

## Extracción optimizada y purificación parcial de invertasa aislada de *S. Cerevisiae* en puré de durazno

Marcela Vega Ferreira<sup>1</sup>, Aline Farias Rossler<sup>2</sup>, Ricardo Peraça Toralles<sup>3</sup>,  
Walter Augusto Ruiz<sup>4</sup>, Cesar Valmor Rombaldi<sup>5</sup>

**Resumen** - La extracción fue realizada a través de un proceso de autólisis, donde las enzimas degradan las estructuras celulares y liberan el contenido citoplasmático al medio extracelular. El proceso de autólisis fue realizado en shaker con diferentes velocidades de agitación (50 - 350 rpm) y concentraciones de bicarbonato de sodio (50 -350 mM NaHCO<sub>3</sub>) a 40 °C por 24 horas, usando un diseño experimental compuesto central adaptado para dos variables y cinco niveles, así como una metodología de superficie de respuesta (MSR) y análisis canónico para definir las condiciones óptimas de extracción de invertasa de *S. cerevisiae* aislada de puré de durazno (ISc). En la condición óptima de extracción, se estudió el efecto de la liofilización y purificación en la actividad de la invertasa, usando el método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a 490 nm para acompañar su actividad expresada en unidades. Una unidad (U) es definida como 1 mg glucosa.min<sup>-1</sup>. El valor de proteínas fue cuantificado por el método Lowry y la invertasa de levadura comercial (ILC) como testigo. La influencia de la concentración de NaHCO<sub>3</sub> y de la velocidad de agitación en la extracción de la enzima invertasa indicó efecto lineal, cuadrático e interactivo. El modelo de forma polinómica de segundo orden explicó el fenómeno de extracción de la invertasa con un R<sup>2</sup> de 0,80, y con actividad significativamente dependiente de ambas variables. La máxima extracción fue observada en el punto central experimental (200 mM NaHCO<sub>3</sub> y 200 rpm) con una actividad de 14,7 U.mg<sup>-1</sup>. El punto estacionario es un punto de máxima extracción, el cual difiere en menos de 10% del punto central experimental. De acuerdo a estas características, las óptimas condiciones para extracción de la invertasa de *S. cerevisiae* aislada de puré de durazno son 200 mM NaHCO<sub>3</sub> como agente de autólisis, 200 rpm de agitación orbital a 40 °C durante 24 horas y usando una biomasa de levaduras liofilizadas. El etanol es más efectivo que la acetona para la recuperación de la actividad específica.

**Términos para indexación:** levadura; autólisis; MSR; análisis canónico.

## Optimized extraction and partial purification of *S. Cerevisiae* invertase from peach puree

**Abstract** - The extraction was performed using an autolysis process where enzymes degrade cell structures and release the cytoplasmic contents to the extracellular medium. The autolysis process was carried out in shake flasks with different agitation speeds (50 - 350 rpm) and the concentration of sodium bicarbonate (50 -350 mM NaHCO<sub>3</sub>) at 40 °C for 24 hours, using a central composite design adapted for two variables and five levels and response surface methodology (RSM) and canonical analysis to define the optimal conditions of extraction of invertase *S. cerevisiae* from peach puree (ISc). In great condition extraction, we studied the effect of the liofilization and purified in the invertase activity using colorimetric method of 3,5-dinitrosalicílico (DNS) at 490 nm to monitor their activity. One unit (U) defined as 1 mg glicose.min<sup>-1</sup>. Protein concentrations were determined by Lowry and invertase comercial yeast (ICY). The influence of concentration NaHCO<sub>3</sub> and stirring speed to extract the enzyme invertase showed linear effect, quadratic and interactive. The polynomial model of second order could explain the extraction phenomenon of invertase with R<sup>2</sup> of 0.80, with significantly dependent on both variables activity. The maximum extraction was observed in the experimental center point (200 mM NaHCO<sub>3</sub> and 200 rpm) with an activity of 14.7 U.mg<sup>-1</sup>. The stationary point is a point of maximum extraction, differing by at least 10% of the experimental center point. Based on these characteristics, the optimal conditions for extraction of *S. cerevisiae* invertase from peach puree (ISc) are 200 mM NaHCO<sub>3</sub> as autolysis agent, 200 rpm orbital shaking at 40°C for 24 hours and freeze-dried using biomass. Ethanol is more effective than acetone for recovery of specific activity.

**Index terms:** Yeast; autolysis; RSM; canonical analysis.

**Corresponding author:**  
E-mail: [marchii20@yahoo.es](mailto:marchii20@yahoo.es)  
**Received:** January 05, 2016.  
**Accepted :** April 18, 2017.

**Copyright:** All the contents of this journal, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution License.



<sup>1</sup>Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Estudiante Universidade Federal de Pelotas-RS, Brasil. E-mail: [marchii20@yahoo.es](mailto:marchii20@yahoo.es).

<sup>2</sup>Estudiante de Ingeniería Química, Instituto Federal Sul rio-grandense-RS. Brasil. E-mail: [alinerossler@yahoo.com.br](mailto:alinerossler@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>Doctor en Ciencias, Profesor del Instituto Federal Sul-rio-grandense-RS. Brasil. E-mail: [toralles@pelotas.ifsul.edu.br](mailto:toralles@pelotas.ifsul.edu.br)

<sup>4</sup>Doctor en Ciencia de Alimentos, Profesor de la Universidade Federal do Rio Grande- RS. Brasil. E-mail: [dqmwar@furg.br](mailto:dqmwar@furg.br)

<sup>5</sup>Doctor en Biología molecular y vegetal, Profesor de la Universidade Federal de Pelotas-RS. Brasil. E-mail: [cesarvrf@ufpel.edu.br](mailto:cesarvrf@ufpel.edu.br)

## Introducción

El durazno (*Prunus persica* (L.) Batsch) está entre las diez frutas más producidas del mundo, con un volumen superior a 20 millones de toneladas. Los mayores productores son China, Italia y España. Brasil ocupa el 12º lugar en la producción mundial, con aproximadamente 218 mil toneladas en un área plantada de 18 mil hectáreas. Dentro de las variedades usadas para industrialización se encuentra la Jubileu, destacada por su bajo potencial de oscurecimiento enzimático y sus atributos sensoriales que son favorables para la elaboración de puré, néctares y jugos (TORALLES et al., 2006; SAINZ e FERRI, 2015; IBGE, 2015; FAOSTAT, 2016).

Han sido identificados más de 160 tipos de microorganismos en diferentes etapas del procesamiento de pulpas de duraznos, destacándose la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con potencial fermentativo y resistencia térmica significativa (LOPES et al., 2014; FERREIRA et al., 2016).

Las enzimas obtenidas a partir de estas levaduras han sido bastante estudiadas, incluyendo la *frutohidrolasa frutofuranosidasa* (EC 3.2.1.26), conocida como invertasa, que cataliza la hidrólisis de la sacarosa produciendo una mezcla de glucosa y fructosa llamada azúcar invertido, usada en la industria de alimentos y farmacéutica (BAYRAMOGLU, et al., 2017). Además de estas levaduras, sobre todo en la especie *Saccharomyces cerevisiae*, las invertasas son también encontradas en invertebrados, vertebrados, algas verdes, bacterias, vegetales y hongos (OLIVEIRA, et al. 2006; GOULART et al., 2013; FERRIERI et al. 2015). En *S. cerevisiae* fueron identificadas dos formas diferentes de invertasa: una no glicosilada, que se encuentra en el citoplasma, y otra localizada en el espacio periplasmático, que es glicosilada, y se encuentra ligada a la pared celular de la levadura, siendo la forma extracelular la predominante (CANTARELLA et al., 2003; BOFO et al., 2005). La levadura *Candida utilis* también presenta esas dos formas (GUIMARÃES et al., 2007).

La actividad óptima de las invertasas generalmente se encuentra en un pH entre 4,6 y 5,0 y una temperatura entre 35°C y 50°C, con concentración de sustrato en media de 120 mM no medio reacional. Por encima de esta concentración la solución de sacarosa aumenta su viscosidad, reduciendo la actividad enzimática en presencia de agua (SANTOS, 2010; TORALLES et al., 2014; LIU et al. 2015).

Numerosos trabajos han sido citados sobre levaduras productoras de invertasa utilizando fermentación discontinua (FL) y sacarosa o melaza como principal fuente de carbono (MUKHERJEE et al., 2005; SHANKAR, et al., 2014), sin embargo, una técnica que viene siendo utilizada es la fermentación en estado sólido (FES), que consiste en el cultivo de microorganismos sobre y en

el interior de partículas porosas húmedas. Al comparar la FES con la FL, el primer método muestra ventajas, toda vez que presenta menor represión catabólica, alta productividad y concentración de la enzima. Sin embargo, a escala de laboratorio, se viene utilizando la fermentación discontinua en estado líquido para obtención de biomasa, con potencial para producción de invertasa (ALEGRE et al., 2009; GHASEMI et al., 2014; FERREIRA et al., 2016).

Al final de la fermentación, las diferentes formas de invertasa necesitan ser extraídas (ANDJELKOVIĆ et al., 2010; SHANKAR et al., 2014). La autólisis es un proceso de extracción bastante utilizado que, resumidamente, consiste en la ruptura y degradación de las estructuras celulares por actividad de enzimas degradativas, principalmente, las endo- y exo- $\beta$ -(1,3) glucanasas. El proceso de auto digestión puede ser iniciado por la aplicación de condiciones controladas de pH, temperatura, velocidades de agitación, potencial osmótico entre otros, que pueden provocar muerte celular sin inactivar tales enzimas. Una serie de desórdenes ocurren dentro de las células, resultando en la solubilización de los componentes celulares y en la desintegración de la membrana celular; así, los componentes solubles, donde se encuentra la invertasa, se permean al medio extracelular (TENKANEN et al., 2003; WANG y LI, 2013). La literatura pertinente no relata la interacción de esas variables para evaluar la extracción de invertasa de levadura de durazno por autólisis.

Posterior a la extracción, la enzima se encuentra libre pero glicosilada, y dependiendo de su aplicación, se necesitan operaciones de purificación antes del estudio de su cinética completa ya sea en la forma libre o inmovilizada. Las técnicas de precipitación con solvente seguido de separación en columnas cromatográficas son bastante citadas para preparar la enzima principalmente para caracterizar las isoenzimas de invertasa y su inmovilización (GUIMARÃES et al. 2007; VEANA et al., 2011; ANDJELKOVIĆ, et al., 2015).

En este trabajo se estudió el efecto combinado de la concentración de  $\text{NaHCO}_3$  (50-350 mM) y de la velocidad de agitación (50-350 rpm) en el proceso de extracción de la invertasa de *S. cerevisiae* aislada de puré de durazno (ISc), usando MSR, así como las condiciones óptimas para la extracción de invertasa y obtención de un extracto parcialmente purificado usando ILC como testigo.

## Materiales Y Métodos

### Micro-organismo y su cultivo

El micro-organismo usado en este experimento fue aislado a partir de puré de durazno a 22 °Brix suministrado por Lopes et al. (2014) e identificado como *Saccharomyces cerevisiae* por el sistema API 20C AUX, con un 95% de exactitud y perfil numérico 2040032 (FERREIRA et al.,

2016). Las colonias fueron mantenidas en placas de agar de dextrosa de papa (PDA), pH 5 y contadas como descrito por Siqueira (1995), después de 5 días de incubación a 25°C. En el puré el recuento inicial de las colonias fue de  $22 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>. El crecimiento de la levadura fue conducido usando cultivo en batch con 20 g de colonias en PDA, 20 g.L<sup>-1</sup> de glucosa, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g.L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g.L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g.L<sup>-1</sup>; FeSO<sub>4</sub> 0,5 g.L<sup>-1</sup> y peptona 5 g.L<sup>-1</sup> sobre agitación de 150 rpm orbital a 30 °C durante 24 horas. Posteriormente, fue realizada una nueva inoculación usando las levaduras identificadas e aisladas como *S. cerevisiae*, con un recuento inicial de cerca de 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Estas levaduras fueron almacenadas a 4°C para subsiguiente extracción de la enzima.

### Determinación azúcares reductores

Los azúcares reductores (AR) fueron determinados por el método colorimétrico de la glucosa usando 1 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Alemanha), 1 mL de medio reactivo y 1 mL de agua, seguido de baño-maría en ebullición durante 5 minutos. Para el blanco fue utilizado agua destilada en lugar del medio reactivo. La transmitancia resultante de esa reacción fue medida a 490 nm, utilizando un espectrofotómetro AJX-1000 UV/VIS. La masa de glucosa en el medio reactivo fue determinada a través de la curva patrón de glucosa como descrito por Toralles et al. (2014).

### Actividad de la invertasa

La actividad enzimática de la invertasa fue determinada por reacción de los azúcares reductores con DNS. La transmitancia resultante de esa reacción fue medida a 490 nm, utilizando un espectrofotómetro AJX-1000 UV/VIS. El medio reactivo contenía 1,0 mL de tampón McIlvaine pH 5.0; 1,0 mL de solución de sacarosa como sustrato y 1,0 mL de extracto enzimático. La mezcla reactiva final contenía 40 mM de sustrato. La reacción fue conducida en pH 5,0 a 25°C. Luego, fue cuantificado el valor de AR. En el blanco, fue utilizado 1,0 mL de agua des-ionizada en reemplazo del sustrato en la mezcla reactiva. La actividad enzimática fue calculada en la parte lineal de la curva. Una unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima que causa el incremento de 1µg glucosa.min<sup>-1</sup>. El valor de proteínas fue determinado por el método Lowry, utilizando BSA como patrón (Acros, New Jersey, USA).

### Efecto de la concentración de bicarbonato de sodio y velocidad de agitación en la extracción de la invertasa.

Para analizar el efecto combinado de la concentración de NaHCO<sub>3</sub> (X1) y de la velocidad de agitación (X2), en la extracción de la enzima, se adaptó un diseño rotacional compuesto central (GACULA, 2008) para dos variables y cinco niveles (Tabla 1). Los extractos

brutos fueron obtenidos usando un método de extracción con bicarbonato de sodio conocido como autólisis. Para cada 100 g de biomasa bruta o liofilizada, fueron utilizados 300 mL de solución en diferentes concentraciones de NaHCO<sub>3</sub> y velocidad de agitación (Tabla 1).

La extracción fue realizada en shaker Quimis por 24 horas a 40°C. Luego, se centrifugo la muestra a 2025 x g durante 10 minutos para obtener el líquido sobrenadante que corresponde al extracto enzimático bruto que, fue almacenado a 20 °C. En el extracto centrifugado fue determinado el valor de actividad de la invertasa como fue descrito previamente. Para la levadura usada como testigo fue aplicado el mismo procedimiento.

El diseño experimental fue configurado con cuatro puntos axiales, cuatro puntos cúbicos, tres puntos centrales (Tabla 1). Todos los ensayos fueron repetidos 3 veces. Una función de forma polinómica de segundo orden (Ecuación 1) fue ajustada a los datos experimentales:

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ii} X_i^2 + \sum b_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

donde: Y<sub>i</sub>= variable respuesta; X<sub>i</sub> ou X<sub>j</sub>= variable entrada; b<sub>0</sub>= punto central del sistema; b<sub>i</sub>= coeficiente lineal; b<sub>ii</sub>= coeficiente cuadrático e b<sub>ij</sub>= coeficiente interactivo. La variable respuesta fue definida en términos de actividad relativa (AR %) en relación a la máxima actividad encontrada para Isc y usado como criterio de extracción por autólisis de la invertasa libre.

El punto estacionario fue determinado a través de la ecuación:

$$X_s = \frac{-1}{2} B^{-1} \cdot b \quad (2)$$

donde: X<sub>s</sub>= es el punto estacionario; b= es un vector (k x 1) dos coeficientes de regresión de primera orden y B= es una matriz simétrica del punto central (k x k). En la diagonal, se encuentran los coeficientes de regresión de segunda orden y fuera de la diagonal los coeficientes de interacción.

Un análisis canónico fue realizado con el objetivo de facilitar la interpretación de los resultados del punto estacionario y definir si es un punto de máximo, mínimo o silla, usando el siguiente modelo:

$$Y = Y_s + \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2 + \dots + \lambda_k w_k^2 \quad (3)$$

Y<sub>s</sub>= es la respuesta del punto estacionario; w<sub>i</sub>= son las variables independientes transformadas y λ<sub>i</sub>= son auto valores de la matriz B.

### Purificación del extracto bruto por precipitación

La recuperación de la invertasa fue realizada a través de la precipitación con solvente orgánico etanol y acetona. El solvente frío fue adicionado al extracto bruto en una proporción de 3:1. Esta mezcla fue mantenida sobre refrigeración por 15 min y posterior a este período de tiempo fue centrifugada por 10 min a 2025 x g. El

precipitado obtenido fue secado, luego suspendido en agua destilada. Las proteínas solubles y la actividad enzimática fueron determinadas como fue descrito previamente.

#### Análisis estadístico

El Software Statistica fue utilizado para calcular los coeficientes de regresión no lineal, coeficiente de determinación y análisis de variancia (ANOVA), así como para generar los gráficos en dos y tres dimensiones. Los intervalos de confianza de los coeficientes fueron calculados multiplicando o error estándar por Student-t ( $t_{n-2}$ ), ajustado a los grados de libertad ( $p < 0,05$ ).

## Resultados y discusión

### Efecto combinado de la concentración de $\text{NaHCO}_3$ y de la velocidad de agitación en la extracción de invertasa

En la Tabla 2, se muestra el delineamiento experimental con las condiciones aplicadas y los resultados obtenidos en la extracción de la invertasa de *S. cerevisiae* de puré de durazno (ISc), en términos de porcentaje de actividad relativa (%AR). En el ensayo 5, con una concentración de 200 mM de  $\text{NaHCO}_3$  y 200 rpm, fue donde se observó mayor extracción por autólisis con una %AR de 100% que corresponde a una actividad específica 14,7  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  en pH 5, a 25°C y 10 minutos de reacción. Los ensayos 2, 6, 7 y 8 no difieren del ensayo 5 con un nivel de significancia de 5%, siendo que los ensayos 6 y 7 son repeticiones del punto central. Cuando se comparan los ensayos 2 y 8, con condiciones experimentales casi inversas, se hace evidente la dependencia por el efecto combinado de ambas variables: concentración de  $\text{NaHCO}_3$  y velocidad de agitación.

**Tabla 1**-Codificación de las variables usadas en el diseño experimental.

Código del nivel	Concentración de $\text{NaHCO}_3$ ( $X_1$ ) (mM)	Velocidad agitación ( $X_2$ ) (rpm)
- 1,414	50	50
-1	100	100
0	200	200
1	300	300
1,414	350	350

**Tabla 2**-Matriz del diseño experimental con los valores codificados, los valores naturales y la respuesta.

Ensayo	Variables Codificadas		Variables naturales		$Y^a$
	X1	X2	X1 (mM)	X2(rpm)	
1	-1	-1	100	100	38,2 b
2	+1	-1	300	100	98,5 a
3	-1	+1	100	300	32,0 b
4	+1	+1	300	300	0,0 c
5	0	0	200	200	100 a
6	0	0	200	200	97,8 a
7	0	0	200	200	99,3 a
8	-1,414	0	50	200	99,3 a
9	0	+1,414	200	350	0,0 c
10	+1,414	0	350	200	0,0 c
11	0	-1,414	200	50	24,3b

<sup>1</sup> $Y^a$ = valor medio de la variable respuesta en términos de actividad relativa (%AR), siendo que 100% de AR corresponde a una actividad de 14,7  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  en pH 5 a 25°C. Valores medios seguidos de la misma letra minúscula en la columna no difieren estadísticamente por el test de Tukey.

El ajuste de un modelo polinómico de segunda orden, Ecuación 1, al conjunto de valores experimentales presentados en la tabla 2 indicaron el efecto lineal, cuadrático e interactivo de las concentraciones de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) ( $X_1$ ) y velocidad de agitación orbital ( $X_2$ ) en la extracción de invertasa se presentan en la Tabla 3. El modelo desarrollado por la Ecuación 1, cuyo coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0,80, fue estadísticamente significativo para regresión ( $p \leq 0,05$ ), Tabla 4.

El efecto interactivo de las concentraciones de  $\text{NaHCO}_3$  y de la velocidad de agitación en la extracción de invertasa por autólisis evaluado a través de su actividad se demuestra en la Figura 1. Este tipo de información es de gran valor para la optimización del proceso de extracción de invertasa. El rango de concentración de  $\text{NaHCO}_3$  y velocidad de agitación, respectivamente, donde ocurrió el máximo de extracción de invertasa, se encuentra entre 175–225 mM y 175–225 rpm (Figura 1).

La literatura no relata la interacción de esas variables para evaluar la extracción de ISc, por lo tanto, no se pueden realizar las comparaciones con la misma. Por otra parte, la metodología de Cunha y Vitolo (1984), evaluando las variables (agitación, concentración y temperatura) de forma independiente, proponen como condición ideal de autólisis 200 rpm, 150 mM de  $\text{NaHCO}_3$  a 45°C para invertasa de levadura de pan. En estas condiciones fue encontrada un % AR alrededor de 20% para invertasa ISc.

Torales et al. (2014) encontraron actividad óptima para invertasa de levadura de durazno de 8,86  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$  equivalente al 60 % del ensayo 5 en este trabajo usando un pH 5, 25°C y 10 minutos. En aquella ocasión los autores no tenían como aislar e identificar las levaduras presentes en el puré de durazno y usaron una técnica de extracción con  $\text{NaHCO}_3$  a 100 mM, 200 rpm y 45 °C. Andjelkovic et al. (2010), utilizando 120 mM de  $\text{NaHCO}_3$  durante 4 días a temperatura ambiente, encontraron una actividad menor para extracto bruto de invertasa de pan a 25 °C, pH 4,5 y 5 minutos de reacción.

### Localización del punto estacionario y análisis canónico

El modelo ajustado de la ecuación 1 es

$$Y_i = 9,0 - 12,4X_1 - 16,9X_2 - 21,1X_1^2 - 36,4X_2^2 - 21,3X_1X_2$$

Para el modelo arriba, el punto estacionario, determinado a través de la ecuación 2.3 está dado por:

$$X_s = \begin{pmatrix} -0,20 \\ -0,18 \end{pmatrix}$$

En términos de variables naturales, el punto estacionario está dado por:

$$X_1 = -0,20 \cdot 100 + 200 = 180$$

$$X_2 = -0,18 \cdot 100 + 200 = 182$$

donde  $X_1$  es la concentración de  $\text{NaHCO}_3$  y  $X_2$  es la velocidad de agitación orbital en el shaker.

Para expresar el modelo ajustado en la forma canónica, primero, se tiene que encontrar los auto valores que son las raíces del determinante en la ecuación  $B \cdot \lambda$ :

$$\begin{pmatrix} -21.1 - \lambda & \frac{-21.3}{2} \\ \frac{-21.3}{2} & -21.1 - \lambda \end{pmatrix} \rightarrow \lambda^2 + 42.2\lambda + 331.79$$

Las raíces de esta ecuación son iguales a:  $\lambda_1 = -10,33$  e  $\lambda_2 = -33,41$ . Como todas las raíces características tienen signo negativo, se puede decir que el punto estacionario se trata de un punto de máxima extracción, con una actividad de  $15,8 \pm 1,63 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ . A un nivel de confianza de 95%, usando el test t, fue aceptada la hipótesis que la actividad del ensayo 5 es igual al punto de máxima extracción. Por otro lado, las diferencias entre las condiciones experimentales del ensayo 5 (200mM y 200 rpm) y de punto estacionario (180 mM y 182 rpm) fueron máximo de 10%. Tales resultados están de acuerdo con el rango óptimo de extracción observado en la Figura 1.

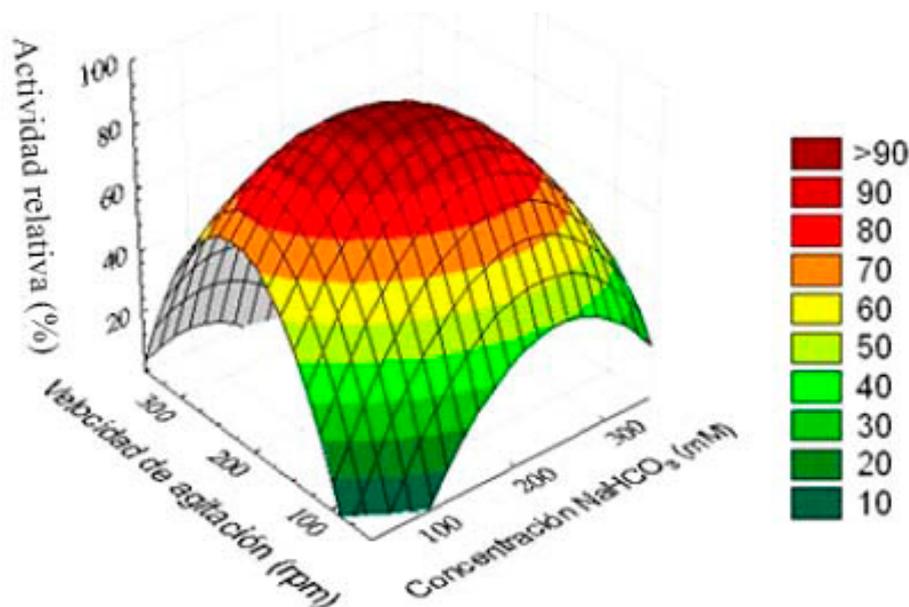
### Comparación entre los extractos liofilizados, no liofilizados y purificados

Realizando un estudio comparativo entre el extracto bruto obtenido por autólisis de *S. cerevisiae* de puré de durazno (ISc) no-liofilizado y liofilizado, Figura 2, ambos con una concentración de cerca de 1,0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de proteína y en las condiciones del ensayo 5, se observó un aumento de cerca de dos veces en la actividad de la ISc liofilizada ( $33,2 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ). Para invertasa de levadura comercial (ILC) – testigo – procedente de una autólisis a 100 mM de  $\text{NaHCO}_3$ , 200 rpm e 45°C, se encontró  $216,8 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  en la misma concentración de proteína. Santos (2010), trabajando con invertasa de levadura comercial, usando un proceso de extracción con sucesivas maceraciones en medio etéreo, encontró  $14,93 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  que corresponde cerca de diez veces el valor encontrado en este estudio. El autor trabajó en condiciones reactivas diferentes para temperatura y tiempo, respectivamente, 50 °C y 30 minutos. En este trabajo la reacción fue conducida a 25 °C y 10 minutos. La mejor explicación para esta diferencia es la dependencia de la actividad de invertasa con la temperatura como citado por Cantarella et al., (2003).

**Tabla 3-** Coeficientes de regresión no lineal y de determinación (R<sup>2</sup>) del modelo matemático de segunda-orden para extracción de invertasa de puré de durazno cv. Jubileu.

Coeficientes	Valores <sup>b</sup>
Intercepto (b <sub>0</sub> )	91,5 ±3,44 **
b <sub>1</sub>	-12,4 ±2,10**
b <sub>2</sub>	-16,9 ±2,10**
b <sub>11</sub>	-21,1 ±2,50**
b <sub>22</sub>	-36,4 ±2,50**
b <sub>12</sub>	-21,3 ±3,00**
R <sup>2</sup>	0,80

<sup>a</sup>  $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1 \cdot X_2$ ; donde X<sub>1</sub> = concentración NaHCO<sub>3</sub> e X<sub>2</sub> = velocidad de agitación. Significativo (p < 0,01). <sup>b</sup>Valores ± intervalo de confianza a p = 0,05. \*\*Significativo (p < 0,01)



**Figura 1-** Superficie de respuesta para efecto interactivo de NaHCO<sub>3</sub> (X<sub>1</sub>) y de la velocidad de agitación (X<sub>2</sub>) en el proceso de extracción de invertasa (ILD) obtenida por autólisis de *S. cerevisiae* de puré de durazno (ISc) de la cv. Jubileu. La AR de 100% a 25°C y pH 5 igual a 14,7 U.mg<sup>-1</sup>.

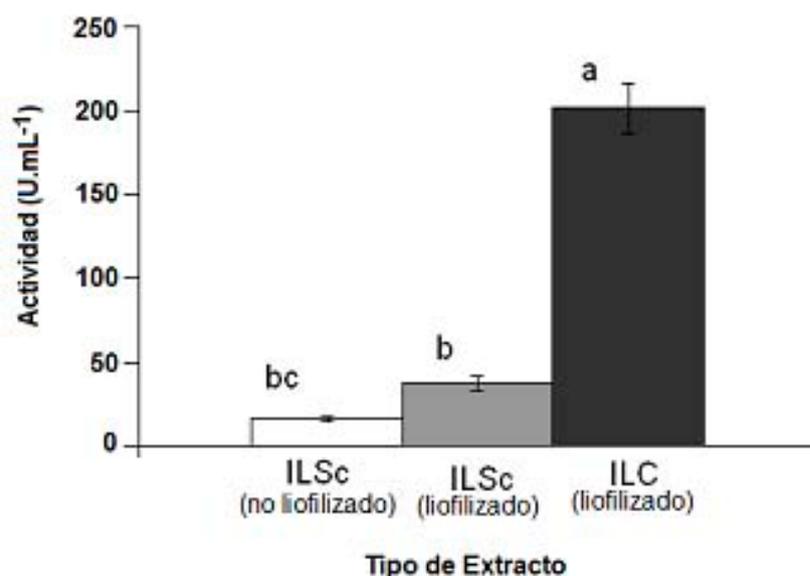
### Purificación de la invertasa

De acuerdo a estudios preliminares, los extractos no purificados de invertasa libre de ISc presentaron óptima actividad tanto para extracto bruto, con una actividad específica de 32,6 U.mg<sup>-1</sup>, como en la dilución 50% v/v con 36,2 U.mg<sup>-1</sup>. Para levadura comercial (ILC) – testigo – en la dilución al 10% (216,8 U.mg<sup>-1</sup>). Se escogió la mayor dilución para los ensayos de purificación por optimización de la muestra.

Con respecto a la purificación de las invertasas ILC y ISc, en la Tabla 5 se presentan los resultados obtenidos a través de la purificación con etanol y acetona para la recuperación de las invertasas por precipitación, usando una proporción de 3:1 (solvente: extracto bruto). Los resultados obtenidos pertenecen a las diluciones escogidas en el ítem anterior.

Comparando el extracto bruto de ISc a 50% en volumen (con actividad específica de 36,2 U.mg<sup>-1</sup>), con las precipitaciones realizadas con acetona y etanol, se encontraron factores de purificación de 2,1 veces (89,9%) para el etanol y 3,0 veces (86,1%) para la acetona, siendo las actividades específicas de 74,8 e 108,4 U.mg<sup>-1</sup> respectivamente.

Para el testigo ILC, con extracto diluido a 10% en volumen, el etanol también fue más efectivo, con una actividad de 275,6 U.mg<sup>-1</sup> y un factor de recuperación de 1,3 y un rendimiento de cerca de 70%. En ambos casos la diferencia fue significativa (Tabla 5). Andjelkovic et al. (2010), trabajando con extracto bruto de invertasa de levadura de pan, obtuvieron un rendimiento de 79,2 % para etanol, que corresponde cerca de 10% inferior de la recuperación de la ISc.



**Figura 2-** Comparación entre los extractos no purificados de invertasas ISc no-liofilizada, ILSc liofilizada e ILC. Valor de proteína de 1 mg. mL<sup>-1</sup>.

**Tabla 4** -Análisis de varianza para el ajuste de un modelo de segunda orden a los datos experimentales.

Origen de la variación	Modelo: $Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{i,i} X_i^2 + \sum b_{i,j} X_i X_j$			
	Suma cuadrática (SC)	Grados de libertad (GL)	Media cuadrática (MC)	F <sub>cal</sub>
Modelo	46022,69	5	9204,54	22,9
Linear	10543,61	2		
Cuadrático	30012,11	2		
Interacciones	5466,97	1		
Resíduo	10864,59	27	402,39	
Total	51346,33	33		

F (5;27) =2,57 (valor tabulado)

**Tabla 5** – Actividad de los extractos de invertasa libre de levadura comercial (ILC), de *S. cerevisiae* de puré de durazno (ISc) purificados con solventes orgánicos.

	ILC		ISc	
	Actividad específica (U.mg <sup>-1</sup> )	Recuperación %	Actividad específica (U.mg <sup>-1</sup> )	Recuperación %
EB*	216,8 ± 16,3b	1,0 100	36,2 ± 1,9c	1,0 100
Acetona	201,0 ± 2,0 b	0,93 72,1	74,8 ± 9,1 b	2,1 89,9
Etanol	275,6 ± 24,6a	1,3 69,5	108,4 ± 12, 9a	3,0 86,0

\*EB es el extracto al 10% en volumen para ILC y 50% para ISc. Valores medios seguidos de la misma letra minúscula en la columna no difieren estadísticamente por el test de Tukey (p<0,05).

## Conclusiones

La función polinómica de segundo orden explicó la extracción de la invertasa libre obtenida por autólisis de *Saccharomyces cerevisiae* de puré de durazno cv. Jubileu (ISc) con una varianza explicada en media de 80%. El efecto interactivo de la concentración de  $\text{NaHCO}_3$  ( $X_1$ ) y velocidad de agitación ( $X_2$ ) en el proceso de extracción indicó un efecto lineal y cuadrático. El punto estacionario es un punto de máxima extracción de la ISc en 182 rpm y 180 mM de  $\text{NaHCO}_3$ , difiriendo del punto central en menos de 10%. Esa diferencia en las condiciones operacionales de extracción no afecta la actividad enzimática.

La recuperación de la actividad de la ISc fue superior a la de la ILC con ambos agentes precipitantes, siendo que el etanol fue más efectivo que la acetona.

Finalmente, se puede afirmar que el  $\text{NaHCO}_3$  es un agente de autólisis efectivo y su utilización es una buena alternativa en la extracción de invertasa, principalmente si es combinado con la velocidad adecuada de agitación en el shaker y liofilización de la levadura.

## References

- ALEGRE, A. C. P.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARAES, L. H. S. Production of thermostable invertases by *Aspergillus Caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.40, n.1, p.612-622, 2009.
- ANDJELKOVIĆ, U.; MILUTINOVIĆ-NIKOLIĆ, A.; JOVIĆ-JOVIČIĆ, N.; BANKOVIĆ, P.; BAJT, T.; MOJOVIĆ, Z.; VUJČIĆ, Z.; JOVANOVIĆ, D. Efficient stabilization of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase by immobilisation on modified beidellite nanoclays. **Food Chemistry**, Davis, v.168, n.1, p.262–269, 2015.
- ANDJELKOVIĆ, U.; PIĆURIĆ, S.; VUJČIĆ, Z. Purification and characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. **Food Chemistry**, Davis, v.120, n.1, p.799-804, 2010.
- BAYRAMOGLU, G.; DOZ, T.; OZALP, V.C., ARICA, M. Y. Improvement stability and performance of invertase via immobilization on to silanized and polymer brush grafted magnetic nano particles **Food Chemistry**, Davis, v.221, n.1, p.1442-1450.
- BOFO, D.C.S.; CASTRO, H.F; MEDEIROS, M.B. Comparação da eficiência de imobilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX (osmotolerante) e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, em bagaço de cana de açúcar. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, p.121-124, 2005. Número especial
- CANTARELLA, L.; ALFANI, F.; CANTARELLA, M.  $\beta$ -D-fructofuranoside fructohydrolase. In: WHITAKER, J.R.; VORAGEN, A.G. J.; WONG (Ed.). **Handbook of food enzymology**. New York: Marcel Dekker, 2003. p.787-804.
- CUNHA, B. C. A.; VITOLLO, M. Effect of viscosity on sucrose hydrolysis catalyzed by invertase obtained from *S. cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, Malden, v.26, p.811-813, 1984.
- FAOSTAT. **Food and agriculture organization of the united nations statistics**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: dez. 2016.
- FERREIRA, M.V.; AVILA, T.L.; TORALLES, R.P., KUHN, C.R.; ROMBALDI, C.V. Identifying yeast isolated from spoiled peach puree and assessment of its batch culture for invertase production. **Food Science and Technology**, Campinas, v.36, n.4, p.701–708, 2016.
- FERRIERI, A.P.; MACHADO, R.A; MEZA-CANALES I.D.; LIMA, E.; BALDWIN I.T.; ERB, M.A. Nicotiana attenuata cell wall invertase inhibitor (NaCWII) reduces growth and increases secondary metabolite biosynthesis in herbivore - attacked plants. **New Phytologist**, Londres, v.208, n.2, p.519-530, 2015.
- GACULA Jr., M. C.; SINGH, J. **Statistical methods in food and consumer research**. Orlando: Academic Press, 2008. 888 p.
- GHASEMI, Y.; MOHKAM, M. Experimental design of medium optimization for invertase production by *Pichia sp.* **Journal of Food Science Technology**, Mysore, v.51, n.2, p.267–275, 2014.
- GOULART, A.J.; SANTOS, A.F.; TAVANO, O.L.; VINUEZA, J.C; CONTIERO, J.; MONTI, R. Glucose and fructose production by *Saccharomyces cerevisiae* invertase immobilized on MANAE-agarose support. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**, Araraquara, v.34, n.2, p.169–175, 2013.
- GUIMARÃES, L.H.S.; TERENCEZI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M.; JORGE, J.A. Production and characterization of thermostable extracellular  $\beta$ -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, Maryland Heights, v.42, n.1, p.52–57, 2007.

- IBGE. **SIDRA**. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: ago. 2015.
- LIU, S.; LAN, J.; ZHOU, B.; QIN, Y.; ZHOU, Y. XIAO, X.; YANG, J.; GOU, J.; QI, J.; HUANG, Y.; TANG, J. HbNIN2, a cytosolic alkaline/neutral-invertase, is responsible for sucrose catabolism in rubber-producing laticifers of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). **New Phytologist**, Lancaster, v.206, n.1, p.709-725, 2015.
- LOPES, A.M.; TORALLES, R.P.; ROMBALDI, C.V. Thermal inactivation of polyphenoloxidase and peroxidase in Jubileu clingstone peach and yeast isolated from its spoiled puree. **Food Science and Technology**, Campinas, v.34, n.1, p.150-156, 2014.
- MUKHERJEE, S.; BASAK, S.; KHOWALA, S. Regulation (Alteration) of activity and conformation of sucrase by coaggregation with cellobiase in culture médium of *Termitomyces clypeatus*. **Biotechnology Progress**, Malden, v.18, n.2, p.404-408, 2005.
- OLIVEIRA, D.P.; OLIVEIRA, L.E.M.; FILHO, N.D. Optimization of invertase assay conditions rubber tree plants (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Sociedade de Investigações Florestais**, Viçosa, MG, v.30, n.5, p.687-692, 2006.
- SAINZ, R. L.; FERRI, V.C. Vida-de-prateleira de sucos clarificados de pêssegos das variedades jubileu e eldorado. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.18, n.3, p.239-249, 2015.
- SANTOS, A. F. **Imobilização de invertase comercial de *Saccharomyces cerevisiae*** em sabugo de milho e bagaço de cana de açúcar. 2010. 95f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.
- SHANKAR, T.; THANGAMATHI, P.; RAMA, R. SIVAKUMAR, T. Characterization of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 170. **African Journal of Microbiology Research**, Kenya, v.8, n.13, p.1385-1394, 2014.
- SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA-SPI; Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1995. p.159.
- TENKANEN, M., NIKU-PAAVOLA, M-L, LINDER, M., VIIKARI, L. Cellulases in food processing. In: WHITAKER, J.R.; VORAGEN, A.G. J.; WONG (Ed.). **Handbook of food enzymology**. New York: Marcel Dekker, 2003. p.775-782.
- TORALLES, R.P.; KUHN, C.R.; SILVA, P.; RUIZ, W.A. Extração e Caracterização Parcial de Invertase de Levedura de Purê e Resíduo de Pêssego. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Paraná, v.8, n.2, p.1399-1415, 2014.
- TORALLES, R.P.; MALGARIM, M.B.; VENDRUCOLO, J.L.; CANTILLANO, R.F.F.; TREPTOW, R.O. Um estudo para compreender a preferência e aceitação de consumidores de purês de pêssegos Brasileiros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.3, p.397-401, 2006.
- VEANA, F. Invertasa del Genero *Aspergillus* y su impacto biotecnológico. **Biocología**, Cuernavaca, v.15, n.1, p.11-29, 2011.
- WANG, SHI-AN; LIA; FU-LI. Invertase SUC2 Is the Key Hydrolase for Inulin Degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.79, n.1, p.403-406, 2013.