

ESTABILIZAÇÃO DE ENZIMAS PARA APLICAÇÃO EM REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÕESThiago B. F. Sant’Anna (IC)¹, José Renato Guimarães (PQ)¹¹Universidade Federal de Itajubá**Palavras-chave:** Açúcar invertido. Alginato de sódio. Imobilização enzimática. Invertase. Termoestabilidade.**Introdução**

A invertase (EC 3.2.1.26), ou β -frutofuranosidase, é uma enzima glicosídica de grande interesse científico e tecnológico, pois promove a hidrólise da sacarose, liberando glicose e frutose. Essa atividade possui ampla aplicação industrial, destacando-se na produção de xaropes ricos em frutose, na formulação de alimentos com elevado teor de açúcares, na síntese de intermediários farmacêuticos e no aproveitamento de biomassa para obtenção de biocombustíveis. A relevância dessa enzima está associada não apenas ao seu elevado rendimento catalítico, mas também à sua especificidade pelo substrato (Choi et al., 2020; Polanía Melo et al., 2023). Do ponto de vista biológico, a invertase é encontrada em diversos organismos, como plantas, bactérias e leveduras, sendo a levedura de gênero *Saccharomyces* e espécie *cerevisiae* a mais empregada na produção industrial devido à sua elevada produtividade enzimática e à facilidade de cultivo (Osiebe et al., 2023).

A viabilidade econômica de processos enzimáticos em escala industrial depende, em grande parte, da estabilidade do biocatalisador, que deve manter sua atividade por períodos prolongados e permitir reutilizações sucessivas dentro do sistema produtivo. Para alcançar esse objetivo, diferentes abordagens têm sido investigadas, como a imobilização da invertase em suportes sólidos e seu encapsulamento em matrizes poliméricas (Polanía Melo et al., 2023; Abdella e Hassan, 2024). Apesar de a imobilização em suportes sólidos apresentar ganhos significativos em termos de estabilidade e reaproveitamento da enzima, o alto custo desses materiais pode elevar substancialmente o valor final do biocatalisador, comprometendo sua viabilidade industrial. Nesse contexto, o desenvolvimento de alternativas mais acessíveis para os suportes representa uma estratégia promissora para reduzir custos e favorecer a implementação desses processos em larga escala (Abdella e Hassan, 2024).

Entre as estratégias disponíveis, a imobilização de enzimas por aprisionamento em géis tem se consolidado como uma das mais empregadas em biotecnologia. Nesse contexto, o alginato de sódio, um polímero natural obtido de algas marrons, destaca-se como suporte preferencial por reunir características como biocompatibilidade, baixo custo e facilidade de processamento (Weng et al., 2023). O procedimento envolve a incorporação da enzima em uma solução de alginato, que é posteriormente gotejada em cloreto de cálcio, resultando na formação de microesferas de gel por reticulação iônica (Choi et al., 2020). A rede tridimensional formada aprisiona a enzima de maneira física, oferecendo proteção frente a condições ambientais desfavoráveis e preservando sua atividade catalítica (Weng et al., 2023). Além disso, essa técnica favorece a recuperação e o reuso do biocatalisador, o que contribui para um processo mais sustentável e economicamente viável em aplicações industriais (Abdella e Hassan, 2024).

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo investigar a extração, imobilização e termoestabilidade da invertase de *S. cerevisiae*, além de avaliar sua aplicação em sistemas descontínuos e contínuos para produção de açúcar invertido, visando aplicações industriais sustentáveis.

Metodologia

Extração e imobilização de invertase de *Saccharomyces cerevisiae* comercial. A invertase foi extraída a partir de 50 g de *Saccharomyces cerevisiae* seca, suspensa em 250 mL de bicarbonato de sódio a 0,15 M, incubada a 37 °C durante 18 h sob agitação de 100 rpm. Então, as amostras foram centrifugadas por 20 min a 3500 rpm. Desta forma, após a centrifugação, o sobrenadante, o qual contém a enzima invertase ativa e outras enzimas proveniente de outras vias, foi utilizado nas etapas subsequentes, enquanto o precipitado foi descartado. Para a imobilização, 50 mL do extrato enzimático foram misturados a uma solução de 2,5 g de

“Do conhecimento acadêmico à transformação sustentável: inovação com validação científica”

alginate preparado em 75 mL de água destilada. A mistura foi gotejada em solução de cloreto de cálcio a 0,2 M, formando esferas com diâmetros distintos (3 mm e 4 mm), que não podem ser consideradas microesferas. A atividade enzimática foi determinada por espectrofotometria, utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959).

Estudo de termoestabilidade. A estabilidade térmica da invertase, tanto na forma livre quanto imobilizada, foi analisada por meio de incubação em tampão fosfato 5 mM (pH 7,0), sob temperaturas entre 35 a 60 °C. Em intervalos determinados, foram retirados 200 µL da solução contendo a enzima livre e 0,20 g do preparado enzimático imobilizado, a fim de quantificar suas atividades residuais. Essa atividade residual foi expressa como a razão entre a atividade enzimática obtida no ensaio e o valor inicial de atividade.

Produção de açúcar invertido. A produção de açúcar invertido foi conduzida a 30 °C, utilizando solução de sacarose a 100 g L⁻¹ preparada em água. Nos ensaios em batelada, realizados em reator tanque agitado (STR), empregou-se enzima livre (50 mL de extrato enzimático) ou imobilizada (60 g em cesta acoplada ao agitador). Já no reator tubular de fluxo pistão (PFR), previamente carregado com 25 g de enzima imobilizada, a operação ocorreu em modo de recirculação, utilizando uma bomba de aquário com vazão de 186 mL/min. Em todos os experimentos, amostras foram coletadas para determinação de açúcares redutores totais pelo método DNS.

Estabilidade operacional. A estabilidade operacional da enzima imobilizada foi avaliada em PFR para a produção de açúcar invertido. Foram realizados 5 ciclos sucessivos da invertase imobilizada nas condições descritas para a produção de açúcar invertido.

Resultados e discussão

A cinética de extração da invertase de *Saccharomyces cerevisiae* mostrou aumento progressivo da atividade volumétrica até aproximadamente 16 h, estabilizando-se em torno de 60 U/mL, o que indica liberação máxima da enzima ou equilíbrio do sistema.

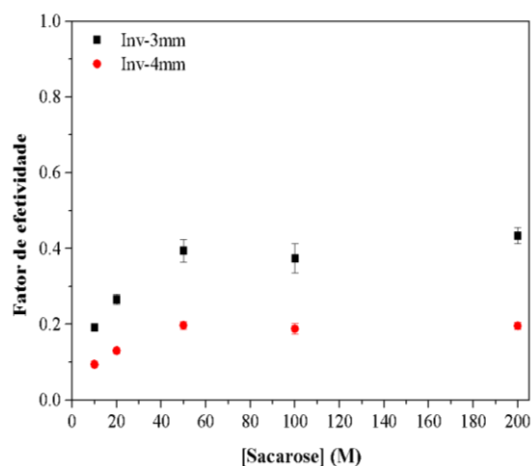
A análise cinética (Tabela 1) evidenciou diferenças marcantes entre a enzima solúvel e as imobilizadas em esferas de alginato de cálcio (3 mm e 4 mm). A invertase solúvel apresentou menor K_m, refletindo maior afinidade

pelo substrato, enquanto as formas imobilizadas exibiram valores superiores, esses resultados podem estar relacionado a limitações difusionais que proporcionaram menor acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. O V_{máx} também foi reduzido após a imobilização, sobretudo na Inv-4mm. Apesar disso, os fatores de efetividade (Figura 1) aumentaram com a elevação da concentração de sacarose, demonstrando que a difusão interna se torna menos restritiva em condições de saturação do substrato no *bulk* da solução, sendo a Inv-3mm mais eficiente que a Inv-4mm.

Tabela 1 - Parâmetros cinéticos estimados para a hidrólise da sacarose a 40 °C e pH 6,0 catalisada pela invertase solúvel e imobilizada em alginato (Inv-3mm e Inv-4mm).

Parâmetros	Invertase solúvel	Inv-3mm	Inv-4mm
K _m (mM)	22.00	78.00	71.00
V _{máx} (µmol mg ⁻¹ min ⁻¹)	2.64 x 10 ²	1.55 x 10 ²	0.71 x 10 ²
K _{cat} (min ⁻¹)	1.73 x 10 ⁷	1.18 x 10 ⁸	2.77 x 10 ⁷
V _{máx} /K _m (min ⁻¹)	1.20 x 10 ⁴	1.98 x 10 ³	1.00 x 10 ³
K _{cat} /K _m (M ⁻¹ min ⁻¹)	7.86 x 10 ⁵	1.51 x 10 ⁶	3.90 x 10 ⁵

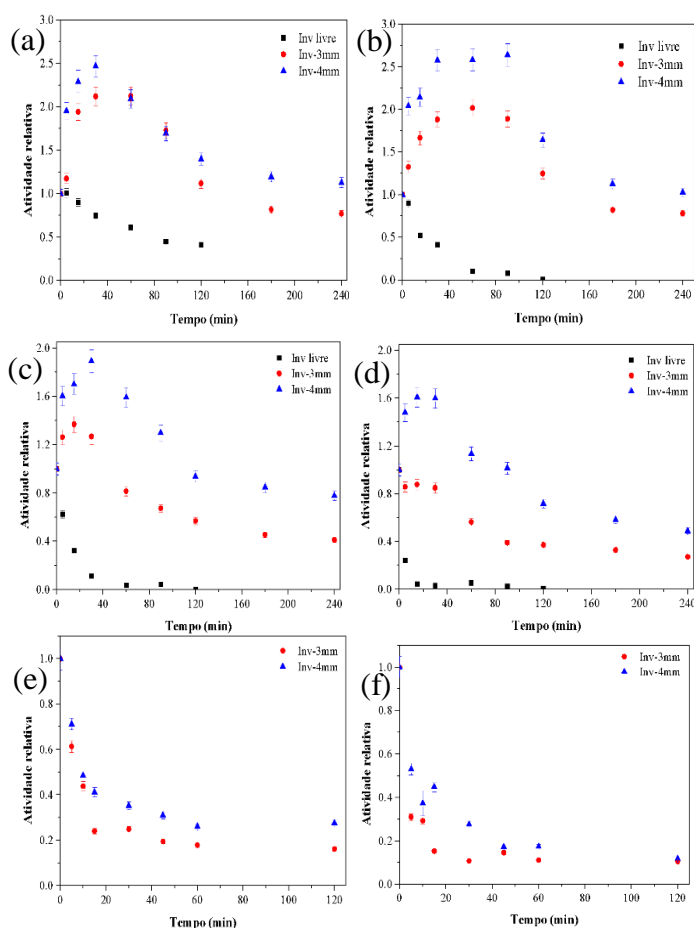
Figura 1 - Fator de efetividade para invertase imobilizada em alginato (Inv-3mm e Inv-4mm).



Os ensaios de termoestabilidade (Figura 2) revelaram que a invertase solúvel foi a mais suscetível à desnaturação térmica, perdendo quase toda sua atividade em 120 min a 55 e 60 °C. Já as enzimas imobilizadas apresentaram maior resistência, destacando-se a Inv-4mm, que preservou cerca de 50% da atividade a 55 °C e aproximadamente 35% a 60 °C, indicando que partículas de maior diâmetro podem conferir maior proteção estrutural à proteína devido a formação de maior gradiente de temperatura ao longo do raio da partícula.

“Do conhecimento acadêmico à transformação sustentável: inovação com validação científica”

Figura 2 - Perfis de inativação térmica de invertase solúvel e imobilizado em alginato (Inv-3mm e Inv-4mm) em diferentes temperaturas (a) 35 °C, (b) 40 °C, (c) 45 °C, (d) 50 °C, (e) 55 °C (f) e 60 °C.



mantendo constante e máximo ao longo dos ciclos de reação, atingindo uma conversão semelhante ao primeiro reciclo. Isso demonstra que a imobilização foi capaz de estabilizar a invertase tridimensionalmente para aplicações industriais robustas.

Figura 3: Hidrólise de sacarose (50 g L^{-1}) catalisada por invertase solúvel e Inv-3mm a 40 °C, pH 6,0 e 300 rpm operado em (a) batelada e (b) PFR.

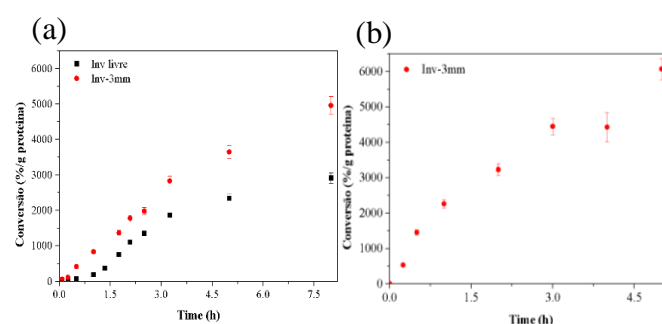
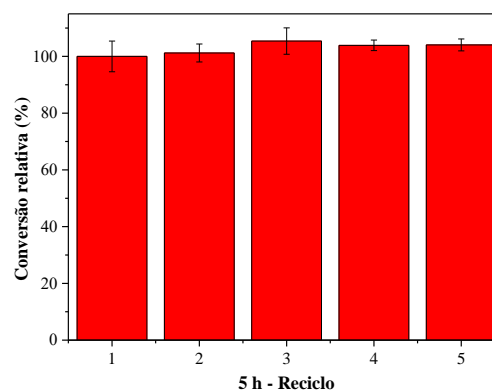


Figura 4: Evolução temporal da hidrólise de sacarose utilizando o Inv-3mm em reator PFR para a produção de açúcar invertido.



Os testes de hidrólise em batelada e em reator de fluxo pistão (Figura 3) confirmaram o bom desempenho da invertase imobilizada (Inv-3mm). Em batelada, atingiu conversão específica superior a $5000\%/g$ de proteína após 8 h, contra cerca de $3500\%/g$ da forma solúvel. No PFR, manteve atividade catalítica elevada, alcançando $\sim 6000\%/g$ em 5 h, com comportamento quase linear ao longo do tempo. Esses resultados reforçam que a imobilização em alginato de cálcio não apenas aumenta a estabilidade térmica e operacional, mas também viabiliza a aplicação em sistemas contínuos e descontínuos, aspecto crucial para processos industriais.

A Figura 4 mostra a estabilidade operacional da invertase imobilizada em esferas de alginato em reação de hidrólise de sacarose em reator PFR. Pode-se observar que não houve perda no desempenho do biocatalisador, se

Conclusões

Os resultados confirmam o potencial biotecnológico da invertase de *Saccharomyces cerevisiae*, sobretudo quando imobilizada em esferas de alginato de cálcio. A imobilização resultou em maior resistência térmica e operacional, garantindo atividade catalítica mesmo em condições adversas. Além disso, o desempenho superior em sistemas descontínuos e contínuos de hidrólise de sacarose demonstrou a viabilidade de sua aplicação em processos industriais. A elevada conversão obtida, associada à possibilidade de reutilização do biocatalisador, evidencia a contribuição da estratégia para

“Do conhecimento acadêmico à transformação sustentável: inovação com validação científica”

processos sustentáveis na indústria de alimentos e biotecnologia.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido ao desenvolvimento deste trabalho.

Referências

ABDELLA, M. A. A.; HASSAN, M. E. Covalent immobilization of β -galactosidase using a novel carrier alginate/tea waste: statistical optimization of beads modification and reusability. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 47, p. 249-261, 2024.

CHOI, H. J.; LEE, H. J.; JANG, W. J. Immobilization of invertase in calcium alginate and calcium alginate-kappa-carrageenan beads and its application in bioethanol production. *Biotechnology Letters*, v. 42, p. 55-63, 2020. DOI: 10.1007/s10529-019-02752-4.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. DOI: 10.1021/ac60147a030.

OSIEBE, O.; ADEWALE, I. O.; OMAFUVBE, B. Production and characterization of intracellular invertase from *Saccharomyces cerevisiae* (OL629078.1) using cassava-soybean as a cost-effective substrate. *Scientific Reports*, v. 13, n. 16295, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-42113-7.

POLANÍA MELO, D.; RODRÍGUEZ-VEGA, G. M.; NIÑO, C. Invertase immobilization on magnetite nanoparticles for efficient fructooligosaccharide generation: a comprehensive kinetic analysis and reactor design strategy. *Chemical Engineering*, v. 7, n. 3, p. 55, 2023. DOI: 10.3390/chemengineering7030055.

WENG, Y.; MA, Y.; YANG, H.; ZHANG, H. Alginate-based materials for enzyme encapsulation. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 318, p. 102957, 2023. DOI: 10.1016/j.cis.2023.102957.