

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

KELLEN NASCIMENTO DOS SANTOS

**APLICAÇÃO DA MICROFILTRAÇÃO NO PROCESSO DE OBTENÇÃO DA
ENZIMA INVERTASE**

TOLEDO

2023

KELLEN NASCIMENTO DOS SANTOS

**APLICAÇÃO DA MICROFILTRAÇÃO NO PROCESSO DE OBTENÇÃO DA
ENZIMA INVERTASE**

**APPLICATION OF MICROFILTRATION IN THE PROCESS OF OBTAINING
INVERTASE ENZYME**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentada como requisito para obtenção do título de
Tecnólogo Processos químicos da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Gilberto da Cunha Gonçalves

TOLEDO

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

KELLEN NASCIMENTO DOS SANTOS

**APLICAÇÃO DA MICROFILTRAÇÃO NO PROCESSO DE OBTENÇÃO DA
ENZIMA INVERTASE**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Tecnólogo em processos químicos da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Aprovado em 27 de novembro de 2023.

Prof. Dr. Gilberto da Cunha Gonçalves
UTFPR, câmpus Toledo
Orientador

Prof^a.Dra Karina Graziella Fiametti Colombo
UTFPR, câmpus Toledo
Avaliador

Prof. Dr Ricardo Fiori Zara
UTFPR, câmpus Toledo
Avaliador

OBS: A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso de Tecnologia em Processos Químicos.

**TOLEDO
2023**

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus por ter me mantido na trilha certa durante este projeto de pesquisa com saúde e forças para chegar até o final.

Ao meu estimado professor orientador, Gilberto da Cunha Gonçalves, quero expressar minha sincera apreciação. Sua orientação sábia, paciência infinita e compromisso com a excelência acadêmica foram inestimáveis. Seu apoio e orientação foram a âncora que me manteve firme durante todo o processo de pesquisa e redação.

Agradeço à UTFPR pois este trabalho foi realizado com o apoio financeiro do Campus Toledo da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, por meio do Edital nº 24/2023.

E, também ao Laboratório Multiusuário da central analítica por fornecer os equipamentos necessários para as análises.

RESUMO

As enzimas são proteínas catalisadoras amplamente utilizadas em diversos setores industriais devido à sua capacidade de acelerar reações químicas. No entanto, a obtenção de enzimas puras e ativas a partir de fontes naturais pode ser um processo complexo e dispendioso. A filtração por membranas surge como uma técnica promissora para separação de enzimas, oferecendo vantagens significativas em relação a outras técnicas convencionais. Este estudo teve como objetivo avaliar o desempenho de diferentes, membranas poliméricas de microfiltração na purificação da enzima invertase, proveniente da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Foram avaliados os parâmetros diâmetro de poros (0,22, 0,45, 0,65 e 0,80 μm) e pressões (1, 2 ou 3 Kgf/cm^2) transmembrana. Os resultados de filtração mostraram um comportamento semelhante, independente do diâmetro de poro ou da pressão: rápido decaimento do fluxo do permeado com estabilização entre 0,067 e 0,083 $\text{Kg.h}^{-2}.\text{m}^{-2}$. Observou-se a formação, praticamente instantânea, de uma camada secundária de filtração na superfície da membrana proveniente do material coloidal no extrato enzimático que não foi totalmente removido pela centrifugação. As membranas foram capazes de remover as partículas coloidais, produzindo um extrato límpido, com atividade enzimática demonstrada por meio da reação de inversão da sacarose.

Palavras chaves: filtração; separação; *Saccharomyces cerevisiae*; membranas; leveduras.

ABSTRACT

Enzymes are catalytic proteins widely used in various industrial sectors due to their ability to accelerate chemical reactions. However, obtaining pure and active enzymes from natural sources can be a complex and expensive process. Membrane filtration appears as a promising technique for enzyme separation, offering significant advantages over other conventional techniques. This study aimed to evaluate the performance of different polymeric microfiltration membranes in the purification of the invertase enzyme, originating from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The parameters pore diameter (0.22, 0.45, 0.65 and 0.80 μm) and transmembrane pressures (1, 2 or 3 Kgf/cm^2) were evaluated. The results showed a similar permeate flow behavior, regardless of pore diameter or pressure: rapid decay of the permeate flux with stabilization between 0.067 e 0.083 $\text{Kg}\cdot\text{h}^{-2}\cdot\text{m}^{-2}$. The formation, practically instantaneous, of a secondary filtration layer on the surface of the membrane was observed, originating from the colloidal material in the enzymatic extract that was not completely removed by centrifugation. The membranes were able to remove colloidal particles, producing a clear extract, with enzymatic activity demonstrated through the sucrose inversion reaction.

Keywords: filtration; separation; *Saccharomyces cerevisiae*; membranes; yeasts.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	6
2.	OBJETIVOS	7
2.1	Objetivo geral.....	7
2.2	Objetivos específicos.....	7
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	8
3.1	Membranas.....	8
3.2	Enzimas	10
3.2.1	Tipos de enzimas.....	11
3.2.2	Obtensão de enzimas.....	12
3.2.3	Enzima invertase	15
3.3	Aplicação do processo de filtração por membranas para a obtenção de enzimas	17
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1	Materiais	19
4.2	Extração das invertases.....	19
4.3	Unidade experimental	20
4.4	Experimentos de filtração do extrato enzimático	22
4.5	Determinação de proteínas solúveis	23
4.6	Experimentos de hidrólise e sacarose	23
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1	Influência do diâmetro de poros da membrana na microfiltração do extrato enzimático centrífugado	24
5.2	Influência de diferentes pressões na microfiltração do extrato enzimático centrífugado.	27

5.3	Avaliação da hidrólise da sacarose utilizando o extrato enzimático permeado.....	34
6.	CONCLUSÃO.....	34
	REFERÊNCIAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

Enzimas são proteínas catalisadoras que aceleram reações químicas em sistemas biológicos e industriais. Elas possuem uma ampla variedade de aplicações, desde a produção de alimentos e medicamentos até a síntese de biocombustíveis. No entanto, a obtenção de enzimas puras e ativas a partir de fontes naturais pode ser um processo complexo e dispendioso. Por isso, o desenvolvimento de técnicas eficientes de separação e purificação de enzimas é fundamental para garantir a qualidade e a viabilidade econômica desses processos.

A filtração por membranas é uma técnica de separação baseada na diferença de tamanho molecular entre os componentes de uma solução. Ela utiliza membranas semipermeáveis para separar os componentes com base em suas diferenças de tamanho. As membranas utilizadas na filtração por membranas podem ser classificadas de acordo com o seu tamanho de poro, que determina quais moléculas podem passar através delas. As membranas de ultrafiltração (UF), por exemplo, permitem a passagem de moléculas com peso molecular abaixo de 100 kDa, enquanto as membranas de nanofiltração (NF) permitem a passagem de moléculas com peso molecular abaixo de 1000 Da (Iulianelli, 2021).

Amplamente empregada nas indústrias alimentícia, farmacêutica e química, a filtração por membranas destaca-se na separação e purificação de proteínas e enzimas (Baker, 2004). Ela tem várias vantagens em relação a outras técnicas de purificação, como a cromatografia e a precipitação, tais como: menor consumo de energia, menos uso de reagentes químicos, maior velocidade de operação, menor custo e menor impacto ambiental (Oliveira e Coelho 2019).

As enzimas obtidas por meio da filtração por membranas destacam-se por sua pureza e preservação da atividade enzimática, tornando-as ideais para aplicações em processos biotecnológicos e industriais. Além disso, a filtração por membranas pode ser facilmente adaptada para diferentes tipos de enzimas e sistemas de produção, o que permite maior flexibilidade e eficiência no processo de purificação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência dos parâmetros diâmetro de poros e pressão transmembrana na microfiltração do extrato enzimático proveniente da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a obtenção da enzima invertase.

2.2 Objetivos específicos

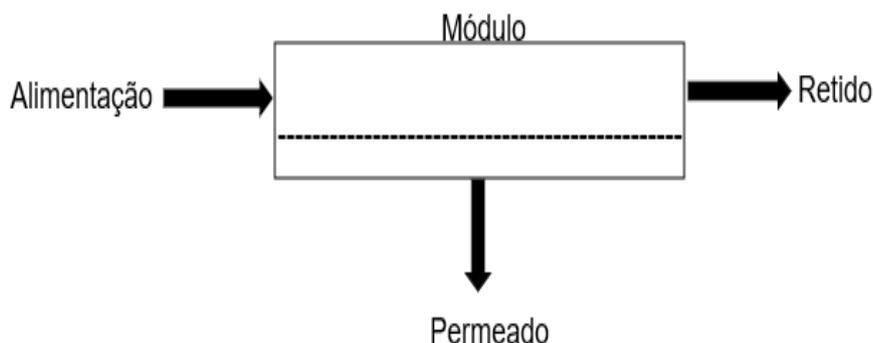
- Extrair a enzima invertase a partir da *Saccharomyces cerevisiae*.
- Avaliar a influência do diâmetro de poro e pressão transmembrana na microfiltração por membranas;
- Avaliar a aplicação da enzima invertase obtida do extrato permeado na reação de inversão da sacarose.

3.REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Membranas

A filtração por membranas é um processo de separação que utiliza membranas seletivas para separar diferentes componentes de um fluido. Segundo Ismail et al., (2018), as membranas são materiais poliméricos com poros muito pequenos, que podem variar de micrômetros a nanômetros de tamanho. Esses poros permitem que apenas as moléculas de tamanho adequado passem através da membrana, enquanto as moléculas maiores são retidas. Na Figura 1 é apresentada uma ilustração de um processo de separação por membranas. Nesse processo, o fluxo de alimentação que entra no módulo de filtração é dividido em duas correntes: a corrente de material retido ou concentrado e a corrente de material permeado. Tanto a corrente de material retido quanto a de permeado podem ser produto de interesse.

Figura 1 – Representação esquemática de um processo de separação por membrana.



Fonte: Adaptado de Mulder, (2010).

No quadro 1 são apresentadas as características dos diferentes processos de separação por membranas que são classificadas com base no tamanho de poro da membrana e na taxa de retenção de solutos (Baker, 2004). A microfiltração é geralmente usada para separar partículas sólidas de líquidos, enquanto a ultrafiltração é usada para separar macromoléculas. A nanofiltração é adequada para separar íons e moléculas orgânicas, enquanto a osmose reversa é usada para separar sais e moléculas muito pequenas.

Quadro 1- Características dos processos por separação por membranas

Processos	Força motriz	Material retido	Material que permeia	Aplicações
Microfiltração (MF)	ΔP (0,5 – 2) atm	Material em suspensão, bactérias. Massa molar > 500 kDa (0,01 μm)	Água e sólidos dissolvidos	Esterilização bacteriana, clarificação de vinhos e sucos.
Ultrafiltração (UF)	ΔP (1 – 7) atm	Colóides, macromoléculas, Massa molar > 5000 Da	Águas (solventes), sais solúveis de baixa massa molar.	Fracionamento/concentração de proteínas e recuperação de pigmentos.
Nanofiltração (NF)	ΔP (5 – 25) atm	Moléculas de massa molar média de 500>2000 Da	Águas (solvente), sais solúveis de baixa massa molar.	Purificação de enzimas, biorreatores de membrana.
Osmose Inversa (OI)	ΔP (15 – 80) atm	Todo material solúvel ou suspensão	Água (solventes)	Dessalinização e desmineralização de água.
Eletrodialise	ΔE volts	Macromoléculas e compostos não iônicos	Íons	Concentração de soluções salinas; purificação de águas.

Fonte: Adaptado de Habert et al., (2006).

A escolha da membrana adequada depende do tipo de separação desejada e das características das moléculas a serem separadas. A seleção do material de membrana também é crucial, pois afeta a permeabilidade, a seletividade, a resistência mecânica e a estabilidade química da membrana. Alguns dos materiais comuns usados para fabricar membranas incluem polímeros (poliacrilonitrila, polietileno, poliésteres, poliacrílicos, poliuretanos e polissulfona), cerâmica e vidro (Ismail *et al.*, 2018).

A filtração por membranas tem uma ampla gama de aplicações industriais. Por exemplo, as membranas podem ser usadas para separar impurezas de água potável e tratamento de águas (Abdelrasoul, 2020). A filtração por membranas também é usada para separar e concentrar proteínas e outras biomoléculas em processos de produção de alimentos e produtos farmacêuticos (Matsuura, 2020). Além disso, as membranas também têm aplicações na separação de gases e na separação de produtos químicos em processos de produção química.

O processo de filtração por membranas é afetado por vários parâmetros, como a pressão aplicada, o tamanho e a porosidade da membrana, e as propriedades das moléculas a serem separadas (Ismail et al.; 2018). O processo também pode ser

afetado pelo acúmulo de impurezas na superfície da membrana, conhecido como bioincrustação. Para evitar a bioincrustação, a filtração por membranas pode ser combinada com outras técnicas de limpeza, como a limpeza química e a limpeza física, ou com o uso de membranas com superfícies modificadas (Abdelrasoul, 2020).

Essa ampla aplicação das membranas na indústria é confirmada por Iulianelli, (2021), que discute as operações de membranas em engenharia química. De acordo com o autor, as membranas são amplamente utilizadas em processos de separação em diferentes setores industriais, incluindo químico, petroquímico, farmacêutico, alimentício e de tratamento de água e efluentes. Além disso, os avanços na tecnologia de membranas têm permitido a produção de membranas com propriedades específicas para atender às necessidades de processos de separação em diferentes aplicações (Matsuura, 2020).

Outra aplicação importante da filtração por membranas é na área médica, em particular na diálise para tratamento de pacientes com doenças renais. As membranas são usadas para remover substâncias tóxicas do sangue e remover o excesso de água do corpo do paciente (Abdelrasoul, 2020). Esse método de tratamento tem se mostrado eficaz e menos invasivo do que outras opções de tratamento disponíveis, como o transplante de rim.

A filtração por membranas é uma técnica versátil e promissora que com a constante evolução da tecnologia, é possível que se torne ainda mais eficiente e econômica, tornando-se uma solução ainda mais amplamente adotada em processos de separação.

3.2 Enzimas

As enzimas apresentam uma estrutura tridimensional única que lhes permite se ligar a substratos específicos, convertendo-os em produtos com alta eficiência e especificidade (Suzuki, 2019). A atividade das enzimas é regulada por fatores como pH, temperatura, concentração de substrato, inibidores e ativadores, o que permite uma resposta adaptativa a diferentes condições fisiológicas (Murray et al. 2014).

A capacidade das enzimas de catalisar reações químicas é fundamental para a vida, uma vez que muitos dos processos metabólicos em organismos vivos ocorrem em velocidades muito lentas sem a presença de enzimas. Segundo Suzuki (2019), as

enzimas atuam como catalisadores, reduzindo a energia de ativação necessária para a ocorrência de uma reação química. Isso significa que elas aceleram a velocidade de reação, tornando-a mais favorável e permitindo que ocorra a uma taxa compatível com as necessidades do organismo.

Além disso, as enzimas também são capazes de realizar outras funções importantes, como a regulação da expressão gênica e a modulação de vias de sinalização celular (Murray et al. 2014). Essas funções adicionais ampliam ainda mais a importância das enzimas para a vida.

Dessa forma, as enzimas são proteínas altamente especializadas em catalisar reações químicas em organismos vivos. Elas apresentam uma estrutura tridimensional única que lhes permite se ligar a substratos específicos, converter esses substratos em produtos e regular sua atividade em resposta a diferentes condições fisiológicas.

3.2.1 Tipos de enzimas

Existem diferentes tipos de enzimas, classificadas de acordo com o tipo de reação que catalisam: hidrolases, transferases, oxidorreduções, liases, isomerases e ligases.

As hidrolases são responsáveis pela quebra de ligações químicas por meio da adição de água, e incluem enzimas como as lipases e proteases (Murray et al. 2014).

As transferases atuam na transferência de um grupo funcional de uma molécula para outra, como no caso da enzima hexoquinase que transfere um grupo fosfato de uma molécula de ATP para uma molécula de glicose (Lehninger et al. 2017).

As oxidorreduções, por sua vez, catalisam reações de oxidação e redução, transferindo elétrons entre moléculas. Exemplos incluem a enzima desidrogenase láctica, que catalisa a conversão de ácido láctico em piruvato, elas incluem enzimas como a desidrogenase lactato (LDH), que catalisa a conversão do lactato em piruvato, liberando elétrons que são transferidos para o NAD⁺ (NADH) (Suzuki, 2019).

As liases atuam na quebra de ligações químicas sem a adição de água ou transferência de grupos funcionais, e incluem enzimas como a frutose-1,6-bisfosfato aldolase (Murray et al. 2014).

As isomerases catalisam a interconversão de isômeros, moléculas que possuem a mesma fórmula molecular, mas estruturas químicas diferentes. Um exemplo é a enzima fosfoglicerato mutase, que catalisa a conversão de 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato durante a glicólise (Lehninger et al., 2017).

Por fim, as ligases catalisam a união de duas moléculas com a formação de uma nova ligação química, como no caso da DNA ligase que une as extremidades de fragmentos de DNA durante a replicação do material genético (Suzuki, 2019).

A classificação internacional das enzimas e o tipo de reação que elas catalisam são apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2 – Classificação internacional das enzimas

Classe nº	Nome da classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidreto ou átomos de H)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
4	Liases	Clivagem de C-C, C-S, C-O e C-N ou outras ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro uma mesma molécula, produzindo formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acoplados à hidrólise de ATP ou cofatores similares
7	Translocases	Movimento de íons ou moléculas através de membranas ou sua separação dentro de membranas

Fonte: Adaptado de Lehninger et al., (2017).

3.2.2 Obtenção de enzimas

A produção de enzimas a partir de microrganismos tem se destacado na indústria alimentícia como uma estratégia para melhorar processos de produção e características dos produtos, tais como sabor, aroma, cor, textura, aparência, vida útil e valor nutricional (Srivastava, 2019).

De acordo com Papadaki et al. (2020), o mercado global de enzimas apresentou um valor estimado em US\$ 7,1 bilhões em 2017, e a previsão é de que alcance US\$ 10,5 bilhões em 2024, com uma taxa anual de crescimento de 5,7%. No mesmo ano, a Europa foi responsável por um terço da produção mundial de enzimas, sendo que cerca de 70% da cota de mercado foi produzida por microrganismos.

A maioria das enzimas utilizadas na indústria é produzida por leveduras e fungos filamentosos, enquanto as bactérias representam cerca de 30% do total. Por outro lado, apenas 8% das enzimas industriais são produzidas por animais, e 4% por plantas. Essas fontes microbianas são vantajosas do ponto de vista econômico, uma vez que o cultivo desses microrganismos é simples e não envolve restrições de tempo e espaço como ocorre com outras fontes. Além disso, avanços tecnológicos têm permitido que genomas de microrganismos sejam sequenciados de forma eficiente, o que possibilita a identificação de novas sequências de genes que codificam variantes de enzimas (Srivastava, 2019).

A obtenção de enzimas a partir de microrganismos é um processo fundamental em biotecnologia, pois essas moléculas são extremamente importantes em diversos setores industriais, como alimentício, farmacêutico, cosmético, têxtil, entre outros. De acordo com Thatoi, (2020), a produção de enzimas por microrganismos é uma alternativa promissora e econômica para a obtenção de enzimas em grande escala. Bactérias, fungos e leveduras são considerados fontes ricas de enzimas, pois apresentam uma grande diversidade metabólica e bioquímica, permitindo a produção de uma ampla variedade de enzimas com diferentes propriedades.

Existem diferentes métodos para obtenção de enzimas a partir de microrganismos, incluindo a extração direta, cultivo em meios líquidos ou sólidos, e fermentação. A escolha do método de obtenção de enzimas depende das características da enzima e do microrganismo em questão, bem como das condições de cultivo e dos requisitos de purificação e estabilidade da enzima (Arora, Mishra e Mishra, 2020).

A extração direta é uma técnica relativamente simples, que envolve a ruptura das células dos microrganismos e a liberação das enzimas. No entanto, este método não é muito utilizado em escala industrial devido ao baixo rendimento e à dificuldade de purificação das enzimas (Singh, 2020).

O cultivo em meios líquidos ou sólidos envolve o crescimento dos microrganismos em um meio de cultura contendo nutrientes adequados, para que as células produzam as enzimas em questão. Este método pode ser utilizado em escala industrial, mas possui algumas limitações, como a necessidade de grandes volumes de meio de cultura, alto custo e baixa produtividade (Thatoi, 2020).

Apesar de a produção de enzimas por microrganismos ser realizada por meio de diferentes técnicas, a fermentação é a mais utilizada. Ela é considerada o método mais eficiente para obtenção de enzimas a partir de microrganismos em escala industrial, pois permite a produção de grandes quantidades de enzimas em um curto período, além de possuir baixo custo e alta produtividade (Gupta, 2016). A fermentação é um processo biotecnológico que envolve o uso de microrganismos, como fungos e bactérias, para converter matérias-primas em produtos, como as enzimas (Thatoi, 2020).

Existem dois principais tipos de fermentação para obtenção de enzimas: a fermentação em estado sólido (SSF, do inglês *solid-state fermentation*) e a fermentação em estado líquido (SSF, do inglês *submerged fermentation*) (Gupta, 2016).

A escolha do sistema de fermentação depende das características do microrganismo e da enzima a ser produzida, bem como das condições de cultivo (Singh, 2020). Durante a fermentação, os microrganismos são cultivados em condições controladas de pH, temperatura, agitação e aeração para que possam se desenvolver e produzir as enzimas desejadas.

Na fermentação em estado sólido, os microrganismos são cultivados em substratos sólidos, como resíduos agrícolas, bagaço de cana-de-açúcar, cascas de frutas, entre outros (Thatoi, 2020). Já na fermentação em estado líquido, os microrganismos são cultivados em meio líquido contendo nutrientes e fontes de carbono (Zhang, et al., 2012).

Apesar de ambas as técnicas serem utilizadas para a produção de enzimas, a fermentação em estado líquido é a mais comum em larga escala, pois permite melhor controle das condições de cultivo e maior produção de enzimas (Gupta, 2016). Além disso, a fermentação em estado líquido é capaz de produzir uma variedade maior de enzimas, incluindo aquelas que são mais sensíveis a mudanças de pH e temperatura (Singh, 2020).

O processo de fermentação microbiana ocorre em três fases: fase de crescimento, fase de produção e fase de declínio. A fase de crescimento é caracterizada pelo aumento da população de microrganismos. A fase de produção é quando os microrganismos começam a produzir as enzimas de interesse. Já a fase de declínio é quando ocorre a morte dos microrganismos e a atividade enzimática começa a diminuir (Singh, 2020).

Existem diversos métodos de quantificação de enzimas, incluindo métodos colorimétricos, espectrofotométricos e titulométricos. Esses métodos permitem determinar a concentração de enzima presente em uma amostra, sendo que a escolha do método adequado depende das características da enzima em questão (Machado *et al.*, 2018).

Dessa maneira, a fermentação microbiana é um método eficiente para a produção de enzimas em larga escala. A escolha do microrganismo e as condições de cultivo são fatores críticos para o sucesso do processo de fermentação. A produção de enzimas por fermentação microbiana oferece vantagens em relação a outros métodos de produção e permite a produção de enzimas de interesse industrial em quantidades suficientes para atender à demanda do mercado.

3.2.3 Enzima invertase

O estudo de enzimas tem sido uma área importante de pesquisa nas ciências biológicas e farmacêuticas. A invertase é uma dessas enzimas, que tem sido objeto de estudo por muitos anos. De acordo com Kulshrestha *et al.* (2013), essa enzima é encontrada em muitas plantas e microrganismos e tem sido utilizada em diversas aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica.

A invertase é uma enzima que catalisa a hidrólise da sacarose em glicose e frutose, conforme a seguinte reação:



Açúcar invertido

Onde:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = rotação específica da substância;

α = ângulo de rotação;

A invertase é uma enzima presente em muitos organismos, incluindo plantas, fungos e bactérias. Ela é amplamente utilizada na indústria de alimentos e bebidas para a produção de xaropes de frutose, que são uma alternativa mais saudável ao açúcar refinado. Além disso, a invertase é usada na hidrólise de açúcares em alimentos e bebidas, como refrigerantes e sucos, para melhorar a textura e o sabor. A invertase é um dos biocatalisadores mais antigos e conhecidos, pertencente à família das hidrolases glicosídicas (GH) que abrange cerca de 370 enzimas, e possui variadas denominações como seu nome formal β -frutofuranosidase (EC.3.2.1.26) e seu nome sistemático sacarose glicosidase, além de ser conhecida por invertina, frutohidrolase, entre outros (Timerman, 2012).

A enzima invertase pode ser isolada de uma diversidade de fontes microbianas, incluindo bactérias, leveduras e fungos. Exemplos clássicos de produtores de invertase são linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Arthrobacter sp.* e *Bacillus macerans* (Pang et al., 2019).

A produção de invertase tem sido objeto de estudos em diversas áreas, incluindo a biotecnologia, a microbiologia e a bioquímica. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é uma das principais fontes de invertase utilizadas na indústria devido à sua capacidade de secretar grandes quantidades de proteínas para o meio de cultivo (Barbosa et al., 2018).

De acordo com Shankar, (2017), a obtenção de invertase a partir da *Saccharomyces cerevisiae* tem sido alvo de pesquisas para otimizar a produção e a sua purificação. Técnicas de engenharia genética, como a seleção de cepas de leveduras com alta atividade invertásica e a introdução de genes que aumentam a atividade da enzima, também podem ser usadas para otimizar a produção de invertase (Shankar, 2017).

A invertase pode ser obtida através da fermentação do microrganismo produtor, que é realizado em diferentes meios de cultura. A fermentação é um processo que envolve diversas etapas, incluindo o crescimento do microrganismo, produção da enzima e separação da enzima do meio de cultura. A fermentação pode ser realizada em escala laboratorial, piloto ou industrial, dependendo da finalidade da produção (Pang et al., 2019).

Para a obtenção da invertase, é necessário realizar a purificação da enzima a partir do meio de cultura. A purificação da invertase pode ser feita por diferentes

métodos, incluindo cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade ou filtração por membranas. Essas etapas permitem separar a enzima das outras proteínas e contaminantes presentes no meio de cultura (Timerman, 2012).

A invertase é uma enzima relativamente pequena, com um peso molecular entre 50 e 70 kDa. A enzima é composta por uma única cadeia polipeptídica, geralmente com um complexo padrão de glicosilação, o que confere uma grande heterogeneidade à enzima (Shankar, 2017).

A comercialização da invertase envolve a produção em larga escala, a purificação e a formulação do produto. A formulação do produto depende da aplicação desejada e pode envolver a adição de estabilizadores, como polióis (álcool de açúcar) e surfactantes, para melhorar a estabilidade e a solubilidade da enzima (Pang et al., 2019).

É importante destacar que a produção e a comercialização de invertase devem ser realizadas de forma sustentável e responsável, levando em consideração questões ambientais e sociais.

3.3 Aplicação do processo de filtração por membranas para a obtenção de enzimas

A aplicação de membranas na purificação de soluções é uma técnica promissora e em constante evolução. Segundo Baker (2004), essa técnica tem se mostrado cada vez mais relevante nas indústrias química, farmacêutica, de alimentos e outras, devido às suas vantagens em relação aos processos tradicionais de separação, como a destilação e a extração líquido-líquido.

Um estudo recente propôs o uso de um processo de ultrafiltração por membranas em uma única etapa para a separação e purificação de uma protease queratinolítica produzida a partir de resíduos de penas de aves (Machado et al., 2018). Esse processo mostrou-se eficiente na purificação da protease, e pode ser aplicado também para a purificação de outras enzimas.

A filtração por membranas desempenha um papel crucial na obtenção de enzimas para a indústria de alimentos, permitindo a purificação de enzimas utilizadas em processos como a produção de queijos, sucos e xaropes. O processo proporciona uma separação eficaz de impurezas, garantindo a qualidade e a segurança dos alimentos. Segundo Baker (2004), a aplicação de membranas nesse contexto resulta

em produtos com maior pureza e melhor desempenho em termos de características organolépticas.

Na biotecnologia farmacêutica, as membranas de filtração são amplamente utilizadas para a purificação de enzimas terapêuticas e proteínas recombinantes. A separação por tamanho de poro permite a remoção eficiente de impurezas, garantindo a conformidade com os padrões regulatórios rigorosos da indústria farmacêutica. Zhang et al. (2017) destacam a eficácia dessa técnica na produção de enzimas utilizadas em tratamentos médicos.

A obtenção de enzimas para a produção de biocombustíveis, como etanol a partir de biomassas lignocelulósicas, é também otimizada por meio da filtração por membranas. Machado et al. (2018) exemplifica a aplicação da ultrafiltração na purificação de enzimas envolvidas na degradação de materiais lignocelulósicos, contribuindo para a eficiência dos processos de produção de biocombustíveis.

A produção de enzimas utilizadas na indústria de papel e celulose, como celulases e xilanases, se beneficia significativamente da filtração por membranas. A remoção eficiente de impurezas e a concentração das enzimas resultam em produtos de alta qualidade. Pesquisas, como as conduzidas por Pérez et al. (2002), destacam a aplicação bem-sucedida de membranas na purificação de enzimas essenciais para processos de branqueamento e modificação de fibras de celulose.

Em setores que demandam enzimas específicas para a produção de produtos químicos especializados, a filtração por membranas oferece um método de purificação versátil. A escolha adequada de membranas e parâmetros operacionais pode ser adaptada para atender às exigências específicas de diferentes enzimas. Essas aplicações destacam a versatilidade da filtração por membranas na obtenção de enzimas em diversos setores industriais, proporcionando benefícios significativos em termos de eficiência, pureza e sustentabilidade.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

As leveduras utilizadas foram provenientes do fermento biológico fresco (Fleischmann), adquirido no comércio local da cidade de Toledo-PR. Os reagentes NaHCO_3 (bicarbonato de sódio), sacarose, reagente de Bradford e BSA (albumina sérica bovina) utilizados foram de grau analítico.

As membranas utilizadas eram membranas planas fornecidas pela Millipore, constituídas de misturas de ésteres de celulose (hidrofílicas) com diferentes diâmetros de poros. Tabela 1 são apresentadas as características das membranas.

Tabela 1 - Características das membranas de filtração

Membranas	Diâmetro de poros (μm)	Vazão da água ($\text{mL}/\text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^2$)	Porosidade (%)
M022	0,22	18	75
M045	0,45	60	79
M065	0,65	140	81
M080	0,80	190	82

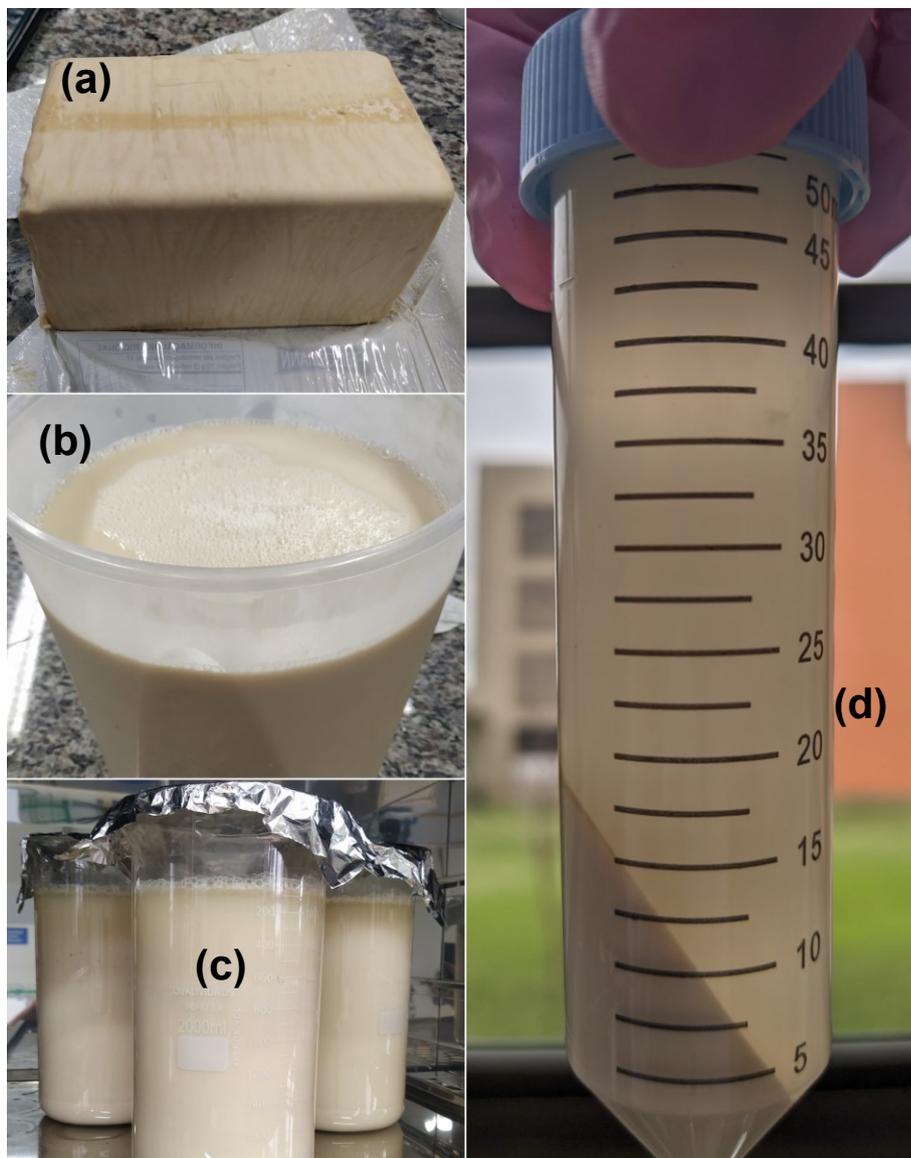
Fonte: Merck Millipore, 2021.

4.2 Extração das invertases

A metodologia utilizada para a obtenção do extrato enzimático bruto foi a descrita por Toralles et al., (2014), com algumas adaptações. Aproximadamente 1000 gramas do fermento fresco foram adicionados a 5000 mL de uma solução de NaHCO_3 (bicarbonato de sódio) $0,10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Após a homogeneização, a suspensão foi incubada em estufa na temperatura de $42 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 36 horas. Essas etapas do processo de produção do extrato enzimático estão apresentadas na Figura 2 (a), (b), (c) e (d).

Em seguida, centrifugou-se a suspensão em uma rotação de 4000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante, ilustrado na Figura 2(d), denominado de extrato enzimático centrifugado foi retirado e transferido para frascos de polietileno de alta densidade (PEAD) de 300 mL e armazenados em freezer até a realização dos experimentos de filtração por membranas.

Figura 2 – Etapas de produção do extrato enzimático: a) Fermento biológico fresco, b) Homogeneização da mistura de fermento com a solução de NaHCO_3 , c) Extrato enzimático bruto na estufa, d) extrato enzimático após o processo de centrifugação.



Fonte: A autoria própria, 2023.

4.3 Unidade experimental

Os experimentos de filtração do extrato enzimático centrifugado com as membranas foram realizados no módulo experimental apresentado na Figura 3.

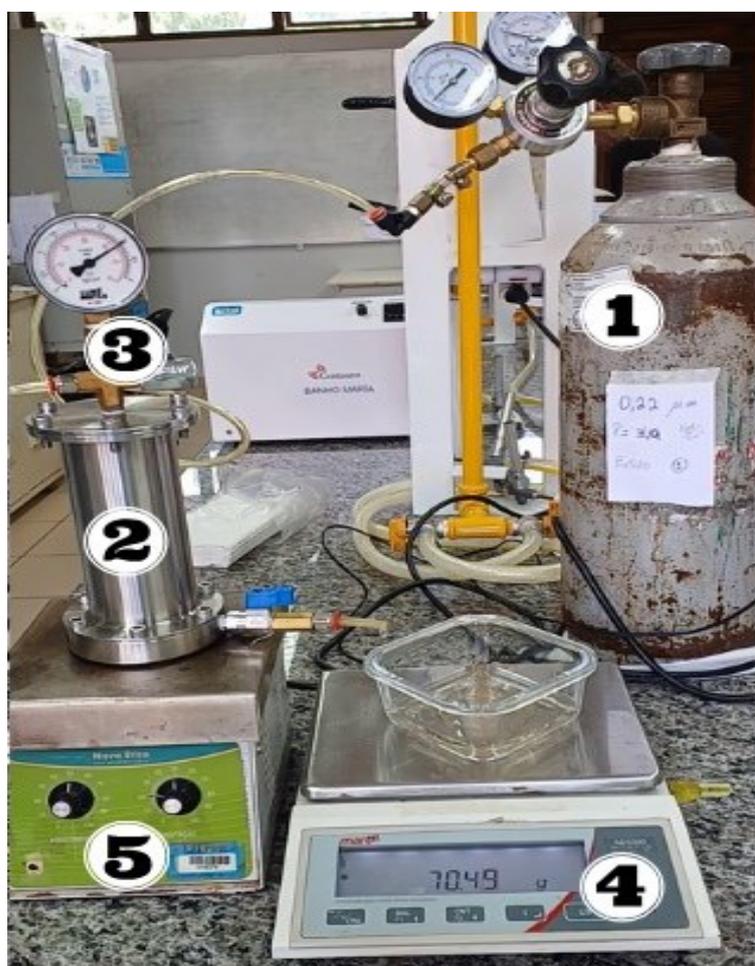
A unidade experimental é constituída de:

- 1- Cilindro de gás nitrogênio: utilizado para controlar a pressão transmembrana dentro do módulo.
- 2- Módulo de membranas: feito de aço inox com capacidade de 400mL, permite

que o fluido a ser filtrado passe através das membranas, enquanto as partículas maiores do que os poros da membrana sejam retidas. O módulo possui uma barra magnética suspensa por uma barra metálica que permite realizar a agitação da alimentação durante a filtração. Na parte lateral inferior tem-se a saída de líquido permeado.

- 3- Manômetro : utilizado para visualizar a pressão no interior do módulo.
- 4- Balança: utilizada para pesar a massa de permeado enquanto ocorre a filtração e calcular o fluxo de escoamento.
- 5- Agitador magnético: agitação do líquido no interior do módulo de filtração.

Figura 3 – Módulo experimental de filtração por membranas: (1) cilindro de gás nitrogênio, (2) módulo de membranas, (3) manômetro, (4) balança e (5) agitador magnético.



Fonte: Autoria própria, 2023.

4.4 Experimentos de filtração do extrato enzimático

Para a realização dos experimentos de filtração, o extrato enzimático centrifugado foi descongelado em banho-maria. Após, transferiu-se 250 mL do extrato para o módulo de filtração contendo a membrana. Depois do fechamento do módulo, a pressão interna (1, 2 ou 3 Kgf.cm⁻²) foi ajustada usando N₂ (nitrogênio) e iniciou-se a agitação interna do extrato. Com a abertura da válvula do módulo, o permeado foi recolhido em um frasco sob a balança, sendo registrado a massa em função do tempo de filtração. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (25 °C) e em duplicata. As amostras de extrato enzimático centrifugado (alimentação) e o extrato enzimático permeado foram armazenados em frascos plásticos (tubos de centrífuga) e submetidos a quantificação de proteínas solúveis.

O fluxo de permeado foi calculado pela equação 1.

$$Jp = \frac{mp}{t.Ap} \quad (1)$$

Em que: Jp é o fluxo de permeado (Kg.h⁻¹.m⁻²), mp é a massa recolhida no intervalo de tempo t (horas) e Ap é área de permeação da membrana (m²).

Ao final de cada experimento, o extrato retido foi removido e o módulo foi enxaguado com água destilada para eliminar resíduos remanescentes. Água destilada foi então adicionada ao módulo e submetida a nova filtração para determinar a permeabilidade da água pura (PAP) das membranas sujas.

O índice de *Fouling* para as membranas, expresso como a redução na PAP antes e após a filtração do extrato bruto, foi calculado pela equação 2.

$$\text{Índice de Fouling: } \left(\frac{PAP_{limpa} - PAP_{suja}}{PAP_{limpa}} \right) . 100 \quad (2)$$

O desempenho das membranas foi avaliado por meio da rejeição de proteínas, calculado pela equação 3.

$$\text{Rejeição de proteína (\%): } \left[\left(1 - \frac{\text{proteína permeado}}{\text{proteína alimentação}} \right) \right] . 100 \quad (3)$$

4.5 Determinação de proteínas solúveis

As proteínas solúveis foram quantificadas pelo método de Bradford que se baseia no fato do corante ácido Cromassie Brilliant Blue G 250 (principal constituinte do reagente de Bradford) ter uma cor vermelha, que muda para azul quando está ligado a uma proteína (Bradford, 1976).

Para a determinação da concentração de proteínas presentes nas amostras, foi utilizada a metodologia descrita por Walker (1994) em que se preparou uma curva de calibração utilizando Albumina bovina sérica (BSA) como proteína padrão. Em tubos de ensaios, foram adicionados 200 μL da solução enzimática e 2,0 mL do reagente Bradford. Após aproximadamente 15 min, leu-se a absorbância em espectrofotômetro (595 nm), contra um branco (2,0 mL do reagente Bradford com 200 μL de água destilada). O mesmo procedimento foi realizado para as seis soluções padrão de concentrações conhecidas, elaboradas a partir da solução principal de BSA.

4.6 Experimentos de hidrólise e sacarose

Para verificar-se que o extrato enzimático permeado apresentava atividade enzimática, foi realizada uma reação de hidrólise da sacarose na temperatura de 25°C. Misturou-se 25 mL de uma solução de sacarose P.A (240 g.L^{-1}) com 25 mL extrato enzimático permeado, obtido nos experimentos de filtração com a membrana M045 em uma pressão de 3 Kgf.cm^{-2} . A mistura foi transferida para um tubo polarimétrico. Em diferentes intervalos de tempo, foi anotada a rotação óptica da mistura. O mesmo experimento foi realizado substituindo o extrato permeado por uma solução de HCl 1,4 mol.L^{-1} , realizando-se, assim, a hidrólise ácida da sacarose para fins de comparação.

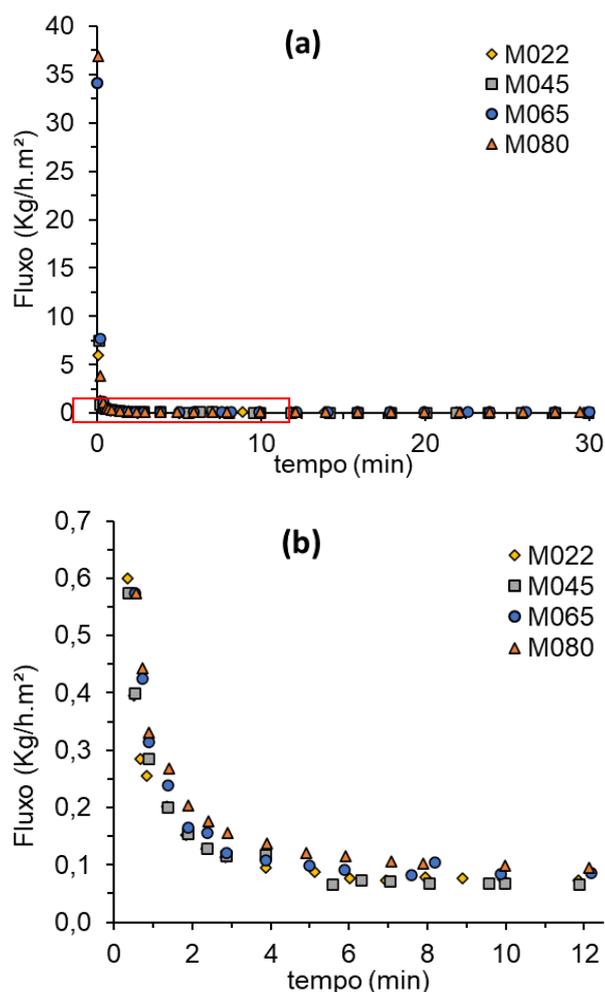
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos de filtração do extrato enzimático centrifugado foram conduzidos com o propósito de avaliar dois parâmetros críticos: o diâmetro de poro da membrana e a pressão transmembrana.

5.1 Influência do diâmetro de poros da membrana na microfiltração do extrato enzimático centrifugado

Na Figura 4 é apresentado o comportamento do fluxo de permeado ao longo do tempo durante a microfiltração do extrato enzimático centrifugado utilizando membranas de diferentes diâmetros de poro. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (25°C) e pressão transmembrana de 2 kgf.cm^{-2} .

Figura 4 – Fluxo permeado em função do tempo para a microfiltração do extrato enzimático centrifugado utilizando membranas com diferentes diâmetros de poro: a) Fluxo dos 30 minutos de experimento, b) Ampliação da região demarcada na figura 4a. ($T=25^{\circ}$ e $P=2\text{Kgf.cm}^{-2}$).



Fonte: autoria própria, 2023.

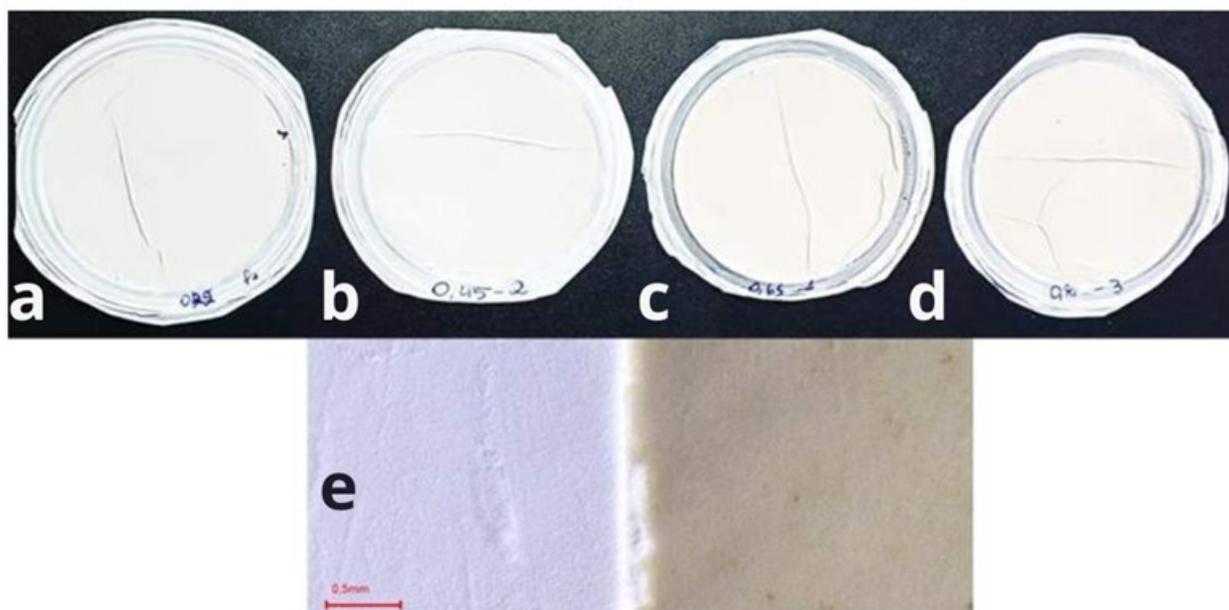
Na Figura 4(a) é apresentada a variação do fluxo de permeado ao longo de 30 minutos de experimentos. Pode-se observar um comportamento semelhante do fluxo permeado para as membranas com diferentes diâmetros de poro. Nos primeiros segundos ocorre um rápido decaimento do fluxo e, depois disso, o fluxo diminui lentamente, tendendo a estabilização a partir de 8 minutos com valores entre 0,067 e 0,083 Kg.h⁻².m⁻², como pode ser observado na Figura 4(b). Este comportamento indica a formação, praticamente instantânea, de uma camada secundária de filtração na superfície da membrana que oferece uma resistência adicional ao fluxo do permeado.

O fenômeno conhecido como *Fouling* é uma ocorrência comum em processos de filtração, e é caracterizado pela aderência de compostos presentes na alimentação que provocam um aumento na resistência ao fluxo de permeado.

De fato, Mercier-Bonin et.al (2002) também observaram a formação de uma camada secundária de filtração nos experimentos de microfiltração de uma suspensão de levedura e invertase usando membranas tubulares cerâmicas e membranas planas.

Na Figura 5 são apresentadas as imagens das membranas após a microfiltração do extrato centrifugado.

Figura 5 - Imagens das membranas após a microfiltração do extrato centrifugado na pressão de 2Kgf.cm⁻²: a) M022; b) M045; c) M065; d) M080; e) comparação entre a membrana limpa e suja.



Fonte: autoria própria, 2023.

De fato, as imagens apresentadas na Figura 5 demonstram o depósito de uma fina camada de material coloidal, presente no extrato enzimático que não foi completamente removido no processo de centrifugação.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados de desempenho das membranas na microfiltração do extrato centrifugado.

Tabela 2- Desempenho das membranas na microfiltração do extrato centrifugado (T = 25 °C e P = 2 Kgf.cm⁻²).

Corrente/Membrana		Proteína (µg/100mL)	% de Rejeição	Fluxo* (kgf.cm ⁻²)	Índice de <i>Fouling</i>
Alimentação		7,979	-	-	-
Permeado	M022	1,891	76,30	0,0705	99,21
	M045	1,584	0,15	0,0675	99,48
	M065	2,541	68,15	0,0770	99,85
	M080	2,967	62,82	0,0835	99,71

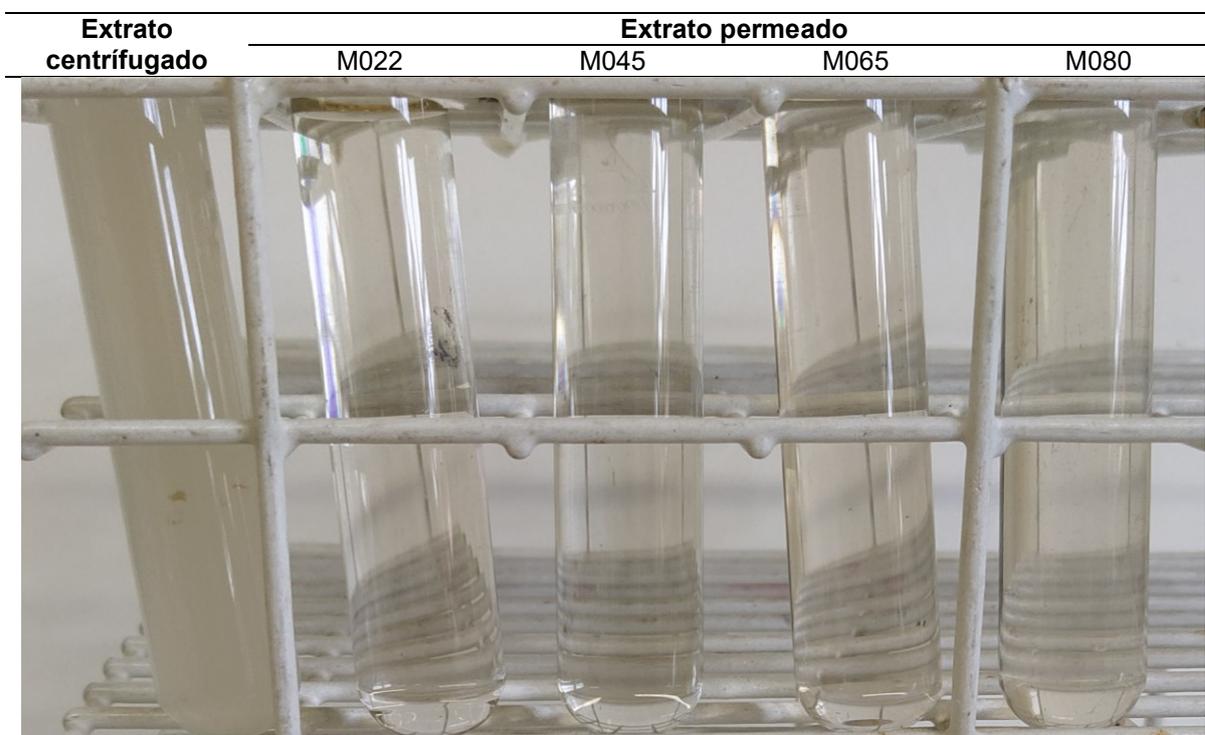
*Fluxo estabilizado (entre 20 e 30 minutos de experimento)

Fonte: autoria própria, 2023.

Pode-se observar que as membranas com diâmetros de poro maiores apresentaram menor rejeição, indicando que mais proteínas estavam presentes no extrato permeado. Os fluxos de permeado estabilizado (entre 20 e 30 minutos de experimento) apresentaram valores próximos para as quatro membranas, que pode ser atribuído a camada secundária de filtração formada na superfície das membranas que possui papel determinante no fluxo de permeado, ao invés do diâmetro de poro. Essa camada é fortemente aderida a superfície da membrana, conforme indicado pelos altos índices de *Fouling* (acima de 99,2%), demonstrando a obstrução quase que total dos poros, reduzindo consideravelmente a permeabilidade da água pura.

Os aspectos visuais do extrato enzimático centrifugado (alimentação) e os extratos permeados, são mostrados na Figura 6. Pode-se observar que o processo de centrifugação do extrato enzimático bruto não removeu completamente o material em suspensão, uma vez que, o extrato centrifugado apresentou turbidez visual. Por outro lado, as membranas demonstraram eficácia ao reter partículas, resultando em uma notável diminuição na turbidez visual.

Figura 6- Aspectos visuais do extrato enzimático centrifugado (alimentação) e extrato enzimático permeado obtido nos experimentos com diferentes membranas (T = 25 °C e P = 2 Kgf.cm⁻²).



Fonte: Autoria própria, 2023

Observou-se que o permeado da M022 exibiu uma maior limpidez, indicando uma retenção mais eficaz de partículas. Esta observação sugere que o tamanho de poro menor dessa membrana foi mais eficiente em reter partículas indesejadas, contribuindo para um permeado mais claro em comparação com a M080, que apresentou uma leve turbidez residual.

5.2 Influência de diferentes pressões na microfiltração do extrato enzimático centrifugado.

Na Figura 7 são apresentados os fluxos de permeado em função do tempo para cada membrana nos experimentos com diferentes pressões.

Novamente, verificou-se que para todas as membranas, a microfiltração do extrato enzimático centrifugado foi caracterizada por um significativo declínio do fluxo devido ao *Fouling* da membrana combinado com a deposição de material coloidal na superfície da membrana.

Figura 7 – Fluxo permeado em função do tempo para a microfiltração do extrato enzimático centrifugado aplicando diferentes pressões: a) M022, c) M045, e) M065 e g) M080. b), d), f) e h) são uma ampliação da região demarcada nas figuras a), c), e) e g), respectivamente.

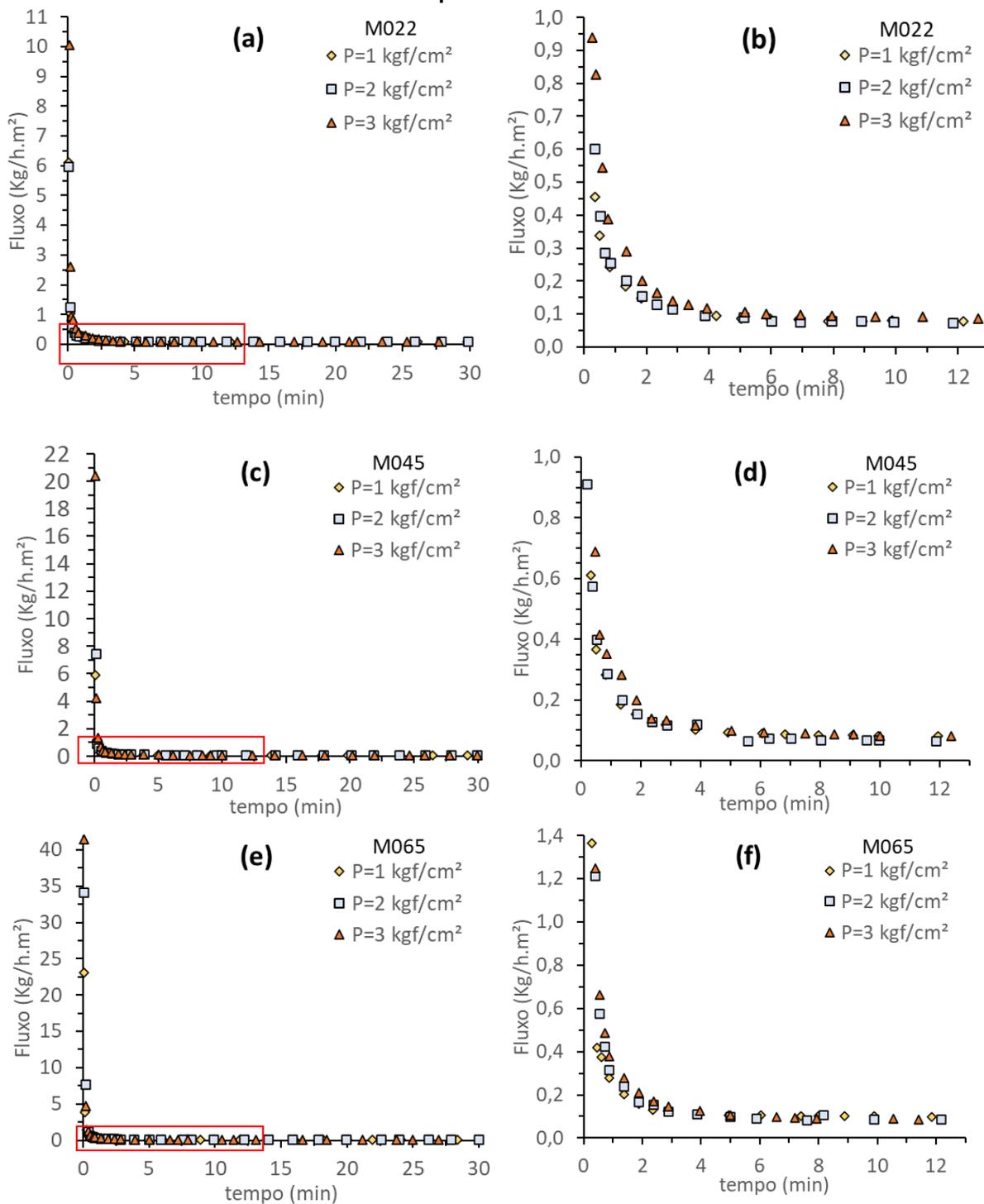
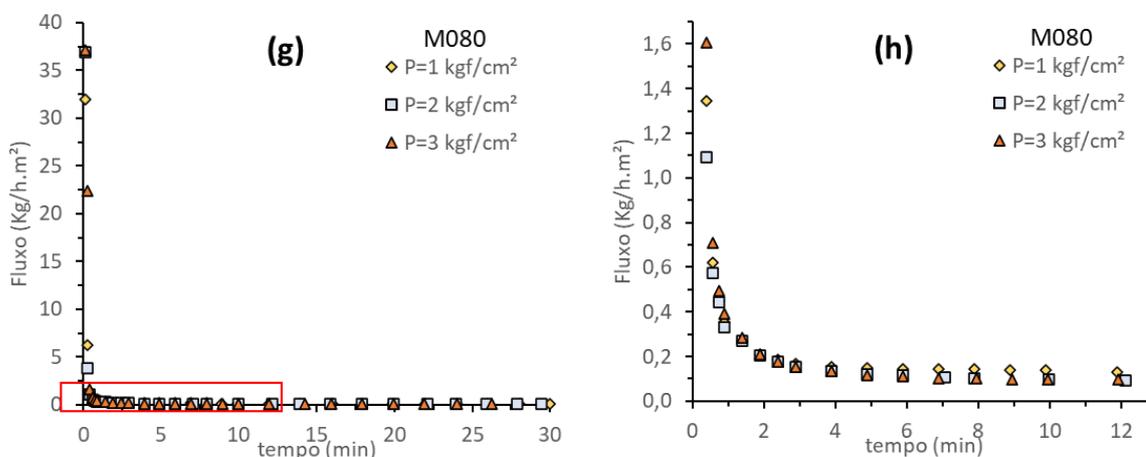


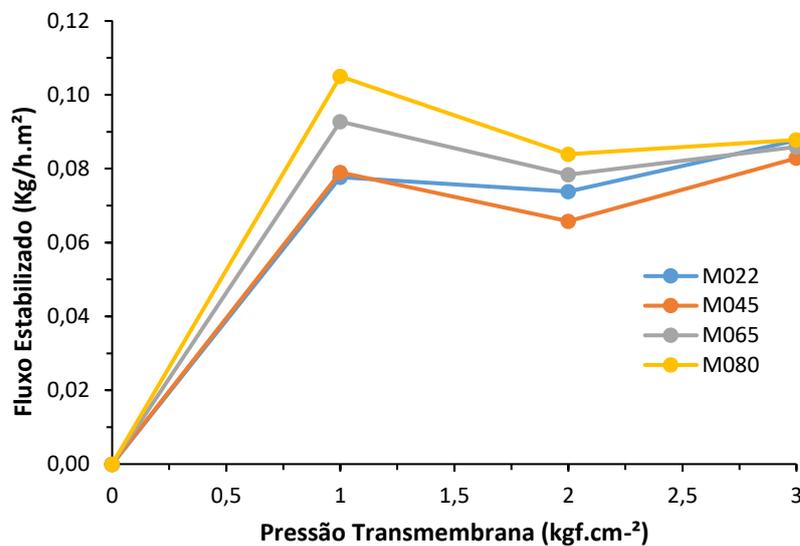
Figura 7 – Fluxo permeado em função do tempo para a microfiltração do extrato enzimático centrifugado aplicando diferentes pressões (continuação).



Fonte: Autoria própria, 2023

Na Figura 8 é apresentado o fluxo médio permeado, calculado entre 20 e 30 minutos da microfiltração em função da pressão transmembrana.

Figura 8 – Fluxo permeado em função do tempo para a microfiltração do extrato enzimático centrifugado aplicando diferentes pressões.



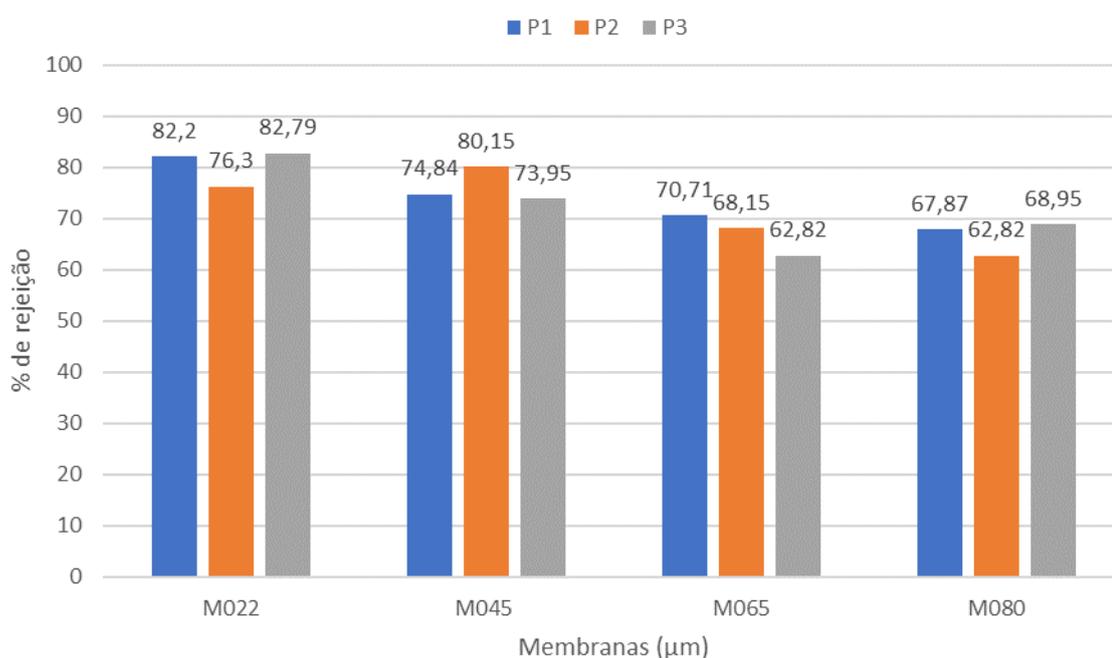
Fonte: Autoria própria, 2023.

Pode-se observar que, em baixas pressões de operação, o fluxo permeado aumenta com o aumento da pressão transmembrana para todas as membranas. O fluxo permeado alcança um valor máximo na pressão de 1 kgf.cm⁻² para as membranas de poros maiores (M065 e M080) e gradualmente diminui com um incremento na pressão. Para as membranas de poros menores (M022 e M045) há um leve aumento do fluxo com o aumento da pressão. Este comportamento pode ser

atribuído a compactação, em pressões maiores, da camada de *Fouling* formada na superfície da membrana. Quanto maior a pressão exercida sobre estas camadas maiores a resistência adicional ao fluxo permeado. Mercier-Bonin et al., (2002) também observam um aumento na resistência adicional ao fluxo com o aumento da pressão.

A Figura 9 apresenta o percentual de rejeição de proteína nos experimentos de filtração com diferentes pressões.

Figura 9 - Desempenho das membranas nos experimentos com diferentes pressões.



Fonte: Autoria própria, 2023.

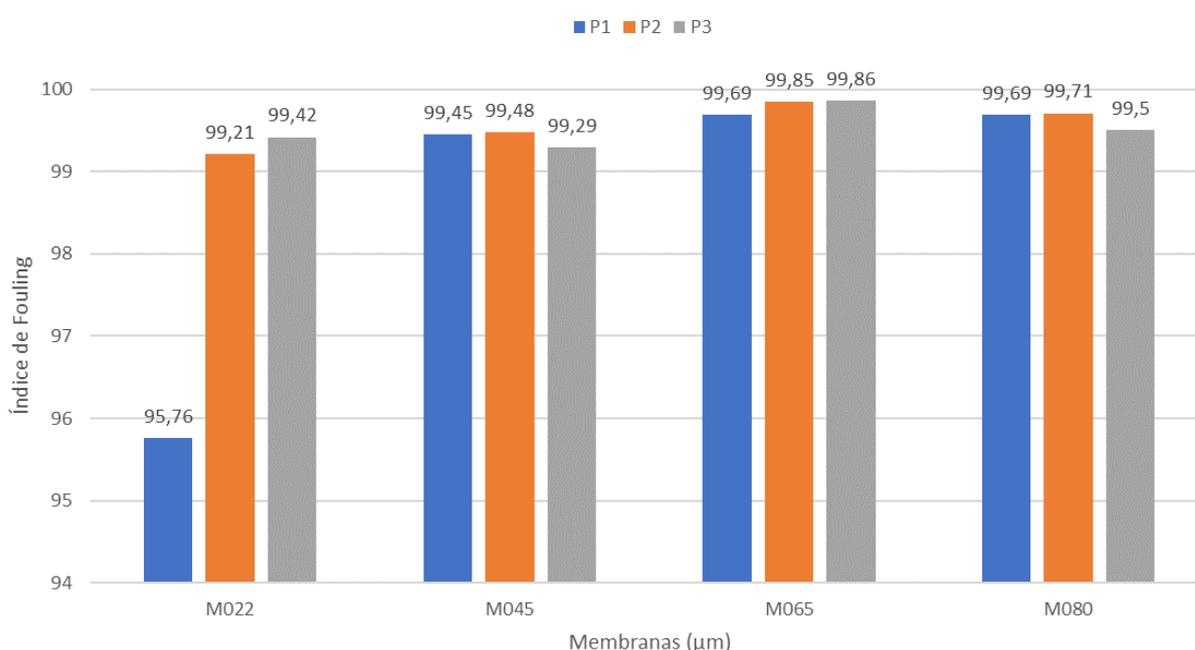
Pode-se observar que, de uma forma geral, os maiores percentuais de rejeição de proteína ocorreram para as membranas de poros menores. Aparentemente, o diâmetro de poro da membrana teve maior efeito na rejeição de proteína do que a pressão transmembrana.

Mercier-Bonin et al., (2002) observaram para a solução somente enzimática, mostrou um rápido aumento na rejeição da enzima durante os primeiros minutos de filtração aumentando gradualmente para 70% durante o resto do experimento. De acordo com os autores, a formação de incrustações externas pode ocorrer neste período. Esta maior rejeição enzimática deveu-se, portanto, provavelmente à camada

externa de incrustação, que tinha uma permeabilidade muito baixa para moléculas de invertase.

Na Figura 10 são apresentados os índices de *Fouling* nas três pressões estudadas. Os experimentos realizados na menor pressão (1 kgf.cm⁻²) apresentaram menor índice de *Fouling*, indicando uma menor compactação da camada secundária de filtração. Esse comportamento ficou mais evidenciado para as membranas de poros menores.

Figura 10- Índice de *Fouling* das membranas nos experimentos com diferentes pressões.



Fonte: Aatoria própria, 2023.

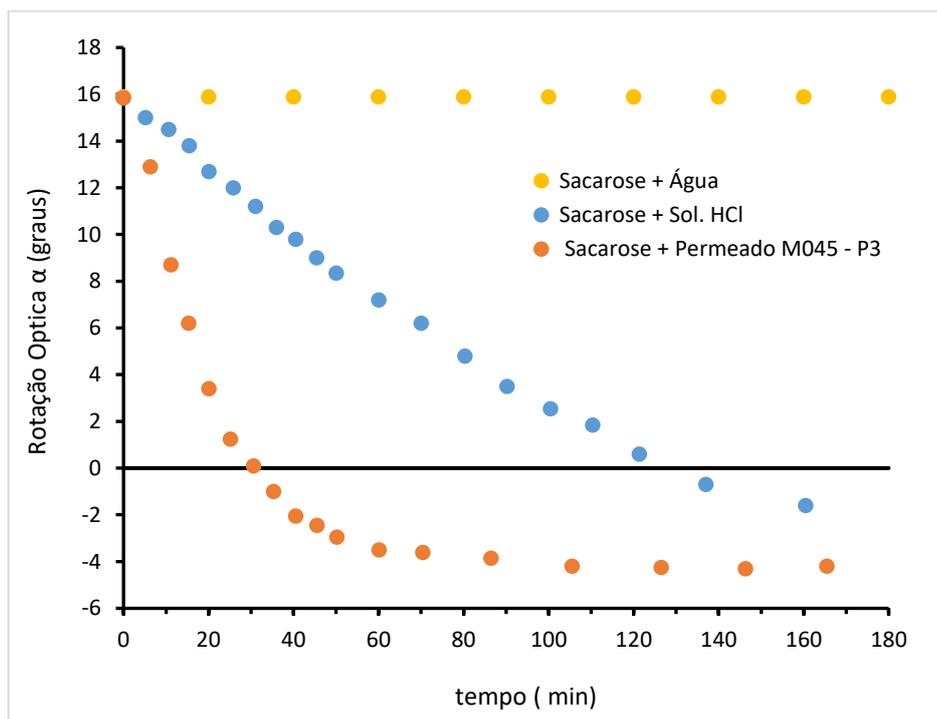
De acordo com Mercier-Bonin et al., (2002) que estudaram a microfiltração de soluções proteicas com ou sem adição de levedura, o declínio inicial pode ser devido à incrustação interna da membrana causada por agregados proteicos (que representam uma fração muito pequena da proteína total) que se depositam no seu interior, nos poros ou perto das entradas dos poros. Uma vez que a incrustação interna é substancial (de modo que os poros ficam altamente bloqueados ou contraídos), a proteína rejeitada começa a formar uma camada na superfície externa da membrana.

5.3 Avaliação da hidrólise da sacarose utilizando o extrato enzimático permeado

A Figura 11 apresenta o comportamento da hidrólise da sacarose, por meio da rotação óptica, em função do tempo. Foi avaliado a hidrólise ácida (utilizando HCl 1,4 mol.L⁻¹) e a hidrólise enzimática utilizando extrato permeado, obtido nos experimentos de filtração com a membrana M045 (pressão de 3 Kgf.cm⁻²).

Nos experimentos, os valores de pH das soluções de sacarose após a adição de água destilada, solução de HCl 1,4 mol.L⁻¹ ou extrato enzimático permeado foram de 6,39, 0,18 e 6,12, respectivamente. Assim, o valor de pH no experimento com o extrato permeado foi próximo ao da água destilada, indicando que a reação de ocorreu por ação enzimática e não ácida.

Figura 11- Comportamento da rotação óptica da solução na reação de hidrólise da sacarose usando HCl 1,4 mol.L⁻¹ e o extrato enzimático permeado da membrana M045.



Fonte: Autoria própria, 2023.

Os resultados observados nos experimentos com a solução de sacarose + água indicou que não houve mudança na rotação óptica durante o tempo do experimento. Em meio ácido, observou-se uma variação gradual na rotação óptica em função do tempo, indicando a inversão da sacarose. Entretanto, a utilização do extrato enzimático permeado propiciou um aumento na velocidade de reação, atingindo o equilíbrio a partir de 90 minutos de reação.

Assim, demonstra-se que o extrato permeado possui atividade enzimática atuando como catalisador na reação da inversão da sacarose. Esse resultado é coerente com os resultados obtidos por Rodriguez et al. (2000), que também exploraram a atividade enzimática, incluindo a inversão da sacarose, utilizando extratos de levedura. O estudo indicou que extratos permeados possuem a capacidade de atuar como catalisadores eficazes na hidrólise da sacarose.

Embora a observação qualitativa realizada neste estudo demonstre a eficácia enzimática do extrato permeado, outros experimentos são necessários para uma avaliação quantitativa da atividade enzimática, avaliando a formação da glicose a partir de diferentes concentrações de sacarose. Além disso a avaliação dos parâmetros cinéticos como a constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) poderão ser obtidos e comparados com os dados da literatura.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi avaliado a aplicação da microfiltração por membranas no processo de obtenção da enzima invertase proveniente da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Dois parâmetros do processo foram avaliados: diâmetro de poro e pressão transmembrana.

O processo de microfiltração do extrato enzimático centrifugado apresentou resultados semelhantes para as membranas de diferentes diâmetros de poro. Houve um decaimento acentuado do fluxo de permeado indicando a formação de uma camada secundária proveniente do material coloidal que estava na alimentação (extrato centrifugado). Esta camada foi responsável por altos índices de *Fouling* nas membranas que ocasionaram baixos fluxos estabilizados de permeado.

O percentual de rejeição de proteínas foi mais significativo para as membranas de poros menores, indicando que o diâmetro do poro teve um impacto maior do que a pressão transmembrana na capacidade de retenção de proteínas. Além disso, a compactação da camada de *Fouling* nas membranas, especialmente nas de poros menores, aumentou com a pressão, evidenciando uma resistência adicional ao fluxo permeado.

A aplicação do extrato enzimático permeado na reação de inversão da sacarose, em comparação com a capacidade catalítica da inversão ácida, demonstrou perspectivas promissoras para seu uso em processos industriais. No entanto, faz-se necessário a realização de estudos quantitativos da atividade enzimática do extrato permeado.

Portanto, embora este estudo ofereça informações valiosas, futuros experimentos são necessários para melhorar o potencial da microfiltração na obtenção eficiente de enzimas para diversas aplicações industriais.

REFERÊNCIAS

- ABDELRASOUL, A. **Advances in membrane technologies**. London: Intechopen, 2020.
- ARORA, N. K.; MISHRA, J.; MISHRA, V. **Microbial enzymes: roles and applications in industries**. Singapore: Springer, 2020.
- BAKER, R. W. **Membrane Technology and Applications**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2004.
- BARBOSA, P. M. G. et al. Biochemical characterization and evaluation of invertases produced from *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 and *Rhodotorula mucilaginosa* for the production of fructooligosaccharides. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 48, n. 6, p. 506–513, 22 jun. 2018.
- BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- GUPTA, V. K. **Microbial Enzymes in Bioconversions of Biomass**. [s.l.] Cham Springer International Publishing, 2016.
- HABERT, A. C. **Processos de separação por membranas**. Rio De Janeiro: E-Papers, 2006.
- ISMAIL, A. F. et al. **Membrane Separation Principles and Applications**. [s.l.] Elsevier, 2018.
- IULIANELLI, A. **Membrane and Membrane Reactors Operations in Chemical Engineering**. [s.l.] MDPI, 2019.
- KULSHRESTHA, S. et al. Invertase and its applications – A brief review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 9, p. 792–797, set. 2013.
- LEHNINGER, A. L. et al. **Lehninger principles of biochemistry**. 7. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2017.
- MACHADO, J. R. et al. One-Step Ultrafiltration Process for Separation and Purification of a Keratinolytic Protease Produced with Feather Meal. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2018, p. e6729490, 28 jun. 2018.
- MATSUURA, T. **Synthetic Membranes and Membrane Separation Processes**. [s.l.] CRC Press, 2020.
- MERCIER-BONIN, M.; C. FONADE. Enzyme recovery during gas/liquid two-phase flow microfiltration of enzyme/yeast mixtures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 80, 20 dez. 2002.

Merck Millipore | Ciências da Vida | Produtos Químicos para Indústrias e Laboratórios | Disponível em: <<https://www.merckmillipore.com/BR/pt>>. Acesso em: 02 nov. 2023.

MULDER, M. **Basic principles of membrane technology**. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ, 2010.

MURRAY, R. K. et al. **Bioquímica ilustrada de Harper**. Porto Alegre: Amgh, 2014.

OLIVEIRA, R. M.; COELHO, I. M. Membrane Technology for the Purification of solutions: a review. Separation and Purification Technology. **Journal of Science**, v. 209, 2019.

PANG, W. C.; RAMLI, A. N. M.; JOHARI, N. D. Structural Properties, Production, and Commercialisation of Invertase. **Sains Malaysiana**, v. 48, n. 3, p. 523–531, 31 mar. 2019.

PAPADAKI, E. et al. Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acid-enzymes production process. **Bioresource Technology**, v. 309, p. 123317, ago. 2020.

PÉREZ, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose, and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53–63, 27 abr. 2002.

RODRÍGUEZ, J. A.; AGUILAR, C. F.; PÉREZ PADILLA, A. Enzyme preparation with invertase activity from yeast cell lysate using tangential flow filtration. **Desalination**, v. 130, n. 2, p. 131–136, nov. 2000.

SHANKAR, T. **Invertase Production by *Saccharomyces Cerevisiae***. [s.l.] Lap Lambert, 2017.

SINGH, S. P. et al. **BIOMASS, BIOFUELS, BIOCHEMICALS: advances in enzyme catalysis and**. [s.l.] Elsevier, 2020.

SRIVASTAVA, N. Production of Food-Processing Enzymes from Recombinant Microorganisms. **Enzymes in Food Biotechnology**, p. 739–767, 2019.

SUZUKI, H. **How Enzymes Work**. [s.l.] CRC Press, 2019.

THATOI, H. N. **Microbial fermentation and enzyme technology**. Boca Raton: CRC Press, 2020.

TIMERMAN, A. P. The Isolation of Invertase from Baker's Yeast – An Introduction to Protein Purification Strategies. **Protein Purification**, 20 jan. 2012.

TORALLES, R. P. et al. EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE INVERTASE DE LEVEDURA DE PURÊ E RESÍDUO DE PÊSSEGO. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 2, 22 jun. 2014.

WALKER, J. M. **Basic protein and peptide protocols**. Totowa, N.J.: Humana Press, 1994.

ZHANG, Z.; DONALDSON; MA. Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 4, p. 913–919, jul. 2012.