



PRODUÇÃO DO AÇÚCAR ALTERNATIVO ISOMALTULOSE USANDO GLICOSILTRANSFERASE MICROBIANA – E PRODUÇÃO DE ENZIMAS UTILIZANDO MICRO-ORGANISMOS POR FERMENTAÇÃO

Ana Clara Ivanof de Oliveira – Escola Estadual Procópio Ferreira

Danielle Cândido Pedrosa – Escola Estadual Francisco Glicério

Mariane Daniele Munhoz (colaboradora) – Universidade Estadual de Campinas

Weysser Felipe Cândido de Souza (colaborador) – Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato (orientadora) – Universidade Estadual de Campinas

INTRODUÇÃO:

As enzimas são catalisadores biológicos de reações essenciais que estão presentes em todas as formas de vida, incluindo plantas, animais e micro-organismos (GURUNG *et al.*, 2013). Entre elas, as enzimas microbianas merecem destaque e têm sido bastante utilizadas devido as suas vantagens comparadas as enzimas de outras fontes, como rápido crescimento do micro-organismo, disponibilidade regular, maior estabilidade, baixo custo de obtenção e alto rendimento (RAVEENDRAN *et al.*, 2018). Na indústria de alimentos, as enzimas são bastante utilizadas para transformar matérias-primas em produtos principais, para modificar as características funcionais de um produto e/ou controlar ou melhorar processos alimentares (SOUZA & KAWAGUTI, 2021).

Inúmeras classes de enzimas podem ser produzidas por micro-organismos, como as carboidrases e proteases. Entre as carboidrases, são encontradas as amilases, invertases, β -galactosidades, β -glucosidases e glicosiltransferases (CONTESINI *et al.*, 2013). Estas últimas, as glicosiltransferases podem ser produzidas por *Erwinia* sp. e *Serratia plymuthica* e são utilizadas na produção de isomaltulose a partir da sacarose, um açúcar alternativo não cariogênico e mais estável que a sacarose, que é aplicado em refrigerantes, balas, chocolates e produtos lácteos (CARVALHO *et al.*, 2021). Já as proteases compreendem enzimas com alta seletividade e especificidade que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas para a modificação de proteínas. As proteases microbianas, como as produzidas por *Bacillus* sp. são bastante utilizadas na produção de hidrolisados proteicos comercializados como suplementos alimentares, produção de derivados lácteos como queijos e na panificação para modificação da rede de glúten e produção de produtos mais macios (AGUILAR & SATO, 2018). Além das proteases microbianas, proteases de origem vegetal como a papaína e bromelina são bastante utilizadas pela indústria de alimentos no amaciamento de carnes.

Devido à pandemia de Covid 19 e restrição às atividades presenciais no laboratório, assistimos aulas teóricas à distância sobre segurança no laboratório, uso de vidrarias e equipamentos, importância e aplicações de diversas enzimas e métodos de produção de enzimas. Assistimos também seminários semanais dos alunos de pós-graduação, graduação e pesquisadores convidados pelo Google meet. Para compreender o modo de ação da protease, testamos em casa o efeito da bromelina de abacaxi fresco em gelatina e nas proteínas de leite desnatado e também o efeito do tratamento térmico. Aprendemos sobre a produção de células de *Erwinia* sp. D12 contendo glicosiltransferase para a conversão de sacarose em isomaltulose e também sobre a produção de proteases por *Bacillus licheniformis* e determinação da atividade de protease.

Palavras-Chave: Glicosiltransferases, isomaltulose, proteases, bromelina

METODOLOGIA:

Estudo do efeito da bromelina de abacaxi em gelatina e proteínas do leite

Para compreender o modo de atuação de protease em proteínas testamos os efeitos da bromelina de abacaxi fresco e abacaxi submetido a tratamento térmico na gelatina e nas proteínas do leite. Cubos de um abacaxi fresco contendo bromelina ativa foram adicionados em dois copos de vidro, um copo contendo 200 mL de leite desnatado e outro copo contendo 200 mL de gelatina sabor limão. Para o teste da bromelina inativada, cubos de abacaxi fresco foram adicionados em uma panela contendo 750 mL de água e levados ao fogão para cozimento em fogo baixo até a evaporação de quase toda a água adicionada. Após esse processo, os cubos de abacaxi cozidos contendo a bromelina inativada foram adicionados a dois outros copos de vidro, um contendo 200 mL de leite desnatado e outro contendo 200 mL de gelatina de limão. Após a adição dos cubos de abacaxi nos substratos reacionais, todos os copos foram incubados em banho-maria contendo água morna para proporcionar uma temperatura ótima para a atividade da bromelina. Após a água esfriar, esta foi trocada por uma nova água morna e o processo foi repetido 3 vezes. Por fim, todos os copos foram acondicionados na geladeira até o dia seguinte e o resultado foi observado visualmente.

Os experimentos de produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D12 e aplicação na conversão de sacarose em isomaltulose e produção de protease de *Bacillus* sp. e determinação da atividade foi realizado por um aluno colaborador do projeto de iniciação científica e os resultados foram discutidos em reuniões à distância.

Produção de células de *Erwinia* sp. D12 produtora de glicosiltransferase e conversão da sacarose em isomaltulose

Foi utilizada a linhagem de *Erwinia* sp. D12, produtora de glicosiltransferase. Para a obtenção da massa celular, uma cultura jovem de *Erwinia* sp. D12 foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo otimizado por Kawaguti *et al.* (2006), composto por melaço de cana de açúcar (150 g/L), água de maceração de milho (20 g/L), extrato de levedura (15 g/L) e pH ajustado para 7,5. Os frascos foram incubados em agitador rotatório (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA), a 200 rpm, a 30°C, por 15 horas para obtenção do pré-inóculo, que foi transferido para um fermentador de 6,6 L Bioflo IIC (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) contendo 2.700 mL do mesmo meio de cultivo, adicionado de antiespumante. Após 24 horas de incubação a 200 rpm e 30 °C, a massa celular foi recuperada por centrifugação a 9.600 x g por 15 minutos, a 5 °C.

A conversão de sacarose em isomaltulose utilizando a massa celular de *Erwinia* sp. D12 contendo as glicosiltransferases foi realizada em frascos sob agitação. A massa celular foi ressuspendida em uma solução de sacarose 35% (m/v), na proporção de 1:9 (m:v) e incubada a 35 °C e 50 rpm em incubador-agitador durante 20 minutos de reação. Após o período reacional, as amostras foram centrifugadas a 9.600 x g por 15 minutos a 5 °C e o processo repetido com a massa celular restante durante quatro bateladas repetidas. Os sobrenadantes de cada batelada foram recolhidos para a determinação da conversão de sacarose em isomaltulose.

A quantificação de isomaltulose produzida foi acompanhada em um cromatógrafo DIONEX DX-600 (Dionex Corporation, 1228 Titan Way Sunnyvale, CA, EUA) equipado com bomba isocrática IP25 e detector eletroquímico de ouro ED50. A separação dos açúcares foi realizada utilizando-se coluna CarboPac™ PA 1 (4 mm x 250 mm), coluna de guarda CarboPac™ PA 1 (4 mm x 50 mm) e solução de hidróxido de sódio 250 mM como fase móvel, com fluxo de 1 mL/min, a 20°C. Os carboidratos foram analisados pelo tempo de retenção, por comparação com padrões de isomaltulose e sacarose (Sigma Ultra®, St. Louis, MO, EUA). Os resultados foram calculados por meio de uma equação linear obtida a partir de uma curva padrão de isomaltulose e foram expressos em percentual de conversão de sacarose em isomaltulose.

Produção e determinação da atividade de proteases de *Bacillus licheniformis*

Foram utilizadas diferentes cepas de *Bacillus* sp. (LBA 07, LBA 08, LBA 48 e LBA 50), produtoras de proteases cultivadas sob fermentação semi-sólida e submersa. Inicialmente foi preparado o pré-inóculo de uma cultura jovem de cada micro-organismo inoculada em solução

salina (0,85% NaCl, m/v) (densidade ótica entre 0,49 e 0,51, a 620 nm). Para a obtenção das proteases por fermentação semi-sólida, 2 mL do pré-inóculo foi transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 48 mL de meio de cultivo composto de farelo de trigo e água 1:1 (m/v) e incubados a 30 °C durante 96 horas. Já para a obtenção das proteases por fermentação submersa, 2 mL do pré-inóculo foi transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 48 mL de meio de cultivo otimizado por Contesini (2014), composto de melaço de cana-de-açúcar (40 g/L), água de maceração de milho (6 g/L), extrato de levedura (2 g/L) e soro de queijo (20 g/L) com pH ajustado para 7,0 e incubados em agitador incubador, a 300 rpm, 30 °C, durante 48 horas. Após os períodos de incubação, os meios de cultivo fermentados foram centrifugados a 9.600 x g por 15 min, a 5 °C e os sobrenadantes contendo a solução de proteases foram coletados para determinação da atividade enzimática.

A atividade das proteases produzidas foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Castro e Sato (2014), utilizando azocaseína como substrato. A mistura de 0,5 mL de solução 0,5% de azocaseína em tampão fosfato 0,1M pH 8,0 e 0,5 mL de solução enzimática foi incubada a 60 °C por 40 min. Após o período de incubação, a reação foi interrompida por adição de 0,5 mL de solução 0,5% de ácido tricloroacético e em seguida centrifugada a 17.000 x g a 15 °C, por 15 min. O sobrenadante foi neutralizado com 1 mL de hidróxido de potássio 5 M, a absorbância foi medida a 428 nm e os resultados de atividade foram calculados. Uma unidade de atividade de protease (U) foi definida como a quantidade de enzima que causa um aumento de 0,01 na absorbância a 428 nm, nas condições do ensaio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Efeito da bromelina de abacaxi em gelatina de limão e proteínas do leite

O efeito da bromelina ativa e inativa do abacaxi em diferentes proteínas foi avaliado visualmente e é demonstrado na Figura 1, a seguir:

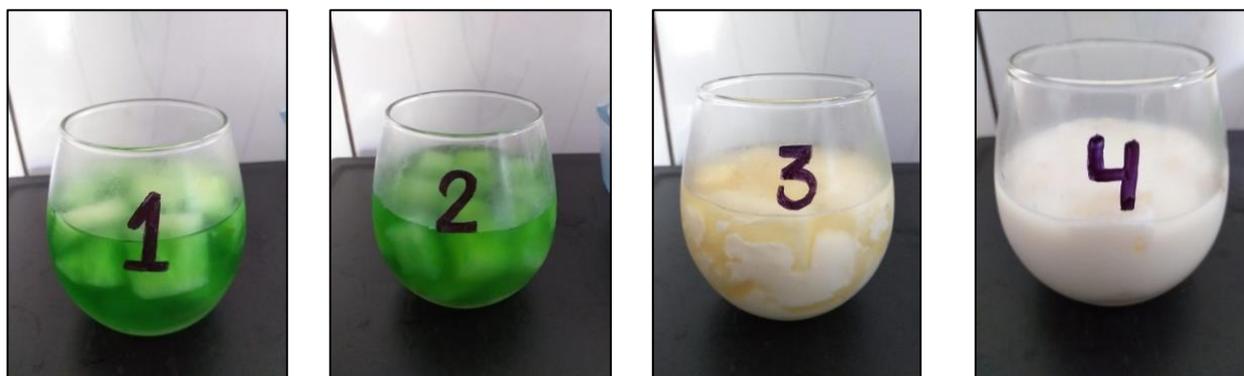


Figura 1 – Efeito da bromelina ativa em gelatina sabor limão (1), bromelina inativa em gelatina sabor limão (2), bromelina ativa nas proteínas do leite desnatado (3) e bromelina inativa nas proteínas do leite desnatado (4)

Foi observado que a bromelina dos cubos de abacaxi fresco foi responsável pela hidrólise da gelatina sabor limão (1) e coagulação das proteínas do leite (3). No experimento que eu testei, o tratamento térmico do abacaxi inativou a bromelina e não foi capaz de alterar a gelatina (2) e nem as proteínas do leite. Desta forma a gelatina formou gel (2) e o leite permaneceu inalterado com adição de cubos de abacaxi tratado termicamente (4). Por outro lado, no teste realizado pela minha colega, o tratamento térmico dos cubos de abacaxi não foi suficiente para a inativação da bromelina e foi observado que a gelatina não formou gel e o leite coagulou ficando espesso. Os resultados demonstraram a capacidade da protease bromelina em hidrolisar a gelatina e coagular a caseína. Além disso, mostram que o tratamento térmico em água em ebulição é capaz de inativar as enzimas.

Relembrando as aulas teóricas ministradas durante o período de iniciação científica, as proteases de frutas como bromelina e papaína podem ser usadas para o amaciamento da carne. A protease do 4º estômago de bezerro e também proteases de micro-organismos podem ser usadas para a coagulação do leite e produção de queijo. As proteases de micro-organismos podem ser usadas para obtenção de hidrolisados proteicos, preparação de alimentos infantis e para idosos, obtenção de peptídeos com funções biológicas desejáveis. Além disso deve ser lembrado que proteases podem hidrolisar proteínas e formar peptídeos amargos indesejáveis.

Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando células de *Erwinia* sp. D12

Os resultados descritos a seguir foram obtidos por um aluno colaborador, devido à restrição do número de pessoas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos e foram explicados e discutidos conosco.

A Figura 2 ilustra o percentual de conversão da sacarose em isomaltulose durante quatro bateladas consecutivas utilizando células de *Erwinia* sp. D12.

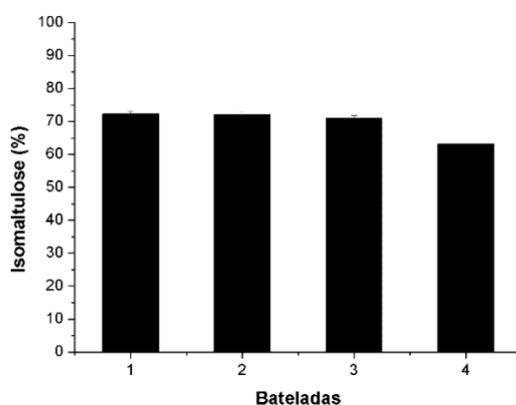


Figura 2 – Percentual de conversão de sacarose em isomaltulose pelas células de *Erwinia* sp. D12

As células de *Erwinia* sp. D12 promoveram alta conversão de sacarose em isomaltulose, variando entre 72,28% a 63,16% na primeira e quarta bateladas, respectivamente. Lucena *et al.* (2019) obtiveram percentuais de conversão de sacarose em isomaltulose variando de 85% a 23% na primeira e quarta bateladas, respectivamente, utilizando células de *Erwinia* sp. D12 cultivadas em meio de cultivo composto de melaço de cana-de-açúcar (40 g/L), peptona bacteriológica (15 g/L) e extrato de levedura (20 g/L). Esses resultados demonstram que o tipo de meio de cultivo utilizado no crescimento do micro-organismo influencia a sua atividade enzimática e estabilidade das enzimas produzidas. No presente estudo verificou-se que as células de *Erwinia* sp. D12 são mais adaptadas ao meio de cultivo utilizado por produzirem glicosiltransferase com maior estabilidade, mantendo a atividade de conversão alta em até quatro bateladas consecutivas de reação.

Atividade de proteases de diferentes cepas de *Bacillus* sp. cultivadas sob fermentação semi-sólida e submersa

Os resultados de atividade das proteases produzidas por diferentes cepas de *Bacillus* sp. por meio de fermentação semi-sólida e submersa são ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Atividade das proteases produzidas por diferentes cepas de *Bacillus* sp. cultivadas em diferentes meios de cultivo

| Micro-organismos | Fermentação semi-sólida (U/g) | Fermentação submersa (U/mL) |
|----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| <i>Bacillus</i> sp. LBA 07 | 9720 | 230 |
| <i>Bacillus</i> sp. LBA 08 | 11800 | - |
| <i>Bacillus</i> sp. LBA 48 | 8980 | 265 |
| <i>Bacillus</i> sp. LBA 50 | - | 530 |

A cepa LBA 08 apresentou maior atividade de proteases do que as outras cepas crescidas sob fermentação semi-sólida, no entanto não produziu proteases por meio de fermentação submersa. Um comportamento similar foi observado na cepa LBA 50 que apresentou melhor atividade entre as cepas crescidas sob fermentação submersa, mas não produziu proteases quando crescida sob fermentação semi-sólida. Esses resultados demonstram que a produção e atividade da enzima são dependentes do tipo de micro-organismo utilizado, assim como o tipo de fermentação e os nutrientes presentes no meio de cultivo.

As preparações enzimáticas brutas dos *Bacillus* sp. LBA 07, LBA 08 e LBA 48 obtidas por fermentação semi-sólida em farelo de trigo apresentaram maior atividade de protease.

CONCLUSÕES:

A bromelina do abacaxi fresco hidrolisou a gelatina e não houve a formação de gel após incubação a baixa temperatura. Por outro lado, a bromelina do abacaxi fresco coagulou as proteínas do leite, resultando na formação de pedaços grandes de coágulos. Verificou-se que o processo de tratamento térmico prolongado dos pedaços de abacaxi inativou enzima. Assim, pedaços de abacaxi devem ser cozidos para a preparação de sobremesas contendo gelatina ou leite.

As células de *Erwinia* sp. D12 cultivadas em meio de cultivo composto por melaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho e extrato de levedura produzem glicosiltransferases com alta capacidade de conversão de sacarose em isomaltulose e estabilidade, podendo ser reutilizadas por até quatro bateladas.

As preparações de proteases de *Bacillus* sp. obtidas por fermentação semi-sólida em meio de cultivo composto por farelo de trigo e água 1:1 mostraram maior atividade.

BIBLIOGRAFIA

- AGUILAR, J. G. S. & SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2018.
- CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Advantages of an acid protease from *Aspergillus oryzae* over commercial preparations for production of whey protein hydrolysates with antioxidant activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 58–65, 2014.
- CONTESINI, F. J. *et al.* Potential applications of carbohydrases immobilization in the food industry. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 1335-1369, 2013.
- CONTESINI, F. J. **Produção, caracterização e aplicação de proteases de *Bacillus* sp.** São Paulo: Brasil, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Tese de Doutorado, 2014.
- GURUNG, N. *et al.* A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-18, 2013.
- KAWAGUTI, H.Y.; MANRICH, E.; SATO, H.H. Production of isomaltulose using *Erwinia* sp. D12 cells: culture medium optimization and cell immobilization in alginate. **Biochemical Engineering Journal**, v.29, p.270-277, 2006.
- LUCENA, F. A. *et al.* Produção de isomaltulose a partir de sacarose utilizando micro-organismos produtores de glicosiltransferases, em processo de batelada. In: V ENCONTRO NACIONAL DA AGROINDÚSTRIA, 2019.RAVEENDRAN, S. *et al.* Applications of microbial enzymes in food industry. **Food Technology & Biotechnology**, v. 56, p. 16-30, 2018.
- SOUZA, T. S. P. & KAWAGUTI, H. Y. Cellulases, hemicellulases, and pectinases: Applications in the food and beverage industry. **Food and Bioprocess Technol**, v. 14, p. 1446-1477, 2021.