (Sigma).
- Dextrose pA (Reagen).
- Sacarose pA (Reagen).
- Bicarbonato de sódio, bicarbonato de potássio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, acetato de sódio e fosfato de sódio (Merck e Baker).

2.1.4 Soluções reagentes

I. Solução alcalina

Carbonato de sódio anidro ..... 20 g

Hidróxido de sódio ..... 4 g

Água destilada .....1000 ml

II. Solução de sulfato cúprico

Sulfato cúprico anidro ..... 2 g

Água destilada ..... 100 ml

III. Solução de tartarato de sódio e potássio

Tartarato de sódio e potássio ..... 4 g

Água destilada ..... 100 ml

IV. Mistura reativa

As soluções I, II e III são, respectivamente, misturadas na proporção: 100:1:1.

V. Reativo de Folin-Ciocalteau

A solução estoque (marca:QEEL) deve ser diluída com água na proporção 1:2.

VI - Solução alcalina

Bicarbonato de sódio	16 g
Sal de Seignette	12 g
Carbonato de sódio	24 g
Sulfato de sódio	144 g
Água destilada	800 ml

VII - Solução cúprica

Sulfato de sódio	46 g
Solução de sulfato cúprico (40 g/l).....	100 ml
Água destilada q.s.p.	200 ml

VIII - Solução arseno-molibdica

Molibdato de amônio	25 g
Ácido sulfúrico	21 ml
Arseniato de sódio	3 g
Água destilada	475 ml

IX - Solução tampão acetato 1 M (pH= 3,7)

a) Dissolver 60 ml de ácido acético em 1000 ml de água.

b) Dissolver 82 g de acetato de sódio em 1000 ml de água.

Misturar 46,3 ml de A e 3,7 ml de B. Diluir para 100 ml.

X - Solução tampão acetato 0,05 M (pH= 4,6)

a) Dissolver 2,9 ml de ácido acético em 1000 ml de água.

b) Dissolver 4,1 g de acetato de sódio em 1000 ml de água.

Misturar 25 ml de A com 25 ml de B. Diluir para 100 ml.

XI - Solução de picrato de sódio

Ácido pícrico	3 g
Hidróxido de sódio 1 N	13 ml
Tampão acetato 1M (pH= 3,7)	2 ml
Água destilada q.s.p.	100 ml

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Dosagem de proteína

(Determinação pelo reagente de Folin-Ciocalteau segundo LOWRY (55)

A uma alíquota de 0,5 ml de extrato protéico adicionou-se 5 ml da solução IV. Homogeneizou-se a mistura e deixou-se em repouso por 10 minutos. A seguir adicionou-se 0,5 ml do reativo de Folin-Ciocalteau. Após 30 minutos leu-se a intensidade da cor desenvolvida num comprimento de onda igual a 660 nm.

Compararam-se as absorbâncias frente a uma curva-padrão. Para fazer a curva, utilizou-se uma solução de albumina bovina na concentração de 0,4 mg/ml.

Montou-se o esquema que se segue:

Tubo (Nº)	Sol.de prot. (ml)	Água (ml)	Mist.Reativa (ml)	Reat.Folin (ml)	Absorb. (1)	(2)
B	-	0,5	5,0	0,5		
1	0,1	0,4	5,0	0,5	0,085	0,085
2	0,2	0,3	5,0	0,5	0,170	0,170
3	0,3	0,2	5,0	0,5	0,270	0,260
4	0,4	0,1	5,0	0,5	0,330	0,330
5	0,5	-	5,0	0,5	0,440	0,430

As equações de mínimo quadrado respectivas são:

$$y = 0{,}002175\ x - 0{,}002 \quad (I) \quad r = 0{,}994$$

$$y = 0{,}002138\ x - 0{,}002 \quad (II) \quad r = 0{,}996$$

onde
y= absorbância
x= microgramas de proteína

2.2.2 Dosagem de açúcares redutores

(Método de SOMOGYI e NELSON (65) (82)

Em tubos de Folin-Wu colocaram-se: alíquota da amostra, água q.s.p. 1 ml e 1 ml de uma mistura das soluções VI e VII (na razão volumétrica de 4:1). Colocaram-se os tubos em banho fervente por 10 min. Resfriaram-se, imediatamente, em banho de gelo. A seguir acrescentou-se 2 ml da solução VIII, completando-se o volume para 25 ml com água. Leu-se a intensidade da cor desenvolvida num comprimento de onda igual a 540 nm.

Compararam-se as absorbâncias frente a uma curva-padrão.

Para fazer a curva utilizou-se glicose na concentração de 0,2 mg/ml.

Montou-se o sistema:

Tubo (nº)	Água (ml)	Sol. de glicose (ml)	Reativo (VI+VII) (ml)	Solução VIII (ml)	Absorbâncias (3)	(4)	(5)
B	1,0	-	1,0	2,0	-	-	-
1	0,8	0,2	1,0	2,0	0,090	0,090	0,085
2	0,6	0,4	1,0	2,0	0,188	0,180	0,185
3	0,4	0,6	1,0	2,0	0,255	0,265	0,260
4	0,2	0,8	1,0	2,0	0,325	0,345	0,330
5	-	1,0	1,0	2,0	0,420	0,420	0,420

As retas de mínimo quadrado correspondentes são:

$y = 2{,}0385\ x + 0{,}01098$ (III) $r = 0{,}998$

$y = 2{,}1154\ x + 0{,}006152$ (IV) $r = 1{,}000$

$y = 2{,}0962\ x + 0{,}004456$ (V) $r = 1{,}000$

onde

y= absorbância

x= mg de glicose

2.2.3 Medida da atividade enzimática

A 1 ml de solução de sacarose 0,3 M acrescentaram-se 1 ml da solução X, 0,5 ml de água e 0,5 ml de extrato enzimático. Misturou-se e deixou-se em repouso

durante 10 min. a 25°C. Interrompeu-se a reação com uma mistura equi-volumétrica de sulfato de zinco 0,17M e hidróxido de sódio 0,3 M. Filtrou-se e diluiu-se convenientemente.

Determinou-se no filtrado o teor de açúcares redutores pelo método de Somogyi e Nelson.

2.2.4 Preparação dos extratos enzimáticos

2.2.4.1 Secagem da levedura (conforme VILLELA *et al* (89))

Tamisou-se a levedura, espalhando-se os grânulos em camadas finas sôbre fôlhas de papel manteiga. A seguir deixou-se à temperatura ambiente durante dez dias. Ao final deste período acondicionou-se a levedura seca em frascos de vidro bem vedados e conservou-se a 4°C.

2.2.4.2 Obtenção do autolisado (conforme VILLELA *et al* (89))

Em erlenmayer de 500 ml colocou-se levedura seca e solução salina na proporção de 1:10. A seguir deixou-se agitando por 24 hs e a 45°C. Centrifugou-se o conteúdo do frasco a 10000 rpm/20 min. Recolheu-se o sobrenadante.

2.2.4.3 Obtenção do pó acetônico (conforme HESTRIN *et al* (45))

Ao autolisado adicionou-se solução de picrato de sódio na proporção volumétrica de 1:0,35. Misturou-se e deixou-se em repouso por 3 hs. A seguir centrifugou-se a 10000 rpm/30 min.

Adicionou-se acetona ao sobrenadante na proporção volumétrica de 3:1. Centrifugou-se e recolheu-se o precipitado.

2.2.5 Efeito da agitação sôbre a liberação da invertase

Fez-se a autólise das células em agitador rotatório conforme ítem 2.2.4.2. Variou-se a frequência de agitação desde 150 até 350 ciclos/min.

Determinou-se a atividade enzimática do autolisado de acordo com o ítem 2.2.3.

2.2.6 Influência da temperatura de autólise sôbre o teor de atividade invertásica do autolisado

Procedeu-se à autólise das células conforme ítem 2.2.4.2. Variou-se a temperatura de 10 em 10°C num intervalo compreendido entre 25 e 55°C.

Determinou-se a atividade invertásica conforme ítem 2.2.3.

2.2.7 Efeito da pressão osmótica sôbre o teor de atividade invertásica do autolisado

Prepararam-se soluções de bicarbonato de sódio, cloreto de sódio e cloreto de potássio com valores de pressão osmótica entre 0,5 e 14 atm.

Calcularam-se as quantidades correspondentes dos sais para cada valor de pressão osmótica mediante a equação (23):

$$P = (n/V)RTi \qquad \text{(VI)}$$

onde

P= pressão osmótica (atm)

(n/V)= concentração molar do sal

R= constante dos gases perfeitos = 0,082 atm. $l/^{o}K.mol$

T= temperatura absoluta (^{o}K)

i= fator de Van't Hoff

Para o cálculo de "i" utilizou-se a relação (23):

$$i = h(q - 1) + 1 \qquad \text{(VII)}$$

onde

h = grau de ionização (admitiu-se h=1 para todos os sais)

q = número de partículas liberadas por uma molécula

Realizou-se a autólise e a determinação da atividade enzimática conforme 2.2.4.2 e 2.2.3.

2.2.8 Efeito de tensoativos sôbre a liberação da invertase na autólise

Prepararam-se os autolisados conforme 2.2.4.2 em presença de tensoativos não iônicos na concentração de 0,1% (P/V).

Trabalhou-se com tensoativos derivados do sorbitol polimerizado com grupos polioxietilênicos, obtendo-se valores de EHL compreendidos entre 14,9 e 16,7.

A atividade invertásica foi determinada conforme ítem 2.2.3.

2.2.9 Efeito do EHL sôbre a eficiência da precipitação da invertase com acetona

O sistema emulsificante, usado nas concentrações de 0,1 e 1% (P/V), consistiu de uma mistura adequada de tensoativos não iônicos de caráter lipofílico (ésteres de ácidos graxos do sorbitol) e hidrofílico (derivados polioxietilênicos do sorbitol).

Trabalhou-se numa faixa de EHL compreendida entre 4,7 e 15,6 (75).

2.2.10 Influência do agente autolisante sôbre a atividade invertásica do autolisado

Prepararam-se autolisados conforme 2.2.4.2, usando-se vários sais como agentes autolisantes.

Selecionaram-se os seguintes sais: bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de po-

tássio, bicarbonato de potássio, citrato de sódio e fosfato de sódio.

Determinou-se a atividade invertásica conforme 2.2.3.

2.2.11 Medida da viscosidade

Determinaram-se as viscosidades das soluções com um viscosímetro de Ostwald, estando a temperatura numa faixa entre 20 e 23°C.

Cronometrou-se o tempo de escoamento, tomando-se para cada solução a média de vinte determinações.

Utilizou-se a água como líquido de referência.

Para o cálculo da viscosidade empregou-se a seguinte relação (26):

$$\frac{\eta_1}{\eta_2} = \frac{t_1 . d_1}{t_2 . d_2} \qquad \text{(VIII)}$$

onde η_1 = viscosidade da amostra (em cp).

η_2 = viscosidade da água destilada (em cp).

t_1 = tempo médio de escoamento da amostra (SEG)

t_2 = tempo médio de escoamento da água destilada (SEG)

d_1 = densidade da amostra

d_2 = densidade da água destilada

2.2.12 Influência da viscosidade da solução substrato sôbre a atividade da invertase

Avaliou-se a influência da viscosidade, substituindo-se a solução de sacarose 0,3 M, conforme descrito em 2.2.3, pela solução com a viscosidade desejada.

2.2.12.1 Soluções com diferentes concentrações de sacarose

Prepararam-se soluções de sacarose, cujas concentrações estavam compreendidas entre 5 e 50%(P/V), com valores de viscosidade entre 1,15 e 6,90 cp.

2.2.12.2 Soluções com diferentes viscosidades e teor de sacarose constante

Variou-se a viscosidade de uma solução de sacarose 10% (P/V) pela adição de carboximetilcelulose de modo a se obter viscosidades compreendidas entre 1,15 e 16,8 cp.

2.2.13 Determinação do Número de Reynolds

Para a determinação deste parâmetro fez-se a autólise com bicarbonato de sódio 0,154M, a 45°C, por 24 hs e a 200 ciclos/min., retirando-se amostras de 4 em 4 hs e medindo-se a densidade e a viscosidade.

Mediram-se as dimensões do recipiente com paquímetro (diâmetro do frasco: 10,7 cm).

Básicamente usou-se a equação seguinte para o cálculo do número de Reynolds:

$$N_{Re} = \frac{D.v.d}{\eta} \qquad (IX)$$

onde: D = diâmetro do recipiente

v = velocidade do fluido

d = densidade do fluido

η = viscosidade do fluido

2.2.14 Medida do número de Froude

Para a avaliação deste fator de escala utilizou-se a relação:

$$N_{Fr} = \frac{v^2}{g.D} \qquad (X)$$

onde: v = velocidade do fluido

g = aceleração da gravidade

D = diâmetro do recipiente

2.2.15 Medida da condutividade

Colocou-se a solução numa cela condutimétrica de constante igual a 0,805 cm^{-1} e capacidade para 50 ml. Mergulhou-se a cela num banho-maria a 20°C. Após o equilíbrio da temperatura fez-se a medida.

Usou-se como unidade condutimétrica o milisiemen (mS). 1 mS equivale a 10^{-3} ohm^{-1}.

2.2.16 Medida da densidade

Mediu-se a densidade das soluções pelo método do picnômetro (86), sendo expressa em g/cm^3.

Usou-se a expressão seguinte:

$$d = \frac{m}{V} \qquad \text{(XI)}$$

onde d = densidade

m = massa do fluido

V = volume do fluido

2.2.17 Determinação gráfica de K_m e $V_{máx.}$

Para a avaliação dos parâmetros cinéticos utilizaram-se os seguintes métodos gráficos: Lineweaver-Burk (54), Woolf (4), HOFSTEE (46) e Cornish-Eisenthal (24).

Utilizou-se solução de sacarose na concentração de 22,8 mg/ml.

Montou-se o seguinte esquema:

Tubo (nº)	Tampão-acetato (pH=4,6) (ml)	Sol. Sacarose (ml)	Água (ml)	Ext.Enz. (ml)
1	1,0	0,22	0,78	0,5
2	1,0	0,44	0,56	0,5
3	1,0	0,65	0,35	0,5
4	1,0	0,88	0,12	0,5
5	1,0	0,92	0,08	0,5
6	1,0	1,00	-	0,5
B	1,0	-	1,00	0,5

Parou-se a reação com 0,5 ml de NaOH 0,3 M e 0,5 ml de $ZnSO_4$ 5% (P/V) e determinou-se o teor de açúcares redutores conforme 2.2.2.

3. RESULTADOS

3.1 TABELAS

A tabela 1 mostra comparativamente a eficiência entre os agitadores recíproco e rotatório na extração de invertase até a obtenção do pó acetônico. Para o cálculo do teor de proteína usou-se a equação I e para a atividade a equação III. Os dados representam a média de dois experimentos.

A tabela 2 mostra a variação da densidade, viscosidade e N_{Re} de um sistema em autólise durante 24 horas. A densidade foi calculada pela equação XI e a viscosidade pela VIII, sendo o valor de t a média de dez medições. O Reynolds foi calculado pela equação LI.

O desvio-padrão e o coeficiente de variação foram calculados a partir das expressões (83):

$$s = \sqrt{\frac{\Sigma (X-\bar{X})^2}{\sqrt{N}}} \qquad \text{(XII)}$$

$$\text{Coeficiente de variação} = \frac{s}{\bar{X}} \qquad \text{(XIII)}$$

A tabela 3 mostra o efeito da frequência de agitação sôbre a liberação de invertase. O teor de proteína e a atividade enzimática foram calculados pelas expressões I e III. O Froude e o Reynolds, respectivamente, LII e LI.

A tabela 4 mostra o efeito da temperatura sôbre a atividade enzimática do autolisado. Os dados foram determinados através das equações II e V.

As tabelas 5-11 mostram o efeito da pressão osmótica e da natureza do agente autolisante sôbre a atividade invertásica obtida no autolisado. Os dados de proteína, atividade invertásica e pressão osmótica foram obtidos a partir das equações II, V, VI e VII. Os dados representam a média de dois ensaios.

A tabela 12 mostra a análise estatística das diferenças dos dados de atividade invertásica total constantesnas tabelas 5 e 6.

O teste estatístico aplicado é o chamado teste "t" bilateral (83), que é baseado nas seguintes expressões:

$$S_{dd} = \sum_{1}^{i} d_i^2 - \frac{D^2}{n} \qquad \text{(XIV)}$$

$$s_{(d)} = \frac{\sqrt{S_{dd}}}{\sqrt{n-1}} \qquad \text{(XV)}$$

$$s_{(\bar{d})} = \frac{s_{(d)}}{\sqrt{n}} \qquad \text{(XVI)}$$

$$t_{calc} = \frac{\bar{d} - d}{s_{(\bar{d})}} \qquad \text{(XVII)}$$

n = número de dados

A tabela 13 mostra a análise estatística (teste "t" bilateral) dos valores das tabelas 7 e 8. As equações utilizadas para o cálculo dos parâmetros necessários ao teste foram (83):

$$\sigma = \frac{\sqrt{N_1 s_1^2 + N_2 s_2^2}}{\sqrt{N_1 + N_2 - 2}} \qquad \text{(XVIII)}$$

$$t = \frac{\bar{X}_2 - \bar{X}_1}{\sigma\sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}} \qquad \text{(XIX)}$$

onde N_1 e N_2 correspondem aos números de dados de cada amostra;

σ é o desvio-padrão do universo;

s_1^2 e s_2^2 são as variâncias das amostras, sendo calculadas pela equação (XII).

A tabela 14 contém os valores das atividades invertásicas totais correspondentes aos sais: $NaHCO_3$, NaCl e KCl para cada um dos valores da pressão osmótica compreendida entre 2 e 12 atm. Os dados correspondentes ao $NaHCO_3$ são os mesmos da tabela 5, enquanto que os dados do NaCl são os da tabela 7.

A tabela 15 mostra os dados utilizados para a análise de variância. O teste estatístico utilizado foi o teste "F" (57). Para o cálculo da soma dos quadrados médios ($S.Q_m$), de cada um dos quadrados médios (Q_m) e da variância F, foram usadas as relações:

$$S.Q_{m_1} = \left(\frac{1}{6}\sum_{i=1}^{3} C_i^2\right) - \frac{T_g^2}{n} \qquad \text{(XX)}$$

$$S.Q_{m_2} = \left(\frac{1}{3}\sum_{j=1}^{6} L_j^2\right) - \frac{T_g^2}{n} \qquad \text{(XXI)}$$

$$S.Q_{m_R} = S_{xx} - (S.Q_{m_1} + S.Q_{m_2}) \qquad \text{(XXII)}$$

$$S.Q_m(\text{total}) = S_{xx} = \left(\sum_{K=1}^{18} X_K^2\right) - \frac{T_g^2}{n} \qquad \text{(XXIII)}$$

$$Q_{m_1} = \frac{S.Q_{m_1}}{2} = s_1^2 \qquad Q_{m_2} = \frac{S.Q_{m_2}}{5} = s_2^2 \qquad Q_{m_R} = \frac{S.Q_{m_R}}{10} = s_R^2$$

(XXIV)

$$F_1 = \frac{s_1^2}{s_R^2} \qquad F_2 = \frac{s_2^2}{s_R^2} \qquad \text{(XXV)}$$

A tabela 16 mostra os valores das atividades invertásicas totais relacionadas aos sais: $KHCO_3$, citrato de sódio e fosfato de sódio frente a dois valores de pressão osmótica (6 e 8 atm).

A tabela 17 mostra os dados utilizados para a análise de variância dos dados acima. O teste estatístico usado foi o teste "F". Para o cálculo dos quadrados médios (Q_m), da soma dos mesmos ($S.Q_m$) e da variância F foram usadas as relações:

$$\frac{S.Q_{m_1}}{2} = s_1^2 \qquad \frac{S.Q_{m_2}}{1} = s_2^2 \qquad \frac{S.Q_{m_R}}{2} = s_R^2 \qquad \text{(XXVI)}$$

$$S.Q_{m_1} = \left(\frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3} C_i^2\right) - \frac{T_g^{\,2}}{n} \qquad \text{(XXVII)}$$

$$S.Q_{m_2} = \left(\frac{1}{3} \sum_{j=1}^{2} L_j^2\right) - \frac{T_g^{\,2}}{n} \qquad \text{(XXVIII)}$$

$$S_{xx} = S.Q_m(\text{total}) = \left(\sum_{K=1}^{6} X_K^{\,2}\right) - \frac{T_g^{\,2}}{n} \qquad \text{(XXIX)}$$

O $S.Q_{m_R}$, F_1 e F_2 foram calculados conforme as relações XXII e XXV.

A tabela 18 mostra os valores da condutividade específica determinadas para as soluções de $NaHCO_3$ e NaCl (pH= 7,0 e 8,9). Como a pressão osmótica é uma propriedade coligativa, então as concentrações de ambos os sais encontram-se na coluna: concentração salina. Nesta tabela estão locadas, também, as condutividades dos autolisados obtidos. Para o cálculo dos valores da pressão osmótica foram usadas as equações VI e VII.

As tabelas 19 e 20 mostram o efeito de tensoativos não iônicos da classe dos derivados polioxietilênicos do sorbitol (Tweens^R) sôbre a liberação da enzima a partir de células de levedura. O teor de proteína e a

atividade invertásica foram calculadas mediante as relações I e V. Os tensoativos foram utilizados na concentração de 0,1%(P/V).

A tabela 21 mostra a análise estatística (teste "t") dos dados das tabelas 19 e 20. Os parâmetros S_{dd}, s_d, $s(\bar{d})$ e t_{calc} foram determinados, respectivamente, através das fórmulas XIV a XVII.

Para a elaboração da tabela 22, atribuiu-se o valor 100 às atividades totais dos brancos das tabelas 19 e 20. Os demais valores foram referidos em relação aos brancos. Os parâmetros necessários para o teste "t" foram calculados como na tabela anterior.

As tabelas 23-26 mostram o efeito do EHL sobre a eficiência de precipitação da invertase com acetona. Para as tabelas 23,24 e 25 usou-se uma concentração de sistema emulsificante igual a 0,1% (P/V). Para a tabela 26, contudo, a concentração foi de 1%(P/V). Além disto, nesta locou-se o efeito do laurilsulfato de sódio nas concentrações de 0,1 e 1% (P/V). As equações II e V foram usadas para calcular o teor de proteína e a atividade invertásica.

A tabela 27 foi composta com os valores da atividade total das tabelas 23-25 e com o valor médio dos EHL respectivos.

A tabela 28 mostra a análise de variância (teste F) dos dados da tabela 27. Para o cálculo dos parâmetros usou-se as relações:

$$S.Q_{m_1} = \left(\frac{1}{5}\sum_{1}^{3} C_i^2\right) - \frac{T_g^{\,2}}{n} \qquad \text{(XXX)}$$

$$S.Q_{m_2} = \left(\frac{1}{3}\sum_{1}^{5} L_j^2\right) - \frac{T_g^{\,2}}{n} \qquad \text{(XXXI)}$$

$$S.Q_m(\text{total}) = \left(\sum_{1}^{15} \chi_K^2\right) - \frac{T_g^{\,2}}{n} \qquad \text{(XXXII)}$$

$$Q_{m_1} = \frac{S.Q_{m_1}}{2} = s_1^2 \qquad Q_{m_2} = \frac{S.Q_{m_2}}{4} = s_2^2$$

(XXXIII)

$$\frac{S.Q_{m_R}}{8} = Q_{m_R} = s_R^2$$

Para o $S.Q_{m_R}$, F_1 e F_2 valem as relações (XXII) e (XXV).

A tabela 29, que mostra a análise estatística (teste "t"), foi composta pelos dados de atividade total da tabela 27 (corresponde ao lote 1) e as atividades totais da tabela 26. Os valores das atividades para cada EHL (lote 1) são a média dos respectivos valores das tabelas 23 a 25. Para o cálculo dos parâmetros necessários ao teste usou-se as equações XIV, XV, XVI e XVII.

A tabela 30 mostra os valores da velocidade de reação (v), expressa em mgAR/ml.min, em função da concentração de substrato (|S|).

A tabela 31 mostra os valores de K_m e $V_{máx}$ calculados por meio de quatro métodos diferentes. As equações para cada um dos métodos, exceto o de Cornish-Eisenthal, foram determinadas através do método dos mínimos quadrados.

A tabela 32 mostra os coeficientes de variação (em percentagem) dos parâmetros cinéticos, obtidos pelo pareamento dos métodos usados.

A tabela 33 mostra os dados obtidos com relação ao efeito da viscosidade da solução substrato sôbre a atividade invertásica do autolisado. Os dados foram calculados usando-se as equações I e III.

A tabela 34 mostra o efeito da viscosidade da solução substrato sôbre a atividade invertásica do autolisado e do pó acetônico. Neste caso, manteve-se constante a quantidade de sacarose (10% P/V) e variou-se a viscosidade com carboximetilcelulose. As equações utilizadas nesta tabela foram I, III e IV.

3.2 FIGURAS

A figura 1 mostra a relação entre a condutividade específica (mS/cm) *versus* concentração salina. A reta *a* refere-se ao bicarbonato de sódio e a reta *b* ao cloreto de sódio.

A figura 2 mostra a relação linear entre a percentagem de rendimento e o EHL do meio.

Nas figuras 3-6 lançaram-se os dados da tabela 30, conforme os métodos gráficos propostos, respectivamente, por: Lineweaver-Burk; Woolf; Hofstee e Cornish-Eisenthal.

A figura 7 mostra a relação entre a atividade enzimática (mgAR/ml.min) e a viscosidade (cp).Os dados estão na tabela 33.

A figura 8 mostra a relação entre a atividade enzimática (mgAR/ml.min) e a concentração percentual de sacarose. Os dados estão na tabela 33.

As figuras 9 e 10 mostram a relação entre a atividade enzimática e a viscosidade(variada com CMC), usando-se, respectivamente, o autólisado e o pó acetônico. Os dados estão na tabela 34.

T A B E L A S

TABELA 1. Extração de invertase utilizando-se agitador recíproco e rotatório com frequência de 200 ciclos/min.

Etapa (nome)	Proteína (mg/ml)		Volume (ml)		AE* (mgAR/ml.min)		AT** (mgAR/min)		AE_p*** (mgAR/mgProt)min^{-1}		Rend. (%)	
	Re	Ro	Re	Ro	Re	Ro	Re	Ro	Re	Ro	Re	Ro
Autolisado	10,7	6,48	39,5	43,5	0,316	0,528	12,5	23,0	29,5	85,0	100	100
Sobr.pícrico	7,91	4,41	46,0	48,0	0,267	0,422	12,3	20,3	33,8	96,0	98,4	88,3
Pó acetônico	6,99	1,31	10,0	25,0	0,415	0,422	4,15	15,9	59,4	322	33,2	46,0

*AE corresponde à atividade enzimática do extrato (AR= Açúcares Redutores)

**AT corresponde à atividade total

***AE_p corresponde à atividade específica. Cada um dos valores tabelados deve ser multiplicado por 10^{-3}.

Re = agitador recíproco

Ro = agitador roratório

TABELA 2. Variação da densidade, viscosidade e do número de Reynolds durante a autólise

Tempo (h)	Densidade (g/cm^3)	Viscosidade (cp)	N_{Re}
0	1,022	2,104	582,1
4	1,023	2,192	559,3
8	1,022	2,216	552,7
12	1,017	2,289	532,4
16	1,019	2,189	557,8
24	1,015	2,034	598,0
Média	1,020	2,171	563,7
desvio-padrão	0,002944	0,08162	21,09
coef.variação	0,28%	3,8%	3,7%
limites de variação ($t_{95\%}$)*	$1,020 \pm 0,007570$	$2,171 \pm 0,2090$	$563,7 \pm 54,22$

* Usou-se a distribuição de Student (teste t) para 5 graus de liberdade.

TABELA 3. Efeito da frequência de agitação sôbre a eficiência da autólise

f^*	Proteína (mg/ml)	Volume (ml)	AE'	AT"	$AE'_p{}^*$	Rend. (%)	N_{Re}	N_{Fr}
150	5,26	45,0	0,365	16,4	0,0694	76,0	422	0,672
200	5,15	45,0	0,480	21,6	0,0932	100	563	1,20
250	4,92	45,0	0,354	15,9	0,0719	73,8	704	1,87
300	5,51	45,0	0,210	9,45	0,0381	43,8	844	2,69
350	4,53	46,0	0,176	8,10	0,0388	36,7	985	3,66

*f = frequência de agitação (ciclos/min)

'AE = atividade enzimática (mgAR/ml.min)

"AT = atividade total (mgAR/min)

'*AE_p = atividade específica (mgAR/mgProt.) min^{-1}

N_{Re} = número de Reynolds

N_{Fr} = número de Froude

TABELA 4. Efeito da temperatura de autólise sôbre a atividade invertásica do autolisado

Temperatura (°C)	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	AE* (mgAR/ml.min)	AT** (mgAR/min)	AE_p*** (mgAR/mgProt.)min^{-1}	Rend. (%)
25	37,5	2,50	0,495	18,6	0,198	83,8
35	37,0	2,97	0,542	20,1	0,182	90,5
45	39,0	3,82	0,568	22,2	0,149	100
55	39,0	4,67	0,230	8,97	0,0493	40,5

*AE = atividade enzimática
**AT = atividade total
***AE_p = atividade específica

TABELA 5. Efeito da pressão osmótica de soluções de bicarbonato de sódio sôbre o teor de atividade invertásica no autolisado

P (atm)	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	AE* (mgAR/ml.min)	AT** (mgAR/min)	AE_p*** (mgAR/mgProt)min^{-1}
2,00	41,0	1,92	1,26	51,8	0,658
4,00	38,0	1,92	1,26	48,0	0,658
6,00	38,0	2,39	1,23	46,7	0,514
8,00	40,0	3,09	1,30	51,9	0,420
10,00	41,0	3,09	0,645	26,4	0,209
12,00	41,0	3,55	0,542	22,2	0,153
14,00	38,0	4,72	0,362	13,7	0,0770

*AE = atividade enzimática

**AT = atividade total

***AE_p = atividade específica

TABELA 6. Efeito da pressão osmótica de soluções de bicarbonato de sódio sôbre o teor de atividade invertásica no autolisado

P (atm)	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	AE* (mgAR/ml.min)	AT** (mgAR/min)	AE_p*** (mgAR/mgProt)min^{-1}
0,500	41,0	6,36	1,14	46,7	0,179
1,00	41,0	4,02	1,44	59,0	0,358
2,00	39,0	2,39	1,91	74,6	0,800
6,00	40,0	2,39	1,57	62,8	0,656
8,00	40,0	2,85	2,04	81,7	0,716
10,0	41,0	3,79	0,818	33,5	0,216
12,0	40,0	3,67	0,668	26,7	0,182

* AE = atividade enzimática

** AT = atividade total

*** AE_p = atividade específica

TABELA 7. Efeito da pressão osmótica de soluções de cloreto de sódio (pH= 7,0) sôbre o teor de atividade invertásica no autolisado

P (atm)	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	AE* (mgAR/ml.min)	AT** (mgAR/min)	AE_p*** (mgAR/mgProt)min^{-1}
2,00	39,0	4,96	1,48	57,9	0,299
4,00	42,0	7,30	1,31	55,1	0,180
6,00	42,0	8,47	1,31	55,1	0,155
8,00	43,0	7,53	1,23	52,7	0,163
10,0	42,0	7,53	1,27	53,3	0,169
12,0	42,0	8,35	1,18	49,7	0,142
14,0	42,0	9,40	1,18	49,7	0,126

* AE = atividade enzimática

** AT = atividade total

*** AE_p = atividade específica

TABELA 8. Efeito da pressão osmótica de soluções de cloreto de sódio (pH= 8,9) sôbre o teor de atividade invertâdica no autolisado

P (atm)	Volume (ml)		Proteína (mg/ml)		AE* (mgAR/ml.min)		AT** (mgAR/min)		AE_p*** (mgAR/mgProt.)min^{-1}	
0,500	41,0	42,0	7,90	7,80	1,33	1,29	54,7	54,2	0,170	0,160
1,00	43,0	44,0	7,30	7,30	1,38	1,31	59,2	57,7	0,190	0,180
2,00	42,0	42,0	8,90	9,10	1,42	1,42	59,6	59,6	0,160	0,160
6,00	42,0	42,0	7,80	7,80	1,36	1,36	56,9	56,9	0,180	0,180
8,00	42,0	41,0	9,60	9,50	1,29	1,31	54,2	53,8	0,130	0,140
10,0	43,0	42,0	11,7	11,8	1,30	1,30	54,6	54,2	0,110	0,110
12,0	42,0	42,0	11,0	11,0	1,20	1,30	51,5	52,4	0,110	0,110

*AE = atividade enzimática; **AT= atividade total; ***AE_p = atividade específica

TABELA 9. Efeito da pressão osmótica de soluções de cloreto de potássio sôbre o teor de atividade invertásica no autolisado

P (atm)	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	AE* (mgAR/ml.min)	AT** (mgAR/min)	AE_p*** (mgAR/mgProt)min^{-1}
0,500	40,0	6,83	1,41	56,4	0,206
1,00	40,0	6,13	1,48	59,2	0,242
2,00	40,0	7,06	1,51	60,2	0,213
4,00	40,0	6,59	1,31	52,6	0,199
6,00	40,0	7,76	1,29	51,6	0,166
8,00	41,0	7,76	1,15	47,1	0,148
10,0	41,0	8,93	1,12	46,1	0,126
12,0	41,0	9,17	1,10	45,1	0,120

* AE = atividade enzimática

** AT = atividade total

*** AE_p = atividade específica

TABELA 10. Efeito da pressão osmótica de soluções de bicarbonato de sódio, cloreto de sódio (pH= 7,0 e 8,9) e cloreto de potássio expressa como relação percentual das atividades totais

P (atm)	$NaHCO_3$	NaCl		KCl
		pH=7	pH=8,9	
0,500	57,2	-	91,3	93,7
1,00	72,2	-	98,1	98,4
2,00	95,5	100	100	100
4,00	92,4	95,2	-	87,3
6,00	83,4	95,2	95,5	85,8
8,00	100	91,1	90,6	76,3
10,0	46,0	92,1	91,3	74,7
12,0	37,8	85,9	87,2	73,1
14,0	26,5	85,9	86,4	-

TABELA 11. Efeito da natureza do agente autolisante sôbre o teor de atividade invertásica no autolisado

Sal (nome)	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	AE* (mgAR/ml.min)	AT** (mgAR/min)	AE_p*** (mgAR/mgProt)min^{-1}
'$KHCO_3$	40,0	3,55	1,70	67,9	0,478
"$KHCO_3$	40,0	3,44	1,87	74,8	0,544
'Cit.Na	40,0	2,97	1,18	47,3	0,398
"Cit.Na	42,0	2,74	1,23	53,3	0,463
'Fosf.Na	39,0	3,32	1,36	52,8	0,408
"Fosf.Na	39,0	2,97	1,33	52,0	0,449

* AE = atividade enzimática

** AT = atividade total

*** AE_p = atividade específica

' Bicarbonato de potássio, citrato de sódio e fosfato de sódio em quantidades adequadas para fornecerem soluções com pressão osmótica igual a 6 atm.

" Idem, para fornecerem soluções com pressão osmótica igual a 8 atm.

TABELA 12. Análise das diferenças entre os dados das Tabelas 5 e 6 mediante o uso do teste "t" bilateral

P (atm)	Lotes (5)	Lotes (6)	d_i (X_6-X_5)	d_i^2
2,00	51,8	74,6***	22,8	520
6,00	46,7	62,8	16,1	259
8,00	51,9	81,7	29,8	888
10,0	26,4	33,5	7,10	50,4
12,0	22,2	26,7	4,50	20,3
			*D= 80,3	**D_1^2= 1737,7
			$\bar{d}$= 16,1	S_{dd}= 448,1
				S_d= 10,58

$$^{*}D = \sum_{1}^{5} d_i$$

$$^{**}D_1^2 = \sum_{1}^{5} d_i^2$$

*** Os valores representam as atividades enzimáticas totais expressas em (mgAR/min).

TABELA 13. Comparação dos valores das atividades enzimáticas totais mostradas nas tabelas 7 e 8

P (atm)	pH* 7,0	pH* 8,9	$(X_{1,i} - \bar{X}_1)^2$ $(X_{1,i} - 53,7)^2$	$(X_{2,i} - \bar{X}_2)^2$ $(X_{2,i} - 55,4)^2$
2,00	57,9	59,6**	17,6	17,6
6,00	55,1	56,9	1,96	2,25
8,00	52,7	54,0	1,00	1,96
10,0	53,3	54,4	0,160	1,00
12,0	49,7	52,0	16,0	11,6
	$\bar{X}_1$=53,7	$\bar{X}_2$=55,4	$(X_{1,i}-\bar{X}_1)^2$=36,7	$(X_{2,i}-\bar{X}_2)^2$ =34,4
	s_1= 2,71	s_2= 2,62		

* Os dados correspondentes ao pH= 7,0 foram chamados de lote 1 e ao pH= 8,9 de lote 2.

** Atividade enzimática total (mgAR/min).

TABELA 14. Valores da atividade enzimática total (mgAR/min) para os sais: $NaHCO_3$, NaCl e KCl em função da pressão osmótica

P \ S	$NaHCO_3$	NaCl	KCl	
2,00	51,8	57,9	60,2	$^{*}L_1 = 170$
4,00	48,0	55,1	52,6	$L_2 = 156$
6,00	46,7	55,1	51,6	$L_3 = 153$
8,00	51,9	52,7	47,1	$L_4 = 152$
10,0	26,4	53,3	46,1	$L_5 = 126$
12,0	22,2	49,7	45,1	$L_6 = 117$
	$^{**}C_1 = 247$	$C_2 = 324$	$C_3 = 303$	$^{***}T_g = 874$

* L é a soma dos valores de cada linha

** C é a soma dos valores de cada coluna

$^{***}T_g$ é a soma geral, englobando todos os dados

TABELA 15. Análise de variância para os valores da Tabela 14

Origem da Variação	Graus de Liberdade	$S.Q_m$ *	Q_m *	F *
Entre subs. *	2	528	264	6,42
Entre pres. ***	5	667	133	3,24
Resto	10	411	41,1	-
Total	17	1606	-	-

*$S.Q_m$ = Soma dos quadrados médios.

*Q_m = Quadrado médio

*F = Variância (Valores tabelados: $F_{5\%}(2;10)$ = = 4,10 e $F_{5\%}(5;10)$ = 3,33)

**Subs.= Substâncias

***pres.= Pressões

TABELA 16. Valores da atividade enzimática total (mgAR/min) para os sais: bicarbonato de potássio, citrato de sódio e fosfato de sódio frente a dois valores de pressão osmótica

P \ S	$KHCO_3$	Cit. Na	Fosf. Na	
6,00	67,9	47,3	52,8	Li^{***}=168,0
8,00	74,8	53,3	52,0	L_2 =180,1
	$^{*}C_1$= 142,7	C_2= 100,6	C_3= 104,8	T_g^{**}= 348,1

$^{*}C$ é a soma dos valores de cada coluna

$^{**}T_g$ é a soma geral, englobando todos os dados

$^{***}L$ é a soma dos valores de cada linha

TABELA 17. Análise de variância para os valores da Tabela 16

Origem da Variação	Graus de Liberdade	$S.Q_m$*	Q_m*	F*
Entre subs.**	2	537,7	268,9	30,21
Entre pres.**	1	24,40	24,40	2,742
Resto	2	17,80	8,900	-
Total	5	579,9	-	-

*$S.Q_m$ = Soma dos quadrados médios

*Q_m = Quadrado médio

*F = Variância (Valores tabelados: $F_{5\%}(2;2)$= = 19,00 e $F_{5\%}(1;2)$= 18,51)

**subs.= Substâncias

***pres.= Pressões

TABELA 18. Medidas condutimétricas de soluções de $NaHCO_3$, NaCl (pH= 7,0) e NaCl (pH= 8,9), numa faixa de pressão osmótica compreendida entre 0,500 e 14,0 atm. Também são mostrados valores de autolisados obtidos usando-se $NaHCO_3$ e NaCl.

P (atm)	Concentração salina*	Condutividade (mS/cm)				
		Soluções			Autolisados	
		$NaHCO_3$	NaCl**	NaCl***	$NaHCO_3$	NaCl
2,00	0,038	4,20	5,50	5,60	-	12,0
4,00	0,077	7,80	10,7	-	-	-
6,00	0,115	11,2	15,5	16,0	-	-
8,00	0,154	14,4	20,5	20,5	11,5	-
10,0	0,192	17,5	25,0	25,0	-	-
12,0	0,230	20,5	29,0	30,0	-	-

* A concentração é expressa em moles/ℓ

** Corresponde a uma solução de NaCl com pH=7,0

*** Corresponde a uma solução de NaCl com pH=8,9

TABELA 19. Efeito de tensoativos na autólise de células de levedura de panificação

Tensoativo (Tween^R)	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	AE* (mgAR/ml.min)	AT** (mgAR/min)	AE_p*** (mgAR/mgProt)min^{-1}	Rend. (%)
B	47,5	5,91	0,353	16,8	0,0600	100
20	50,0	5,56	0,319	15,9	0,0570	94,6
40	49,0	5,79	0,387	18,9	0,0660	113
60	44,5	6,48	0,309	13,8	0,0480	82,1
80	45,0	5,56	0,336	15,1	0,0600	89,9

*AE = atividade enzimática
**AT = atividade total
***AE_p = atividade específica

TABELA 20. Efeito de tensoativos na autólise de células de levedura de panificação

Tensoativo (Tween^R)	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	AE* (mgAR/ml.min)	AT** (mgAR/min)	AE_p*** (mgAR/mgProt)min^{-1}	Rend. (%)
B	42,5	6,48	0,559	23,8	0,0860	100
20	43,5	6,48	0,542	23,6	0,0840	99,2
40	47,0	6,02	0,576	27,1	0,0960	114
60	44,0	6,25	0,508	22,4	0,0810	94,1
80	43,5	6,37	0,525	22,8	0,0820	95,8

*AE = atividade enzimática
**AT = atividade total
***AE_p = atividade específica

TABELA 21. Análise das diferenças dos dados das tabelas 19 e 20 mediante o uso do teste "t"

EHL	Lotes (1)	Lotes (2)	$d_i = (X_2 - X_1)$	d_i^2
B	16,8***	23,8	7,00	49,0
16,7	15,9	23,6	7,70	59,3
15,6	18,9	27,1	8,20	67,2
14,9	13,8	22,4	8,60	74,0
15,0	15,1	22,8	7,70	59,3
			*D=39,2	**D_1^2=309
			$\bar{d}$= 7,84	S_{dd}= 1,67
				S_d = 0,646

$$^{*}D = \sum_{1}^{5} d_i$$

$$^{**}D_1^2 = \sum_{1}^{5} d_i^2$$

*** Os valores representam as atividades enzimáticas totais expressas em (mgAR/min)

TABELA 22. Efeito de tensoativos não iônicos e a respectiva análise das diferenças dos resultados (teste "t"). As atividades enzimáticas totais das tabelas foram expressas em termos percentuais em relação aos brancos respectivos.

Tensoativo (Tween^R)	EHL	Lotes (1)	Lotes (2)	$d_i=(X_2-X_1)$	d_i^2
20	16,7	94,6	92,2	4,60	21,16
40	15,6	113	114	1,00	1,00
60	14,9	82,1	94,1	12,0	144
80	15,0	89,9	95,8	5,90	34,81
	$\overline{EHL}$= 15,6	$\bar{X}$=94,9	$\bar{X}_2$=100,78	$^*D$=23,5	$^{**}D_1^2$=200,97
	s =0,829	$\bar{X}$ = 97,8		$\bar{d}$ =5,875	S_{dd} = 62,91
	Coef.var.=	s = 9,56			S_d = 4,58
	= 5,3%	coef.var.= 9,8%			

$$^*D = \sum_1^4 d_i$$

$$^{**}D_1^2 = \sum_1^4 d_i^2$$

TABELA 23. Efeito do EHL sôbre a eficiência da precipitação de invertase com acetona. Sistema emulsificante formado por Tween 40^R e Span 40^R.

Etapa (nome)	EHL	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	AE*	AT**	AE_p***	Rend. (%)
Autolisado	-	170	4,26	0,775	132	0,182	100
Sobrenadante pícrico	-	73,3	2,85	0,711	52,1	0,249	-
	6,70	73,3	3,09	0,711	52,1	0,230	-
	8,50	73,3	2,97	0,711	52,1	0,239	-
	10,2	73,3	2,97	0,711	52,1	0,239	-
	12,0	73,3	3,09	0,711	52,1	0,230	-
	13,8	73,3	3,09	0,689	50,5	0,223	-
	15,6	73,3	3,09	0,711	52,1	0,230	-
Ressuspensão aquosa	-	20,0	1,11	2,09	41,8	1,88	31,7
	6,7	20,0	1,23	1,38	27,6	1,12	21,0
	8,50	20,0	1,18	1,45	29,0	1,23	22,0
	10,2	20,0	1,16	1,71	34,2	1,47	26,0
	12,0	20,0	1,16	1,78	35,6	1,53	27,0
	13,8	20,0	1,11	1,91	38,2	1,72	29,0
	15,6	20,0	1,09	2,04	40,8	1,87	31,0

* AE = atividade enzimática (mgAR/ml.min)

** AT = atividade total (mgAR/min)

*** AE_p = atividade específica (mgAR/mgProt.)min^{-1}

TABELA 24. Efeito do EHL sôbre a eficiência da precipitação de invertase com acetona. Sistema emulsificante formado por Tween 60^R e Span 60^R.

Etapa (nome)	EHL	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	AE*	AT**	AE_p***	Rend. (%)
Autolisado	-	170	4,26	0,775	132	0,182	100
Sobrenadante pícrico	-	73,3	2,85	0,711	52,1	0,249	-
	4,70	73,3	3,09	0,690	50,6	0,223	-
	6,70	73,3	2,97	0,711	52,1	0,239	-
	8,30	73,3	3,09	0,711	52,1	0,230	-
	10,3	73,3	3,09	0,690	50,6	0,223	-
	12,9	73,3	2,97	0,690	50,6	0,223	-
	14,9	73,3	3,09	0,711	52,1	0,230	-
Ressuspensão aquosa	-	20,0	1,11	2,09	41,8	1,88	31,7
	4,70	20,0	1,25	1,38	27,6	1,10	20,9
	6,70	20,0	1,20	1,38	27,6	1,15	20,9
	8,30	20,0	1,18	1,52	30,4	1,29	23,0
	10,3	20,0	1,18	1,65	33,0	1,40	25,0
	12,9	20,0	1,16	1,85	37,0	1,59	28,0
	14,9	20,0	1,13	1,91	38,2	1,69	28,9

* AE = atividade enzimática (mgAR/ml.min)

** AT = atividade total (mgAR/min)

*** AE_p = atividade específica (mgAR/mgProt.)min^{-1}

TABELA 25. Efeito do EHL sôbre a eficiência da precipitação de invertase com acetona. Sistema emulsificante formado por Tween 80^R e Span 80^R

Etapa (nome)	EHL	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	AE*	AT**	AE_p***	Rend. (%)
Autolisado	-	170	4,26	0,775	132	0,182	100
Sobrenadante pícrico	-	73,3	2,85	0,711	52,1	0,249	-
	4,30	73,3	3,09	0,689	50,5	0,223	-
	6,40	73,3	3,09	0,689	50,5	0,223	-
	8,50	73,3	3,09	0,711	52,1	0,230	-
	10,7	73,3	2,97	0,711	52,1	0,239	-
	12,8	73,3	3,20	0,711	52,1	0,222	-
	15,0	73,3	2,97	0,711	52,1	0,239	-
Ressuspensão aquosa	-	20,0	1,11	2,09	41,8	1,88	31,7
	4,30	20,0	1,27	1,32	26,4	1,04	20,0
	6,40	20,0	1,25	1,38	27,6	1,10	20,9
	8,50	20,0	1,23	1,58	31,6	1,28	24,0
	10,7	20,0	1,18	1,65	33,0	1,40	25,0
	12,8	20,0	1,13	1,85	37,0	1,64	28,0
	15,0	20,0	1,13	1,98	39,6	1,75	30,0

* AE = atividade enzimática (mgAR/ml.min)

** AT = atividade total (mgAR/min)

*** AE_p = atividade específica (mgAR/mgProt.)min^{-1}

TABELA 26. Efeito do EHL sôbre a eficiência da precipitação de invertase com acetona. Sistema emulsificante formado por Tween 40^R e Span 40^R. Usou-se, também, laurilsulfato de sódio nas concentrações de 0,1% (LSS') e 1% (LSS")

Etapa (nome)	EHL	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	AE*	AT**	AE_p***	Rend. (%)
Autolisado	-	170	4,02	0,754	128	0,187	100
Sobrenadante pícrico	-	73,3	3,09	0,732	53,7	0,237	-
	6,70	73,3	3,09	0,711	52,1	0,230	-
	8,50	73,3	2,97	0,689	50,5	0,232	-
	10,2	73,3	3,09	0,711	52,1	0,230	-
	12,0	73,3	3,09	0,732	53,7	0,237	-
	13,8	73,3	3,09	0,711	52,1	0,230	-
	15,6	73,3	2,97	0,711	52,1	0,239	-
	LSS'	73,3	2,97	0,711	52,1	0,239	-
	LSS"	73,3	3,09	0,711	52,1	0,230	-
Ressuspensão aquosa	-	20,0	1,11	2,09	41,8	1,88	32,6
	6,70	20,0	1,23	1,42	28,4	1,15	22,2
	8,50	20,0	1,20	1,44	28,8	1,20	22,5
	10,2	20,0	1,16	1,70	34,0	1,47	26,5
	12,0	20,0	1,13	1,78	35,6	1,58	27,8
	13,8	20,0	1,11	1,91	38,2	1,72	29,8
	15,6	20,0	1,18	2,06	41,2	1,75	32,2
	LSS'	20,0	1,23	2,09	41,8	1,70	32,6
	LSS"	20,0	1,01	2,04	40,8	2,02	31,9

*AE= atividade enzimática (mgAR/ml.min); **AT= atividade total (mgAR/min)
***AE_p=atividade específica (mgAR/mgProt)min^{-1}

TABELA 27. Efeito do EHL e da natureza do tensoativo sôbre a atividade enzimática total obtida no pó acetônico (mgAR/min)

EHL	'T/S/40	''T/S/60	T/S/80'''	
6,60	27,6	27,6	27,6	L_1= 82,8***
8,40	29,0	30,4	31,6	L_2= 91,0
10,4	34,2	33,0	33,0	L_3= 100,2
12,6	35,6	37,0	37,0	L_4= 109,6
15,2	40,8	38,2	39,6	L_5= 118,6
	*C_1=167,2	C_2=166,2	C_3= 168,8	T_g= 502,2 **

*C = soma dos valores de cada coluna

**T_g= soma geral

***L = soma dos valores de cada linha

'T/S/40 = sistema emulsificante formado por: Tween 40 e Span 40

''T/S/60 = idem: Tween 60 e Span 60

'''T/S/80 = idem: Tween 80 e Span 80

TABELA 28. Análise de variância dos dados da Tabela 27

Origem da variação	Graus de liberdade	$S.Q_m$ *	Q_m *	F *
Entre subs.**	2	0,688	0,344	0,330
Entre pres.***	4	271,344	67,836	64,98
Resto	8	8,352	1,044	-
Total	14	280,384	-	-

** Subs. = substâncias

*** Pres. = pressões

* $S.Q_m$ = soma dos quadrados médios

* Q_m = quadrado médio

* F = variância. Valores tabelados: $F_{5\%}(8;2) = 19,4$ e $F_{5\%}(4;8) = 3,84$

TABELA 29. Análise das diferenças dos grupos de dados de atividades totais das tabelas 26 e 27 (teste "t")

EHL	Lotes (1)	Lotes (2)	$d_i = (X_2 - X_1)$	d_i^2
6,60	27,6	28,4***	0,8	0,64
8,40	30,3	28,8	-1,5	2,25
10,4	33,4	34,0	0,6	0,36
12,6	36,5	35,6	-0,9	0,81
15,2	39,5	41,2	1,7	2,89
			*D= 0,7 $\bar{d}$= 0,14	**D_1^2=6,95 S_{dd}=6,852 s_d=1,31

$$^{*}D = \sum_{1}^{5} d_i$$

$$^{**}D_1^2 = \sum_{1}^{5} d_i^2$$

*** Os valores representam as atividades invertásicas totais expressas em (mgAR/min)

TABELA 30. Variação da velocidade da reação enzimática em função da concentração de substrato

V*	1/v	|S|**	1/|S|	|S|/v	v/|S|
0,122	8,20	5,80	0,170	47,5	0,0210
0,208	4,80	11,7	0,0850	56,3	0,0180
0,269	3,70	17,5	0,0570	65,1	0,0150
0,312	3,20	23,4	0,0430	75,0	0,0140
0,322	3,11	24,6	0,0410	75,9	0,0130
0,326	3,07	26,7	0,0370	81,9	0,0120

*V = velocidade da reação (mgAR/ml.min)

**|S| = concentração de sacarose (mM)

TABELA 31. Valores de K_m e $V_{máx}$ calculados por diferentes métodos gráficos

Método	K_m (mM)	$V_{máx}$ (mgAR/ml.min)	Equações	F
Lineweaver-Burk	29,4	0,714	y= 1,52 +39,1x	0,999
Hofstee	24,7	0,647	y= 0,648-25,0x	-0,989
Woolf	24,3	0,633	y=37,7 + 1,60x	0,998
Cornish-Eisenthal*	23,6	0,620	-	-
Média	25,5	0,654		
Desvio-padrão	2,29	0,0362		
Valor médio para α = 0,025	25,5±7,30	0,654±0,120		
Coef.variação	8,98%	5,54%		

* Neste método consideram-se um grupo de retas. As equações são:

y= 0,021x + 0,122 ; y= 0,018x + 0,208 ;

y= 0,0133x + 0,312 ; y= 0,0130x + 0,322 ;

y= 0,015x + 0,269.

TABELA 32. Variabilidade percentual de K_m e $V_{máx}$ entre quatro métodos gráficos tomados dois a dois

Pares de Métodos	Coeficiente de variação (%)	
	K_m	$V_{máx}$
Lineweaver-Burk Hofstee	8,70	4,90
Lineweaver-Burk Woolf	9,50	6,00
Lineweaver-Burk Cornish-Eisenthal	10,9	7,00
Hofstee Woolf	0,800	1,10
Hofstee Cornish-Eisenthal	2,30	2,10
Woolf Cornish-Eisenthal	1,50	1,00

TABELA 33. Efeito da viscosidade da solução substrato sôbre a atividade invertásica do autolisado

Viscosidade (cp)	AE* (mgAR/ml.min)	AE_p** (mgAR/mgProt)min^{-1}	Conc. de sacarose (%P/V)
1,15	0,923	0,181	5
1,32	0,731	0,143	10
1,55	0,569	0,112	15
1,82	0,550	0,0900	20
2,03	0,371	0,0730	25
2,43	0,358	0,0700	30
3,05	0,321	0,0630	35
4,11	0,293	0,0570	40
4,84	0,304	0,0590	45
6,90	0,255	0,0500	50

* AE = atividade enzimática

** AE_p = atividade específica

TABELA 34. Efeito da viscosidade da solução substrato sobre as atividades invertásicas do autolisado e do pó acetônico

Viscosidade (cp)	AE* (mgAR/ml.min)		AE_p** (mgAR/mgProt)min^{-1}		Conc.de sacarose (%P/V)
	Aut.	pó	Aut.	pó	
1,30	1,23	1,48	0,265	1,88	10
3,00	0,782	1,18	0,169	1,50	10
4,00	0,645	1,05	0,139	1,33	10
6,20	0,456	0,925	0,0980	1,17	10
8,60	0,387	0,840	0,0830	1,06	10
13,2	0,447	0,882	0,0960	1,12	10
16,8	0,576	1,05	0,124	1,33	10

* AE = atividade enzimática
** AE_p = atividade específica

F I G U R A S

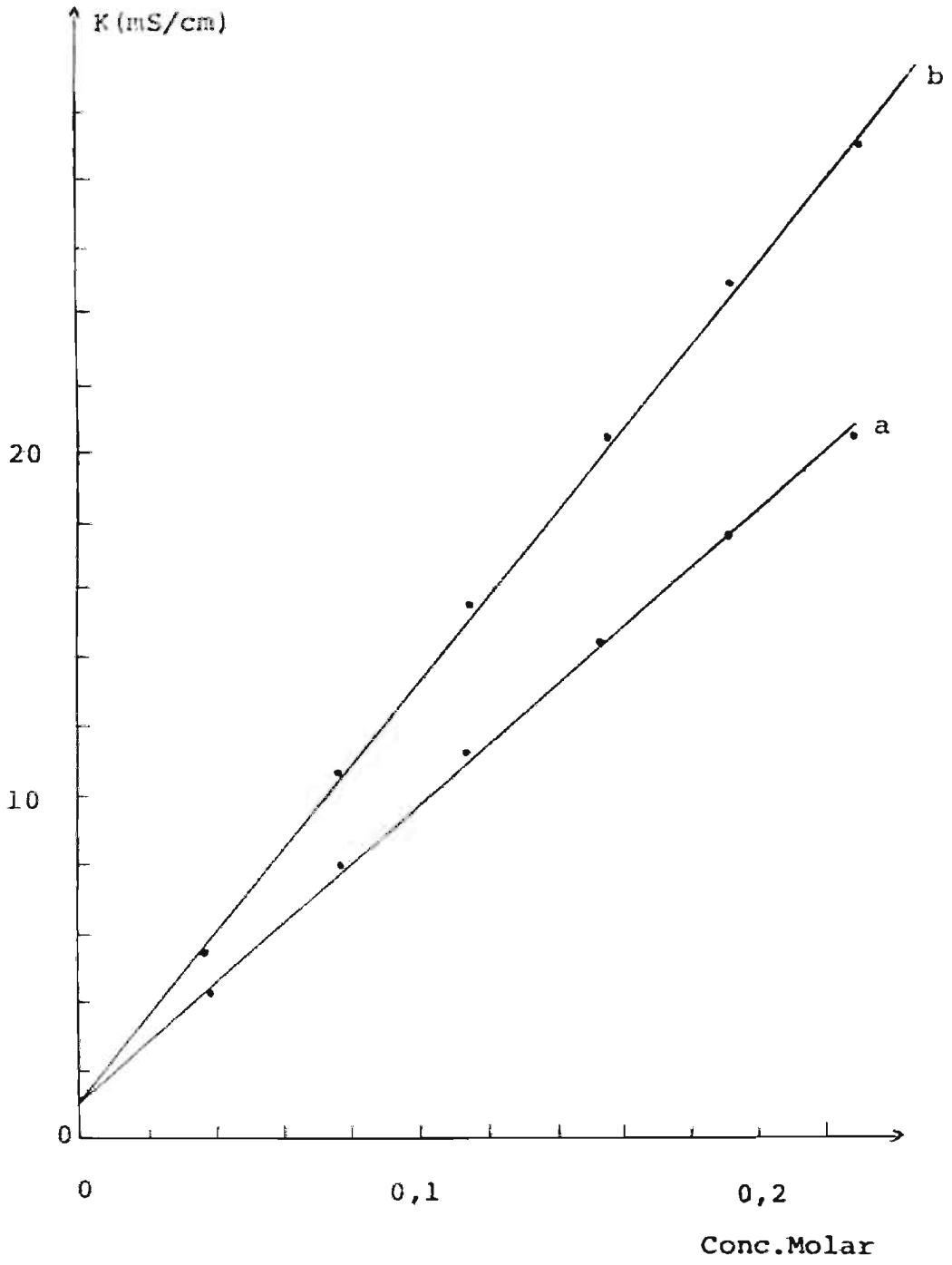

FIGURA 1. Relação entre a condutividade específica das soluções salinas e a concentração dos sais. As retas a e b correspondem, respectivamente, às soluções de $NaHCO_3$ e NaCl.

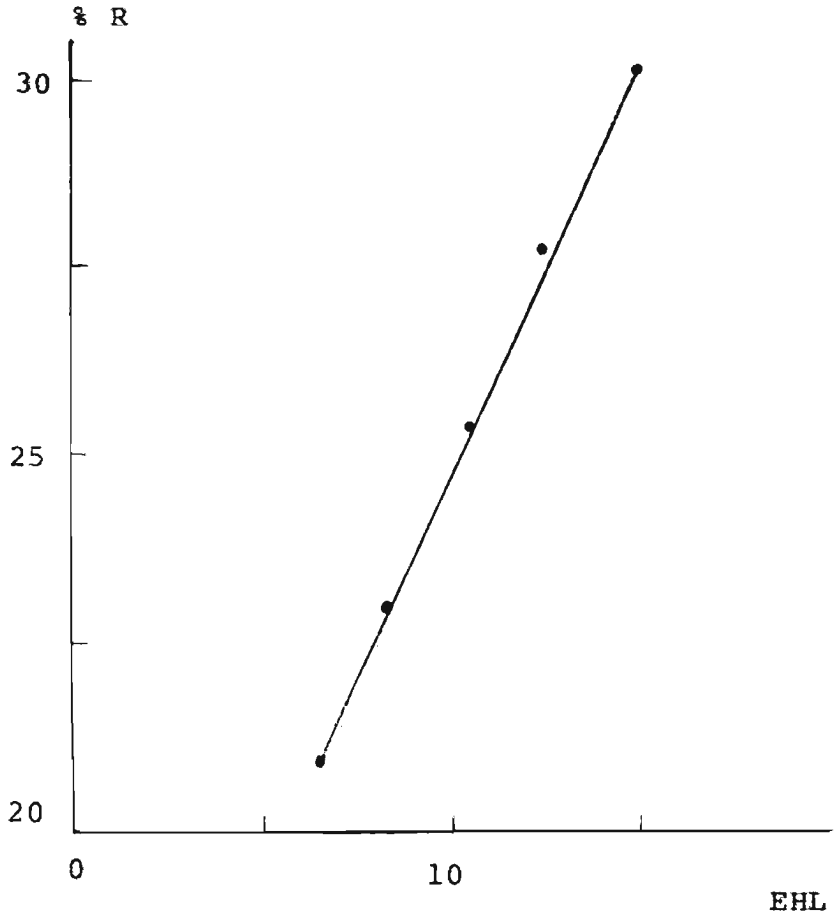

FIGURA 2. Relação entre o EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo) e a percentagem de rendimento em invertase no pó acetônico.

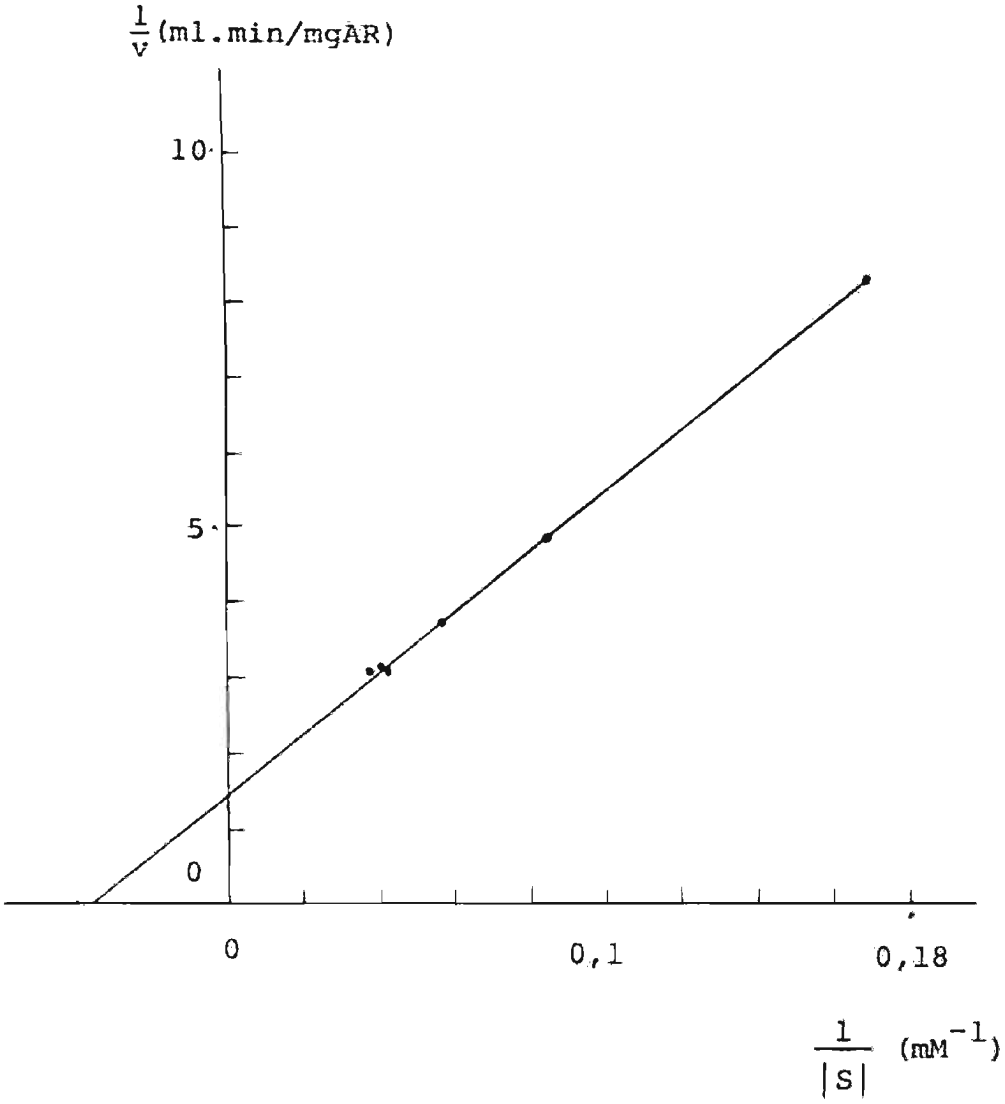

FIGURA 3. Determinação de K_m e $V_{máx}$ conforme método de Lineweaver-Burk.

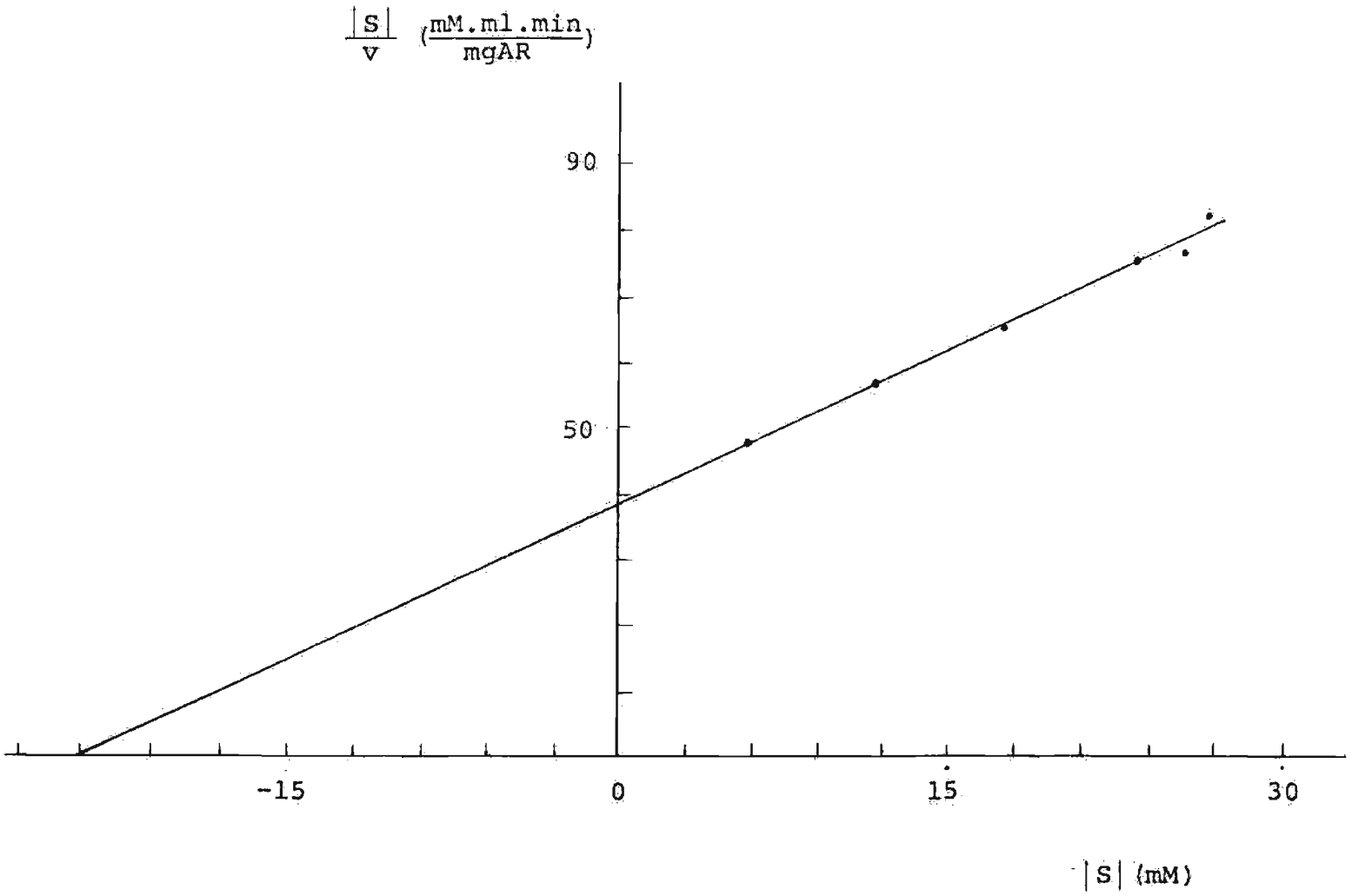

FIGURA 4. Determinação de K_m e $V_{máx.}$ conforme método de Woolf.

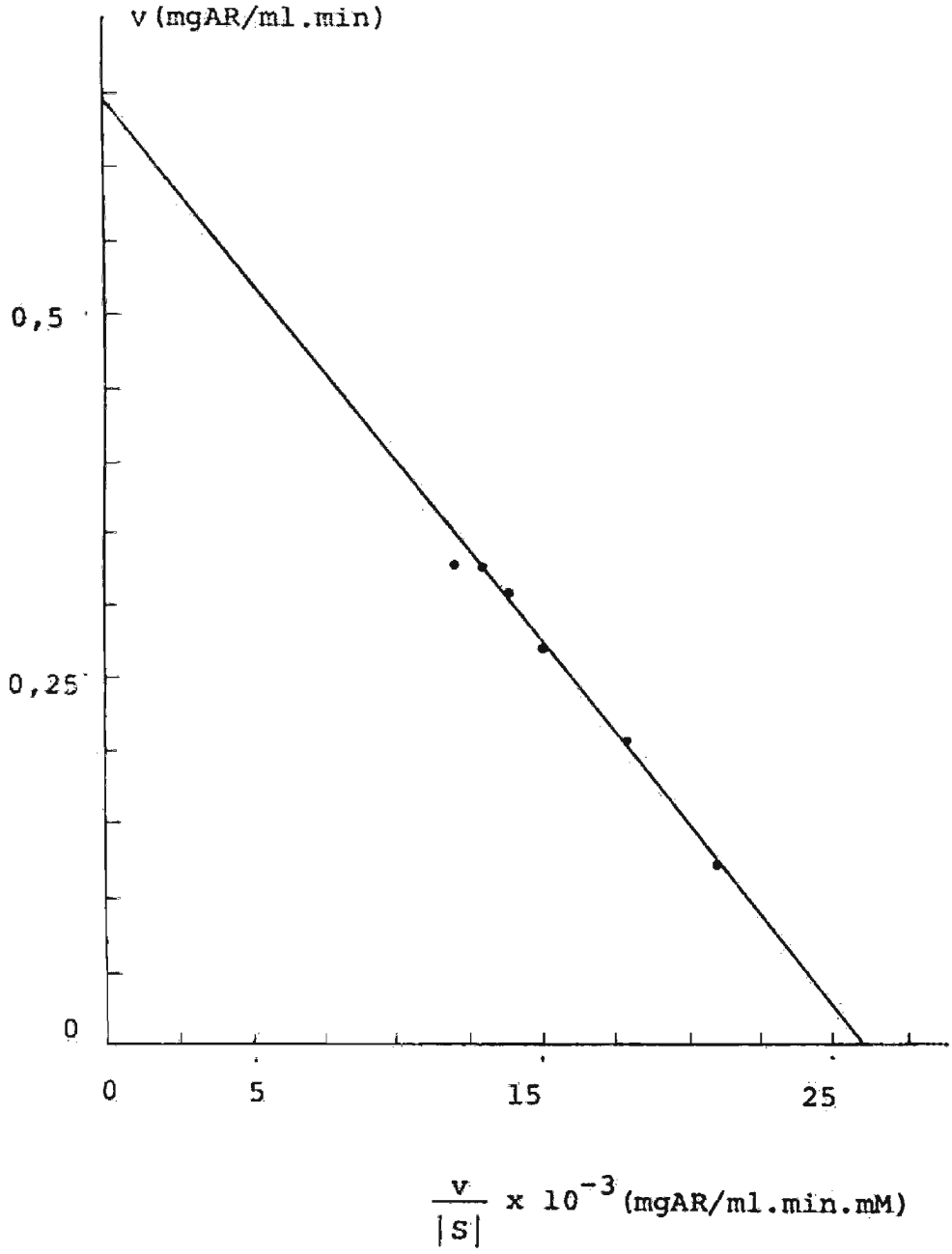

FIGURA 5. Determinação de K_m e $V_{máx.}$ conforme método de Hofstee.

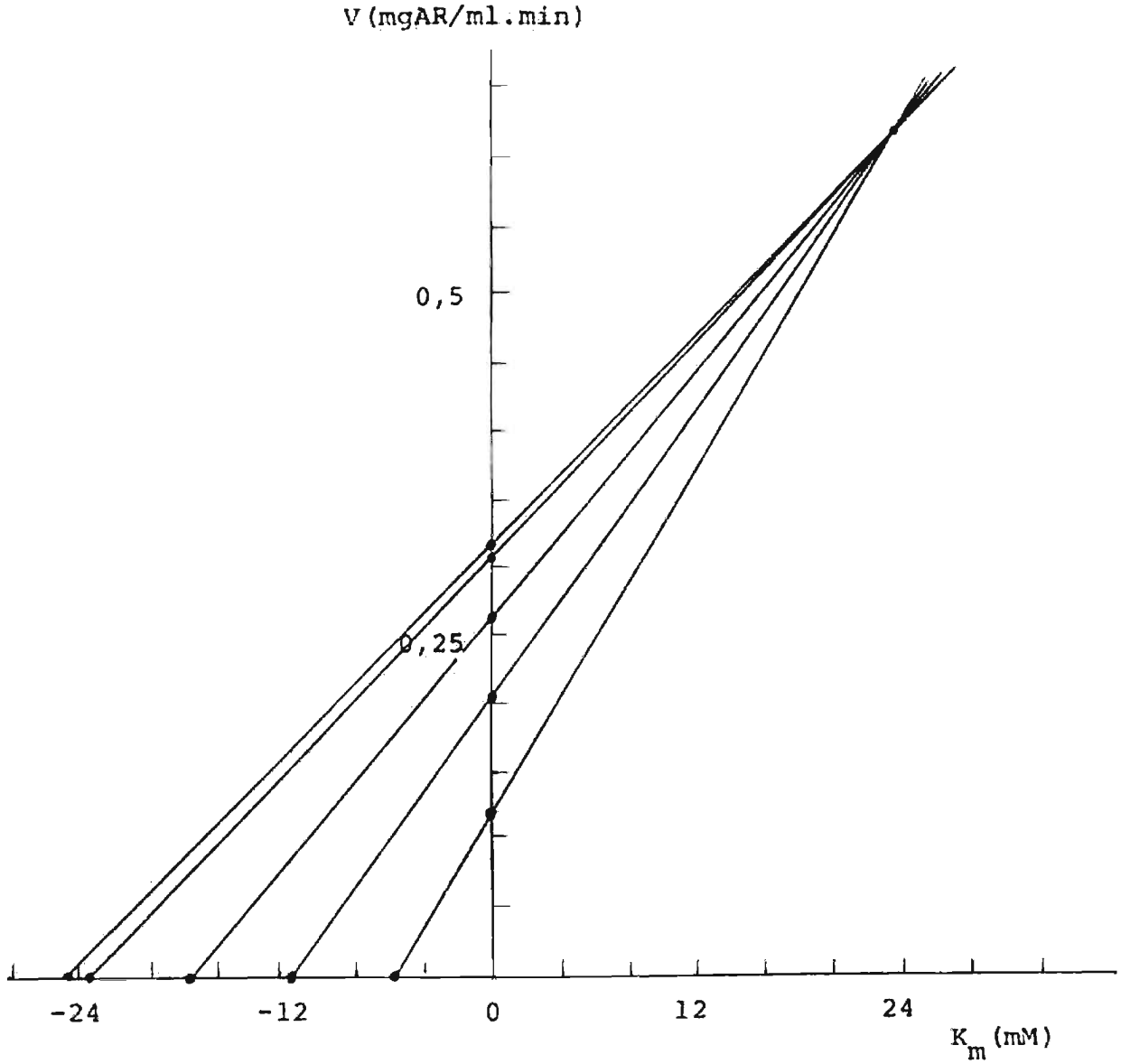

FIGURA 6. Determinação de K_m e $V_{máx.}$ conforme método de Cornish-Eisenthal.

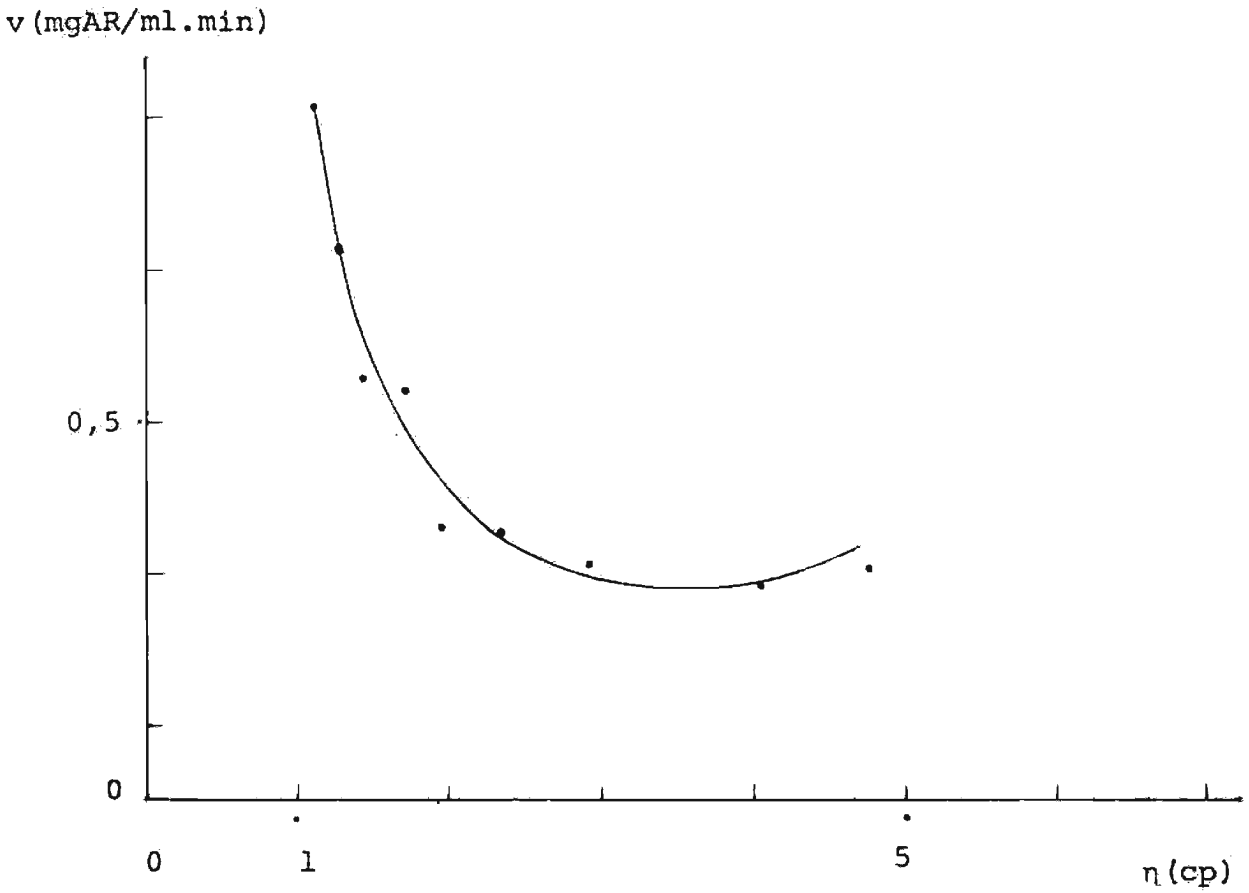

FIGURA 7. Relação entre a atividade enzimática e a viscosidade da solução de sacarose.

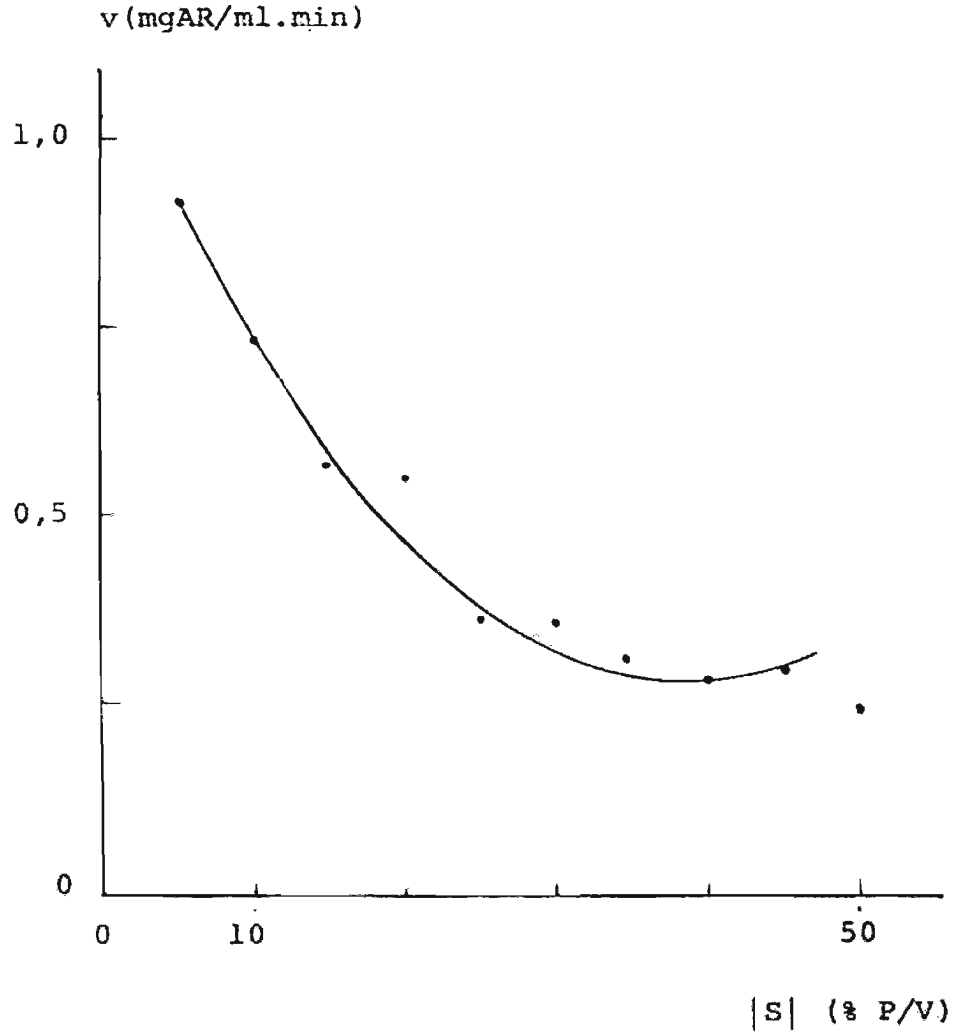

FIGURA 8. Relação entre a atividade enzimática e a concentração percentual da solução de sacarose.

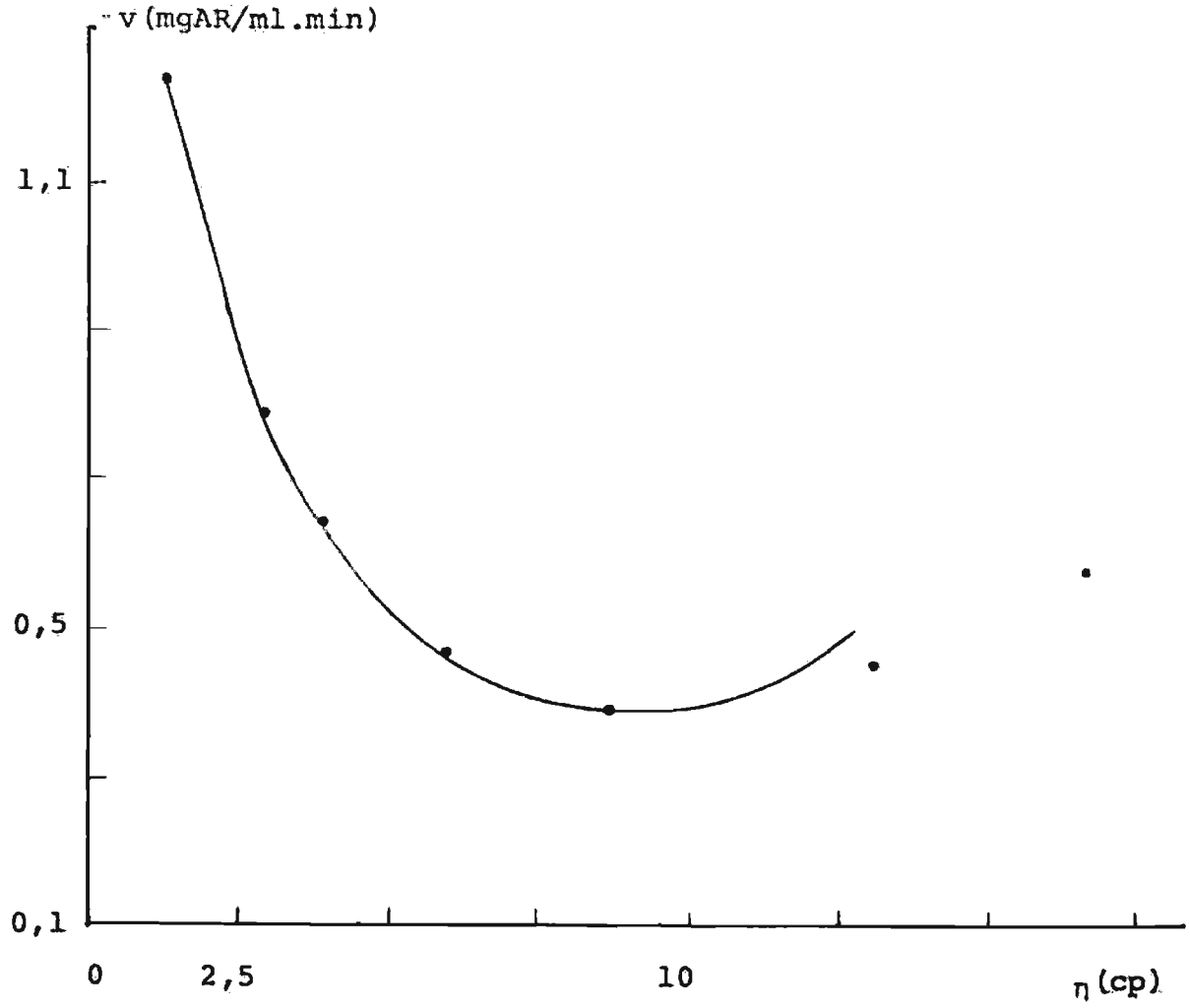

FIGURA 9. Relação entre a atividade enzimática do autolisado e a viscosidade (variada com CMC) do sistema de reação.

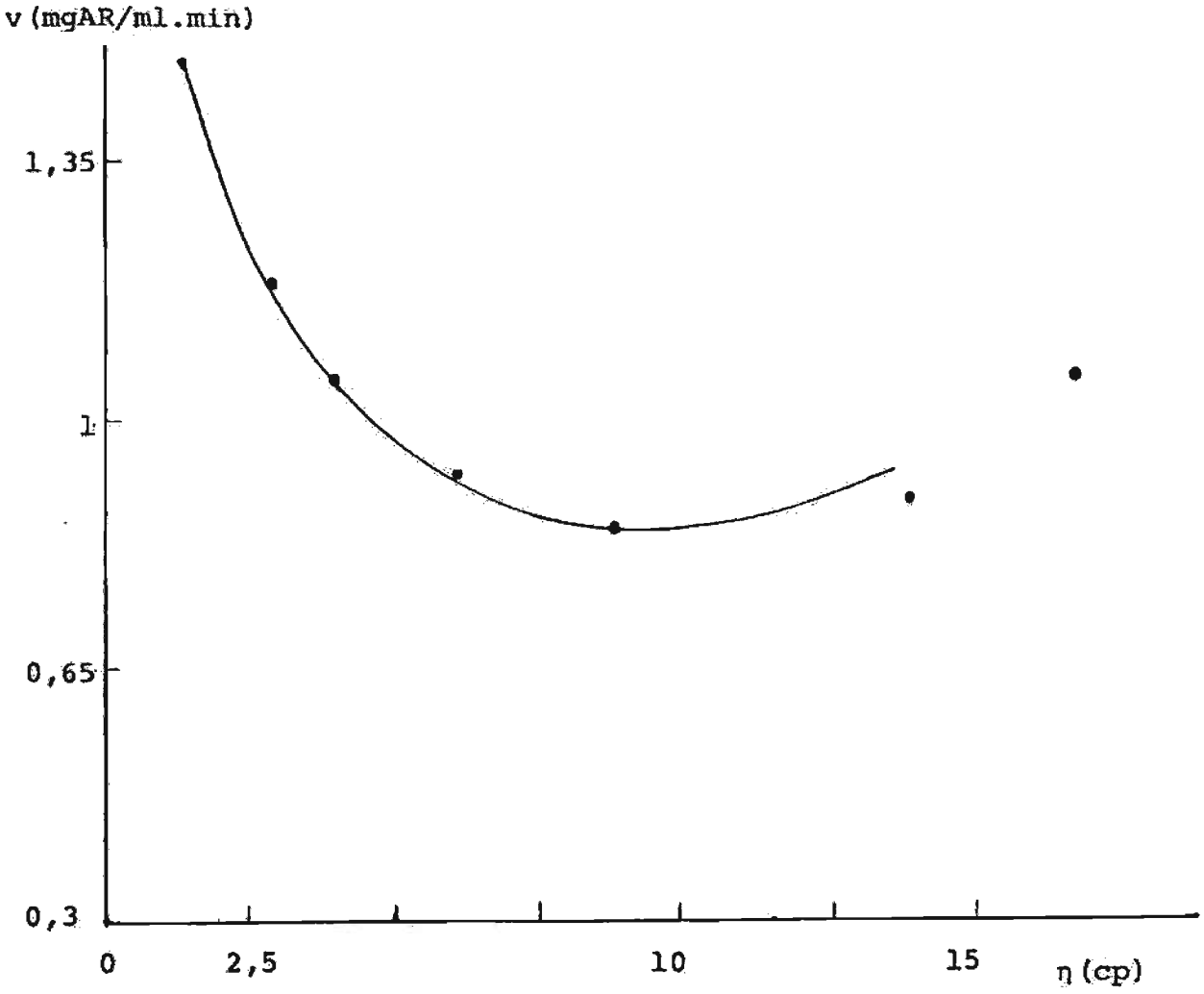

FIGURA 10. Relação entre a atividade enzimática do pó acetônico e a viscosidade (variada com CMC) do sistema de reação.

4. DISCUSSÃO

4.1 TIPO DE AGITAÇÃO

Pela análise da tabela 1 constata-se que o tipo de agitação influi no processo de extração. O autolisado obtido num agitador rotatório possui uma atividade invertásica específica superior àquela obtida com agitador recíproco. Contudo em termos de percentagem de rendimento ambos apresentam valores aproximados.

Isto sugere que, provávelmente, no recíproco o grau de denaturação é maior do que no rotatório. Explica-se os rendimentos análogos pelo fato dos mesmos serem calculados como frações percentuais da atividade enzimática existente no autolisado. Para este cálculo, portanto, não se considera a quantidade de proteína enzimática denaturada durante o processo (2).

Está claro que o padrão de fluxo do fluido autolisante influi na atividade enzímica obtida. Embora a frequência de agitação (200 ciclos/min) fosse mantida constante para ambos os casos, no recíproco o regime é aparentemente turbulento, ao passo que no rotatório é laminar. Provávelmente o maior grau de denaturação ocorrido no recíproco, esteja relacionado ao fato de que sob este regime, a proteína enzimática sofre desarranjos estruturais que se refletem sobre sua atividade catalítica.

4.2 DETERMINAÇÃO DOS NÚMEROS DE REYNOLDS E FROUDE

Pela tabela 2 depreende-se que a densidade e a viscosidade do fluido autolisante variam ligeiramente. O coeficiente de variação para a densidade foi de 0,28% e para a viscosidade 3,8%.

Pelo teste "t" calculou-se que o valor médio da densidade é 1,020 $\pm$ 0,003383 g/cm^3 e da viscosidade é 2,171 $\pm$ 0,09381 cp. Estes resultados foram obtidos com um grau de confiança igual a 95% e com 5 graus de liberdade.

Admitindo-se o fluido autolisante como sendo newtoniano e com a densidade e viscosidade constantes, a equação do movimento é dada por (19):

$$d\,\frac{D\vec{v}}{Dt} = -\nabla_p + \eta\nabla^2_{\vec{v}} + d\vec{g} \qquad \text{(XXXIV)}$$

onde:

$\frac{D\vec{v}}{Dt}$ é a derivada substancial da velocidade em relação ao tempo.

∇_p é o gradiente de pressão.

$\nabla^2_{\vec{v}}$ é o laplaciano da velocidade.

d é a densidade do fluido.

$\vec{g}$ é o vetor aceleração da gravidade.

Fixemos como grandezas características do sistema o diâmetro (D) do recipiente e a velocidade média (V) do fluido.

Por meio das grandezas acima definamos as seguintes variáveis adimensionais:

$$\vec{v}^{\,*} = \frac{\vec{v}}{V} \qquad p^* = \frac{(p - p_o)}{dV^2} \qquad t^* = \frac{tV}{D} \tag{XXXV}$$

$$\nabla^* = D\nabla \qquad \nabla^{*2} = D^2\nabla^2 \tag{XXXVI}$$

$$\frac{D}{Dt^*} = \left(\frac{D}{V}\right)\frac{D}{Dt} \tag{XXXVII}$$

Substituindo-se as equações XXXV, XXXVI e XXXVII na XXXIV, temos:

$$d\left(\frac{V}{D}\right) . \frac{D(v^* V)}{Dt^*} = - \left(\frac{1}{D}\nabla^* \; p^* \; dV^2\right) + \eta \frac{1}{D^2} \nabla^{*2} (v^* V) + dg$$

Multiplicando por $D/d.V^2$, temos:

$$\frac{D\vec{v}^*}{Dt^*} = -\nabla^* p^* + \frac{\eta}{DVd} \nabla^{*2} \vec{v}^* + \frac{gD}{V^2} \tag{XXXVIII}$$

Na equação adimensional acima surgem dois grupos de grandezas adimensionais, que reünem as propriedades físicas do sistema.

Ao inverso do coeficiente do laplaciano da velocidade deu-se o nome de número de Reynolds. Assim:

$$N_{Re} = \frac{DVd}{\eta} \tag{XXXIX}$$

À grandeza V^2/gD deu-se o nome de número de Froude. Assim:

$$N_{Fr} = \frac{V^2}{gD} \qquad \text{(XL)}$$

Os números de Reynolds e Froude por descreverem o tamanho, a velocidade e as propriedades físicas do sistema receberam o nome de fatores de escala.

Ambos são de grande valia para se proceder à variação de escala de um sistema.

Se dois sistemas distintos tiverem os mesmos números de Froude e Reynolds, então ambos serão descritos pelas mesmas equações diferenciais adimensionais.

Em nosso sistema podemos considerar: regime estacionário (densidade e viscosidade constantes), velocidade angular do frasco igual a W, o raio do frasco igual a R, fluido newtoniano, fluxo laminar tangencial, sistema isotérmico, o sistema de referência em coordenadas cilíndricas e o fluido está em movimento circular uniforme.

A equação da continuidade em coordenadas cilíndricas (19) é:

$$\frac{\delta d}{\delta t} + \frac{1}{r} \cdot \frac{\delta}{r}(drv_r) + \frac{1}{r} \cdot \frac{\delta}{\delta \theta}(d.v_\theta) + \frac{\delta}{\delta z}(d\ v_z) = 0 \qquad \text{(XLI)}$$

De acordo com as considerações iniciais a equação (XLI) se anula, pois:

$\frac{\delta d}{\delta t} = 0$ (o fluido é incompressível).

$v_r = v_z = 0$ (regime estacionário) e $v_\theta = f(r)$

$\frac{\delta v_\theta}{\delta \theta} = 0$ (movimento circular uniforme).

A componente θ da equação do movimento é (19):

$$d\left(\frac{\delta v_\theta}{\delta t} + v_r \frac{\delta v_\theta}{\delta r} + \frac{v_\theta}{r} \cdot \frac{\delta v_\theta}{\delta \theta} + \frac{v_r \cdot v_\theta}{r} + v_z \cdot \frac{\delta v_\theta}{\delta z}\right) = -\frac{1}{r}\frac{\delta p}{\delta \theta} + dg_\theta +$$

$$+ \eta\left\{\frac{\delta}{\delta r}\left|\frac{1}{r} \cdot \frac{\delta}{\delta r}(rv_\theta)\right| + \frac{1}{r^2} \cdot \frac{\delta^2 v_\theta}{\delta \theta^2} + \frac{2}{r^2} \cdot \frac{\delta v_r}{\delta \theta} + \frac{\delta^2 v_\theta}{\delta z^2}\right\}$$

(XLII)

Tendo em vista as considerações acima e, ainda, que:

$\frac{\delta v_\theta}{\delta t} = 0$ (regime estacionário)

$\delta^2 v_\theta / \delta \theta^2 = 0$ (movimento circular uniforme)

$\delta^2 v_\theta / \delta z^2 = 0$ (v_θ não varia ao longo do eixo z)

$g_\theta = g_r = 0$ (a aceleração da gravidade só influi ao longo do eixo z)

A equação XLII fica:

$$\frac{\delta}{\delta r}\left|\frac{1}{r} \cdot \frac{\delta}{\delta r}(r \cdot v_\theta)\right| = 0 \qquad \text{(XLIII)}$$

logo:

$$\frac{1}{r} \cdot \frac{\delta(rv_\theta)}{\delta r} = c_1$$

Integrando e ajeitando, temos:

$$v_\theta = C_1 \cdot \frac{r}{2} + \frac{C_2}{r} \qquad \text{(XLIV)}$$

$C_2 = 0$, pois v_θ tem um valor finito quando $r = 0$.

para $r = R$ temos:

$$v_\theta = RW \qquad \text{(XLV)}$$

igualando XLIV e XLV temos:

$$C_1 = 2W \qquad \text{(XLVI)}$$

Substituindo XLVI em XLIV temos:

$$v_\theta = rW \qquad \text{(XLVII)}$$

Tendo em vista as considerações feitas, as equações XXXIX e XL podem ser escritas:

$$N_{Re} = \frac{Dv_\theta d}{\eta} \qquad \text{(XLVIII)}$$

$$N_{Fr} = \frac{v_\theta^2}{gD} \qquad \text{(XLIX)}$$

Define-se em física que

$$W = 2\pi f$$

onde f é a frequência.

Então, substituindo na XLVII temos:

$$v_\theta = 2\pi\ fr \qquad \text{(L)}$$

Substituindo (L) em (XLVIII) e (XLIX) temos:

$$N_{Re} = \frac{4\pi\ fr^2 d}{\eta} \quad (LI) \qquad e \qquad N_{Fr} = \frac{2\ \pi^2\ f^2 r}{g} \quad (LII)$$

Através das equações LI e LII calculou-se os fatores de escala, lançados nas tabelas 2 e 3.

Pela tabela 2 vemos que o coeficiente de variação para o número de Reynolds é de 3,74%. O valor médio, calculado pelo teste "t" com 95% de certeza , é 563,7 $\pm$ 54,2. Considerando esta variação desprezível, bem como as da densidade e viscosidade, podemos tomar como valores destas grandezas, respectivamente, 1,020 g/cm^3,2,171 cp e 563,7.

Os fatores de escala constantes na tabela 3 foram calculados com base nos valores médios acima.

Da tabela 3 infere-se que a atividade enzimática do autolisado obtido varia com os fatores de escala. A atividade invertásica atinge um máximo para número de Reynolds e Froude iguais, respectivamente, a 563 e 1,20, decrescendo a seguir.

Experimentalmente observou-se que para Reynolds de 985 o fluido apresentava vários pontos de turbilhonamento. Isto nos leva a crer que para este caso particular de sistema, atinge-se o regime turbulento para Reynolds superior ou igual a 1000.

O fato de que a atividade invertásica decai a partir de um certo valor de Reynolds, nos leva a

admitir que a autólise das células não deve ser realizada em regime turbulento. Inclusive o fato de termos obtido em agitador recíproco um rendimento cerca de 45% inferior ao do agitador rotatório, corrobora a afirmação anterior. Lembremos que no recíproco o regime de fluxo numa freqüência de 200 ciclos/min visualmente se apresenta turbulento.

4.3 EFEITO DA TEMPERATURA

Da tabela 4 infere-se que a temperatura de autólise influi no teor de atividade invertásica do autolisado. Pelos resultados observa-se que a faixa de temperatura mais adequada situa-se entre 35 e 45°C.

Este resultado concorda com VILLELA, BACILA & TASTALDI (89) que preconizam uma temperatura de 45°C para a autólise de células de levedura em solução salina (bicarbonato de sódio 0,154M).

4.4 EFEITO DA PRESSÃO OSMÓTICA E NATUREZA DO SAL SÔBRE O TEOR DE ATIVIDADE INVERTÁSICA DO AUTOLISADO

O método de ruptura das células de levedura consistiu de uma autólise salina durante período e temperatura determinados. Conforme VILLELA *et al* (89) utilizou-se uma solução de bicarbonato de sódio 0,154 M.

Uma solução é constituida de espécies químicas dissolvidas num solvente. Este sistema possui algumas propriedades devidas à presença destas espécies. Dentre elas salienta-se a pressão osmótica, que é uma propriedade relacionada apenas com o número de partículas dispersas e não com a natureza das mesmas.

Pelas equações (VI) e (VII) calcula-se que a pressão osmótica de uma solução de bicarbonato de sódio 0,154 M é de 8 atm. Este dado corresponde ao valor médio atribuído à pressão osmótica intracelular (59).

Baseados nisto resolveu-se estudar o efeito que a pressão osmótica da solução autolisante teria sobre a atividade invertásica total do autolisado obtido. Para tal preparou-se soluções de bicarbonato de sódio, cloreto de sódio e cloreto de potássio, nas concentrações adequadas, para que se obtivessem valores de pressão compreendidos entre 0,500 e 14,0 atm.

Em paralelo estudou-se, também, a influência da natureza do sal.

Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas 5 a 11. Observando-as vemos que os valores da atividade enzimática total (mgAR/min) são diferentes para ambos os fatores.

Na tabela 10 notam-se valores não coincidentes, sendo que a atividade total máxima foi obtida em 8 atm para o bicarbonato de sódio e em 2 atm para os cloretos.

Além disso para o caso do bicarbonato de sódio, à medida que a pressão osmótica aumenta a atividade cresce até atingir um máximo, decaindo a seguir. Já para os cloretos a atividade total é decrescente com o aumento da pressão osmótica.

Comparando-se as tabelas 5 e 6 notamos ligeira variação entre os dois grupos de valores das atividades totais, embora tenham sido obtidos nas mesmas condições. Daí surge a questão: os lotes representam ou não amostras de uma mesma população?

Para verificar, analisou-se estatísticamente as diferenças entre ambos os lotes, usando-se o teste "t" bilateral (83). Os resultados estão na tabela 12.

Admitindo-se como hipótese nula a igualdade dos lotes e com um grau de confiança igual a 99% e 4 graus de liberdade, concluiu-se que as flutuações das diferenças observadas são devidas ao acaso. O valor calculado para "t" foi de 3,40 e o tabelado entre -4,60 e 4,60.

Comparando-se as tabelas 7 e 8 nota-se que há diferenças entre os valores da atividade total, para o autolisado obtido com NaCl em pH 7,0 e em pH 8,9. Neste caso os lotes diferem apenas num parâmetro. Surge então, o problema de saber se os dois lotes são ou não amostras de populações diferentes. Em outros termos, o pH influi ou não na atividade enzimática total do autolisado?

Aplicando-se o teste "t", cujos dados estão na tabela 13 calculou-se para as amostras o valor 1,47. O valor tabelado com 8 graus de liberdade e 99% de confiança está entre -3,36 e 3,36. Tendo sido tomada como hipótese nula a não existência de diferença entre os valores obtidos em pH 7,0 e 8,9, conclui-se que ela não pode ser rejeitada. Daí o pH não influir.

Para analisar-se os efeitos da pressão osmótica e da natureza do sal utilizou-se a análise de variância (57). Os dados estão nas tabelas 14 e 15.

Os valores de F calculados para a variância dos dados devido à natureza do sal e a pressão osmótica são, respectivamente, 6,42 e 3,24. Os correspondentes valores de F tabelados são: $F_{5\%}(2;10) = 4,10$ e $F_{5\%}(5;10) = 3,33$.

Assim para o caso da natureza do sal F calculado é maior do que F tabelado e para a pressão osmótica ocorre o inverso. Disto infere-se que aquele, com 95% de segurança, apresenta efeito, enquanto que para este os dados disponíveis são insuficientes para uma conclusão segura.

Em adição, das tabelas 16 e 17, onde foram usados outros tipos de sais, vemos que o valor de $F_{calc.} = 30,21$ é maior do que o tabelado: $F_{5\%}(2;2)=19,00$. Isto corrobora a conclusão acima. Com relação à pressão osmótica, ainda, não se pode concluir com segurança sobre seu efeito, apesar de $F_{calc.} = 2,742$ e $F_{tab.} = 18.51$.

A conclusão de que o tipo de agente autolisante influi no rendimento em invertase no autolisado, vem de encontro ao fato da enzima estar presa à parede celular. É evidente que o tipo de sal usado, cederá ao sistema íons que, provávelmente, interagirão em graus diferentes com as ligações envolvidas na união entre a proteína enzimática e a parede celular. Daí resultando a liberação de invertase em quantidades distintas.

Embora não se possa afirmar com segurança sobre o efeito da pressão osmótica, parece razoável admitir que ela não deveria realmente influir, dada à localização externa da invertase. Certamente a parede celular não apresenta permeabilidade seletiva, sendo livremente atravessada pelos íons. Daí não surgir um gradiente de pressão osmótica através da parede celular.

Além do mais, salienta-se que a faixa de pressão osmótica utilizada incluiu situações em que o meio extracelular era hipo e hipertônico em relação ao intracelular. Daí, caso a invertase fosse intracitoplasmática, o efeito da pressão deveria ser ponderável.

Baseados nestes fatos, pode-se admitir o não efeito da pressão osmótica, como sendo uma evidência indireta da localização extracitoplasmática da invertase.

BURGER (22) estudou a influência da pressão osmótica sobre a liberação de invertase. Este autor usou glicerol em concentrações percentuais (v/v), que

lhe permitiram obter uma gama de pressão osmótica entre 3,4 e 34 atm. Concluiu que a pressão osmótica não influia na liberação de invertase a partir de células de levedura.

Este autor não conseguiu liberar a invertase de S. cerevisiae, usando glicerol como agente autolisante, ao passo que nós o conseguimos, porém utilizando solução salina. Certamente a diferença reside na natureza do agente autolisante.

Uma explicação plausível estaria relacionada com o fato do polissacarídeo manana poder ser extraído da parede celular por meio de soluções salinas. Sobretudo por uma solução de álcali diluído (76), caso em que se enquadra a solução de bicarbonato de sódio. Por conseguinte, desde que a invertase está associada à manana (12),(69),(70), é de se esperar sua liberação para o meio.

4.5 POSSÍVEL USO DE MEDIDAS CONDUTIMÉTRICAS PARA CONTRÔLE DO PROCESSO

As soluções de eletrólitos conduzem a corrente elétrica por meio da migração de íons, obedecendo à lei de Ohm, tal como os condutores metálicos.

Assim ao aplicar-se uma F.E.M. constante entre dois eletrodos mergulhados numa solução eletrolítica, a intensidade de corrente "i" que flui é inversamente proporcional à resistência (R) da solução. Chama-se de condutância (G) à recíproca da resistência. A condutância depende da concentração e da natureza do eletrólito (72).

A relação básica da condutometria é:

$$G = \frac{1}{R} = k.\frac{a}{L} \qquad \text{(LIII)}$$

onde: G = condutância

k = condutância específica (mS/cm)

a = área da secção da solução compreendida entre os eletrodos

L = distância entre os eletrodos

Da tabela 18 infere-se que a condutividade específica das soluções varia com o número de moles do eletrólito e por conseguinte com a pressão osmótica.

A figura 1 mostra uma solução linear entre a condutividade específica e a concentração dos eletrólitos.

As equações das retas a e b com os coeficientes de correlação, são respectivamente:

$$k = 84{,}7c + 1{,}25 \qquad r = 1{,}00 \qquad \text{(LIV)}$$

$$k = 123c + 1{,}20 \qquad r = 1{,}00 \qquad \text{(LV)}$$

onde k = condutividade específica (mS/cm)

c = concentração molar do eletrólito.

Pela tabela 18 obtém-se os valores de k para o autolisado feito com $NaHCO_3$ (8 atm) e NaCl (2 atm), os quais são, respectivamente, iguais a 11,5 e 12,0 mS/cm.

Substituindo-se k= 11,5 na (LIV) e K= 12,0 na (LV) obtém-se c= 0,121 M e c= 0,0877 M, respectivamente.

Como se observa, para o bicarbonato há uma queda da condutividade, cujo valor corresponderia ao de uma solução 0,121 M. Para o cloreto de sódio há um aumento da condutividade, a qual corresponderia a uma solução de concentração igual a 0,0877 M.

Para o caso do bicarbonato pode-se aventar duas hipóteses para explicar a queda da condutividade:
a) as macromoléculas depositam-se sobre a superfície dos eletrodos de platina, aumentando a capacitância do sistema;
b) como as macromoléculas geralmente em solução possuem caráter anfotérico, o pH alcalino do autolisado poderia favorecer o aparecimento de grupos carregados, os quais diminuiriam sua mobilidade. Ou então tais grupos interagiriam com os íons, diminuindo-lhes a mobilidade.

No caso do cloreto de sódio pode-se aventar, essencialmente as mesmas hipóteses. Ressalvando-se, apenas, que o pH neutro favoreceria o aparecimento de grupos carregados nas macromoléculas, conferindo-lhes maior mobilidade, ou uma queda no grau de interação com os íons.

Os resultados disponíveis, infelizmente, não nos permitem fugir do campo das hipóteses. Contudo, desde que foi constatada uma diferença de condutividade antes e após a autólise, fica aberta a possibilidade de se usar a condutometria como parâmetro de contrôle do processo.

4.6 EFEITO DE TENSOATIVOS SÔBRE A LIBERAÇÃO DE INVERTASE

ALMEIDA CUNHA et al (3) salientaram a importância que o equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) tem sôbre as interações hidrofóbicas de um sistema. Neste trabalho o autor demonstrou que variando o EHL, a atividade da renina era afetada. Aventou a hipótese de que o EHL influindo na hidrofobicidade do meio afetaria a interação enzima-substrato.

Partindo de um raciocínio análogo, procurou-se averiguar a possibilidade de aumentar a liberação de invertase através de modificações das interações hidrofóbicas do sistema. Portanto a finalidade precípua da variação do EHL é interferir nas ligações entre a proteína enzimática e os constituintes da parede celular. Secundariamente poder-se-ia esperar alguma influência sobre a atividade catalítica da invertase, pois os tensoativos utilizados estariam dissolvidos no autolisado.

Em relação a esta segunda parte SARASWAT (80) evidenciou uma queda da atividade invertásica devido ao efeito de tensoativos iônicos. Constatou,outrossim, que os catiônicos causavam a maior inibição. No entanto, os dados obtidos por este autor não podem ser comparados aos nossos, devido ao fato de termos usado tensoativos não iônicos. Saliente-se, inclusive, que os tensoativos iônicos apresentam EHL muito alto (superior a 20), não se enquadrando dentro da faixa de EHL obtida com os agentes não iônicos.

Comparando-se as tabelas 19 e 20 vemos que as atividades totais são diferentes. Para saber se esta diferença é ou não significativa usou-se o teste "t", cujos dados estão na tabela 21. Os valores de "t" encontrados são: $t_{calc.} = 27,1$ e $t_{5\%}(4) = 2,78$. Disto conclui-se que há diferença significativa entre os dois lotes de resultados.

Uma explicação possível seria a não homogeneidade do teor de invertase da levedura utilizada, desde que os experimentos, embora realizados sob as mesmas condições, foram feitos em épocas diferentes.

Para tornar os dados comparáveis, construiu-se a tabela 22 onde os resultados representam as percentagens das atividades totais frente aos brancos respectivos.

Aplicando o teste "t" à tabela 22 encontram-se os valores: $t_{calc.} = 2,56$ e $t_{5\%}(3) = 3,18$. Como $t_{calc.}$ é menor que $t_{tab.}$ conclui-se que não há diferença significativa entre os dois lotes.

Esta conclusão, por outro lado, permite-nos inferir que o EHL influi de maneira análoga em ambos os casos.

Pela tabela 22 observamos que os coeficientes de variação das percentagens e do EHL valem, respectivamente, 9,8 e 5,3%.

Depreende-se, portanto, que a variação do EHL promove variação, embora pouco acentuada, so

bre o teor de invertase total liberada.

Examinando-se a percentagem da atividade total em função de cada valor de EHL, nota-se que, apenas, para EHL de 15,6 houve um aumento da atividade invertásica total no autolisado.

Desde que a faixa de EHL considerada foi muito estreita, surge a questão: este aumento na atividade total seria, efetivamente, devido ao valor do EHL ou à natureza química do tensoativo?

É claro que para responder satisfatoriamente a esta questão, seriam necessários mais resultados, sobretudo ampliando-se a faixa de EHL.

4.7 EFEITO DO EHL SÔBRE A EFICIÊNCIA DA PRECIPITAÇÃO DA INVERTASE COM ACETONA

O EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo é um sistema de classificação de tensoativos introduzido por GRIFFIN (42).

O EHL é a expressão da atração simultânea de um tensoativo pela água e pelo óleo ou pelas duas fases de um sistema emulsionado.

Todos os tensoativos para poderem ser classificados como tais, devem possuir na molécula uma porção hidrofílica e outra lipofílica.

Griffin introduziu este sistema, admitindo a seguinte definição para o EHL:

$$EHL = \frac{\text{PM da porção hidrofílica}}{\text{PM total}} \times \frac{1}{5} \qquad \text{(LVI)}$$

De acordo com esta definição o EHL nada mais é do que um número adimensional, cujo valor varia entre 0 e 20. Deve-se ressaltar que a relação acima só é válida para os tensoativos não iônicos, tais como : Tween^R e Span^R.

Para outros tipos de tensoativos devem ser usadas outras relações.

Desde que as diversas fôrças interagentes num sistema são das mais variadas naturezas, inclusive hidrofóbicas, pode-se correlacionar o EHL com fôrças desta classe. Aliás esta idéia já foi aplicada no ítem anterior.

Baseados neste ponto de vista, tentamos melhorar o rendimento da precipitação da invertase com acetona a partir do sobrenadante pícrico, pela interferência sôbre as eventuais fôrças hidrofóbicas existentes.Fez-se isto pelo uso de misturas de tensoativos não iônicos, que forneceram valores de EHL bem determinados.

As tabelas 23-26 mostram os resultados obtidos. Combinando-se as tabelas 23-25 resultou a tabela 27, na qual estão correlacionados os efeitos do EHL e a natureza do tensoativo.

Fazendo-se uma análise de variância dos dados da tabela 27 obtém-se: a) natureza do tensoativo:

$F_{calc.} = 0,330$ e $F_{5\%}$ (8;2) = 19,4; b) EHL: $F_{calc.} = 64,98$ e $F_{5\%}$ (4;8) = 3,84.

Pela análise de variância (tabela 28) infere-se que a natureza do sistema de tensoativos não influi na eficiência da precipitação acetônica da inversão.

Com relação ao EHL nota-se que sua influência é ponderável sôbre a eficiência da precipitação.

Uma explicação provável reside no fato de que ao se adicionar acetona ao sobrenadante pícrico, o sistema tem sua polaridade global diminuída, daí ficar mais susceptível às influências desempenhadas pelo sistema de tensoativos.

Pela tabela 27 observa-se que a atividade total do pó acetônico cresce à medida que o EHL aumenta. Este fato seria o reflexo de um contrabalanceamento das modificações das fôrças hidrofóbicas do sistema, devido à adição de acetona.

A figura 2 mostra que a percentagem de rendimento obtida na precipitação com acetona é uma função linear do EHL, cuja equação é:

$$y = 1,064x + 14,08 \quad r = 0,998 \qquad \text{(LVII)}$$

onde y corresponde ao rendimento (em percentagem) e

x corresponde ao EHL.

Pela tabela 26 vemos que a percentagem de rendimento do pó acetônico, obtido na presença de laurilsulfato de sódio (0,1% p/V), é 32,6%.

Substituindo-se este valor na equação (LVII) obtém-se um valor de X= 17,4. Como este tensoativo é iônico, certamente seu EHL é superior a 20. Daí o valor encontrado mediante a equação (LVII) não ser correto.

Este resultado, contudo, não invalida o que foi dito, pois deve-se levar em conta a natureza do laurilsulfato. Inclusive o método de calcular o EHL desta substância é diferente daquele usado para substâncias não iônicas (75).

Desde que a natureza do sistema emulsificante não influi na precipitação, selecionou-se o sistema Tween/Span 40 para estudar se o aumento da concentração teria alguma influência.

Na tabela 26 foram lançados os valores das atividades totais, utilizando-se o sistema emulsificante na concentração de 1% (p/v).

Estamos diante da seguinte questão: os dados da tabela 27 e os da tabela 26 são ou não amostras de uma mesma população ?

Aplicando-se o teste "t", cujos dados estão na tabela 29, para as diferenças temos: $t_{calc.}$ = 0,239 e $t_{5\%}(4)$ = 2,78. Conclui-se que os dois lotes são amostras de uma mesma população e que a concentração do sistema emulsificante não influi.

4.8 CONSIDERAÇÕES SÔBRE OS PARÂMETROS CINÉTICOS DA INVERTASE

MICHAELIS E MENTEN (58) deduziram um modelo matemático, que correlaciona a velocidade de uma reação enzimática com a concentração do substrato.

Supuseram que uma reação catalisada por uma enzima seria esquemàticamente representada por:

$$E+S \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{K_2} P + E \qquad \text{I}$$

onde E representa a enzima, S o substrato, ES o complexo enzima-substrato, P o produto formado e K_1, K_{-1}, K_2 são constantes de velocidade.

Admitiram a hipótese de que o complexo (ES) estaria em equilíbrio com E e S, isto é, a decomposição de ES seria muito lenta. Assim, pode-se escrever:

$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} ES$$

Se v_1 e v_2 representarem, respectivamente, as velocidades de formação e decomposição de ES, podemos escrever:

$$v_1 = K_1 . \ |E| . \ |S| \qquad \text{(LVIII)}$$

$$v_2 = K_{-1} \ |ES| \qquad \text{(LIX)}$$

Pela hipótese do equilíbrio temos:

$$K_1 . |E| . |S| = K_{-1} . |ES| . \qquad \text{(LX)}$$

Considerando que

$$|E_t| = |E| + |ES| \qquad \text{(LXI)}$$

onde $|E_t|$, $|E|$ e $|ES|$ representam, respectivamente, as concentrações: total da enzima, da enzima livre e da mesma no complexo enzima-substrato.

Substituindo (LXI) em (LX) e rearranjando, temos:

$$|ES| = \frac{K_1 . |E_t| . |S|}{K_{-1} + K_1 |S|} \qquad \text{(LXII)}$$

Reconsiderando a etapa "lenta" do processo, podemos escrever:

$$v = K_2 |ES| \qquad \text{(LXIII)}$$

Substituindo (LXII) em (LXIII) temos:

$$v = \frac{K_2 |E_t| . |S|}{K_{-1} + K_1 . |S|} \qquad \text{(LXIV)}$$

Dividindo a equação acima por K_1, obtém-se:

$$v = \frac{K_2 . |E_t| . |S|}{\frac{K_{-1}}{K_1} + |S|} \qquad \text{(LXV)}$$

Chamando K_{-1}/K_1 de K_m e lembrando que: $V_{máx.} = |E_t|.K_2$, temos:

$$v = \frac{V_{máx.}|S|}{K_m + |S|} \qquad \text{(LXVI)}$$

BRIGGS & HALDANE (21) generalizaram este modelo considerando que a concentração do complexo, enzima-substrato permanecia constante durante a reação, isto é,

$$\frac{d|ES|}{dt} = 0 \qquad \text{(LXVII)}$$

Assim, de I vemos que a velocidade de formação do produto (P) dependerá da concentração de ES, isto é,

$$v = K_2.|ES| \qquad \text{(LXIII)}$$

Aplicando a lei da ação das massas, para descrever como a concentração do complexo enzima-substrato varia com o tempo, tem-se:

$$\frac{d|ES|}{dt} = K_1.|E|.|S| - K_{-1}|ES| - K_2|ES| \qquad \text{(LXVIII)}$$

Substituindo (LXI) na (LXVIII) e levando em conta a (LXVII), temos:

$$|ES| = \frac{|E_t| \cdot |S|}{|S| + \frac{K_{-1}+K_2}{K_1}} \qquad \text{(LXIX)}$$

Substituindo (LXIX) na (LXIII), temos:

$$v = \frac{K_2 \, |E_t| . |S|}{|S| + \frac{K_{-1}+K_2}{K_1}} \qquad \text{(LXX)}$$

Observando a equação (LXIII) vemos que, quando a $|S|$ é alta, é razoável supor que toda a enzima estará na forma de complexo: nesta situação o sistema atinge a maior velocidade possível. Por isoo pode-se escrever que:

$$V_{máx.} = K.|E_t| \qquad \text{(LXXI)}$$

Substituindo (LXXI) na (LXX) e chamando $\frac{K_{-1}+K_2}{K_1}$ de K_m, temos:

$$v = \frac{V_{máx.} \, |S|}{|S| + K_m} \qquad \text{(LXXII)}$$

À primeira vista as equações (LXVI) e (LXXII) são idênticas. Porém, isto não é correto, já que elas diferem no K_m. Na LXVI o K_m representa a razão de duas constantes (K_{-1} e K_1) e na (LXXII) leva em conta três constantes de velocidade (K_1, K_{-1} e K_2).

Contudo é facil de ver que a equação (LXVI) é um caso particular da (LXXII), e o uso de uma ou outra só poderá ser decidido diante do tipo particular de catálise que se pretende estudar.

Se na equação (LXXII) fizermos $K_m = |S|$, obtém-se $v = \frac{V_{máx.}}{2}$.

Daí surge o significado da constante de Michaelis-Menten (K_m): K_m é numéricamente igual à concentração de substrato para a qual a velocidade da reação é a metade da velocidade máxima.

Observando a equação (LXXII) vemos que existem dois parâmetros cinéticos ($V_{máx.}$ e K_m) que devem ser determinados. Praticamente o método consiste em se usar várias concentrações de substrato e medir as respectivas velocidades de reação. Com estes pares de valores constrói-se um gráfico do tipo v x $|S|$ conforme (LXXII). Porém, $v = f(|S|)$ conforme (LXXII) é hiperbólica, o que dificulta sobremaneira a estimativa de $V_{máx.}$ e K_m.

Para contornar este problema, vários autores procuraram linearizar a equação (LXXII) através de recursos algébricos.

Daí existirem na literatura os seguintes métodos gráficos:

a) <u>Método de LINEWEAVER-BURK</u> (54)

Este método consiste na inversão de ambos os membros da equação (LXXII). Com este artifício obtém-se:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{máx.}} + \frac{K_m}{V_{máx}} \cdot \frac{1}{|S|} \qquad \text{(LXXIII)}$$

O gráfico $\frac{1}{v}$ x $\frac{1}{|S|}$ é uma reta (Fig. 3).

b) Método de HOFSTEE (46)

Multiplicando-se ambos os membros da equação (LXXIII) por $V_{máx}.v$, obtém-se:

$$v = V_{máx} - \frac{v}{|S|} \cdot K_m \qquad \text{(LXXIV)}$$

Como se pode observar $v \times v/|S|$ é uma reta (Fig. 5).

c) Método de WOOLF (4)

Multiplicando (LXXIII) por $|S|$ e rearranjando, temos:

$$\frac{|S|}{v} = \frac{|S|}{V_{máx}} + \frac{K_m}{V_{máx}} \qquad \text{(LXXV)}$$

O gráfico $|S|/v \times |S|$ é linear (Fig. 4).

d) Método de CORNISH-EISENTHAL (24,25)

Rearranjando a equação (LXXII), obtém-se:

$$\frac{V_{máx}}{v} - \frac{K_m}{|S|} = 1 \qquad \text{(LXXVI)}$$

A equação (LXXVI) representa uma função linear: $V_{máx} = f(K_m)$.

Para cada par de pontos (-s;0) e (0;v) existe uma reta que os contém. Por conseguinte, determinando-se alguns pares de pontos obtém-se uma série de retas.

A intersecção das mesmas num dado ponto tem as coordenadas K_m; $V_{máx}$). Daí, este método gráfico permite a leitura direta dos parâmetros cinéticos. A figura 6 mostra a aplicação deste processo.

O simples fato de existirem vários métodos, já é uma forte evidência de que nenhum deles é inteiramente satisfatório.

ALMEIDA CUNHA & VITOLO (4) aplicando estes vários métodos, notaram que os valores de K_m e $V_{máx}$ obtidos, apresentavam uma variação da ordem de 10%.

WILKINSON (94) e DOWD (32), entre outros, enumeraram várias objeções estatísticas relacionadas aos métodos acima.

A tabela 30 mostra os dados da variação da velocidade da reação enzimática em função da concentração do substrato. A partir desta tabela, construiram-se os gráficos das figuras 3-6.

Os valores de K_m e $V_{máx}$ determinados gráficamente foram tabulados na tabela 31. Como se pode depreender a variação dos valores de K_m girou em torno de 9%, enquanto que a do $V_{máx}$ girou em torno de 5,5%.

Fazendo-se uma comparação pareada dos métodos estudados (tabela 32), observamos que o método de Lineweaver-Burk apresenta maior percentagem de variação quando comparado com os demais. Os métodos de Hofstee e Woolf foram os métodos que, entre si, apresentaram menor variação nos valores de K_m e $V_{máx}$.

É interessante notar que a variabilidade entre os métodos de Hofstee e Eisenthal-Cornish é maior do que se poderia esperar à primeira vista, dada à similaridade matemática existente entre ambos. Observando-se as equações LXXIV e LXXVI, vê-se que elas são fácilmente interconversíveis, já que constituem duas maneiras de se escrever uma mesma relação. A diferença dos métodos reside no fato de que o de Hofstee considera o espaço vs enquanto que Eisenthal-Cornish o espaço $V_{máx}.K_m$. Em outros termos, naquele v e s, são variáveis ao passo que, neste, as variáveis são $V_{máx}$ e K_m. A vantagem deste sobre aquele reside no fato de que $V_{máx}$ é função linear de K_m, enquanto que v não é função linear de $|S|$.

A maior variabilidade com relação ao método de Lineweaver-Burk é um reflexo da grande influência que valores mais altos de $1/|S|$ exercem sobre a inclinação da reta, enquanto que valores mais altos de $|S|$, os quais possibilitam maior precisão de medida, tendem a se aproximar muito do eixo das ordenadas e exercer maior influência (4).

Disto tudo infere-se que existem oscilações intermétodos, o que implica numa escolha criteriosa do método gráfico a ser usado.

Comparando o nosso valor médio de K_m (25,5 mM) com os existentes na literatura, concluimos que ele possui uma magnitude comparável, aos demais, já que NELSON (64) apresenta valores compreendidos entre 16 e 40 mM e BERGGREN (14)(17), entre 18 e 32 mM.

Em relação a $V_{máx}$ existem poucos dados na literatura, dificultando sobremaneira a comparação. BERGGREN (17) determinou alguns valores de $V_{máx}$ por polarimetria. Sendo assim não dá para compará-lo com o nosso, já que o obtivemos através da medida de açúcares redutores.

A inexistência de valores concordantes para os parâmetros cinéticos da invertase, pode ser atribuída a vários fatores, entre os quais:

a) preparações enzimáticas com graus de pureza diferentes;

b) existência de isoenzimas com parâmetros cinéticos distintos (17) em quantidades variáveis nos preparados;

c) diferentes métodos analíticos para a determinação da velocidade de reação;

d) métodos gráficos diferentes;

e) uso de cepas diferentes de *S. cerevisiae*.

4.9 INFLUÊNCIA DA VISCOSIDADE DA SOLUÇÃO SUBSTRATO

Há muito observa-se que a velocidade da reação catalisada pela invertase diminui após certo valor da concentração de substrato. Em outros termos a equação de Michaelis-Menten é, apenas, parcialmente válida.

Conforme NELSON (64) e DRAETTA (33) o decréscimo da velocidade se inicia após o substrato atingir

uma concentração ao redor de 12%.

Para explicar este fato, os autores têm sido quase que unânimes em atribuir este comportamento à maior ou menor concentração de água no sistema.

Contudo BOWSKI et al (20) em recente trabalho mostraram que o fator acima não é o único a influir na cinética da invertase. Deve-se levar em conta, também, os efeitos inibitórios que o substrato exerce sobre o catalisador. Assim, introduzindo na equação de Michaelis-Menten os fatores acima, conseguiram tornar os resultados experimentais e os teóricos concordantes.

Todos os trabalhos encontrados e que estão relacionados a este ítem, estudaram a cinética da invertase variando a concentração de substrato dentro de uma faixa compreendida entre 1 e 60%. Procedendo assim o eventual papel da viscosidade na catálise não é realçado.

Para averiguar o efeito da viscosidade sem a interferência de fatores inibitórios, planejou-se ensaios, nos quais a viscosidade foi variada com carboximetilcelulose (CMC), mantendo-se constante o teor de sacarose (10%.P/V).

Para efeito de comparação fizeram-se experimentos onde se variou a concentração de sacarose. As concentrações de substrato utilizadas estavam entre 5 e 50% (P/V). Os dados obtidos encontram-se na tabela 34.

A figura 7 mostra a relação entre a velocidade da reação e a viscosidade da solução substrato.

Usou-se como extratos enzimáticos alíquotas do autolisado.

Visualmente nota-se que o perfil da curva da figura 7, assemelha-se a um trecho de parábola, desde que se despreze o último ponto. Então ajustando-se a parábola de mínimo quadrado aos pontos experimentais (83), obtém-se a relação:

$$y = 1,48 - 0,683x + 0,093\ x^2 \quad r = 0,940 \qquad \text{(LXXVII)}$$

onde y = velocidade da reação (mgAR/ml.min)

x = viscosidade da solução (cp)

A figura 8 mostra a relação entre a velocidade da reação e a concentração percentual de sacarose. Analisando-se o perfil do gráfico nota-se que aos pontos experimentais podem ser ajustadas ou uma reta ou uma parábola.

Se desprezarmos os pontos (5;0,923) e (50; 0,255) e tentarmos ajustar uma reta de mínimo quadrado, obtém-se a relação

$$y = 0,767 - 0,012x \qquad r = 0,924 \qquad \text{(LXXVIII)}$$

onde y = velocidade da reação

x = concentração percentual de sacarose

Se desprezarmos o ponto (50;0,255) e tentarmos ajustar uma parábola de mínimo quadrado, obtém-se a relação:

$$y = 0,00035\ x^2 - 0,032x + 1,01 \qquad r = 0,940 \qquad \text{(LXXIX)}$$

onde y = velocidade da reação

x = concentração percentual de sacarose

A tabela 35 mostra os resultados obtidos, variando-se a viscosidade com CMC. Utilizaram-se duas frações de um mesmo preparado enzimático, sendo uma bruta (autolisado) e outra mais pura (pó acetônico).

As figuras 9 e 10 mostram os perfis das curvas obtidas com os dados da tabela 35, correspondendo, respectivamente, ao autolisado e ao pó acetônico.

Ajustou-se para ambas as figuras, as correspondentes parábolas de mínimo quadrado, cujas equações são, respectivamente:

$$y = 1{,}52 - 0{,}286x + 0{,}018\,x^2 \qquad r = 0{,}960 \qquad \text{(LXXX)}$$

$$y = 1{,}72 - 0{,}211x + 0{,}013\,x^2 \qquad r = 0{,}972 \qquad \text{(LXXXI)}$$

onde y = velocidade da reação

x = viscosidade da solução (cp).

Comparando-se os coeficientes de correlação das equações (LXXX) e (LXXXI) (83), conclui-se que ao nível de 95% a diferença entre eles não é significativa. Portanto a pureza do extrato enzimático não interfere.

Comparando, agora, a (LXXX) ou (LXXXI) com a (LXXVII) vemos que a diferença dos coeficientes não é significativa, também. Isto mostra que a viscosidade influi de algum modo sobre a atividade invertásica.

Como vimos, BOWSKI et al (20) além do fator inibitório postularam a influência da concentração de água sobre a atividade catalítica da invertase. Ora, em última análise a concentração de água reflete indiretamente a viscosidade do meio, Daí, os nossos resultados podem ser considerados complementares.

Comparando-se as equações (LXXVIII) e (LXXIX) vemos que o perfil parabólico se ajusta um pouco melhor aos dados experimentais do que o perfil linear, já que o coeficiente de correlação da parábola é superior ao coeficiente de correlação da reta. Além disto deve-se considerar que para a parábola despreza-se apenas um ponto, ao passo que para a reta desprezam-se dois.

5. CONCLUSÕES

- O tipo de agitação influi no rendimento em invertase do autolisado. Com agitador rotatório obteve-se um rendimento cerca de 45% superior ao recíproco.

- O regime turbulento, aparentemente, denatura a proteína enzimática em maior extensão do que o laminar.

- Existe uma correlação entre os fatores de escala (número de Reynolds e Froude) e a atividade invertásica obtida no autolisado. Para Reynolds igual a 563 e Froude 1,20, que correspondem a uma frequência de agitação de 200 ciclos/min, obteve-se o máximo de atividade total no autolisado.

- A temperatura de autólise deve estar compreendida na faixa entre 35 e 45°C.

- A pressão osmótica da solução autolisante aparentemente não influi na liberação da invertase a partir da parede celular.

- A natureza do agente autolisante influi na liberação da invertase.

- As condutividades do autolisado e a da solução salina pura são diferentes. No caso do $NaHCO_3$ a condutividade do autolisado foi de 11,5 mS/cm, enquanto que a da solução inicial (0,154M) foi de 14,4 mS/cm. No caso do NaCl o autolisado apresentou uma condutividade de 12,0 mS/cm, ao passo que a solução inicial (0,038 M) apresentou o valor de 5,50 mS/cm.

- A natureza do agente autolisante parece influir na variação global da condutividade entre a solução inicial e o autolisado. Para o $NaHCO_3$ houve uma queda de 20%, enquanto que para o NaCl houve um aumento de 54%. Contudo, a diferença das condutividades finais para ambos os sais foi de 4,2%.

- A condutimetria possivelmente poderá ser usada como parâmetro de controle do processo de autólise.

- A presença de tensoativos pouco influi na liberação da invertase durante a autólise.

- A natureza do sistema tensoativo não influi na eficiência da precipitação da invertase com acetona.

- O EHL influi sobre a eficiência de precipitação da enzima.

- A percentagem de rendimento em invertase no pó acetônico é uma função linear do EHL, obedecendo à relação: $y= 1,064x + 14,08$ com $r= 0,998$.

- A quantidade do sistema tensoativo nas concentrações de 0,1 e 1% não influi no rendimento.

- Conforme o método gráfico escolhido, obtêm-se valores diferentes para K_m e $V_{máx}$. Pelos métodos escolhidos a variação de K_m e $V_{máx}$ giraram ao redor de 9 e 5,5%, respectivamente.

- O método gráfico de Lineweaver-Burk foi o que mostrou maior variabilidade intermétodos.

- O método gráfico de Cornish-Eisenthal mostrou-se bastante prático, porém nada se pode dizer sobre sua maior precisão estatísticas frente aos demais.

- Vários fatores poderão, simultâneamente ou não, estar relacionados com a discordância dos valores de K_m e $V_{máx}$ encontrados na literatura.

- A viscosidade da solução substrato não é capaz de explicar por si só o desvio da cinética da invertase em relação ao modelo de Michaelis-Menten.

- Existe uma relação entre a velocidade da reação e a viscosidade. Uma curva possível, que se ajusta aos dados experimentais, é a parábola.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AL-BAKIR, A. & WHITAKER, J.R. - Purification and characterization of invertase from dates. (Phoenix dactylifera). J. Food Biochem., Westport, 2(2): 133-60, 1978.

2. ALMEIDA CUNHA,B.C.; VITOLO, M.; FRUTUOSO, L.J. - Extração de invertase para uso na produção de xarope glicose-frutose. Ciência e Cultura, São Paulo, 30 (Supl.):73, 1978.

3. ALMEIDA CUNHA, B.C.; VITOLO, M.; BACARIN, A.; CARAMICO, I.; POPPER, I.; MANDERLYN, M.- Influência do EHL na atividade coagulante de renina. An.Farm.Quim.S.Paulo, São Paulo, 17(Supl.):89, 1977.

4. ALMEIDA CUNHA, B.C. & VITOLO, M. - Variabilidade de parâmetros de cinética enzimática. I. Oscilação intermétodos. Rev.Farm.Bioquim.Univ.São Paulo, São Paulo, 14(1):23-34, 1976.

5. ANDERSEN, B. Isolation of beta-fructofuranosidase from yeast by ion exchange chromatography on diethylaminoethylcellulose. Acta chem.scand., København, 14(8): 1849-51, 1960.

6. _____ The transferring activity of invertase: formation of two disaccharides from fructose. Acta chem.scand., København, 21:828-9, 1967.

7. ANDERSEN, B. & STEEN, O.J. - Purification of external invertase from brewers yeast. Acta.chem.scand., Kø benhavn, 23(7):2270-6, 1969.

8. ANDERSEN, B.; THIESEN, N.; BROE, E.P. - The transferring activity of beta-fructofuranosidase from yeast: a quantitative description. Acta chem. scand., Kø- benhavn, 23(7):2367-73, 1969.

9. ANDERSON, R.S. & EWING, E.E. - Partial purification of potato tuber invertase and its proteinaceous inhibi tor. Phytochemistry, New York, 17(7):1077-81,1978. Apud Chem.Abstr., Columbus, 90:50282x, 1979.

10. BASINI, M.C. - Industrial applications of invertase. Fermentation of molasses with invertase. Zymol. Chim. Colloidi, Bologna, 3(3):105-7, 1928. Apud Chem.Abstr., Columbus, 23:2240, 1929.

11. BECKER, J.C.; MITCHELL, R.L.; PIERSON, W.G. - Inverta se containing mouth care agent. Ger.Offen 2,044, 534, (Cl. A 61K) Apr. 15, 1971, US Appl. Oct. 06 , 1969. Apud Chem. Abstr., Columbus, 75:52834t,1971.

12. BERGGREN, B. - Studies on yeast beta-fructofuranosida- se. XX. Gel filtration on sephadex and estimation of molecular dimensions. Ark.Kemi, Stockholm, 26: 415-23, 1967.

13. BERGGREN, B. - Studies on yeast beta-fructofuranosidase. XXIII. Studies on the heterogeneity of the enzyme and its liberation from the yeast. Ark.Kemi, Stockholm, 29: 117-26, 1969.

14. ————. ————. XXIV. Comparison of K_m values of enzyme fractions separated through gel filtration and by isoelectric focusing. Ark.Kemi, Stockholm, 31:555-63, 1970.

15. ————. ————. XXV. Isoenzymes of invertase studied with isoelectric focusing. Ark.Kemi, Stockholm, 32:143-50, 1970.

16. ————. ————. XXVI. Starch gel electroforetic study of the enzyme. Ark.Kemi, Stockholm, 32: 161-5, 1970.

17. ————. ————. XXVII. Kinetic examination of the isoenzymes. Ark.Kemi, Stockholm, 32: 167 - 80, 1970.

18. BERTHELOT, M. - Sur la fermentation glucosique du sucre de canne. C.R.Acad.Sci., Paris, 50:980-6, 1860.

19. BIRD, R.B.; STEWART, E.W.; LIGHTFOOT, E.N. - Fenômenos de transporte. Barcelona, Editora Reverté, 1975. p. 3-6 a 3-16.

20. BOWSKI, L.; SAINI, R.; RYU, D.Y.; VIETH, W.R. - Kinetic modeling of the hydrolysis of sucrose by invertase. Biotechnol. Bioeng., New York, 13:641-56, 1971.

21. BRIGGS, G.E. & HALDANE, S.B.J. - A note on the kinetics of enzyme action. Biochem. J., London, 19:338-9 , 1925.

22. BURGER, M.; BACON, E.E.; BACON, J.S.D. - Some observations on the form and location of invertase in the yeast cell. Biochem. J., London, 78:504-11, 1961.

23. CARVALHO, G.C. - Problema de química. São Paulo, Livraria Nobel, 1968. v.3, p. 114-6.

24. CORNISH, A. & EISENTHAL, R. - A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. Biochem. J., London, 139:715-20, 1974.

25. CORNISH, A. & EISENTHAL, R. - Statistical considerations in the estimation of enzyme kinetic parameters by the direct linear plot and other methods. Biochem. J., London, 139:721-30, 1974.

26. COSTA, F.A. - Farmacognosia. Lisboa, Fundação C. Gulbenkian, 1972. v.3, p. 212-7.

27. DAHLQVIST, A. - Assay of intestinal disaccharidases. Analyt.Biochem., New York, 22:99-107, 1968.

28. DARBYSHIRE, B. & HENRY, R.J. - An assay for glycosyltransferases using phenol partition and gas-liquid chromatography. Analyt.Biochem., New York, 90:234-8, 1978.

29. DAVIES, R. - Ezyme formation in S.fragilis. Biochim.J., London, 55:484-97, 1953.

30. DEMIS, D.J.; ROTHSTEIN, A.; MEIER, R. - The relationship of the cell surface to metabolism. X. The location and function of invertase in the yeast cell. Arch.Biochem.Biophys., New York, 48:55-62, 1954.

31. DODYK, F. & ROTHSTEIN, A. - Factors influencing the appearance of invertase in S.cerevisiae. Arch.Biochem. Biophys., New York, 104:478-86, 1964.

32. DOWD, E.J. & RIGGS, S.D. - A comparison of estimates of Michaelis-Menten kinetic constants from various linear transformations. J.biol.Chem., Baltimore, 240: 863-9, 1964.

33. DRAETTA, I.S. - Isolamento, purificação e cinética da invertase de S.cerevisiae. Coletânea do Inst. Tecn. de Alimentos, Campinas, 4:23-37, 1971/1972.

34. EDDY, A.A. & WILLIAMSON, D.H. - Formation of aberrant cell walls and of spores by the growing yeast protoplast. Nature, London, 183: 1101-4, 1959.

35. EYRING, H. & STERN, A.E. - The application of the theory of absolute reaction rates to proteins. Chem.Rev., Washington, 24:253-70, 1939.

36. FISCHER, E.H. & KOHTES, L. - Purification de l'invertase de levure. Helv. chim. Acta, Basel, 34(4):1123-31, 1951.

37. FOLLOWS, M.; HETHERINGTON, P.J.; DUNNILL, P.; LILLY, M. D. - Release of enzymes from baker's yeast by disruption in an industrial homogenizer. Biotechnol. Bioeng., New York, 13: 549-60, 1971.

38. FORSSMAN, S. - Über das Enzymsystem des Termobacterium mobile (Pseudomonas). Biochem.Z., Berlin, 264: 231-6, 1933.

39. GASCON, S.; NEUMAN, N.P.; LAMPEN, O.J. - Purification of the internal invertase of yeast. J.biol.Chem., Baltimore, 243:1567-72, 1968.

40. GOLDSTEIN, H.; BARRY, W.P.; RIZZUTO, A.R.; VIETH, W.R.- Continuous enzymic production of invert sugar. J. Ferment.Technol., Tokyo, 55(5);516-24, 1977.

41. GOTTSCHALK, A. - Principles underlying enzyme specificity in the domain of carbohydrates. Advanc.Carbohyd. Chem., New York, 5:49-78, 1950.

42. GRIFFIN, C.W. - Emulsification. In: SAGARIN, E., ed. - Cosmetics: Science and technology. New York, Interscience, 1963. p. 1005-11.

43. HARDING, S.T. - Invertase in sirup manufacture. Digestive Ferments Co. Sugar, New York, 23:599-600, 1921. Apud Chem.Abstr., Columbus, 16:353, 1922.

44. ——————. Making invert sugar from sucrase. Sugar, New York, 24:140-2, 1922. Apud Chem.Abstr.,Columbus, 16:2425, 1922.

45. HESTRIN, S.; FEINGOLD, D.S.; SCHRAMM, M. - Hexoside hydrolases. In: COLOWICK, P.S. & KAPLAN, O.N., eds. Methods in Enzymology, New York, 1:231-57, 1955.

46. HOFSTEE, B.H.J. - Non inverted versus inverted plots in enzyme kinetics. Nature, London, 184:1296 - 8, 1959.

47. HOSHINO, J. & MOMOSE, A. - Interconversion "in vitro" of the two forms of yeast beta-fructofuranosidase. J.Biochem., Tokyo, 59(2):192-4, 1966.

48. INGLETON, F.J. - Use of invertase in the confectionary industry. Confectionery Prod., 29(9):773-4, 1963. Apud Chem.Abstr., Columbus, 60:4702h, 1964.

49. JACOBY, M. - Über die Verstarkung der Enzymwirkung durch. Kleinste Mengen in ihrer Zusammensetzung bekannter Substanzen. Biochem.Z., Berlin,181: 194 - 206, 1927.

50. KEIJIRO, I. - Invertase-containing dentifrices. Ger. Offen. 2, 028, 285 (Cl. A 61K) Dec. 10, 1970, Japan, Appl. Jun. 05, 1969. Apud Chem.Abstr., Columbus,74: 57309p, 1971.

51. KIDLEY, K.D. & DAVIES, R. - Thiol induced release of invertase from cell walls of S.fragilis. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 201:261-6, 1970.

52. KOSHLAND, D.E. & STEIN, S.S. - Correlation of bond breaking with enzyme specificity. Cleavage point of invertase. J.biol.Chem., Baltimore, 208:139-48, 1954.

53. LAMPEN, O.J. - Yeast and Neurospora invertase. In:BOYER, P.D., ed. The Enzymes, New York, Academic Press,1970. p. 291-303.

54. LINEWEAVER, H. & BURK, D. - The determination of enzyme dissociation constant. J.Am.Chem.Soc., Washington, 6:658-66, 1934.

55. LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.V.; FARR, R.V.; RANDALL, R. V. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.biol.Chem., Baltimore, 193:265-71,1951.

56. MANSVELT, M. - Use of invertase in confectionary making. Choc.Confiserie Fr., Paris, 217:34-40, 1967. Apud Chem.Abstr., Columbus, 66:114.735m, 1967.

57. MENDENHALL, W. - Introduction to statistics. Belmont, Wadsworth, 1964. p.201-5.

58. MICHAELIS, L. & MENTEN, M.L. - Die Kinetic der invertin wirrug. Biochem.Z., Berlin, 49:333-69, 1913.

59. MORRIS, J.G. - Físico-química para biólogos. São Paulo, Editora Polígono, 1972. p. 82.

60. MYRBACK, K. - Studies on yeast beta-fructofuranosidase. XXII. The reaction with the zinc ion. Ark.Kemi,Stockholm, 27:507-14, 1967.

61. NEGORO, H. - Continuous inversion of sucrose by using insoluble sucrase. J.Ferment.Technol., Tokyo, 48(11): 689-97, 1970.

62. NELSON, J.M. & COHN, J.D. - Invertase in honey. J. biol.Chem., Baltimore, 61:193-224, 1924.

63. NELSON, J.M. & SOTTERY, T.C. - Influence of glucose and fructose on the rate of hydrolysis of sucrose by invertase from honey. J.biol.Chem., Baltimore, 62: 139-47, 1924.

64. NELSON, M.J. - Enzymes from the standpoint of the chemistry of invertase. Chem.Rev., Washington, 12: 1-42, 1933.

65. ————. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J.biol.Chem., Baltimore, 153:375-80, 1944.

66. NEUBERG, C. - Kleinere Mitteilungen verschiedenen Inhalts. Biochem.Z., Berlin, 56:495-507, 1913.

67. NEUBERG, C. & KOBEL, M. - Kleinere Mitteilungen verschiedenen Inhalts. Biochem. Z., Berlin, 238: 226-52, 1931.

68. NEUBERG, C. & MANDL, I. - Invertase. In: SUMNER, B.J. & MYRBACK, K., eds. The Enzymes: chemistry and mecanism of action. New York, Academic Press, 1950. p. 527-50.

69. NEUMANN, P.N. & LAMPEN, O.J. - Purification and properties of yeast invertase. Biochemistry, Easton, 6(2): 468-75, 1967.

70. ——————————. The glycoprotein structure of yeast invertase. Biochemistry, Easton, 8:3552-6, 1969.

71. NURMINEN, T.; OURA, E.; SUOMALAINEN, H. - The enzymic composition of the isolated cell wall and plasma membrane of baker's yeast. Biochem.J., London, 116: 61-9, 1970.

72. OHLWEILER, A.O. - Teoria e prática da análise quantitativa inorgânica. Brasília, Ed. Universidade de Brasília, 1968. v.3, p.627-41.

73. OWEN, L. - Yeast and the manufacture of invert molasses. Facts Sugar, New York, 35(6):37-8, 1940. Apud Chem. Abstr., Columbus, 34:5309, 1941.

74. PAPADAKIS, P.E. - Further findings on invertase from honey. J.biol.Chem., Baltimore, 83:561-8, 1929.

75. PEREGO, R.; CASADIO, S.; SCLAVI, E.; TREU, T. - Tecnologia Farmacêutica. Milano, Cisalpino-Goliardica,1972. v.1, p.601-45.

76. PHAFF, J.H.; MILLER, M.W., MRAK, E.M. - The life of yeast. 2nd ed. Cambridge, Haward University Press, 1968.

77. PREISS, W.J. - The localization of invertase in the yeast cell with low voltage electrons. Arch.Biochem. Biophys., New York, 75:156-95, 1958.

78. RODRIGUES, L. - Yeast invertase: subcellular distribution and possible relationship between the isoenzymes.Curr. Microbiol., New York, 1(1):41-44, 1978. Apud Chem. Abstr., Columbus, 89:159858v, 1978.

79. SAKSENA, R.K. & BOSE, S.K. - Enzymes of two water molds. J.Indian Bot.Soc., Madras, 23:108-12, 1944. Apud Chem. Abstr., Columbus, 42:4206h, 1947.

80. SARASWAT, H.C.- Effect of detergents on the activity and inactivation of invertase. Proc. Indian Acad.Sci., Bangalore, 38A:220-5, 1953. Apud Chem.Abstr., Columbus, 48:4603b, 1955.

81. SIZER, I.W. - Effects of temperature on enzyme kinetics. Advanc.Enzymol., New York, 3: 35-62, 1943.

82. SOMOGYI, M. - Notes on sugar determination. J.biol.Chem., Baltimore, 195:19-23, 1952.

83. SPIEGEL, R.M. - Estatistica. Rio de Janeiro, McGraw Hill, 1971.

84. SUOMALAINEN, H. & OURA, E. - Increase of saccharase content in baker's yeast during the growth phase. Arch. Biochem.Biophys., New York, 68:425-31, 1957.

85. SUTTON, D.D. & LAMPEN, O.J. - Localization of sucrose and maltose fermenting system in S.cerevisiae. Biochim.biophys.Acta, Amsterdam, 56:303-12, 1962.

86. TAGLIARO, A. - Física. 13ª ed. São Paulo, F.T.D.,1966. v.1, p.533-4,

87. TRACEY, M.V. - Substrate constant for yeast invertase. Biochim.biophys.Acta, Amsterdam, 77:147-9, 1963.

88. VESTERBERG, O. & BERGGREN, B. - Studies on yeast beta-fructofuranosidase. XXI. Studies on enzyme preparation by isoelectric focusing in a pH gradient. Ark. Kemi, Stockholm, 27:119-27, 1967.

89. VILLELA, G.G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. - Técnicas e experimentos de bioquímica. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 1973. p. 225-6.

90. WAHEED, A. & SHALL, S. - Chemical modification of the active site of yeast invertase. Biochim.biophys. Acta, Amsterdam, 242:172-86, 1971.

91. WALT, J.P. - Saccharomyces Meyen emend. Reess. In: LODDER, J., ed. The yeasts, Amsterdam, North-Holland, 1971. p. 555-718.

92. WEIDENHAGEN, R. - Beta-h-fruktosidase (Saccharase, Invertin). In: BAMANN, T.E. & MYRBACK, K., eds. Die Methoden der Fermentforschung. New York, Academic Press, 1945, p. 1725-44.

93. WICKERHAM, I.J. - Evidence of the production of extracellular invertase by certain strains of yeasts. Arch. Biochem. Biophys., New York, 76:439-48, 1958.

94. WILKINSON, G.N. - Statistical estimation in enzyme kinetics. Biochem.J., London, 80:324-32, 1961.