



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA

JOSÉ GUILHERME ALBUQUERQUE GOMES

**ESTUDO DA SÍNTESE DE INVERTASE E TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO EM
CULTIVO DE *Saccharomyces cerevisiae***

Recife

2025

JOSÉ GUILHERME ALBUQUERQUE GOMES

**ESTUDO DA SÍNTESE DE INVERTASE E TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO EM
CULTIVO DE *Saccharomyces cerevisiae***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientadora: Gisely Alves da Silva

Recife

2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Gomes, José Guilherme Albuquerque.

Estudo da síntese de invertase e técnicas de extração em cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* / José Guilherme Albuquerque Gomes. - Recife, 2025.

52 p. : il., tab.

Orientador(a): Gisely Alves da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Engenharia Química - Bacharelado, 2025.

Inclui referências.

1. Extração. 2. Lise celular. 3. Ácido 3,5-Dinitrosalicílico. 4. Açúcares redutores. 5. Métodos mecânicos. I. Silva, Gisely Alves da. (Orientação). II. Título.

660 CDD (22.ed.)

JOSÉ GUILHERME ALBUQUERQUE GOMES

**ESTUDO DA SÍNTESE DE INVERTASE E TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO EM
CULTIVO DE *Saccharomyces cerevisiae***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Data de defesa: 05/08/2025

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



GISELY ALVES DA SILVA

Data: 16/08/2025 21:06:28-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Gisely Alves da Silva (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente



MARIA DE LOS ANGELES PEREZ FERNANDEZ

Data: 18/08/2025 03:36:58-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente



PEDRO FERREIRA DE SOUZA FILHO

Data: 18/08/2025 16:17:50-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Pedro Ferreira de Souza Filho (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Graças Albuquerque e Antônio
Gomes (*in memoriam*), à minha irmã,
Roberta Albuquerque, às minhas sobrinhas,
Isabela e Eduarda. À minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por abençoar e guiar o meu caminho, me atribuindo forças para enfrentar os obstáculos e concluir com êxito essa jornada acadêmica.

Aos meus pais, Graças Albuquerque e Antônio Gomes (*in memoriam*), que foram a base e a força durante toda a minha trajetória, sem eles eu nada seria.

À minha Família, especialmente aos meus padrinhos, Carminha Albuquerque e Adeildo Silva, que estiveram sempre de portas abertas para mim. À minha irmã Roberta Albuquerque, que sempre me orientou e me guiou pelos melhores caminhos. Às minhas sobrinhas, Isabela e Eduarda, e à minha namorada, Carla Queiroz, fontes de inspiração e amor.

À minha amiga Mariana Enes, conselheira nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos de graduação, Igor Henriques, Ramon Machado, Humberto Andrade, Max Silvestre, Aziz Calife, Augusto Simas, Luiz Filipe, Byanka Emilly e Jurandir Muniz, pelos momentos de descontração, ensinamentos compartilhados e todo apoio emocional.

Agradeço aos professores da UFPE, Maria de Los Angeles Perez (Engenharia Bioquímica), Hélio Magalhães (Estatística) e Eduardo Dias (Físicas 2 e 3), pelo apoio e ensinamentos inspiradores durante a graduação.

Sou grato também aos mestres do período pré-universitário, Ednaldo Ernesto e Carlos Alberto (Matemática), Cláudio de Química, e Rafael Vieira de Física, que foram as fagulhas iniciais pela minha paixão pela Química e pela Matemática.

À minha orientadora, Dr^a Gisely Alves, pela orientação, paciência e ensinamentos prestados durante a graduação e elaboração do presente trabalho de conclusão de curso.

Agradecimento à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em especial ao Departamento de Engenharia Química, por todo o apoio institucional.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que eu alcançasse esta etapa da minha vida e realizasse meus objetivos.

EPÍGRAFE

“O que diz sua consciência? – ‘torne-se aquilo que você é’”

Nietzsche - A Gaia Ciência

RESUMO

Este trabalho de conclusão de curso investigou a produção da enzima invertase pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* e avaliou a eficácia de métodos físicos de extração para a recuperação dessa enzima. O cultivo da *S. cerevisiae* foi realizado em meios contendo sacarose e melão de cana-de-açúcar. A presença e a ação da invertase foram determinadas pela quantificação de açúcares redutores através do método colorimétrico do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), analisando as concentrações formadas após a hidrólise da sacarose a 50°C. Os resultados confirmaram a capacidade da *S. cerevisiae* de produzir invertase ativa, observando-se um aumento na concentração de açúcares redutores no sobrenadante do cultivo após a hidrólise da sacarose, o que indica a presença de enzima extracelular funcional. Contudo, as tentativas de extração da enzima intracelular por métodos mecânicos, como os testes de moinho de bolas com agitador vórtex e o uso de banho ultrassônico, não foram eficazes nas condições testadas. Isso resultou em baixas concentrações de açúcares redutores após a lise celular, divergindo significativamente dos resultados de estudos na literatura que demonstram alta eficiência para esses métodos. Essa ineficácia foi atribuída principalmente à inadequação dos equipamentos de laboratório utilizados e à falta de otimização específica de parâmetros, como o tamanho das pérolas de vidro e a intensidade do tratamento ultrassônico. Assim, embora a produção e a ação da invertase extracelular sejam evidentes, a recuperação eficiente da enzima intracelular permanece como um desafio, exigindo aprimoramentos metodológicos e a investigação de condições e equipamentos mais adequados para aplicações industriais.

Palavras-chave: Extração; Lise celular; Ácido 3,5-Dinitrosalicílico; Açúcares redutores; Métodos mecânicos.

ABSTRACT

This undergraduate thesis investigated the production of invertase enzyme by *Saccharomyces cerevisiae* and evaluated the effectiveness of physical extraction methods for enzyme recovery. *S. cerevisiae* was cultivated in media containing sucrose and sugarcane molasses. Invertase presence and activity were determined by quantifying reducing sugars using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) colorimetric method, analyzing concentrations formed after sucrose hydrolysis at 50°C. The results confirmed *S. cerevisiae*'s ability to produce active invertase, showing an increase in reducing sugar concentration in the cultivation supernatant after sucrose hydrolysis, indicating the presence of functional extracellular enzyme. However, attempts at intracellular enzyme extraction using mechanical methods, such as tests ball milling with a vortex agitator and bath ultrasound, were not effective under the tested conditions. This resulted in low reducing sugar concentrations after cell lysis, significantly diverging from literature studies that demonstrate high efficiency for these methods. This inefficiency was primarily attributed to the inadequacy of the laboratory equipment used and the lack of specific optimization for parameters, like glass bead size and ultrasonic treatment intensity. Additionally, the complex molasses matrix presented challenges for accurate sugar quantification due to interference with the DNS method. Thus, while extracellular invertase production and action were evident, efficient intracellular enzyme recovery remains a challenge, requiring methodological refinements and the investigation of more suitable conditions and equipment for industrial applications.

Keywords: Extraction; Cell lysis; Dinitrosalicylic Acid; Reducing sugars; Mechanical methods.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 1.1 OBJETIVO GERAL..... | 16 |
| 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 16 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA..... | 17 |
| 3.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 17 |
| 3.2 INVERTASE..... | 18 |
| 3.3 O SÍTIO ATIVO DA INVERTASE: ESTRUTURA E RECONHECIMENTO DO SUBSTRATO..... | 20 |
| 3.4 CONDIÇÕES ÓTIMAS DE CULTIVO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 21 |
| 3.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA..... | 22 |
| 3.6 MÉTODO COLORIMÉTRICO DO ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO - QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES E ATIVIDADE ENZIMÁTICA..... | 23 |
| 3.7 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DA INVERTASE INTRACELULAR..... | 24 |
| 3.7.1 Parâmetros para a escolha do método de extração..... | 24 |
| 3.7.2 Moinho de bolas (homogeneizador de esferas)..... | 25 |
| 3.7.3 Ultrassom..... | 27 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 29 |
| 4.1 ANÁLISE DA PRESENÇA DE ENZIMA EXTRACELULAR..... | 29 |
| 4.1.1 Preparação dos Meios e Inóculo e Fermentação..... | 29 |
| 4.1.2 Separação das Amostras e Centrifugação..... | 30 |
| 4.1.3 Reação Enzimática..... | 31 |
| 4.1.4 Testes de DNS – Análises de açúcares redutores..... | 31 |
| 4.2 PREPARO DOS TESTES DE EXTRAÇÃO INTRACELULAR..... | 32 |
| 4.3 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO..... | 34 |
| 4.3.1 Moinho de bolas de vidro..... | 34 |
| 4.3.2 Ultrassom..... | 35 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 37 |
| 5.1 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ENZIMA EXTRCELULAR..... | 37 |
| 5.2 ANÁLISES DE EXTRAÇÃO - SUBSTRATO SACAROSE..... | 43 |
| 5.3 AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO FÍSICA DA INVERTASE..... | 44 |
| 5.4 ANÁLISE GRÁFICA DOS RESULTADOS..... | 46 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 50 |

| | |
|-------------------------|-----------|
| REFERÊNCIAS..... | 51 |
|-------------------------|-----------|

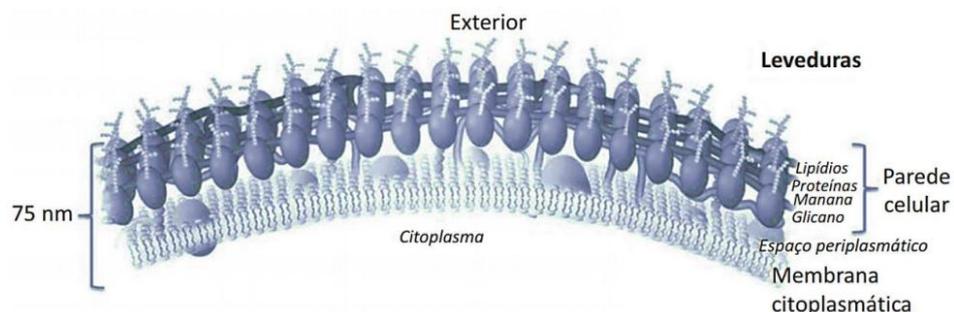
1 INTRODUÇÃO

As enzimas, enquanto catalisadores biológicos, possuem uma aplicação vasta e crescente tanto em ambientes laboratoriais quanto industriais. Sua relevância advém da alta especificidade, eficiência e capacidade de operar sob condições brandas de pH e temperatura (Nelson; Cox, 2017). Essas proteínas são moléculas biológicas com uma notável capacidade de acelerar reações químicas, oferecendo vantagens significativas em comparação aos catalisadores químicos. A invertase, também conhecida como β -frutofuranosidase (EC 3.2.1.26), é uma enzima de particular importância que catalisa a hidrólise da sacarose em uma mistura equimolar de glicose e frutose, denominada "açúcar invertido" (Fellows, 2017).

A invertase é uma enzima utilizada principalmente na indústria alimentícia, onde atua na fabricação de xaropes, doces e sorvetes, aprimorando a textura e evitando a cristalização do açúcar (Fellows, 2017; Almeida, 2024). Seu produto, o açúcar invertido, é essencial em confeitos para prevenir a formação de cristais indesejáveis (Koblitz, 2008). Adicionalmente, a enzima é amplamente utilizada na indústria de refrigerantes, onde o xarope de glicose e frutose serve como um edulcorante fundamental (Barbosa, 2009). A otimização da produção e uso da invertase é, portanto, vital para esses setores industriais.

A recuperação eficaz dessa enzima, que é predominantemente intracelular em muitas cepas, representa um desafio significativo. A parede celular das leveduras (Figura 1), conhecida por sua robustez e complexidade, atua como uma barreira protetora, transformando a etapa de extração enzimática em um gargalo crítico para a viabilidade da produção em escala industrial. A liberação da invertase requer, portanto, o rompimento controlado dessa barreira, processo conhecido como lise celular (Fernandes *et al.*, 2020).

Figura 1 – Representação da composição da parede celular de leveduras.



Fonte: Kilikian; Pessoa Jr. (2020)

A complexidade dos métodos de lise celular reside na necessidade de maximizar a liberação da enzima sem comprometer sua atividade e integridade, ao mesmo tempo em que se busca otimização de custos e a escalabilidade do processo. Métodos de lise podem ser amplamente classificados em físicos (ou mecânicos) e químicos (Ferreira *et al.*, 2017). Os métodos mecânicos, como a utilização de homogeneizadores de esferas (também conhecidos como moinhos de pérolas), dependem da aplicação de forças de cisalhamento e impacto para desintegrar a parede celular. Embora sejam altamente eficazes na liberação do conteúdo intracelular, esses métodos podem gerar calor excessivo e forças que potencialmente causam a desnaturação da enzima, além de serem energeticamente intensivos e complexos para o escalonamento (Pereira *et al.*, 2019; Gomes *et al.*, 2021).

Por outro lado, os métodos químicos, como a permeabilização com detergentes (ex: Triton X-100), atuam dissolvendo ou desorganizando componentes da membrana celular e da parede, facilitando a liberação das proteínas. Estes métodos tendem a ser mais brandos em relação à preservação da integridade enzimática e são, em geral, mais simples em termos de requisitos de equipamento. No entanto, sua eficiência pode variar significativamente dependendo da cepa e das condições, e a remoção dos agentes químicos após a extração pode se tornar um desafio adicional nas etapas subsequentes de purificação do produto (Fernandes *et al.*, 2020). A seleção do método de extração ideal para a invertase envolve, portanto, um balanço crítico entre a eficiência de recuperação, a preservação da atividade enzimática, os custos operacionais e o impacto ambiental.

O presente estudo justifica-se pela sua relevância industrial e didática. Ao investigar a síntese da invertase e analisar a eficácia dos métodos físicos de extração, a partir de cepas comerciais de *S. cerevisiae* amplamente disponíveis no Brasil, esta pesquisa busca fornecer dados comparativos concretos que podem contribuir para a seleção de métodos de extração mais adequados, potencialmente reduzindo custos e aumentando a disponibilidade da enzima para aplicações industriais e nos laboratórios. Adicionalmente, este trabalho aprofunda o conhecimento sobre a síntese e obtenção de bioprodutos intracelulares, servindo como valioso recurso didático e prático para estudantes das engenharias Química e de Alimentos.

1.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a produção de invertase por *Saccharomyces cerevisiae* e avaliar a eficiência de diferentes métodos de extração intracelular da enzima a partir do caldo de cultivo.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

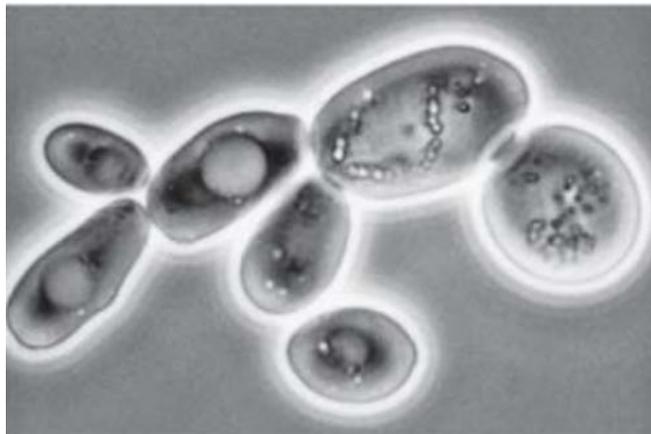
- Cultivar *S. cerevisiae* em meio adequado sob agitação contínua para indução da produção de invertase.
- Determinar a presença ou ausência da enzima no sobrenadante (caldo) por meio de ensaios enzimáticos e espectrofotometria.
- Aplicar, posteriormente, métodos de extração intracelulares mecânicos (bolas de vidro e ultrassom) para extração da enzima intracelular.
- Quantificar a concentração de açúcares redutores em g/L para determinar se há ação da invertase na hidrólise e após lise intracelular

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 2), um fungo unicelular, destaca-se como a levedura de maior relevância para aplicações comerciais e industriais. Sua importância é histórica e contínua em setores como a produção de pão e cerveja, onde suas capacidades fermentativas são amplamente exploradas (Fellows, 2017). Este micro-organismo, caracterizado por sua forma elíptica e reprodução por brotamento, demonstra notável adaptabilidade metabólica, prosperando tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias, o que facilita seu cultivo e manipulação em grande escala (Alves, 2020). Essa versatilidade e robustez a posicionam como um biorrecurso fundamental para diversas biotecnologias, abrangendo desde a produção de biomoléculas de alto valor agregado até a engenharia metabólica para a geração de combustíveis e produtos farmacêuticos (Madigan *et al.*, 2015).

Figura 2 – Células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* por microscopia de contraste de fase



Fonte: Madigan *et al.* (2015)

No contexto da produção enzimática, a levedura *S. cerevisiae* é reconhecida como a principal fonte de invertase para fins industriais e comerciais (Ávila *et al.*, 2022). Embora a enzima invertase (β -D-frutofuranosidase, EC 3.2.1.26), que catalisa a hidrólise da sacarose, esteja presente em diversas fontes naturais – incluindo plantas, bactérias e outros fungos (Alegre; Marquez; Ferreira, 2009) – a preferência pela *S. cerevisiae* advém de fatores como sua classificação "Geralmente Reconhecida como Segura" (GRAS) pela FDA (*Food and Drug*

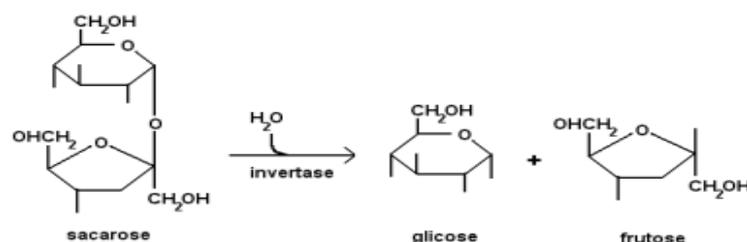
Administration) e sua eficiência comprovada na síntese de grandes volumes da enzima (Ávila *et al.*, 2022). A levedura produz predominantemente uma forma glicosilada de invertase, associada à parede celular no periplasma, que é a mais relevante para aplicações industriais (Ávila *et al.*, 2022).

A invertase proveniente de *S. cerevisiae* possui vasta aplicação, especialmente na indústria alimentícia, onde é utilizada para a fabricação do açúcar invertido, um xarope de glicose e frutose (Almeida, 2024). Este produto é valorizado por suas propriedades singulares, como maior poder adoçante, elevada solubilidade e menor ponto de congelamento, características que o tornam indispensável em confeitaria e na indústria de refrigerantes, evitando a cristalização e melhorando a textura dos produtos (Fellows, 2017). A preferência pela hidrólise enzimática, em detrimento da ácida, também se deve à ausência de subprodutos indesejáveis como sabores e impurezas coloridas (Kotwal; Shankar, 2009). A capacidade da *S. cerevisiae* de fornecer esta enzima de forma eficiente e segura reforça seu papel central na biotecnologia.

3.2 INVERTASE

A invertase, também designada como β -D-frutofuranosidase (EC 3.2.1.26), é uma enzima importante que catalisa a hidrólise da sacarose (Figura 3) (Marquez *et al.*, 2007). Esse processo enzimático cliva a ligação glicosídica da sacarose, resultando na formação de glicose e frutose. A designação "invertase" deriva da capacidade da enzima de inverter a rotação óptica do meio reacional quando observada em um polarímetro, um fenômeno atribuído à diferença na rotação da frutose em relação à sacarose (Koblitz, 2008). O produto resultante, conhecido como "açúcar invertido", é um xarope de glicose e frutose com características diferenciadas e vantajosas em comparação ao xarope de sacarose original (Almeida, 2024).

Figura 3 – Hidrólise enzimática da sacarose



Fonte: Pereira (2019)

A invertase pertence à família das glicosídeo hidrolases GH32 e é encontrada em uma ampla gama de organismos, incluindo vegetais, bactérias, e particularmente em leveduras do gênero *Saccharomyces*, além de fungos filamentosos como *Aspergillus spp.* (Alegre; Marquez; Ferreira, 2009; Koblitz, 2008). As leveduras *Saccharomyces spp.* podem produzir diferentes tipos de invertases, incluindo formas intracelulares, ligadas à parede celular e, ocasionalmente, extracelulares (Alegre; Marquez; Ferreira, 2009). A enzima ligada à parede celular, frequentemente glicosilada, é considerada importante para aplicações industriais e exibe sua atividade ótima em temperaturas que variam de 55°C para soluções diluídas de sacarose a 65-70°C para soluções mais concentradas (Koblitz, 2008). A termoestabilidade da invertase pode ser influenciada por sua estrutura terciária, que envolve interações específicas de carboidrato-proteína e ligações cruzadas na cadeia polipeptídica (Marquez *et al.*, 2007).

A invertase de *S. cerevisiae* é uma glicoproteína, o que significa que sua estrutura proteica está covalentemente ligada a cadeias de carboidratos (Silva *et al.*, 2022). Essa característica de glicosilação é particularmente proeminente na forma extracelular da enzima, que é a mais relevante para aplicações industriais e a principal forma secretada pela levedura. A forma extracelular de invertase é conhecida por sua alta massa molecular (Almeida, 2024). Para a maioria das aplicações biotecnológicas e industriais, a forma extracelular glicosilada é a de maior interesse devido à sua acessibilidade e robustez.

A glicosilação, ou seja, a adição de porções de açúcares à proteína, confere à invertase de levedura propriedades físico-químicas cruciais para sua estabilidade e funcionalidade em ambientes de processamento. Essas cadeias de carboidratos atuam como um escudo protetor, aumentando a estabilidade da enzima contra desnaturação térmica e protegendo-a da ação de proteases que poderiam degradar a estrutura proteica. Além da proteção, a glicosilação influencia positivamente a solubilidade da invertase em soluções aquosas, facilitando sua recuperação e manuseio em processos industriais. A extensão da glicosilação é um fator determinante para a massa molecular aparente da enzima e pode influenciar sutilmente sua atividade catalítica, mas é primariamente reconhecida por seu papel na estabilidade em condições industriais adversas (Schmidell, 2001).

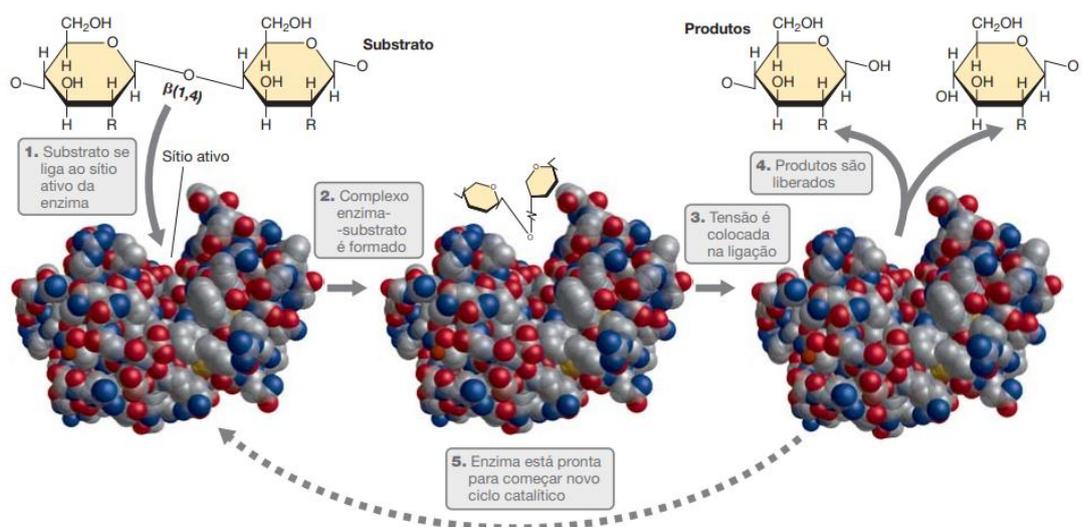
A estrutura quaternária da invertase extracelular ativa é predominantemente um dímero, composta pela associação de duas subunidades de invertase (Oliveira *et al.*, 2023). Essa

organização dimérica é fundamental para a atividade catalítica da enzima, pois a interação entre as subunidades contribui para a formação de um sítio ativo funcional e para a estabilidade da conformação tridimensional necessária à ligação e hidrólise da sacarose (Almeida, 2024). A preservação dessa estrutura espacial é essencial para que a enzima mantenha sua alta especificidade pelo substrato sacarose e sua capacidade de converter eficientemente o dissacarídeo em glicose e frutose (Madigan *et al.*, 2015).

3.3 O SÍTIO ATIVO DA INVERTASE: ESTRUTURA E RECONHECIMENTO DO SUBSTRATO

A funcionalidade das enzimas, como a invertase, reside em sua capacidade de interagir de forma altamente específica com moléculas particulares, denominadas substratos, catalisando reações bioquímicas. Essa interação é descrita por modelos como o "chave-fechadura" ou o "encaixe induzido" (Figura 4), nos quais o sítio ativo da enzima possui uma conformação tridimensional única que se liga ao substrato de maneira complementar, formando um complexo enzima-substrato transiente. Essa especificidade é o que garante que as enzimas catalisem apenas reações específicas, tornando-as biocatalisadores eficientes (Madigan *et al.*, 2015). No contexto da invertase, um substrato específico pode ser a sacarose, um dissacarídeo que a enzima hidrolisa em glicose e frutose (Silva *et al.*, 2022).

Figura 4 - Ilustração do mecanismo de encaixe enzima-substrato



Fonte: Madigan *et al.* (2015)

Contudo, para que a enzima invertase seja produzida em quantidades significativas por *S. cerevisiae*, é essencial que o micro-organismo seja cultivado em um meio que forneça todos os nutrientes necessários para seu crescimento e metabolismo. Os componentes do meio de cultivo desempenham papéis distintos: enquanto a sacarose é o substrato da enzima, ela e outros compostos servem como fontes de carbono, nitrogênio e micronutrientes para a levedura (Schmidell, 2001).

O melaço de cana-de-açúcar, por exemplo, é frequentemente utilizado como uma fonte de carbono complexa e econômica em escala industrial (Oliveira *et al.*, 2023). Embora seja rico em sacarose, que atua tanto como nutriente para a levedura quanto como indutor da síntese de invertase, o melaço também contém outros açúcares e componentes que podem influenciar o processo. A sacarose, em sua forma pura, é o substrato direto da invertase; mas, no meio de cultivo, sua concentração é um fator crítico para a indução da síntese da enzima por *S. cerevisiae*, devido ao fenômeno de repressão catabólica por glicose (Almeida, 2024).

Componentes como a peptona e o extrato de carne são fontes complexas de nitrogênio e vitaminas essenciais para o crescimento microbiano (Vieira *et al.*, 2017). A peptona é um hidrolisado proteico rico em aminoácidos e peptídeos, fornecendo blocos construtores para as proteínas celulares e enzimas. O extrato de carne, por sua vez, complementa com vitaminas do complexo B, nucleotídeos e sais minerais, que são cofatores importantes para diversas reações metabólicas da levedura, incluindo aquelas envolvidas na síntese de invertase (Shuler; Kargi, 2001). A combinação desses nutrientes no meio de cultivo é importante para sustentar um crescimento robusto de *S. cerevisiae* e, conseqüentemente, uma produção eficiente da enzima invertase. A compreensão da interação entre a enzima e seu substrato, juntamente com o papel dos nutrientes na produção da levedura, é fundamental para otimizar todo o bioprocessamento de obtenção da invertase.

3.4 CONDIÇÕES ÓTIMAS DE CULTIVO DE *Saccharomyces cerevisiae*

A otimização das condições de cultivo é fundamental para a produção eficiente de biomassa e bioprodutos por *S. cerevisiae*, especialmente a invertase. Como levedura de grande relevância industrial, a *S. cerevisiae* é comumente inoculada em meios ricos em fontes de carbono e energia. O melaço de cana-de-açúcar e a sacarose destacam-se como substratos

ideais, sendo o melaço um subproduto da indústria açucareira abundante em sacarose, glicose e frutose, além de minerais que favorecem o crescimento microbiano (Barbosa, 2009; Santos, 2010). A capacidade da *S. cerevisiae* de metabolizar eficientemente esses açúcares a torna uma escolha estratégica para a produção em larga escala, dada a disponibilidade e o custo-benefício desses substratos.

Para garantir o crescimento ideal de *S. cerevisiae* e a consequente produção de invertase, é imperativo o controle de parâmetros físicos como temperatura e pH. A levedura apresenta seu crescimento ótimo em uma faixa de temperatura que geralmente varia entre 20°C e 30°C (Alves, 2020), sendo 28-30°C frequentemente citados como ideais em estudos de cultivo (Barbosa, 2009). Quanto ao pH, a faixa ótima para o desenvolvimento da *S. cerevisiae* situa-se entre 4,5 e 5,5 (Alves, 2020; Barbosa, 2009). Manter esses parâmetros dentro das faixas ideais é importante, pois desvios podem comprometer a taxa de crescimento celular, a eficiência metabólica e, conseqüentemente, a produtividade da enzima de interesse.

Adicionalmente, a agitação constante desempenha um papel vital no cultivo de *S. cerevisiae*, especialmente em condições onde a aeração é importante. A agitação promove a homogeneização do meio de cultivo, garantindo a distribuição uniforme de nutrientes e prevenindo a sedimentação celular (Barbosa, 2009). Mais significativamente, em sistemas aeróbios, a agitação otimiza a transferência de oxigênio do gás para o líquido, um fator limitante crítico para o crescimento celular e a produção de biomassa em micro-organismos aeróbios facultativos como a *S. cerevisiae* (Alves, 2020). Embora a levedura possa fermentar em anaerobiose, condições aeróbias controladas sob agitação tendem a maximizar a biomassa celular e, por extensão, a quantidade de enzima intracelular ou periplásmica produzida.

3.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática é intrinsecamente ligada a condições ambientais específicas, sendo a temperatura um fator crítico para a funcionalidade ideal de enzimas como a invertase. Uma etapa importante na caracterização enzimática é período inicial de reação em uma temperatura ótima que favoreça a máxima atividade da enzima (Koblitz, 2008). Este aquecimento da amostra com sacarose não só garante que a enzima atinja sua conformação mais eficiente, mas também que a reação de hidrólise da sacarose ocorra de forma robusta e mensurável antes de qualquer inibição ou quantificação.

A utilização de um banho termostático a 50°C por um período de 10 minutos antes da realização do teste de DNS serve exatamente a esse propósito: promover a reação enzimática. Durante esse tempo, a invertase, em condições de temperatura próxima ao seu ótimo para soluções diluídas de sacarose (Koblitz, 2008), catalisa ativamente a quebra da sacarose (um dissacarídeo não redutor) em glicose e frutose (monossacarídeos redutores). Essa etapa de reação controlada garante a acumulação de açúcares redutores no meio reacional, que são os substratos detectáveis pelo método de DNS, permitindo uma medição precisa da taxa de conversão da sacarose.

3.6 MÉTODO COLORIMÉTRICO DO ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO - QUANTIFICAÇÃO DE AÇUCARES E ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A quantificação de açúcares redutores é uma etapa fundamental em diversas análises bioquímicas e biotecnológicas, especialmente na caracterização de enzimas hidrolíticas como a invertase. Para este propósito, o ensaio do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) destaca-se como um método colorimétrico amplamente empregado. Sua relevância reside na capacidade de determinar a concentração de açúcares que possuem grupos carbonila livres, os quais reagem com o DNS para formar um produto colorido, permitindo a medição da atividade enzimática indiretamente pela quantidade de açúcares liberados (Santos *et al.*, 2017).

O princípio do ensaio de DNS baseia-se em uma reação de oxirredução. Sob condições alcalinas e de aquecimento, o ácido 3,5-dinitrosalicílico (amarelo) é reduzido pelos grupos carbonila livres dos açúcares redutores, formando o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que possui uma coloração vermelho-alaranjada (Santos *et al.*, 2017). A intensidade dessa coloração é diretamente proporcional à concentração de açúcares redutores presentes na amostra e pode ser quantificada utilizando um espectrofotômetro, em comprimentos de onda próximos a 540 nm. Essa metodologia permite uma análise relativamente simples e rápida, tornando-a ideal para rotinas laboratoriais e o acompanhamento de reações enzimáticas.

Apesar de sua ampla utilização, o ensaio de DNS possui vantagens e limitações. Entre as vantagens, incluem-se a simplicidade, o baixo custo dos reagentes e a facilidade de automação, permitindo a análise de múltiplas amostras simultaneamente (Santos *et al.*, 2017). No entanto, é fundamental considerar suas limitações. Interferências podem ocorrer devido à

presença de outras substâncias no meio reacional, como aminoácidos, que também possuem capacidade redutora e podem superestimar a concentração de açúcares redutores (Santos *et al.*, 2017). Portanto, é importante a utilização de controles adequados e, em alguns casos, tratamentos prévios da amostra para garantir a especificidade e a precisão dos resultados.

No contexto da caracterização da invertase, o ensaio de DNS é uma ferramenta indispensável. A invertase catalisa a hidrólise da sacarose (um dissacarídeo não redutor) em glicose e frutose, ambos monossacarídeos com propriedades redutoras (Almeida, 2024; Koblitz, 2008). Assim, a atividade da enzima pode ser precisamente monitorada e quantificada pela medida da formação de açúcares redutores ao longo do tempo de reação, utilizando o DNS.

3.7 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DA INVERTASE INTRACELULAR

A extração de enzimas intracelulares, como a invertase de *S. cerevisiae*, é uma etapa importante no processo biotecnológico, exigindo o rompimento da parede e membrana celular para a liberação do produto de interesse (Alves, 2020). A eficiência da ruptura celular impacta diretamente o rendimento e a pureza da enzima, sendo, portanto, um ponto crítico nos processos pós fermentação (Almeida, 2024). Diversas estratégias são empregadas para essa finalidade, classificadas em métodos mecânicos, físicos, químicos e, em alguns contextos, biológicos, cada um com suas particularidades e aplicabilidades.

3.7.1 Parâmetros para a escolha do método de extração

Os métodos mecânicos envolvem a aplicação de forças físicas intensas para desintegrar a estrutura celular. Dentre eles, o moinho de bolas é uma técnica amplamente utilizada, onde esferas de alta densidade colidem com as células em suspensão, provocando a ruptura por cisalhamento e impacto (Alves, 2020; Neves, 2006). A eficácia desse método depende de parâmetros como o tamanho das bolas, a concentração celular, a velocidade de agitação e o tempo de processamento. Outras abordagens mecânicas incluem a homogeneização de alta pressão e a extrusão, que submetem as células a gradientes de pressão e cisalhamento severos (Almeida, 2024).

Em relação aos métodos físicos, o ultrassom (sonicação) se destaca por induzir a ruptura celular através da cavitação, fenômeno em que microbolhas são geradas e colapsam

violentamente próximo às células, liberando energia que desintegra as paredes e membranas (Alves, 2020).

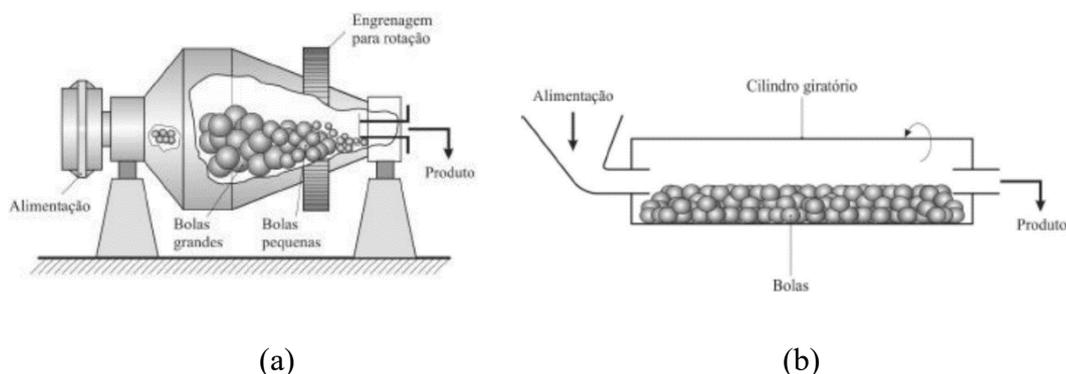
A escolha do método de extração da invertase de *S. cerevisiae* é multifatorial, dependendo da localização predominante da enzima (intracelular ou periplásmica), da sensibilidade da enzima a condições extremas (temperatura, pH, cisalhamento), da escala de produção e dos custos envolvidos (Santos, 2010). A otimização desses parâmetros é essencial para garantir uma liberação eficiente da invertase, com a máxima atividade e em um estado que facilite as etapas subsequentes de purificação e, conseqüentemente, sua aplicação em diversas indústrias, como a alimentícia (SENAI, 2009).

3.7.2 Moinho de bolas (homogeneizador de esferas)

O moinho de bolas, ou moinho de pérolas, representa um dos métodos mecânicos mais eficientes para o rompimento de células microbianas, sendo aplicado em diversas escalas de operação para a liberação de produtos intracelulares (Pereira *et al.*, 2019). O princípio fundamental envolve a agitação vigorosa de uma suspensão celular contendo pequenas esferas de alta densidade (com diâmetros que podem variar tipicamente de 0,25 a 1,0 mm, frequentemente de vidro, cerâmica ou zircônia) dentro de uma câmara fechada.

A lise celular ocorre devido às intensas forças de cisalhamento e impacto geradas pelas colisões contínuas entre as esferas, as paredes do moinho e as próprias células (Gomes *et al.*, 2021). Essa configuração estrutural, que pode ser tanto horizontal quanto vertical, emprega agitadores internos ou a rotação da própria câmara para promover o movimento das esferas (Pereira *et al.*, 2019). Discos ou hastes podem estar distribuídos ao longo do eixo de rotação da câmara (Figura 5), girando para intensificar o atrito e as forças de cisalhamento sobre as células intactas (Gomes *et al.*, 2021).

Figura 5 - Esquema Moinho de bolas (a) Cônico e (b) Cilíndrico.



Fonte: Tadini (2015)

Para micro-organismos como *S. cerevisiae*, o método de moinho de bolas pode alcançar eficiências de rompimento celular notáveis, frequentemente superiores a 90% em condições operacionais otimizadas, o que o torna altamente eficaz para a recuperação de enzimas intracelulares como a invertase (Pereira *et al.*, 2019). A eficiência do processo é diretamente influenciada pela intensidade da agitação, que pode gerar velocidades rotacionais para os agitadores na faixa de 1.000 a 3.000 rpm (Gomes *et al.*, 2021).

Parâmetros como a concentração de células na suspensão (comumente entre 10% e 40% m/v) e o volume de esferas dentro do reator (geralmente uma alta fração do volume total) são determinantes para a frequência e a intensidade das colisões, impactando diretamente a taxa de lise. Contudo, o atrito e os impactos geram calor significativo, o que exige um rigoroso controle de temperatura, frequentemente mantendo-a abaixo de 4°C por meio de sistemas de resfriamento, para prevenir a desnaturação da enzima invertase (Pereira *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2022).

O mecanismo de rompimento celular em moinhos de bolas envolve a transferência de energia cinética das esferas para as células através de múltiplos eventos. A taxa de lise é influenciada por uma combinação de fatores mecânicos, como a densidade e o tamanho das esferas, que afetam a energia do impacto. Por exemplo, esferas menores, geralmente entre 0,25 mm e 0,5 mm, são mais eficazes para micro-organismos de menor diâmetro, como leveduras, devido à maior área superficial de contato e maior frequência de colisões (Pereira *et al.*, 2019).

Além disso, a taxa de cisalhamento e a energia de entrada por volume são parâmetros críticos que se correlacionam diretamente com a eficiência de rompimento. Em sistemas

contínuos, a otimização da taxa de fluxo (que pode variar de 1 a 10 L/h em equipamentos de laboratório e semi-industriais) e do tempo de residência das células na câmara é importante para garantir a lise completa sem excesso de estresse enzimático. O objetivo é atingir um equilíbrio entre a liberação máxima da enzima e a minimização da sua inativação e da liberação de contaminantes celulares indesejáveis (Gomes *et al.*, 2021).

A aplicação industrial do moinho de bolas para a extração de enzimas é favorecida pela sua alta eficiência de rompimento e versatilidade para diferentes tipos de micro-organismos e escalas de produção (Pereira *et al.*, 2019). No entanto, o custo de investimento e manutenção do equipamento, o desgaste das esferas e das partes internas devido à abrasão constante, e a necessidade de um eficiente sistema de resfriamento para gerenciar o calor gerado são considerações importantes no planejamento e na operação (Gomes *et al.*, 2021). A escolha deste método para a extração da invertase de *S. cerevisiae* reflete a busca por uma solução robusta e escalável para a liberação da enzima, exigindo a otimização de seus parâmetros operacionais para garantir a recuperação da invertase com a máxima atividade e a pureza desejada para etapas subsequentes de purificação (Oliveira *et al.*, 2023).

3.7.3 Ultrassom

A lise celular por ultrassom é uma técnica física que emprega ondas mecânicas de alta frequência para promover a desintegração celular. O principal mecanismo de rompimento é a cavitação acústica, que envolve a formação e o rápido colapso de microbolhas na suspensão líquida (Shuler; Kargi, 2001). O colapso dessas bolhas gera ondas de choque e forças de cisalhamento localizadas, com pressões que podem atingir milhares de atmosferas, capazes de romper as paredes e membranas celulares, liberando o conteúdo intracelular, incluindo a invertase (Pereira *et al.*, 2019).

A eficiência da extração por ultrassom é influenciada por parâmetros como a frequência das ondas (geralmente entre 20 e 50 kHz), a intensidade da potência aplicada (comumente entre 50 e 500 W), o tempo de tratamento (tipicamente de 5 a 30 minutos) e a concentração celular (Schmidell, 2001). Embora o ultrassom seja um método relativamente simples de aplicar em escala laboratorial e eficaz para pequenas quantidades de biomassa, sua aplicabilidade em larga escala pode ser limitada pela dificuldade em aplicar energia de forma uniforme em grandes

volumes. Além disso, o calor gerado pela cavitação pode ser significativo, exigindo um controle rigoroso da temperatura da amostra para preservar a atividade da enzima (Pereira *et al.*, 2019).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo será descrita a metodologia de cultivo da *Saccharomyces cerevisiae*, a preparação dos caldos fermentados, a aplicação das técnicas de extração enzimática e a quantificação dos açúcares redutores. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia Industrial e Biotecnologia Ambiental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.1 ANÁLISE DA PRESENÇA DE ENZIMA EXTRACELULAR

4.1.1 Preparação dos Meios e Inóculo e Fermentação

Inicialmente, foram preparados 500 mL de caldo nutritivo com as seguintes concentrações: 1,5 g de extrato de carne (3 g/L) e 2,5 g de peptona (5 g/L). Após o caldo pronto, ele foi dividido em duas partes de 250 mL. Em uma das partes, foram adicionados 5 g de sacarose e, na outra, 5 g de melação, a fim de obter concentrações de 20 g/L desses nutrientes. Cada parte foi fracionada em cinco Erlenmeyers de 125 mL (Figura 6), contendo 50 mL de mistura cada – totalizando 5 Erlenmeyers com sacarose e 5 Erlenmeyers com melação (20 g/L), somando 10 meios para o crescimento de *S. cerevisiae*.

Figura 6 – Meios de cultivo de *S. cerevisiae* com substratos de sacarose (líquidos mais claros) e melação (misturas mais escuras)



Fonte: O autor (2025)

A levedura *S. cerevisiae* foi inoculada a uma concentração de 10 g/L, a partir de fermento biológico seco (0,5 g em cada Erlenmeyer de 50 mL). Os meios foram mantidos sob agitação por um período 24 horas em uma incubadora modelo Marconi MA-420, em temperatura ambiente.

4.1.2 Separação das Amostras e Centrifugação

Após o tempo de cultivo, os caldos fermentados foram separados em 4 tubos Falcon de 25 mL cada: em duplicata, 2 tubos contendo o meio com sacarose e 2 tubos contendo o meio com melão. Em seguida, os meios fermentados foram centrifugados em uma Centrífuga MPW 350R de rotação horizontal (Figura 7) por cinco minutos, e as células foram lavadas duas vezes com água destilada.

As células de *S. cerevisiae* permaneceram retidas no fundo dos tubos. A seguir, foram realizados os testes de reação enzimática, destinados a promover a ação da invertase, que consistiram em misturar 4 mL de solução de sacarose com 1 mL do caldo e conduzir a reação a 50°C em banho termostático por 10 minutos, sendo interrompida imediatamente após esse período com a imersão em banho de gelo.

Figura 7 – Centrífuga MPW 350R de rotação horizontal

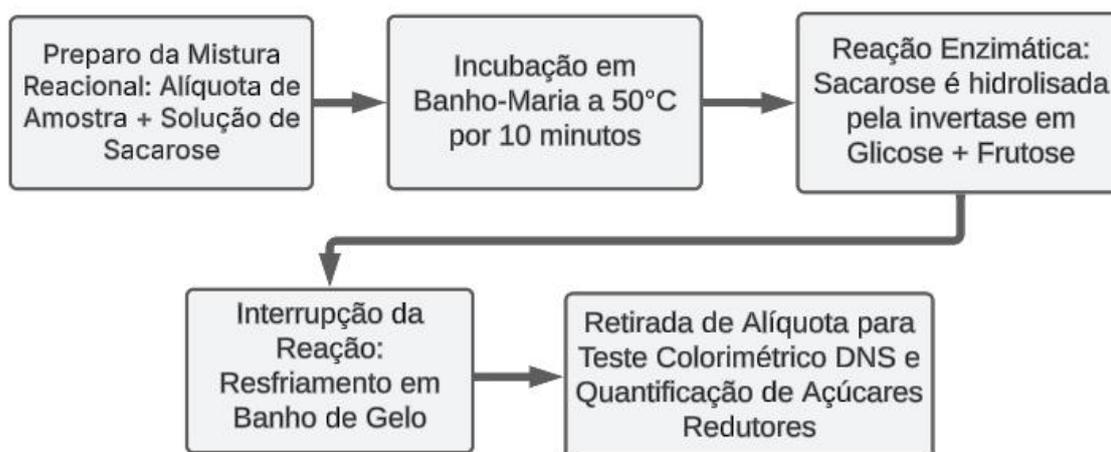


Fonte: O Autor (2025)

4.1.3 Reação Enzimática

As amostras após centrifugadas foram colocadas em banho termostático a 50°C por 10 minutos antes da etapa de teste de DNS para promoção da reação de hidrólise (Figura 8). Durante esta reação controlada, a invertase, em uma temperatura próxima ao seu ponto ótimo catalisa ativamente a conversão da sacarose (um dissacarídeo não redutor) em glicose e frutose (monossacarídeos redutores). Esta fase garante a formação e acumulação de açúcares redutores no meio, os quais são passíveis de detecção pelo método de DNS.

Figura 8 - Fluxograma do procedimento experimental para provocar reação enzimática com alíquota de amostra do caldo (extracelular) e após lise celular



Fonte: O Autor (2025)

Concluído o período de incubação, a reação enzimática foi prontamente cessada por imersão em banho de gelo. Este resfriamento rápido é fundamental para interromper a atividade enzimática, permitindo a quantificação precisa dos açúcares redutores formados mediante a aplicação subsequente do teste de DNS.

4.1.4 Testes de DNS - Análises de açúcares redutores

Os testes de DNS, para verificação da presença de açúcares redutores (glicose + frutose) – que indicaram a provável presença de invertase –, foram realizados com 0,5 mL da

amostra e 1 mL de reagente DNS em tubos de Folin-Wu. A amostra em branco consistiu de 0,5 mL de água destilada e 1,0 mL de DNS. A mistura foi aquecida a 100°C durante 5 minutos, seguida de um banho de gelo para cessar a reação. Posteriormente, foi aferido o volume de cada resultado para 12,5 mL com água destilada, e a leitura foi realizada em um espectrofotômetro UV a 540 nm, comparando a coloração desenvolvida nas amostras com a da amostra em branco. O objetivo dessa primeira parte do trabalho foi analisar se havia presença de enzima nos caldos.

4.2 PREPARO DOS TESTES DE EXTRAÇÃO INTRACELULAR

Para as análises finais em que se utilizou os métodos de extração por lise celular, o processo de inoculação da levedura foi repetido, desta vez utilizando dois Erlenmeyers de 250 mL cada para o meio de sacarose e outros dois Erlenmeyers de 250 mL cada para o meio de melação (Figura 9). Após um período de cultivo de 24 horas, decidiu-se por unir os caldos de cada substrato em um Erlenmeyer único correspondente, ou seja, os dois caldos de sacarose foram unidos em um só Erlenmeyer, e os dois caldos de melação em outro.

Figura 9 – Preparação dos meios de cultivo de *S. cerevisiae* em 04 Erlenmeyer de 250mL contendo sacarose e melação respectivamente



Fonte: O Autor (2025)

Em seguida, cada caldo de sacarose foi dividido em 4 tubos Falcon de 45 mL. Esses tubos foram centrifugados duas vezes por 5 minutos para separar as células da levedura do meio de

cultivo líquido. Após cada centrifugação, os sobrenadantes foram removidos para garantir que as etapas de extração se concentrassem apenas no conteúdo celular. As células, que permaneceram retidas no fundo dos 8 tubos Falcon (4 de sacarose e 4 de melaço), foram lavadas duas vezes com água destilada. Este procedimento de lavagem é importante para remover resíduos do meio de cultivo e quaisquer proteínas extracelulares remanescentes, que poderiam contaminar as análises posteriores.

As células lavadas foram então centrifugadas novamente por 5 minutos para concentrá-las no fundo dos tubos. Para a padronização final das amostras e preparação para as técnicas de extração, as suspensões celulares foram transferidas e aferidas em dois balões volumétricos: um balão de 200 mL contendo as células de sacarose ressuspensas em água destilada, e um balão de 250 mL contendo as células de melaço também ressuspensas em água destilada.

O uso de balões volumétrico para ressuspensão foi para garantir o conhecimento dos volumes de amostra para captação das células. Esta etapa finalizou a preparação da biomassa para as análises subsequentes e a aplicação das técnicas de extração, conforme vemos na Figura 10.

Figura 10 – Suspensão das células de melaço e sacarose nos balões volumétricos de 250 e 200 mL respectivamente



Fonte: O Autor (2025)

4.3 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO

4.3.1 Moinho de bolas de vidro

Para o método de moinho de bolas, dois tubos de ensaio foram preparados: um contendo as células de *S. cerevisiae* provenientes do cultivo em sacarose e outro com as células do cultivo em melaço. Cada tubo foi preenchido com bolas de vidro de 3 mm de diâmetro até a marca de 2,5 cm. Em seguida, as amostras de suspensão celular centrifugadas (obtidas após a preparação da biomassa) foram adicionadas aos tubos, preenchendo-os até a marca de 5 cm.

Os tubos contendo a mistura de células e bolas de vidro foram então posicionados em um agitador tipo vórtex, modelo B. Braun Biotech International Certomat MV, operando a uma frequência de rotação de 50 Hz (Figura 11). A agitação vigorosa visou promover o rompimento celular pela ação das bolas de vidro.

Figura 11- Agitador tipo vórtex, modelo B. Braun Biotech International Certomat MV 50 Hz



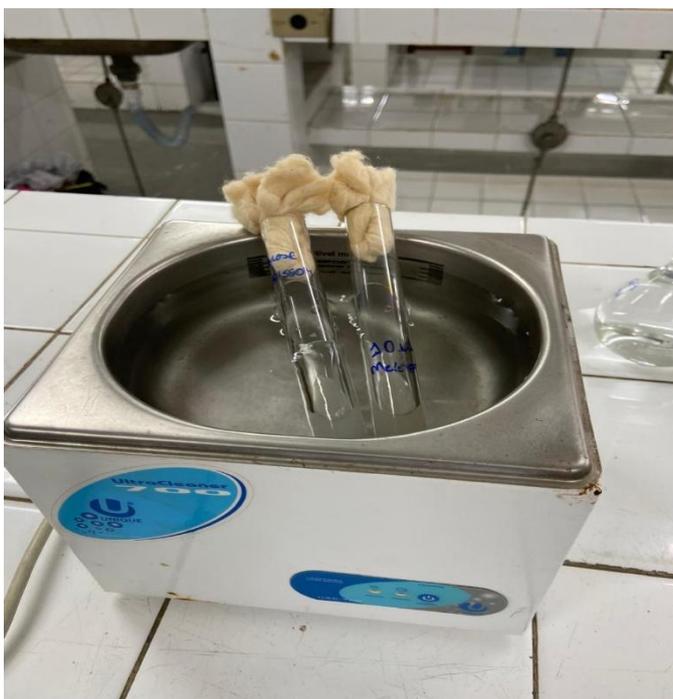
Fonte: O Autor (2025)

Foram feitos testes isolados das amostras de células só com extração de moinho de bolas e, posteriormente, testes em conjunto com ultrassom, nesta ordem: moinho de bolas e ultrassom.

4.3.2 Ultrassom

O procedimento para a extração por ultrassom foi realizado de maneira simplificada. Duas alíquotas de suspensão celular, uma contendo células do cultivo em melação e outra com células do cultivo em sacarose, foram transferidas para tubos de ensaio separados. Esses dois tubos foram então colocados no equipamento de ultrassom, modelo Unique Ultracleaner 700, que opera a uma frequência de 55 kHz (Figura 12). As células foram expostas às ondas ultrassônicas por um período contínuo de 15 minutos.

Figura 12 – Método de lise celular por Ultrassom, equipamento modelo Unique Ultracleaner 700 de 55 kHz



Fonte: O Autor (2025)

Após o tratamento com ultrassom, o resultado da suspensão celular foi centrifugado para a posterior separação do extrato bruto e análise DNS. Foram feitos testes isolados de amostra só de extração com ultrassom e, posteriormente, testes em conjunto com moinho de bolas, nesta ordem: ultrassom e moinho de bolas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação da concentração de açúcares redutores foi realizado utilizando o método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) com curva analítica conhecida, Equação (1) abaixo:

$$y = 0,2932 * x - 0,0201 \quad (1)$$

A Equação (1) foi obtida a partir da linearização da curva padrão dos açúcares redutores do reagente DNS utilizado nos experimentos, onde a absorbância ("y") é diretamente proporcional à concentração ("x"), conforme a Lei de Beer-Lambert. Assim tem-se a concentração de glicose (x) em g/L em função da absorbância (y):

$$x = \frac{y+0,0201}{0,2932} \quad (2)$$

A seguir, apresentam-se os resultados obtidos com base nesses cálculos, organizados em conjuntos de análises extracelulares e técnicas de extração intracelular, com foco na concentração de açúcares redutores para a avaliação da hidrólise enzimática e da liberação da enzima.

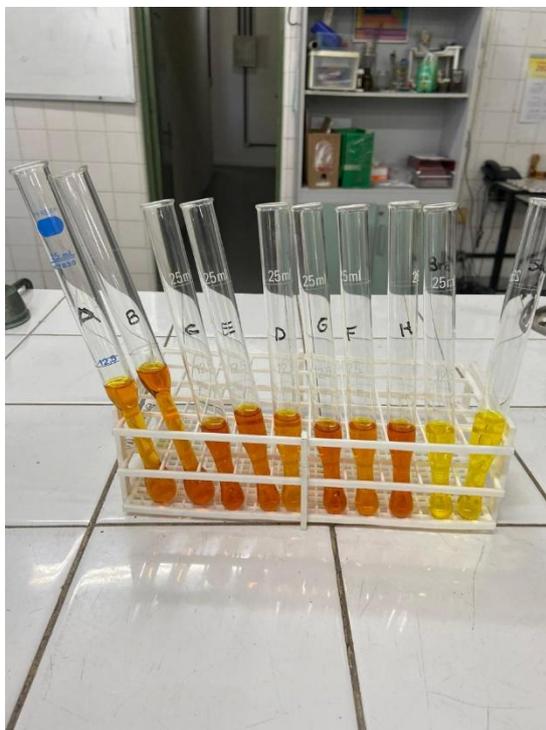
5.1 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ENZIMA EXTRACELULAR

Os testes preliminares foram feitos para determinar se havia ou não a presença de invertase nos caldos, que caracterizaria a invertase extracelular. As amostras das análises do caldo foram identificadas de forma padronizada. Os rótulos A e B correspondem às duplicatas das amostras de levedura cultivadas em sacarose, enquanto os rótulos E e F referem-se às duplicatas das amostras cultivadas em melão. Essa identificação será utilizada para referenciar e comparar os resultados entre os diferentes substratos e condições de teste ao longo desta seção.

No primeiro dia de análise, foram feitas duplicatas do caldo de sacarose (A e B) e melão (E e F) que, após a reação enzimática, apresentaram-se visivelmente alaranjadas em relação ao branco e à sacarose pura, o que significa que estavam ideais para análise no espectrofotômetro

(Figura 13). Todas as amostras nesse primeiro momento passaram pelo processo de banho termostático para provocar a hidrólise enzimática.

Figura 13 - Amostras iniciais de sacarose e melão após reação de DNS



Fonte: O autor (2025)

A Tabela 1 detalha os resultados de absorvância e as atividades enzimáticas calculadas para essas amostras.

Tabela 1 – Concentração de açúcares redutores das amostras iniciais de sacarose e melão.

| Amostra | Absorbância | Concentração de açúcares (g/L) |
|------------|-------------|--------------------------------|
| Sacarose A | 0,32 | 1,16 |
| Sacarose B | 0,51 | 1,82 |
| Melão E | 0,53 | 1,87 |
| Melão F | 0,33 | 1,18 |

Fonte: O Autor (2025)

Observa-se que tanto o melão quanto a sacarose permitiram a detecção de açúcares redutores, com concentrações variando de 1,16 g/L a 1,87 g/L. Essas concentrações, que

levaram a amostras visivelmente escuras, indicam uma quantidade considerável de substâncias redutoras presentes. Para as amostras de sacarose, essa poderia ser uma indicação inicial de hidrólise pela enzima. No entanto, para as amostras de melaço, a alta concentração calculada pode ter sido influenciada por outras substâncias redutoras além dos açúcares, como aminoácidos e outras impurezas complexas presentes nesse substrato, que podem reagir com o DNS. Isso sugere que, embora o melaço seja uma fonte rica em açúcares, a quantificação pode ser comprometida por sua composição complexa.

Testes subsequentes com amostras não hidrolisadas (A2, B2, E2, F2), diluídas em 1:50, foram realizados para verificar a presença de açúcares no próprio caldo, sem a indução da reação enzimática. Os resultados desse teste estão presentes na imagem a seguir (Figura 14).

Figura 14 – Amostras diluídas em 1:50 de caldo não hidrolisadas após reação de DNS



Fonte: O Autor (2025)

A Tabela 2 apresenta os cálculos de atividade enzimática para esses resultados.

Tabela 2 – Concentração de açúcares das amostras não hidrolisadas.

| Amostra | Absorbância | Concentração de açúcares (g/L) |
|----------------|--------------------|---------------------------------------|
| Sacarose A2 | 0,68 | 2,39 |
| Sacarose B2 | 0,63 | 2,22 |
| Melaço E2 | 0,63 | 2,22 |
| Melaço F2 | 0,37 | 1,33 |

Fonte: O Autor

Os resultados para as amostras diluídas em 1:50 (A2, B2, E2, F2) apresentaram concentrações de açúcares redutores variando de 1,33 g/L a 2,39 g/L. Embora esses valores sejam as concentrações das amostras diluídas, eles confirmam que os açúcares já existiam no meio de cultivo mesmo antes da reação enzimática induzida. Isso significa que a concentração de açúcares redutores no caldo original (não diluído) era significativamente alta (multiplicando-se esses valores pelo fator de diluição de 50, as concentrações originais seriam, por exemplo, de 200 g/L para Sacarose A2), proveniente dos substratos utilizados.

Para confirmar a presença de açúcares fermentáveis já no caldo antes da reação enzimática, os testes foram refeitos, mas novamente se mostraram muito escuros. As amostras foram então diluídas em 1:10 (A4, B4, E4, F4), e os resultados estão na imagem a seguir (Figura 15) e os cálculos respectivos resumidos na tabela 3.

Figura 15 - Amostras diluídas em 1:10 de caldo não hidrolisadas após reação de DNS



Fonte: O Autor (2025)

Tabela 3 – Atividade enzimática das amostras não hidrolisadas diluídas em 1:10.

| Amostra | Absorbância | Concentração de açúcares (g/L) |
|-------------|-------------|--------------------------------|
| Sacarose A4 | 0,22 | 0,82 |
| Sacarose B4 | 0,23 | 0,85 |
| Melaço E4 | 0,08 | 0,34 |
| Melaço F4 | 0,09 | 0,38 |

Fonte: O Autor (2025)

Mesmo após diluição em 1:10, os testes confirmaram a presença de açúcares fermentáveis no caldo, com concentrações entre 0,34 g/L e 0,85 g/L, sem a necessidade de hidrólise enzimática. Isso reforça a conclusão de que os caldos já continham açúcares redutores em sua composição inicial.

A fim de confirmar os testes anteriores da presença de açúcares extracelular antes da reação enzimática, foram realizados testes comparativos com as amostras de sacarose e melaço com e sem hidrólise. As amostras de sacarose com hidrólise (A6 e B6) apresentaram atividades visivelmente mais elevadas do que as amostras sem hidrólise (A5 e B5), o que é um indicativo da ação da invertase. A imagem a seguir (Figura 16) e Tabela 4 apresenta os resultados para as amostras de sacarose.

Figura 16 – Resultados em duplicata de sacarose com e sem hidrólise A5 e B5, A6 e B6



Fonte: O Autor (2025)

Tabela 4 – Concentrações das amostras de sacarose com e sem hidrólise.

| Amostra | Absorbância | Concentração de açúcares (g/L) |
|-----------------------------|-------------|--------------------------------|
| Sacarose A5 (sem hidrólise) | 0,28 | 1,02 |
| Sacarose B5 (sem hidrólise) | 0,15 | 0,59 |
| Sacarose A6 (com hidrólise) | 0,33 | 1,19 |
| Sacarose B6 (com hidrólise) | 0,2 | 0,75 |

Fonte: O Autor (2025)

Já as amostras de melaço (Figura 17), tanto com quanto sem hidrólise (E5, F5, E6, F6), permaneceram muito claras, próximas ao branco (absorbâncias entre 0,025 e 0,096).

Figura 17 – Amostras de melaço com e sem hidrólise (E5, F5, E6, F6)



Fonte: O Autor (2025)

5.2 ANÁLISES DE EXTRAÇÃO - SUBSTRATO SACAROSE

Devido aos desafios do tipo de substrato e também de erros experimentais observados com as amostras de melaço (amostras turvas levadas à análise), as análises finais para extração intracelular concentraram-se apenas nas amostras com substrato sacarose.

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos com o caldo de sacarose após reação enzimática (Scaldo) e a comparação com amostras de sacarose pura (Sac. Pura) e caldo sem reação enzimática (SRcaldo).

Tabela 5 – Concentração de glicose e atividade enzimática do extrato.

| Amostra | Absorbância | Concentração de açúcares (g/L) |
|----------------|--------------------|---------------------------------------|
| Scaldo 1 | 0,12 | 0,47 |
| Scaldo 2 | 0,1 | 0,42 |
| SRcaldo | ≈0 | 0,08 |
| Sac. Pura 1 | 0,01 | 0,11 |
| Sac. Pura 2 | 0,01 | 0,11 |

Fonte: O Autor (2025)

O caldo sem reação enzimática (SRcaldo) e as amostras de sacarose pura (Sac. Pura 1 e Sac. Pura 2) apresentaram concentrações de açúcares redutores muito baixas (0,08 g/L para SRcaldo e média de 0,11 g/L para Sacarose Pura). Os resultados indicam que a concentração de açúcares redutores foi mais expressiva nas amostras de caldo de cultura com reação enzimática (Scaldo 1 e 2), com uma média de 0,44 g/L. Isso confirma a presença e ação da invertase extracelular, presente no caldo, prévio à lise celular.

5.3 AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO FÍSICA DA INVERTASE

Para maior clareza, as siglas utilizadas para identificar as amostras nos métodos de extração física referem-se a Sacarose Físico Bolas de Vidro (SFBV), que identifica a amostra de levedura submetida ao método de moinho de bolas, e Sacarose Físico Ultrassom (SFU), que corresponde à amostra do mesmo cultivo submetida ao método de ultrassom. A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos com base nessas metodologias.

Tabela 6 – Avaliação da atividade enzimática após extração física.

| Método | Absorbância | Concentração de açúcares (g/L) |
|---------------|--------------------|---------------------------------------|
| SFBV | 0,012 | 0,1 |
| SFU | 0,006 | 0,09 |
| SFBV + SFU | 0,014 | 0,12 |
| SFU + SFBV | 0,014 | 0,12 |

Fonte: O autor (2025)

Os métodos de extração física testados (SFBV, SFU e suas combinações) resultaram em absorbâncias muito baixas (entre 0,005 e 0,015) e concentrações de açúcares redutores variando de 0,09 g/L a 0,12 g/L. Ou seja, nas condições experimentais empregadas, a liberação da enzima invertase intracelular ou periplásmica não foi eficaz.

A literatura, no entanto, aponta para a eficácia desses métodos em diferentes contextos. O moinho de bolas é um método eficiente para o rompimento de leveduras, alcançando altas taxas de ruptura. Estudos de Almeida (2024) e Alves (2020) relataram concentrações de açúcares redutores significativamente maiores após a extração com moinho de bolas, tipicamente variando de 1,01 g/L a 1,45 g/L. A discrepância entre os resultados obtidos (0,10 g/L para SFBV) e os da literatura, que são cerca de 10 a 15 vezes maiores, pode ser atribuída a vários fatores: (i) O uso de um agitador tipo vórtex para simular o moinho de bolas no presente estudo pode não ter gerado as forças de cisalhamento e impacto necessárias, em comparação com moinhos de pérolas usados em outros estudos; (ii) O diâmetro das pérolas de vidro (3 mm) empregado pode não ter sido o ideal para *S. cerevisiae*, pois pérolas menores (0,5 a 1,0 mm) são geralmente mais eficazes, proporcionando maior área de contato e frequência de colisões com as células.

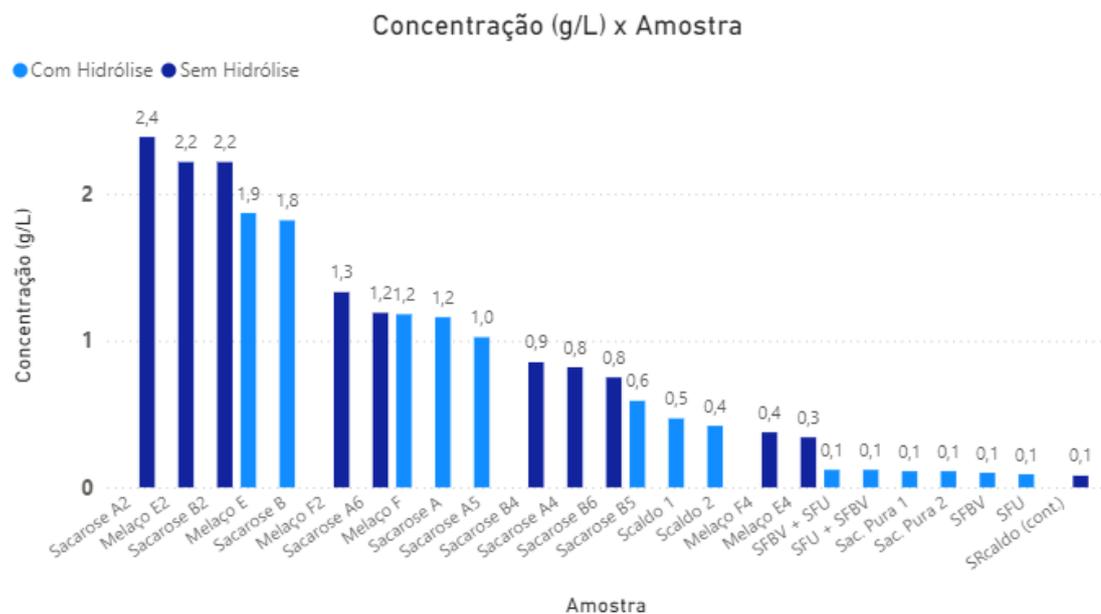
Para o ultrassom, os resultados também foram negativos, com uma concentração de açúcares redutores de 0,09 g/L para SFU. Almeida (2024) relatou uma concentração de açúcares redutores de aproximadamente 1,22 g/L para o ultrassom, embora em seu estudo a concentração diminuísse com o tempo. Medeiros *et al.* (2008) relataram que a sonificação por si só não libera

a enzima; a presença de bolas de vidro foi essencial, combinando cavitação e abrasão. Neves (2006) concluiu que o ultrassom, mesmo otimizado, não é ideal para o rompimento de leveduras, atingindo apenas 47% de ruptura, abaixo do mínimo desejado de 60-80%. O banho ultrassônico utilizado (Unique Ultracleaner 700 de 55 kHz), sem contato direto com a sonda, pode ter limitado a eficácia da cavitação. Almeida (2024) observou que a atividade enzimática pelo ultrassom diminuiu com o tempo, e que para superar o moinho de bolas, seriam necessários 40 minutos de exposição, o que seria inviável economicamente.

5.4 ANÁLISE GRÁFICA DOS RESULTADOS

A análise gráfica dos resultados complementa as observações tabulares, oferecendo uma visão consolidada do comportamento das concentrações de açúcares redutores sob diferentes condições experimentais. Os gráficos a seguir ilustram as variações de concentração (g/L) em diversas amostras, a influência da reação enzimática e do tipo de substrato. A Figura 18 ("Concentração (g/L) x Amostra") apresenta a concentração de açúcares redutores para todas as amostras analisadas, discriminando entre "Com Hidrólise" e "Sem Hidrólise".

Figura 18 - concentração de açúcares redutores para todas as amostras analisadas



Fonte: O Autor (2025)

O gráfico mostra que amostras como Sacarose A2 e Melaço E2/B2, correspondentes aos caldos não hidrolisados diluídos em 1:50, exibem as maiores concentrações de açúcares redutores. Esta elevada concentração reforça a evidência da presença de açúcares redutores nos caldos originais, independentemente da hidrólise enzimática, o que foi observado desde os primeiros dias de análise.

Para as amostras de sacarose com hidrólise (A6 e B6), nota-se uma leve elevação na concentração de açúcares redutores em comparação com suas contrapartes sem hidrólise (A5 e B5). Embora as diferenças não sejam drásticas no gráfico, a existência dessa elevação é uma evidência da hidrólise enzimática pela invertase presente, que converte sacarose em glicose e frutose.

Em contraste, as amostras relacionadas à extração intracelular (SFU + SFBV, SFBV + SFU, SFBV, SFU) apresentam consistentemente as menores concentrações de açúcares redutores (entre 0,09 g/L e 0,12 g/L). Esta baixa concentração é uma indicação de liberação enzimática ineficaz por meio dos métodos físicos empregados. A eficiência de liberação de produtos intracelulares nessas condições se mostra muito abaixo do esperado pela literatura, onde moinhos de bolas e ultrassom são capazes de romper leveduras e liberar enzimas com concentrações de açúcares redutores significativamente maiores (tipicamente entre 1,01 g/L e 1,45 g/L para moinho de bolas, e cerca de 1,22 g/L para ultrassom).

Por exemplo, Almeida (2024) relatou que o moinho de bolas foi o método mais viável para extração, com uma concentração de açúcares redutores de aproximadamente 1,43 g/L. O mesmo autor também obteve uma concentração de cerca de 1,22 g/L para a extração por ultrassom. De forma similar, o trabalho de Alves (2020) mostrou que a extração por moinho de bolas resultou em concentrações entre 1,01 g/L e 1,45 g/L, confirmando a alta eficiência do método. Neves (2006), em seus estudos sobre rompimento celular, reportou que o moinho de pérolas pode alcançar taxas de ruptura de até 88% se as condições forem otimizadas. A grande discrepância entre as concentrações observadas (0,09 g/L a 0,10 g/L) e as da literatura (cerca de 10 a 15 vezes maiores) sugere que as condições experimentais não foram adequadas para promover a lise celular de forma eficaz.

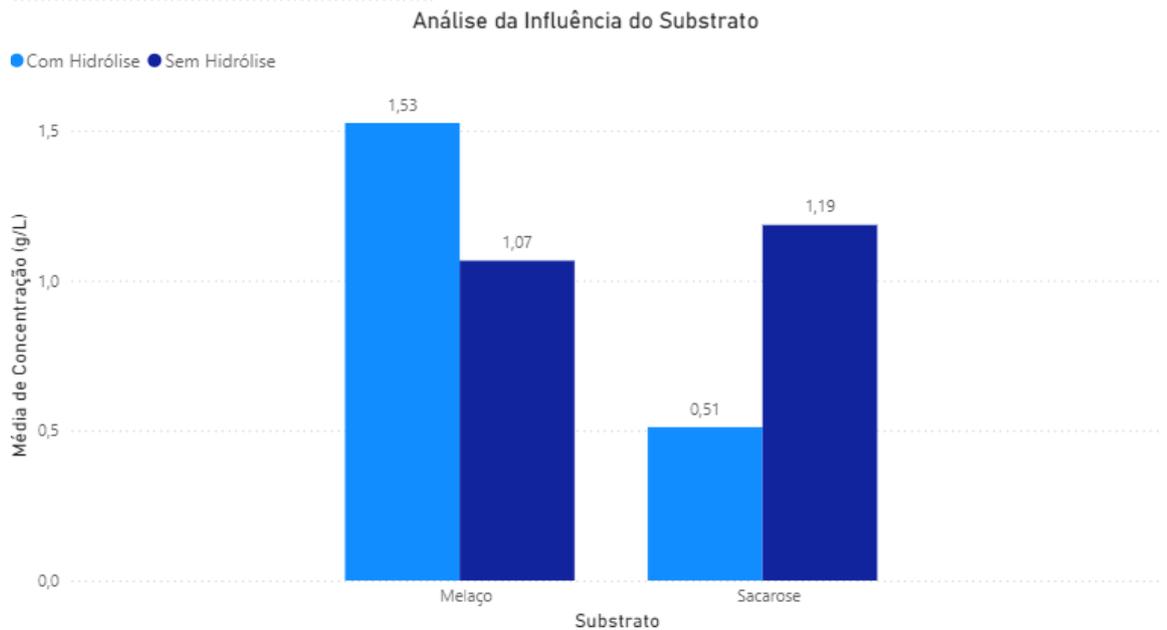
Nesta pesquisa, a simulação do moinho de bolas foi realizada com um agitador vórtex e pérolas de vidro de 3 mm. A literatura especializada ressalta a importância crítica do diâmetro

das pérolas de vidro para a eficiência do rompimento celular em leveduras. Estudos indicam que pérolas menores, geralmente entre 0,5 mm e 1,0 mm, são mais adequadas para este fim. Medeiros *et al.* (2008) aprofundam essa recomendação, especificando que pérolas com diâmetros entre 0,50 mm e 0,75 mm "favorecem a ruptura de leveduras", visto que o tamanho ideal da pérola está diretamente relacionado ao diâmetro do micro-organismo. Essa sugestão corrobora o princípio geral de que "quanto menor o diâmetro da esfera, mais eficiente é o rompimento", conforme observado por Alves (2020), pois pérolas menores aumentam a área superficial de contato e a frequência de colisões com as células, maximizando as forças de impacto e cisalhamento para a lise celular.

Os resultados do ultrassom foram obtidos aplicados em um banho ultrassônico por um período contínuo de 15 minutos. Em contrapartida, estudos como o de Medeiros *et al.* (2008) indicaram que tempos de extração mais longos, de 30 a 40 minutos, foram necessários para obter a máxima liberação de enzimas. A pesquisa de Almeida (2024) também revelou que, para o ultrassom, seriam necessários tempos de até 40 minutos para superar o moinho de bolas.

Além disso, a escolha da frequência é um fator crítico, já que outros estudos utilizam frequências na faixa de 2 MHz, como o de Resa *et al.* (2009), o estudo utilizou uma frequência de 55kHz o que pode ser insuficiente para lise celular.

Já no gráfico da Figura 19 tem-se que o melaço, em geral, apresentou concentrações médias de açúcares redutores maiores após a hidrólise (1,53 g/L vs. 1,07 g/L), o que pode ser um bom indicativo de que houve ação da enzima nesses casos. Já nos testes de sacarose esses resultados foram inesperados: os resultados sem hidrólise prevaleceram com valores mais altos, o que indicou pelo menos a presença de açúcares redutores nos caldos, mas não garantiram a evidência da invertase atuando. Os valores baixos extrações com lise celular conduziram a média dos resultados com hidrólise para 0,53 (entre 0,09 g/L e 0,12 g/L).

Figura 19 - Análise da influência da reação enzimática para diferentes substratos

Fonte: O Autor (2025)

Além das limitações de equipamento e tempo, erros operacionais na execução do experimento podem ter contribuído para os resultados. A rigorosa adesão a protocolos de tempo e temperatura é essencial, pois o calor gerado durante a agitação pode desnaturar a enzima, reduzindo a concentração de invertase ativa detectável. O controle inconsistente da temperatura, mesmo com banho de gelo, pode comprometer o resultado.

A precisão na preparação e manuseio das amostras também é crítica, já que erros na pipetagem ou na diluição podem distorcer as concentrações finais. Em suma, a discrepância nos resultados da sacarose sugere que a metodologia utilizada, embora baseada em princípios corretos, careceu de refinamentos operacionais e de equipamentos adequados para garantir a eficácia e a reprodutibilidade necessárias para a extração.

6 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram claramente a capacidade da *Saccharomyces cerevisiae* de produzir invertase ativa extracelularmente, evidenciada pela formação de açúcares redutores no sobrenadante do cultivo, com uma concentração média de 0,44 g/L para as amostras de caldo de sacarose com hidrólise. A hidrólise da sacarose foi consistentemente confirmada como resultado da ação catalítica da invertase, observada pelo aumento das concentrações de açúcares redutores após a reação enzimática, em contraste com concentrações menores nos testes sem hidrólise. As análises colorimétricas de DNS mostraram-se consistentes na detecção dos açúcares redutores formados.

No entanto, as tentativas de extração da enzima invertase intracelular por métodos físicos, utilizando o moinho de bolas simulado por vórtex e o ultrassom em banho, não obtiveram sucesso sob as condições testadas. Isso resultou em concentrações muito baixas de açúcares redutores (entre 0,09 g/L e 0,12 g/L), o que diverge significativamente dos resultados da literatura, que apontam para concentrações tipicamente 10 a 15 vezes maiores (entre 1,01 g/L e 1,45 g/L para moinho de bolas, e cerca de 1,22 g/L para ultrassom). Essa ineficácia é atribuída, principalmente, à inadequação dos equipamentos utilizados para o rompimento celular, como o uso de um agitador tipo vórtex para simular o moinho de bolas e de um banho ultrassônico em vez de uma sonda de ultrassom. Fatores como o diâmetro das pérolas de vidro (3 mm), que pode não ser o ideal para *S. cerevisiae*, e a ausência de otimização detalhada de parâmetros como tempo e intensidade dos tratamentos, também contribuíram para a limitada liberação da enzima. Adicionalmente, a complexidade da matriz do melão revelou-se um desafio para a quantificação precisa de açúcares redutores devido à interferência da matriz com o método DNS, limitando sua inclusão nas análises de extração.

Em suma, embora a produção e a ação da invertase extracelular sejam evidentes, o desafio da extração intracelular eficaz permanece crítico para a viabilidade industrial, demandando aprimoramentos metodológicos e a investigação de equipamentos mais adequados para otimizar a liberação da enzima e alcançar eficiências compatíveis com os padrões da literatura.

REFERÊNCIAS

- ALEGRE, R. M.; MARQUEZ, M. C.; FERREIRA, L. B. M. A. **Microbiologia Industrial**. Lisboa: IST PRESS, 2009.
- ALMEIDA, M. **Extração da enzima invertase por diferentes métodos de rompimento celular da *Saccharomyces cerevisiae***. 2024. Monografia (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2024.
- ALVES, B. N. **Avaliação dos métodos de moinho de bolas e choque osmótico para ruptura celular da *Saccharomyces cerevisiae***. 2020. 55 f. Monografia (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2020.
- ÁVILA, T. L.; TORALLES, R. P.; JANSEN, E. T.; FERREIRA, M. V.; KUHN, C. R.; RUIZ, W. A. **Extraction, purification and characterization of invertase from *Candida guilliermondii* isolated from peach solid wastes**. Revista brasileira de fruticultura, Jaboticabal, v. 44, n. 4, p. e-050, 2022.
- BARBOSA, E. F. **Avaliação da atividade da invertase de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em polianilina sobre o caldo de cana**. 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.
- FELLOWS, P. J. **Food Processing Technology: Principles and Practice**. 4. ed. Duxford: woodhead publishing, 2017.
- FERNANDES, L.; PEREIRA, A.; AZEVEDO, L.; GOMES, J.; GOMES, P. **Cell lysis of yeast and microalgae for enzyme recovery**. Applied microbiology and biotechnology, v. 104, n. 1, p. 119-129, 2020.
- FERREIRA, M. V.; ÁVILA, 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, v. 36, n. 4, p. 701-708, 2017.
- GOMES, J.; FERREIRA, L. B.; LIMA, S. P.; PEREIRA, P. F. **An overview of mechanical cell disruption methods: a review**. Biotechnology and bioengineering, v. 118, n. 1, p. 1-15, 2021.
- KILIKIAN, B. V.; PESSOA JR., A. **Purificação de produtos biotecnológicos: operações e processos com aplicação industrial**. São Paulo: Blucher, 2020.
- KOBLITZ, M. G. **Bioquímica de Alimentos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- KOTWAL, S. M.; SHANKAR, V. S. **Microbial invertase: a review**. Applied biochemistry and biotechnology, v. 154, n. 2, p. 95-112, 2009.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

MARQUEZ, M. C.; ALMEIDA, R. P.; SILVA, F. M.; ALMEIDA, S. D. **Invertase from *Saccharomyces cerevisiae*: Purification, characterization and application in the production of high fructose syrup.** Process biochemistry, v. 42, n. 4, p. 646-652, 2007.

MEDEIROS, F. O. de; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. de S.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. **Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de beta-galactosidase para uso em laboratório.** Química Nova, Rio Grande, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

NEVES, L. C. M. **Estudo dos Métodos Mecânicos de rompimento celular.** 2006. Anexo. (Dissertação de Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry.** 7. ed. New York: W. H. Freeman, 2017.

OLIVEIRA, R. L.; SILVA, M. F.; CONVERTI, A.; PORTO, T. S. **A study on invertase production from *Saccharomyces cerevisiae*.** Brazilian journal of chemical engineering, v. 40, n. 3, p. 301-309, 2023.

PEREIRA, S. J.; GOMES, P. F.; SOUZA, V. P.; SILVA, C. C. **A review of mechanical cell disruption methods for bioproduct recovery from microorganisms.** Journal of chemical technology & biotechnology, v. 94, n. 8, p. 2487-2501, 2019.

RESA, P.; ELVIRA, L.; SIERRA, C.; ESPINOSA, F. M. de. **Ultrasonic velocity assay of extracellular invertase in living yeasts.** Analytical Biochemistry, v. 384, p. 68-73, 2009.

SANTOS, A. A.; DEOTI, J. R.; MÜLLER, G.; DÁRIO, M. G.; STAMBUK, B. U.; ALVES JUNIOR, S. L. **Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca.** Brazilian journal of food technology, Campinas, v. 20, e2015113, 2017.

SANTOS, A. F. **Imobilização de invertase comercial e de *Saccharomyces cerevisiae* em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar.** 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2010.

SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial Vol. 2: Engenharia Bioquímica.** São Paulo: blucher, 2001.

SENAI. **Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática.** Goiânia: SENAI, 2009.

SILVA, J. A.; SOARES, D. V.; PEREIRA, M. L.; GOMES, P. F. **Invertase activity from *Saccharomyces cerevisiae* for sucrose hydrolysis: A kinetic study.** Process biochemistry, v. 50, n. 1, p. 90-97, 2022.

TADINI, C. C. **Operações Unitárias na Indústria de Alimentos.** Rio de Janeiro: grupo gen, 2015.

VIEIRA, V. B.; SILVA, F. M.; SILVA, T. L. da; PAULA, P. R. de; CORREIA, A. M. da S. **Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus ochraceus* using agroindustrial residues as carbon sources.** Enzyme and microbial technology, v. 40, n. 1, p. 52-57, 2017.