

RECUPERAÇÃO DE INVERTASE POR EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

ELIANA MARIA GONÇALVES RODRIGUES

Fatec Piracicaba “Deputado Roque Trevisan” - Tecnologia em Alimentos/Biocombustíveis
eliana.goncalves@fatec.sp.gov.br

Invertase recovery by liquid-liquid extraction

Eixo Tecnológico: *Produção Alimentícia*

Resumo

A invertase é uma enzima de forte apelo comercial devido sua capacidade de catalisar a hidrólise da sacarose em glicose e frutose. Entretanto, um dos grandes desafios consiste em utilizar as enzimas em diferentes setores da indústria sem que seja necessário empregar métodos com custos elevados na sua produção e recuperação, uma vez que, os métodos convencionais para purificar biomoléculas geralmente incluem etapas muito complexas. Sendo assim, uma alternativa viável é extrair a molécula de interesse através de um sistema de duas fases aquosa. É neste sentido, que o presente trabalho tem o intuito de propor um método de recuperação para a enzima invertase a partir da utilização de um sistema de duas fases aquosa, tendo em vista sua simplicidade, baixo custo e a alta seletividade. A metodologia proposta se baseia na obtenção 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 do Programa *Statistix 10* e construção do gráfico de superfície de resposta pelo Programa *Minitab Statistical Software*. Os resultados das análises demonstraram que a variável pH e o modelo são significativos, podendo o modelo ser representado por um linear, além de não apresentar falta de ajuste. O melhor resultado para a recuperação em atividade enzimática da invertase foi de 84,5%, obtido quando se trabalhou com a concentração de 30% (p/p) para o PEG₆₀₀₀ e 15% (p/p) para o MgSO₄ no pH 7,0.

Palavras-chave: *Enzima, Saccharomyces cerevisiae, Sistema de duas fases aquosa.*

Abstract

Invertase is an enzyme with strong commercial appeal due to its ability to catalyze the hydrolysis of sucrose into glucose and fructose. However, one of the major challenges is to use enzymes in different sectors of industry without the need to employ costly methods for their production and recovery, since conventional methods for purifying biomolecules generally include very complex steps. Therefore, a viable alternative is to extract the molecule of interest through an aqueous two-phase system. It is in this sense that the present work aims to propose a recovery method for the enzyme invertase using an aqueous two-phase system, given its simplicity, low cost and high selectivity. The proposed methodology is based on obtaining invertase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, using the aqueous two-phase system formed by a polymer and salt, determining the invertase activity through the quantification of reducing sugars released by the dinitrosalicylic acid (DNS) method, analyzing the results using the *Statistix 10* program and constructing the response surface graph using the *Minitab Statistical Software* program. The results of the analyses demonstrated that the pH variable and the model are significant, and the model can be represented by a linear model, in addition to not presenting lack of adjustment. The best result for the recovery of invertase enzymatic activity was 84.5%, obtained when working with the concentration of 30% (w/w) for PEG₆₀₀₀ and 15% (w/w) for MgSO₄ at pH 7.0.

Key-words: *Enzyme, Saccharomyces cerevisiae, Aqueous two-phase system.*

1. Introdução

O processo de extração líquido-líquido apresenta-se como uma opção atrativa para a separação de biomoléculas, sendo que no sistema de duas fases aquosa, a formação de fases ocorre devido ao tipo de componente envolvido; devido a variação de concentração de uma das

fases; variação de pH ou temperatura e por gradiente de força iônica [1]. As vantagens na sua utilização envolvem baixo tempo de processo e consumo energético, altos rendimentos, facilidade de aumento de escala operacional de um nível laboratorial para industrial e a possibilidade de se operar em um processo contínuo [2]. Além disso, possui aplicações em diversos setores industriais, como no setor alimentício, na extração de compostos fenólicos em subprodutos do café, na extração de ácido láctico e para produção de corantes alimentícios sintéticos [3, 4, 5 e 6].

O polietileno glicol (PEG) é um polímero sintético, não carregado, de cadeia linear de unidades de oxietileno que apresenta alta solubilidade em água, baixa pressão de vapor, não inflamável, não corrosivo e nem tóxico, além de ser aprovado pela FDA para uso em fármacos e alimentos [7]. Geralmente quase todas as biomoléculas menores tendem migrar para a fase inferior (fase sal) que é mais polar e as proteínas permanecem na fase superior (fase PEG) menos polar. Além, do sistema de duas fases aquosa, poder atuar como um processo de pré-purificação, uma vez que promove a redução de grande quantidade de contaminantes, auxiliando no aumento do rendimento em processos mais onerosos de purificação [8]. Estudos demonstram a recuperação de proteínas através da utilização do sistema de duas fases aquosa, utilizando uma única proteína ou múltiplas proteínas como moléculas-alvo [9 e 10].

A invertase ou β -D-frutofuranosidase (E.C.3.2.1.26) é uma glicoproteína, que produz uma forma intracelular mais leve de 135 kDa e outra extracelular mais pesada, contendo uma porção importante de carboidratos, glicoproteína, de 270 kDa. Possui um pH isoelétrico de 4, apresenta um máximo de atividade catalítica em pH de 4,5 e estável termicamente a 50°C, com máxima atividade a 55°C [11]. Seu principal substrato é a sacarose, resultando da sua hidrólise uma molécula de glicose e outra de frutose [12].

Industrialmente, as invertases têm seu maior campo de aplicação na área de alimentos, tanto na fabricação de mel artificial, quanto para a produção dos frutooligossacarídeos [13 e 14]. O açúcar invertido, é amplamente utilizado na panificação, na formulação de cremes para recheio e de geleias especialmente na preparação de balas, doces e xaropes [15 e 16]. No processo de fabricação de xaropes, sua utilização apresenta vantagens significativas, uma vez que não forma subprodutos [17]. A sua principal aplicação na indústria alimentícia é explicada pela frutose ter maior poder adoçante do que a sacarose, além do fenômeno da cristalização acontecer de forma mais lenta, produzindo produtos mais frescos e com as propriedades físicas estáveis [18 e 19]. Além disso, ao ser utilizada em alimentos contribui também com respostas de Maillard, ou seja, o escurecimento da massa após assamento, dando a impressão visual de que o produto não está cru. É importante ressaltar que, no setor alimentício e de bebidas, há uma grande expansão do mercado, chegando a movimentar 6,4 bilhões de dólares em 2021 de acordo com pesquisa do Business Communication Company (BCC) e com uma projeção de crescimento anual de 6,3% por ano, chegando a 8,7 bilhões de dólares em 2026 [20].

Assim o intuito deste 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 por PEG e sal.

2. Materiais e métodos

2.1 Obtenção da invertase

A invertase foi obtida a partir da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Foi pesado 50 gramas de levedura seca, depois suspender em 250mL de bicarbonato de sódio 0,15M e manter em banho-maria a 37°C durante 6 horas, com agitação ocasional. Centrifugar por 20 minutos a

Anais da VIII Mostra de Docentes em RJ

3500rpm. Coletar o sobrenadante, o qual contém a enzima invertase ativa. Conservar em freezer.

2.2 Determinação da atividade enzimática

A atividade da invertase foi determinada pela concentração de açúcares redutores produzidos após o tempo de ensaio. Em um tubo, colocar-se 1,0 mL da solução contendo invertase e 1,0 mL de solução tamponada de sacarose 0,3M (tampão acetato 0,05 M; pH 4,6). Misturar-se e deixar-se o tubo em banho-maria a 37°C por 10 minutos. A seguir, adicionar-se 1,0 mL de solução de ácido dinitrosalicílico, mergulhando o tubo em banho fervente por 5 minutos. Resfriar-se e completar-se o volume a 10 mL com água destilada e fazer-se as leituras em espectrofotômetro em 540 nm. Para preparar-se o branco, substituir-se a solução da enzima por água destilada. A quantificação de açúcares redutores liberados foi estimada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) conforme [21].

2.3 Recuperação da invertase pelo sistema de duas fases aquosa

Colocou-se o tubo de centrífuga graduado (15mL) em uma balança analítica e adicionou-se quantidades definidas de PEG, MgSO₄ e invertase de acordo com o planejamento experimental. Em seguida, o sistema foi misturado e centrifugado por 10 minutos a uma velocidade de 2500g, para separação das fases. Observou-se a formação das fases superior (de topo) e inferior (de fundo), foram retiradas amostras de cada uma das fases para a determinação da atividade enzimática.

2.4 Planejamento Experimental

A análise estatística dos resultados foi realizada através do Programa *Statistix* 10, 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. E o gráfico de superfície de resposta foi obtido através do Programa *Minitab Statistical Software*.

2.5 Metodologia de análise dos resultados

Para a avaliação do processo de recuperação da invertase foi analisado a recuperação em atividade enzimática (R_{AE}). Define-se recuperação em atividade enzimática (R_{AE}) como:

$$R_{AE} = A_2/A_1 \times 100$$

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

Anais da VIII Mostra de Docentes em RJ

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 [22]. 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 [2, 22 e 23]. 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 [24 e 25]. Foi utilizado um planejamento experimental, com as seguintes variáveis: porcentagem de PEG/ $MgSO_4$, pH e Massa Molecular do PEG. As condições experimentais de cada ensaio, juntamente com os resultados de recuperação em atividade enzimática, são apresentadas na Tab. 1.

Tab. 1 - Esquema da matriz utilizada no planejamento fatorial completo 2^3 com 2 ensaios no ponto central e os resultados em Recuperação em Atividade Enzimática utilizando o sistema PEG/ $MgSO_4$.

Ensaio	A	B	C	R _{AE} (%)
1	-1	-1	-1	33,2
2	+1	-1	-1	49,9
3	-1	+1	-1	43,4
4	+1	+1	-1	66,0
5	-1	-1	+1	50,0
6	+1	-1	+1	67,8
7	-1	+1	+1	44,7
8	+1	+1	+1	84,5
9	0	0	0	64,9
10	0	0	0	64,1

A = Concentração de PEG/ $MgSO_4$ (%) (p/p) (-1 = 15/30; 0 = 22,5/22,5; 1 = 30/15); B = pH (-1 = 4,0; 0 = 5,0; 1 = 6,0); C = Massa Molar PEG (g/mol) (-1 = 1500; 0 = 4000; 1 = 6000)

Ao analisar os resultados da Tab. 1, percebe-se que o maior e o menor rendimento em atividade da enzima são encontrados nos ensaios 8 e 1, justamente onde temos as variáveis no maior e menor valor, respectivamente.

Através dos resultados estatísticos (Tab. 2 e 3), foi possível constatar que a variável pH e o modelo são significativos, podendo o modelo ser representado por um linear, além de não apresentar falta de ajuste.

Tab. 2 - Efeitos estimados, valores do teste t de “Student” obtidos no planejamento fatorial completo 2^3 com 2 ensaios no ponto central.

Efeitos	Estimativas	T	P
Média	56,85	23,6758	0,0000*
A	12,1125	4,5118	0,0040*
B	4,7125	1,7553	0,1297
C	6,8125	2,5376	0,0442

A = Concentração de PEG/ $MgSO_4$ (%); B = pH; C = Massa Molar PEG (g/mol)

*Significativos ao nível de 95% de confiança

Fonte: (Autor, 2025)

Tab. 3 - Análise da variância para o estudo da recuperação de amilase por sistema de duas fases aquosas, no planejamento fatorial completo 2^3 com 2 ensaios no ponto central.

	SQ	Df	MQ	F	P
Modelo	1722,64	3	574,215	9,96	0,0096*
Resíduo	345,94	6	57,6569		
Total	2068,59	9			
Falta de ajuste	345,62	5	69,1243	216,01	0,0516

$R^2 = 0,83$; SQ = Soma Quadrática; QM = Média Quadrática; *Significativos ao nível de 95% de confiança

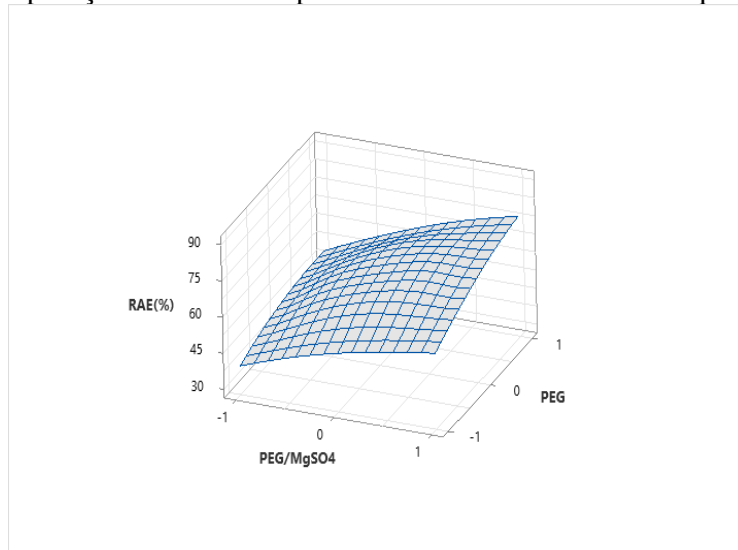
Fonte: (Autor, 2025)

Portanto, podemos representar o processo de recuperação da invertase por um sistema de duas fases aquosas, considerando os termos que realmente influenciam no rendimento em atividade, pela Eq. (1):

$$Y = 56,85 + 12,11 \cdot A \quad (1)$$

Sendo que Y representa o recuperação em atividade enzimática e A a concentração PEG/MgSO₄. A superfície de resposta do modelo e as linhas de contorno estão apresentadas na Fig. 1.

Fig. 1 - Superfície de resposta descrita pelo modelo da Equação 1, que representa a recuperação da invertase por um sistema de duas fases aquosas.



Fonte: (Autor, 2025)

4. Considerações finais

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que, o sistema de duas fases aquosa pode ser uma alternativa para a recuperação e concentração das enzimas, pois dentro dos limites estipulados, através da utilização do planejamento experimental, o modelo não apresentou falta de ajuste, sendo representado por um modelo linear, tendo como variável significativa a concentração de PEG/MgSO₄, alcançando um valor máximo de 84,5% para a recuperação em

atividade enzimática da invertase nas concentrações de PEG₆₀₀₀ 30% (p/p) e MgSO₄ 15%(p/p) e pH 7,0.

Agradecimentos

Ao CPRJI, CPS e Governo do Estado de São Paulo.

Referências

- [1] RAJA, S. et al. Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules—a review. **Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 7-16, 2011.
- [2] 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.
- [3] SMIRNOVA, S. V. et al. Extraction and determination of synthetic food dyes using tetraalkylammonium based liquid-liquid extraction. **Microchemical Journal**, v. 162, p. 105833, 2021.
- [4] BEG, D. et al. Liquid-liquid extraction of lactic acid using non-toxic solvents. **Chemical Data Collections**, p. 100823, 2022.
- [5] BONDAM, A. F. e al. Phenolic compounds from coffee by-products: extraction and application in the food and pharmaceutical industries. **Trends In Food Science & Technology**, v. 123, p. 172-186, 2022.
- [6] CHEN, J. e al. Simulation of the enhancement of Dean flow on the liquid–liquid extraction in membrane contactors. **Separation and Purification Technology**, v. 285, p. 120-384, 2022.
- [7] LIU, W. et al. Stability and conformational change of methoxypolyethylene glycol modification for native and unfolded trypsin. **Food Chemistry**, v.146, p.278-283, 2014.
- [8] PHONG, W. N. et al. Recovery of biotechnological products using aqueous two-phase systems. **Journal of bioscience and bioengineering**, v.126, n.3, p. 273-281, 2018.
- [9] PEDRO, M. S.et al. Effect of flow patterns on bovine serum albumin and ampicillin partitioning using aqueous two-phase systems in microdevice. **Separation and Purification Technology**, v. 254, p. 117592, 2021.
- [10] SANTOS, K. A. et al. Partitioning of amylase produced by *Aspergillus niger* in solid state fermentation using aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 94, p. 116-125, 2020.
- [11] KERMASHA, S.; ESKIN, M. N.A. Selected industrial enzymes. **Enzymes**, p. 259- 305, 2021. Elsevier.
- [12] FIEDUREK, J. et al. 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.
- [13] PADILHA, C. E. A.et al. Partition coefficient prediction of Baker's yeast invertase in aqueous two phase systems using hybrid group method data handling neural network. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 25, n. 5, p. 652-657, 2017.
- [14] CHAN, W. D. et al. 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.
- [15] GRACIDA-RODRÍGUEZ, J. et al. Invertases. In: PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. (Ed.) **Enzyme Technology**. New Delhi: Asiatech Publishers, 2005. p. 449-464.

Anais da VIII Mostra de Docentes em RJ

- [16] SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2004.
- [17] SWAIN, R.; STEPHAN, J. **Enzyme treated maple syrup and shelf stable products containing enzyme treated maple syrup**. US Patent 6.936.290, 2005.
- [18] AKARDERE, E. et al. Three-phase partitioning of invertase from Baker's yeast. **Separation and Purification Technology**, v. 72, n. 3, p. 335-339, 2010.
- [19] VALERIO, S. G. et al. High operational stability of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chitosan nanoparticles. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 1, p. 462-468, 2013.
- [20] BCC RESEARCH. **Global Markets for Enzymes in Industrial Applications**; BCC Publishing: Wellesly, MA, USA, 2021.
- [21] MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- [22] CARVALHO, J. **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.
- [23] WYSOCZANSKA, K. et al. Cation effect on the (PEG 8000+ sodium sulfate) and (PEG 8000+ magnesium sulfate) aqueous two-phase system: Relative hydrophobicity of the equilibrium phases. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 91, p. 321-326, 2015.
- [24] KARKAŞ, T.; ÖNAL, S. Characteristics of invertase partitioned in poly (ethylene glycol)/magnesium sulfate aqueous two-phase system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 142-150, 2012.
- [25] 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.