



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

PRODUÇÃO DA ENZIMA ALFA-ACETOLACTATO DESCARBOXILASE POR FERMENTAÇÃO MICROBIANA: ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DE ETAPAS DE PRÉ- PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

K. P. DOS SANTOS¹, M. V. L. SOARES¹, R. M. J. GONÇALVES¹, B. PESSELA², V. M. M.
MELO³, L. R. B. GONÇALVES¹

¹ Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química

² Universidad Autónoma de Madrid, Centro de Investigación en Ciencia de la Alimentación

³ Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Biologia

E-mail para contato: kimberleps@gmail.br

RESUMO –Dentre as diversas substâncias formadas durante o processo fermentativo de indústrias de bebidas, uma substância de particular interesse é o diacetil, que pode conferir à bebida um sabor desagradável, quando se encontra em concentração acima de 0.5 ppm. O processo de remoção desse composto pela sua conversão em acetoína pode ser catalisado pela enzima alfa-acetolactato descarboxilase (ALDC). No presente estudo, a enzima ALDC foi obtida pela fermentação utilizando Bacillus subtilis, que a produz de forma intracelular. O trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de etapas de pré-purificação através da precipitação com o sal sulfato de amônio em três faixas percentuais diferentes (0 - 30%, 30% - 60% e 60% - 90%) seguidas de diálise. O precipitado oriundo da porcentagem 60% - 90% foi o que proporcionou maiores valores de atividade catalítica e atividade específica, 48,3 U/mL e 251,7 U/ mg de proteína, respectivamente.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produção de bebidas

Durante o processo de produção de cerveja, os micro-organismos responsáveis pelo processo fermentativo, leveduras do gênero Saccharomyces, produzem de forma extracelular o α -acetolactato como metabólito essencial para o crescimento celular (BONCIU e STOICESCU, 2007). Essa substância pode sofrer oxidação, através de um processo lento, não enzimático, mas dependente da temperatura, que causará uma descarboxilação, resultando em um composto carbonílico, o diacetil. Este, por sua vez, sofrerá catálise, durante a etapa de maturação, de enzimas redutases presentes na levedura e será convertido à acetoína (YUNRUI e JIYUAN, 1997).

O composto diacetil, dependendo da concentração em que está presente pode conferir à bebida

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

um sabor “amanteigado” desagradável. A formação desse composto durante o processo fermentativo é desvantajosa, porque mesmo após a ação de redutases na etapa de maturação da bebida, se houver ainda a presença de diacetil, mesmo em concentrações baixas (0,10 - 0,15 mg/ litro de bebida) o seu sabor pode ser perceptível (OLSEN e AUNSTRUP, 1986).

Durante a etapa de maturação, a bebida deve alcançar níveis aceitáveis de diacetil para poder prosseguir para a etapa de filtração. A remoção de diacetil é, portanto, uma etapa limitante no processo de produção de bebidas podendo, assim, reduzir o tempo de maturação e, portanto, o tempo total de produção (BONCIU e STOICESCU, 2007).

Para contornar o problema da presença de diacetil (até certos níveis de concentração) ao final da produção da bebida, pode-se diminuir a formação de α -acetolactato ou acelerar a redução do diacetil à acetoína (YUNRUI e JIYUAN, 1997). Uma maneira alternativa de reduzir a presença do diacetil, é a utilizando a enzima microbiana α -acetolactato descarboxilase (ALDC) que converte o α -acetolactato diretamente em acetoína, não formando ou reduzindo a formação do diacetil (BONCIU e STOICESCU, 2007).

1.2. Produção da enzima ALDC

A enzima α -acetolactato descarboxilase tem como substrato principal o α -acetolactato e catalisa a reação de descarboxilação desse composto para a formação de acetoína através de uma redução oxidativa.

A ALDC pode ser produzida por fermentação utilizando vários micro-organismos. Essa enzima pode ser encontrada em diversas bactérias, como *Lactococcus lactis* (GOUPIL-FEULLERAT. et al., 2000), *Bacillus licheniformis* (QIN et al., 2000) e *Bacillus subtilis* (GUO, et al., 2001). As provenientes do gênero *Bacillus* são as que mais se adequam à utilização nas indústrias produtoras de bebidas (OLSEN e AUNSTRUP, 1986).

O presente trabalho avaliou a produção da enzima ALDC por *Bacillus subtilis* por fermentação submersa. A enzima produzida por esse micro-organismo é intracelular. Além de produzida e extraída da célula após a quebra da parede celular, a enzima deve ser, também, purificada.

1.3. Etapas de pré-purificação do extrato enzimático

Após a quebra da parede celular e separação de todas as partículas insolúveis do meio fermentativo, e enzima produzida permanece solubilizada em seu extrato, juntamente com diversas outras substâncias. Alguns dos métodos de se concentrar a proteína de interesse no extrato são a precipitação e a diálise.

Precipitação: Essa técnica baseia-se na diferença de solubilidade das diferentes proteínas produzidas pelo micro-organismo em estudo, a qual depende de interações da proteína com o solvente (água) e com os sais presentes em solução. A adição de sais inorgânicos neutros promove uma precipitação seletiva de proteínas presentes no extrato. O sulfato de amônio, $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, é um sal de

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

elevada aplicação em precipitação de enzimas devido ao seu baixo custo e fácil obtenção, atuando, por vezes, como estabilizante no processo de estocagem e armazenamento de enzimas comerciais (BIOSE-UFRJ).

Diálise: A separação por diálise baseia-se na diferença de tamanho das diversas partículas solúveis presentes no extrato. Uma membrana semipermeável é utilizada a fim de reter as proteínas (macromoléculas), permitindo a passagem de moléculas menores como os sais presentes no meio fermentativo e também os que foram adicionados para precipitação. Essa técnica é, portanto, útil tanto para purificação quanto para dessalinização do extrato enzimático (DEBIQ-EEL-USP).

2. MATERIAS E MÉTODOS

2.1. Fermentação e extração da enzima

A cepa do micro-organismo utilizado é pertencente à coleção de bactérias do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. O micro-organismo era mantido em meio ATGE (ágar 15,0 g.L⁻¹, triptona 5,0 g.L⁻¹, glicose 5,0 g.L⁻¹ e extrato de levedura 2,5 g.L⁻¹, esterilizado por 15 min à 121 °C).

O meio fermentativo foi preparado com os componentes apresentados na Tabela 1. Após a mistura de todos os componentes em meio aquoso, o meio foi esterilizado à 110 °C por 10 min.

Tabela 1- Componentes do meio fermentativo para produção de ALDC

Componente	Concentração (g. L ⁻¹)
Fosfato Monossódio	1.00
Fosfato de Potássio Dibásico	1.00
Sulfato de Amônio	2.50
Cloreto de Sódio	0.25
Sulfato de Magnésio	0.20
Cloreto Férrico	0.04
Sulfato de Manganês	0.25
Glicose	10.0
Extrato de Levedura	3.00

O inóculo foi preparado com o mesmo meio fermentativo. 3 alçadas foram inseridas em meio e depois incubados à 37 °C e 150 rpm, por 24 horas. Após as 24 horas, o inóculo foi, então, inserido no meio fermentativo em uma proporção de 10% em volume. A fermentação foi realizada em

PROMOÇÃO



REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



erlenmeyers de 250 mL de volume contendo 150 ml de meio fermentativo + 15 mL de inóculo (165 mL no total) e colocados em shakers a 37 °C e 150 rpm, durante 24 horas. Após o tempo de fermentação, o meio foi, então, centrifugado a 5000 rpm e 4 °C por 15 min para separar as células do meio fermentativo.

Adicionou-se tampão MES pH 6, 50mM, às células. A solução de células foi colocada em banho de gelo e, então, submetida a ondas ultrassônicas para rompimento da parede celular e extração da enzima intracelular. Uma nova centrifugação foi realizada, (6000 rpm e 4 °C, por 30 min) para eliminar os resquícios de células do extrato enzimático.

2.2 Etapas de pré-purificação

Precipitação de proteínas do extrato bruto com sulfato de amônio (0-90%): após a extração celular, adicionou-se sulfato de amônio (variando de 0-90%, com intervalos de 30%) lentamente à solução enzimática a uma temperatura de aproximadamente 4 °C, sob agitação constante e a solução salinizada foi deixada na geladeira "overnight". Primeiramente o sal foi adicionado com uma faixa percentual de 0-30%. O precipitado foi então separado para posterior diálise. Ao sobrenadante foi, então, adicionado sulfato de amônio numa faixa percentual de 30-60%. O precipitado foi novamente separado para diálise. Ao sobrenadante foi adicionado sal numa faixa percentual de 60-90%. O precipitado foi novamente separado para posterior diálise, bem como o sobrenadante.

Diálise: aos 3 materiais precipitados obtidos (precipitado de 0-30%, precipitado de 30-60%, precipitado de 60-90%) foi adicionado tampão MES. As 3 soluções de precipitados e a solução de sobrenadante foram submetidas à diálise para eliminar o sulfato de amônio da solução enzimática. Foi feita diálise da solução desse extrato de ALDC parcialmente purificada, em membrana de poros de 12 – 16 KDa, semipermeável próprio para diálise, contra água contida num béquer, por 24 horas, com agitação.

2.3 Medida de atividade enzimática e quantificação de proteína

A medida de atividade foi baseada no método de Stormer, 1975. O método baseia-se na quantificação colorimétrica de produto formado pela catálise enzimática, a acetoína, que reage com uma solução de creatina e 1-naftol para formar uma solução de coloração rosada. A leitura foi feita em espectrofotômetro com comprimento de onda de 522 nm. A atividade é dada em U/mL onde 1 U é a quantidade de enzima capaz de formar 1 µmol de acetoína por minuto à pH 6 e 30 °C.

A quantificação de proteínas presentes no extrato foi realizada pelo método de Bradford e é dada em mg proteína/ ml de solução.

A atividade específica de cada extrato é dada pela equação 1.

$$\textit{Atividade específica} \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{\textit{Atividade enzimática} \left(\frac{U}{mL} \right)}{\textit{Concentração de proteínas} \left(\frac{mg}{mL} \right)} \quad (1)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A precipitação com sulfato de amônio foi feita a fim de se concentrar mais a solução do extrato bruto, portanto diminuir a concentração de outras proteínas em solução. Esse processo foi realizado em várias concentrações de sulfato de amônio (0-90%) e o de melhor resultado foi o de 60-90% em sulfato de amônio (Figura 1). Pode-se notar que ao se usar o método de purificação enzimática com sulfato de amônio na concentração de 60-90%, o mesmo apresentou melhores resultados quando comparado as demais precipitações e ao sobrenadante final. Ainda com base na Figura 1, percebe-se que no sobrenadante ainda restou uma quantidade da enzima de interesse, embora a maior parte dela tenha precipitado na fração 60-90%.

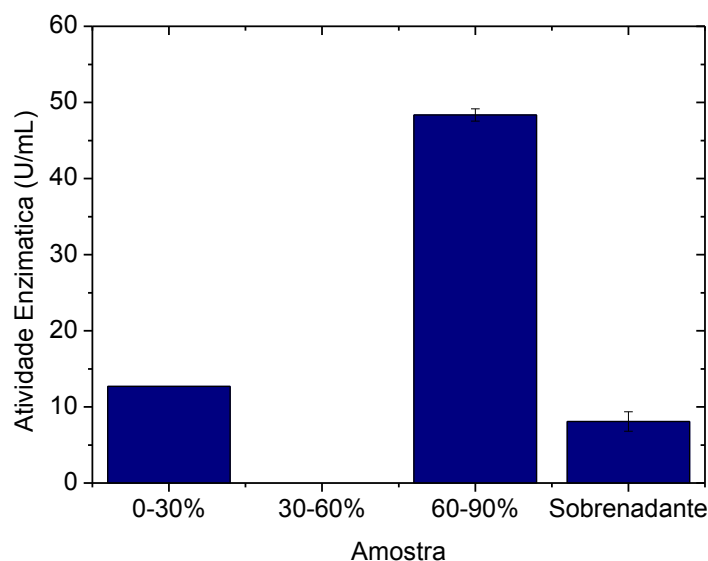


Figura 1 – Atividade enzimática em U/mL das frações de precipitação e sobrenadante final.

Na Figura 2, tem-se a atividade específica obtida em cada fração de precipitação, bem como no sobrenadante final, e pode-se perceber que, embora a fração 60-90% tenha uma elevada atividade específica, no sobrenadante final ainda há uma concentração elevada da enzima em estudo, sendo necessário que, após a purificação com sulfato de amônio, seguido de diálise, seja feita alguma outra etapa de purificação como, por exemplo, cromatografia, a fim de deixar o extrato com a menor quantidade possível de outras proteínas que não são de interesse. Thompson, et al. (1970) também utilizaram o sulfato de amônio para purificar a ALDC proveniente de *Aerobacter aerogenes* e obteve 117.6 U/mg, utilizando 50% do sal, e essas diferenças na faixa de precipitação podem ser devido a utilização de micro-organismos diferentes.

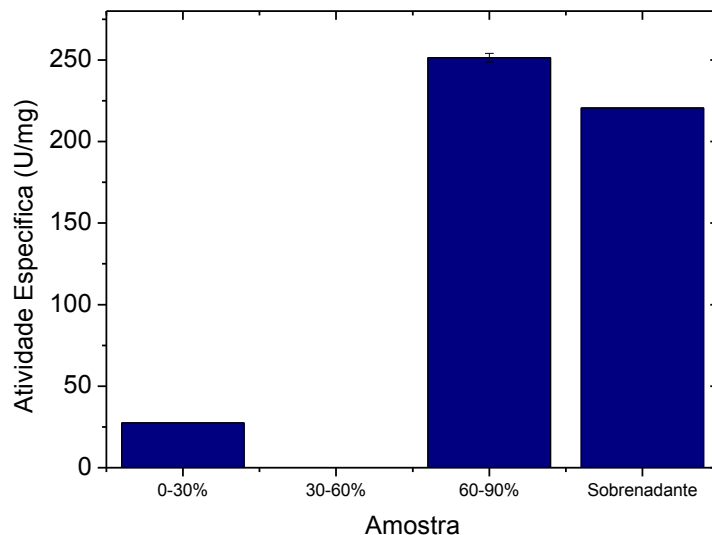


Figura 2 – Atividade específica da enzima nas frações e sobrenadante final, em U/mg de proteína.

O processo de precipitação de enzimas presentes em um extrato ocorre pela interação do sal adicionado com essas proteínas e pela mudança na solubilidade das mesmas no meio. A concentração necessária para precipitação de uma determinada enzima depende de fatores como peso molecular e grupos funcionais presentes na estrutura da enzima. Uma mesma enzima produzida por micro-organismos distintos pode apresentar algumas diferenças em seus grupos funcionais e, assim, o comportamento da solubilidade de cada uma delas, frente ao processo de precipitação com sulfato, será diferente. Assim, a precipitação utilizando uma certa porcentagem de sal pode ser eficiente para a enzima proveniente de um determinado micro-organismo, mas ineficiente para a enzima proveniente de outro, sendo necessário um aumento ou diminuição da concentração de sal durante o processo de precipitação desta.

Os processos realizados neste trabalho constituem em etapas de pré-purificação. Para se obter resultados que expressem melhor o comportamento da enzima frente a processos mais eficientes de purificação, faz-se necessário a utilização de outras técnicas mais avançadas, como as dos processos cromatográficos.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que a pré-purificação com sulfato de amônio concentrou bastante a proteína de interesse, na fração de 60-90%, com valor de atividade específica de aproximadamente 250 U/mg, porém faz-se necessário outro método de purificação posterior, uma vez que no sobrenadante final



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

ainda há elevada concentração da enzima em estudo, com atividade específica de 215 U/mg de proteína.

5. REFERÊNCIAS

- BIOSE-UFRJ: http://www.eq.ufrj.br/biose/nukleo/aulas/Enzimol%20Aplc/eqb706_aula_08.pdf acesso em: 11/02/2016.
- BONCIU, C.; STOICESCU, A. G. Research concerning the use of encapsulated Maturex for beer fermentation. *Ann. Univ. Dunarea de Jos of Galati*, v. 4, p. 82-86, 2007.
- BRADFORD, M. 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, 1976.
- DEBIQ-EEL-USP: http://www.debiq.eel.usp.br/aferraz/public_html/pagguiaE.htm acesso em: 11/02/2016.
- GOUPIL-FEULLERAT, N.; CORTHER, G.; GODON, J. J.; EHRLICH, S. D.; RENAULT, P. Transcriptional and Translational Regulation of α -Acetolactate Decarboxylase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of bacteriology*, v. 182, n. 19, p. 5399-5408, 2000.
- GUO, W.; HE, X.; TIE, C.; ZHANG, B. Expression of alpha-acetolactate decarboxylase gene from *Bacillus subtilis* in Brewer's yeast. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 41, pág.105–108.
- OLSEN, F.; AUNSTRUP, K. Alpha-acetolactate decarboxylase enzyme and preparation thereof. *U.S. Patent* n. 4,617,273, 1986.
- QIN, Y.J; GAO, D; WANG, Z.N. Alpha-acetolactate decarboxylase from *B. licheniformis* AS10106: cloning and expression gene in *E. coli* and *S. cerevisiae*. *Yi chuan xue bao. Acta genetica Sinica*, 2000; 27:165–169
- STORMER, F.C. *Methods in Enzymology*, 1975.
- THOMPSON, J. W.; SHOEVERS, J.; SANDINE, W. E.; ELLIKER, P. R. Enzymatic Removal of Diacetyl from Beer III. Enzyme Protection and Regeneration of Cofactor. *Applied microbiology*, v. 19, n. 6, p. 883-889, 1970.
- YUNRUI, Z.; JIYUAN, L. Diacetyl in Beer. *Food and Fermentation Industries*, v. 5, p. 010, 1997.

PROMOÇÃO



REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO

