

Recuperação de invertase através da extração líquido-líquido

Lorena Nicole Fischer

Fatec Piracicaba “Dep. Roque Trevisan”

lorena.fischer@aluno.cps.sp.gov.br

Eliana Maria Gonçalves Rodrigues

Fatec Piracicaba “Dep. Roque Trevisan”

eliana.rodrigues01@cps.sp.gov.br

Resumo

A invertase apresenta forte apelo comercial, responsável pela hidrólise da sacarose em glicose e frutose. Entretanto, um dos grandes desafios de utilizar as enzimas industrialmente é empregar métodos com custos elevados na sua produção e recuperação. É neste sentido, que o trabalho tem o intuito de propor um método de recuperação a partir da utilização de um sistema de duas fases aquosa, tendo em vista sua simplicidade e a alta seletividade. A metodologia proposta se baseia na obtenção de invertase a partir da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, na utilização do sistema de duas fases aquosa formada por um polímero e sal, na determinação da atividade da invertase através da quantificação de açúcares redutores liberados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), na análise dos resultados através da Manus IA. Os resultados demonstraram que a variável pH é significativa e o melhor resultado para a recuperação em atividade enzimática foi de 136%, obtido quando se trabalhou com a concentração de 12% (p/p) para o PEG4000 e 25% (p/p) para o MgSO_4 no pH 6,0.

Palavras-Chave

Enzimas; Polietilenoglicol (PEG); *Sacharomyces cerevisiae*.

1. Introdução

O processo de extração líquido-líquido apresenta-se como uma opção atrativa para a separação de biomoléculas, sendo o sistema de duas fases aquosa, constituídos por uma mistura aquosa de um polímero com sal orgânico (Zielińska-Dawidziak e Michalak, 2019).

A enzima invertase é responsável por catalisar a hidrólise da sacarose (Denti et al., 2022), sendo obtida através de diversas fontes como plantas e outros organismos, porém a fonte mais utilizada são as leveduras, em especial a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Seu principal substrato é a sacarose, resultando da sua hidrólise uma molécula de glicose e outra de frutose (Fiedurek et al., 2000). Industrialmente, as invertases têm seu maior campo de aplicação na área de alimentos e de bebidas, principalmente na produção de xarope e em substratos de sacarose para fermentação com a finalidade de produção de bebidas alcoólicas (Chan et al., 2020).

O objetivo do trabalho foi estudar a recuperação da enzima invertase, obtida através da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, mediante a utilização de um sistema de duas fases aquosa composto de PEG/ MgSO_4 .

2. Metodologia

Obtenção da Invertase

A invertase foi obtida segundo Chaplin e Bucke (1990) a partir da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Foi pesado 50 gramas de fermento biológico, em seguida foi diluído em 250mL de bicarbonato de sódio 0,15M e mantido em banho-maria a 37°C durante 6 horas. Centrifugou por 20 minutos a 3500rpm e coletou-se o sobrenadante, o qual contém a enzima invertase ativa.

Determinação das Linhas de amarração

Para a determinação das curvas binodais, foi utilizado o método de titulação descrito em (Bamberger et al., 1985; Vernau, 1990).

Determinação da atividade enzimática

A atividade da invertase foi determinada pela concentração de açúcares redutores produzidos após o tempo de ensaio. A quantificação de açúcares redutores liberados foi estimada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) conforme Miller (1959).

Em um tubo de ensaio foi adicionado 0,5 mL de solução tamponada de sacarose 1% (tampão acetato 0,05 M, pH 4,60), 0,5 mL de invertase e deixada em banho maria a 37°C, após 10 minutos foi adicionado 0,5 mL do ácido dinitrosalicílico (DNS) e levado ao banho de ebulição por 5 minutos, após resfriar completado o volume para 5 mL; para o branco foi substituída a enzima por água destilada.

Delineamento experimental da recuperação da invertase através do SDFA

Para o estudo da recuperação da invertase foi proposto um delineamento experimental para verificar as variáveis que influenciam a recuperação da invertase através do sistema de duas fases aquosas composto por PEG/sulfato de magnésio.

Planejamento Experimental

A análise estatística dos resultados foi realizada estatisticamente com o auxílio da inteligência artificial Manus IA (Manus, 2026), onde foram feitas estimativas dos efeitos das variáveis, considerando um nível de significância de 95%. Os resultados foram expressos em tabelas de estimativa de efeitos, teste t de “Student” e ainda em tabelas de análise de variância.

Metodologia de análise dos resultados

Para a avaliação do processo de recuperação da invertase foi analisado a recuperação em atividade enzimática (RAE).

$$RAE = A2/A1 \times 100$$

A2 = atividade da enzima na fase extraída

A1 = atividade da enzima antes da extração

As atividades A1 e A2 correspondem à atividade enzimática multiplicada pelo volume da fase considerada.

3. Resultados e discussão

Visando a recuperação da invertase, por meio de um sistema de duas fases aquosas, utilizou-se o polietilenoglicol (PEG) em diferentes massas molares, sua escolha se deve à boa eficiência do mesmo de formar fases em meio aquoso e não provocar a diminuição da atividade enzimática, além de ser biodegradável e atóxico. Além do PEG foi utilizado o sulfato de magnésio, uma vez que o MgSO_4 apresentou bons resultados na recuperação da invertase no sistema de duas fases aquosas (Carvalho, 2022). Além disso, o sulfato de magnésio é um sal neutro e o PEG é um polímero que possui baixa tendência de dissociação, formando assim uma boa combinação para a formação de um sistema aquoso bifásico (Carvalho, 2022). Grande parte dos trabalhos de recuperação de invertase, obtida através da levedura *S. cerevisiae*, que utilizam o sistema de duas fases aquosas trabalham no pH em torno de 5,0, o que garante a estabilidade da atividade enzimática (Karkas e Önal, 2012; Madhusudhan e Raghavarao, 2011).

Foi realizado um planejamento experimental, com as seguintes variáveis: porcentagem de PEG4000/ MgSO_4 e pH. As condições experimentais de cada ensaio, juntamente com os resultados de recuperação em atividade enzimática, são apresentadas na Tabela 1. Ao analisar os resultados, percebe-se que o rendimento em atividade enzimática (R_{AE}) foi maior quando se trabalhou com o menor nível da concentração PEG/ MgSO_4 e no maior nível do pH. Este valor, superior a 100%, pode ser justificado devido à remoção de inibidores entre as fases.

Ensaios	A	B	R_{AE} (%)
1	-1	-1	9,0
2	+1	-1	21,4
3	-1	+1	135,7
4	+1	+1	116,1
5	0	0	84,7
6	0	0	32,8
7	0	0	58,3
8	0	0	57,5

Tabela 1: Esquema da matriz utilizada no planejamento fatorial completo 2^2 com 4 ensaios no ponto central e os resultados em Recuperação em Atividade Enzimática utilizando o sistema PEG4000/ MgSO_4 . (A = Concentração de PEG4000/ MgSO_4 (%) (p/p) (-1 = 12/25; 0 = 16/18,5,0; 1 = 20/12); B = pH (-1 = 4,0; 0 = 5,0; 1 = 6,0); R_{AE} (%) Recuperação em atividade enzimática)

O planejamento fatorial permite investigar os efeitos individuais de cada fator, bem como as interações entre eles, enquanto os pontos centrais fornecem uma estimativa da variância experimental e a possibilidade de detectar curvatura no modelo. Através dos resultados estatísticos (Tabelas 2 e 3), foi possível constatar que a variável pH possui um efeito estatisticamente significativo, além de apresentar um valor positivo, sugerindo que o aumento do nível do pH leva a um aumento no RAE (%). Os fatores PEG/MgSO₄ (%) e a sua interação com o pH não são estatisticamente significativos nos níveis de confiança usuais. Os resultados da ANOVA (Tabela 3), corroboram com o teste t, pois a variável pH apresenta um p-valor que é menor que 0,05, confirmando sua significância estatística. O modelo de regressão ajustado apresenta um R² de 0,884, indicando que aproximadamente 88,4% da variabilidade no RAE (%) pode ser explicada pelos fatores PEG/MgSO₄ (%), pH e suas interações.

Efeitos	Estimativas	t-value	p-value
Média	64,438	-	-
A	-3,60	-0,177	0,868
B	110,70	5,455	0,005*
AB	-16,00	-0,788	0,474

Tabela 2: Efeitos estimados, valores do teste t de “Student” obtidos no planejamento fatorial completo 22 com 4 ensaios no ponto central. (A = Concentração de PEG/MgSO₄ (%); B = pH; *Significativos ao nível de 95% de confiança)

	Df	SQ	MQ	f	p
A	1	12,96	12,96	0,032	0,868
B	1	12254,49	12254,49	29,77	0,005*
AB	1	256,00	256,00	0,62	0,474
Resíduo	3	1646,75	411,69	-	-

Tabela 3: Análise da variância para o estudo da recuperação de invertase por sistema de duas fases aquosas, no planejamento fatorial completo 22 com 4 ensaios no ponto central. (R² = 88,4%; df = graus de liberdade; SM = Soma Quadrática QM = Média Quadrática; *Significativos ao nível de 95% de confiança)

Sendo assim, podemos representar o processo de recuperação da invertase por um sistema de duas fases aquosas, pela Equação 1:

$$Y = 64,44 - 1,8 * A + 55,35 * B - 8,0 * AB \quad (1)$$

Sendo que Y representa recuperação em atividade enzimática, A concentração PEG/MgSO₄, B pH e AB interação concentração PEG/MgSO₄ e pH.

A superfície de resposta do modelo e as linhas de contorno estão apresentadas na Figura 1.

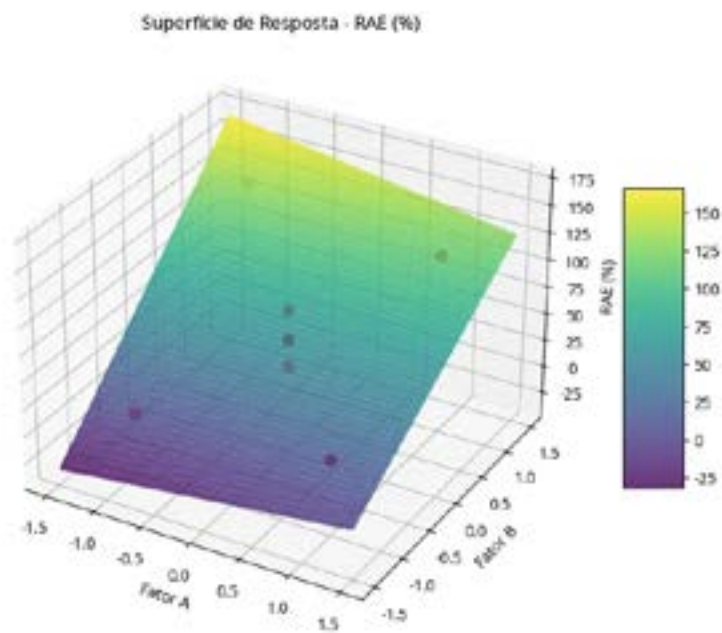


Figura 1: Superfície de resposta descrita pelo modelo da Equação 1, que representa a recuperação da invertase por um sistema de duas fases aquosas. (A = (%) PEG/MgSO₄; B = pH e RAE = Recuperação em atividade enzimática)

Fonte: Manus IA (Manus, 2026)

4. Conclusão

A análise estatística revelou, nas condições estudadas, que o pH é o único fator estatisticamente significativo na recuperação em atividade enzimática, aumentando quando seu valor é maior. O modelo de regressão ajustado explica uma proporção considerável da variabilidade da recuperação em atividade enzimática, sendo estatisticamente significativo como um todo. Para otimizar a recuperação em atividade enzimática, recomenda-se trabalhar no ajuste do pH.

5. Agradecimentos

À CGESG e CPS.

6. Referências

- BAMBERGER, S., BROOKS, D.E., SHARP, K.A., ALSTINE, J.M.V., WEBBER, T. J. Preparation of phase systems and measurement of their physicochemical properties. In: WALTER, H., BROOKS, D.E., FISHER, D. **Partitioning in aqueous two-phase systems: theory, methods, uses and applications to biotechnology**. Orlando: Academic Press, 1985, p.85-130.
- CARVALHO, J.C. R. **Recuperação e purificação de invertases de *Saccharomyces cerevisiae* usando sistema aquoso bifásico PEG 1500/sulfato de magnésio em microcanais**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Natal, RN, 2022. 97 f.
- CHAN, W. D.; HICKS, B.; KALIAPPAN, A.; GARBETT, N. C.; HANSEN, L. D.; KENEALEY, J. D. Employing calorimetric methods to determine the mechanism of the invertase maximal activity delay. **ACS Food Science & Technology**, v. 1, n. 1, p. 60-65, 2020.
- CHAPLIN, M.; BUCKE, C. **Enzyme Technology**. Cambridge University Press. 1990.
- DENTI, A. F.; POLINA, C. C.; VANZ, J.; BERNARDI, J. L. Enzimas e suas aplicações com ênfase na indústria de alimentos. **Revista Perspectiva**, n. 46, v.175, p.11-20, 2022.
- FIEDUREK, J.; PIELECKI, J.; SKOWRONEK, M. Direct methods for selecting mutants with increased production of invertase from mutagenised cultures of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 40, p. 111-118, 2000.
- KARKAŞ, Taylan; ÖNAL, Seçil. Characteristics of invertase partitioned in poly (ethyleneglycol)/magnesium sulfate aqueous two-phase system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 142-150, 2012.
- MADHUSUDHAN, M. C.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two phase extraction of invertase from baker's yeast: Effect of process parameters on partitioning. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 2014-2020, 2011.
- MANUS. Manus IA. Ferramenta de Inteligência Artificial. Disponível em: <https://manus.ai>. Acesso em 9 jun. 2026.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- VERNAU, J., KULA, M.R. Extraction of proteins from biological raw material using aqueous polyethylene glycol-citrate phase systems. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.12, p.397-404, 1990.
- ZIELIŃSKA-DAWIDZIAK, M.; MICHALAK, M. Influence of magnetic field on extraction of model proteins in polyethylene glycol/magnesium sulfate aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v. 1126, p. 121760, 2019.