



Estudo do potencial enzimático da Cystationina Beta-liase para a liberação de tióis na produção de cerveja

Study of the enzymatic potential of Cystationin Beta-lyase for the release of aromatic in beer production

Evelyn Souto Oliveira¹, Guataçara dos Santos Junior²,
Sabrina Rodrigues Ávilla³, Juliana Vitória Messias Bittencourt⁴, Jorge Iulek⁵,
Márcio Silva⁶

RESUMO

Com a demanda emergente por biomoléculas capazes de expressar aromas diversos na produção de cerveja, os compostos voláteis sulfurados inodoros (VCS's) mencionados na literatura como "tióis", mostram-se presentes em diversas espécies vegetais, sobretudo no malte e no lúpulo e apresentam uma alternativa para expressão de aromas diversos, promovendo singularidade aos produtos, através da expressão de notas similares às de frutas cítricas e tropicais. Assim sendo, para que tais moléculas se tornem funcionais, torna-se necessário um processo denominado "biotransformação", onde, enzimas provenientes de leveduras, irão atuar na rota metabólica dos precursores Cystationina e GlutathionaS-conjugados, propiciando a liberação dos compostos aromáticos. No entanto, as leveduras utilizadas, em sua maioria do gênero *Saccharomyces*, apresentam baixa capacidade de produção das enzimas supracitadas. Neste sentido, este trabalho objetiva promover uma análise estrutural acerca da enzima Cystationina Beta-Liase, derivada do microrganismo *Lactobacillus delbrueckii*, visando a possibilidade de aplicações futuras para a produção heteróloga da enzima e sua liberação no processo de produção de cerveja.

PALAVRAS-CHAVE: Beta-Liases, enzimas exógenas, tióis, lúpulo

ABSTRACT

With the emerging demand for biomolecules capable of expressing various aromas in beer production, odorless sulfur volatile compounds (VCS's) mentioned in the literature as "thiols", are shown to be present in several plant species, and hops and present an alternative for expression of diverse aromas, promoting uniqueness to the products, through the expression of notes similar to those of citrus and tropical fruits. Therefore, for such molecules to become functional, it becomes necessary a process called "biotransformation", where enzymes from yeasts will act on the metabolic route of the precursors Cystationin and Glutathione S-the release of aromatic compounds. However, the yeasts used, mostly of the genus *Saccharomyces*, have low production capacity of the enzymes mentioned above. In this sense, this work aims to promote a structural analysis about the enzyme Cystationin Beta-Lia, derived from the microorganism *Lactobacillus delbrueckii*, applications for the heterologous production of the enzyme and its ex for the beer production process.

KEYWORDS: Beta-Lyases, exogenous enzymes, thiols, hops

¹ Bolsista Voluntário do(a) Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica (PIVIC). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. E-mail: oliveirae.2020@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: I 0974310579782396.

² Docente do Departamento de Matemática). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. E-mail: guata@utfpr.edu.br. ID Lattes: 5026078100746374.

³ Docente no Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Brasil. E-mail: sabrinaavilla@utfpr.edu.br. ID Lattes: 1165441010027633.

⁴ Docente no Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Nome da Instituição por Extenso, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. E-mail: julianavitoria@utfpr.edu.br. ID Lattes: 5844979052853050.

⁵ Docente no Departamento de Química. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. E-mail: iulek@uepg.br. ID Lattes: 2817758210035652.

⁶ Docente no Departamento de Ensino. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná, Brasil. E-mail: marcios@utfpr.edu.br.. ID Lattes: 0053558163139317.



INTRODUÇÃO

Com o advento da evolução das técnicas moleculares voltadas à produção de cerveja, bem como o crescimento das produções artesanais, urge a necessidade da elucidação de biocomponentes capazes de expressar aromas diversos, tais como: aromas frutados, tropicais, cítricos, entre outros. Assim sendo, moléculas voláteis sulfuradas presentes no malte e no lúpulo, previamente denominadas “tióis”, passam a ser consideradas como uma alternativa para a liberação de aromas desejáveis na produção de produtos fermentados. (Bonnafox et al, 2020).

Neste sentido, as moléculas supracitadas normalmente apresentam uma conformação bioquímica inodora, uma vez que seus precursores de aroma, cisteína e glutatona S-conjugados, mostram-se associados quimicamente a grupos com função hidrofílica, compostos voláteis e açúcares. Assim sendo, para que tais compostos sejam convertidos em tióis funcionais, torna-se necessária a biossíntese, através da ação de enzimas provenientes de leveduras, que agem em sua rota metabólica em um processo em cascata, denominado popularmente como “biotransformação” (Molitor et al, 2022). Neste sentido:

Originalmente, cisteína e glutatona S-conjugados surgem diretamente da glutatona (GSH), um tripeptídeo essencial (γ - glutamil cisteinil-glicina) conhecido no reino vegetal pelo seu papel no metabolismo do enxofre e pelas suas propriedades antioxidantes e desintoxicantes. No caso da biossíntese do precursor tiol no lúpulo, a glutatona de S-conjugados resultam diretamente da ligação de GSH a uma carbonila α,β -insaturada, catalisada por uma glutatona S-transferase citosólica. Os adutos G podem, portanto, ser vistos como pró-precursores dos adutos Cys, eles próprios precursores de formas livres. (Chenot et al, 2023)

Outrossim, o processo catalítico final para a liberação dos tióis, se dá pela ação de enzimas beta-liases provenientes de leveduras, mais comumente do gênero *Saccharomyces*, as quais apresentam potencial enzimático reduzido, para a enzima previamente mencionada. Os tióis liberados no processo portanto, apresentam-se detectáveis em pequenas escalas (ng/L), onde, quando se observa um aumento na concentração, podem ser detectados odores desagradáveis devido ao enxofre presente na região terminal. Assim, os tióis funcionais mais documentados pela literatura científica são: 3-mercaptopentanol (3MP), 3-mercaptopentilacetato (3MPA), 4-mercaptopentilacetato (4MPA), 3-mercaptopentanol (3MP) e 3-mercaptopentilacetato (3MPA), que apresentam odores como: maracujá e groselha preta. (Krogerus, Rettberg e Gibson, 2022)

Neste contexto, considerando a classe de enzimas beta-liases, destaca-se o papel da Cistationina Beta Liase, a qual se trata de um peptídeo em conformação quaternária, dependente do piridoxal 5-fosfato como cofator para se tornar funcional, onde, devido a sua alta especificidade para compostos sulfurados a base de ami-noetil-L-cisteína e L-cistina, apresenta diversas contribuições para a indústria alimentícia. Além do citado, devido a baixa produção desta enzima por leveduras, busca-se compreender os mecanismos de



produção e aplicação de C-S liases exógenas, produzidas de maneira heteróloga por bactérias envolvidas no processo de catalização do ácido láctico, mais precisamente do gênero *Lactobacillus*. Além disso, a enzima apresenta temperatura ótima em 25°, sendo desnaturada quando submetida à 44°C, sendo seu ph ideal 8.3.

Este trabalho objetiva, portanto, promover uma análise da enzima Cistationina Beta-Lisa, proveniente de *Lactobacillus delbrueckii*, mediante modelagem de proteínas, de forma a compreender sua conformação estrutural para futuras aplicações na indústria cervejeira, através da liberação de tióis, provenientes do lúpulo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Primeiramente deu-se a busca pela enzima Cistationina Beta-Liase, através da plataforma NCBI (Centro Nacional de Informação Biotecnológica), utilizando o código para a sequência FASTA da proteína, através do código: CUS17378.1, conforme documentado por Allegrini et al (2017).

Após esse primeiro momento, deu-se a submissão da sequência de aminoácidos na plataforma BLAST, selecionando a opção “pdb”, de forma a encontrar uma proteína que apresentasse maior homologia com a sequência de base, proveniente do organismo de interesse.

Figura 1- Resultados da busca na plataforma BLAST

select all 70 sequences selected		GenPept		Graphics				
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Chain A, putative pyridoxal 5'-phosphate-dependent C-S lyase [Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus ATCC BA...	Lactobacillus delb...	747	747	99%	0.0	97.17%	391	3DZZ_A
<input checked="" type="checkbox"/> Chain A, Cystathionine beta-lyase PatB [Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168]	Bacillus subtilis s...	272	272	96%	9e-88	37.70%	387	6QP3_A
<input checked="" type="checkbox"/> Chain A, Putative pyridoxal phosphate-dependent transferase [Clostridioides difficile 630]	Clostridioides diffi...	266	266	97%	1e-85	33.25%	391	4DGT_A

Fonte: Autoria própria, 2023

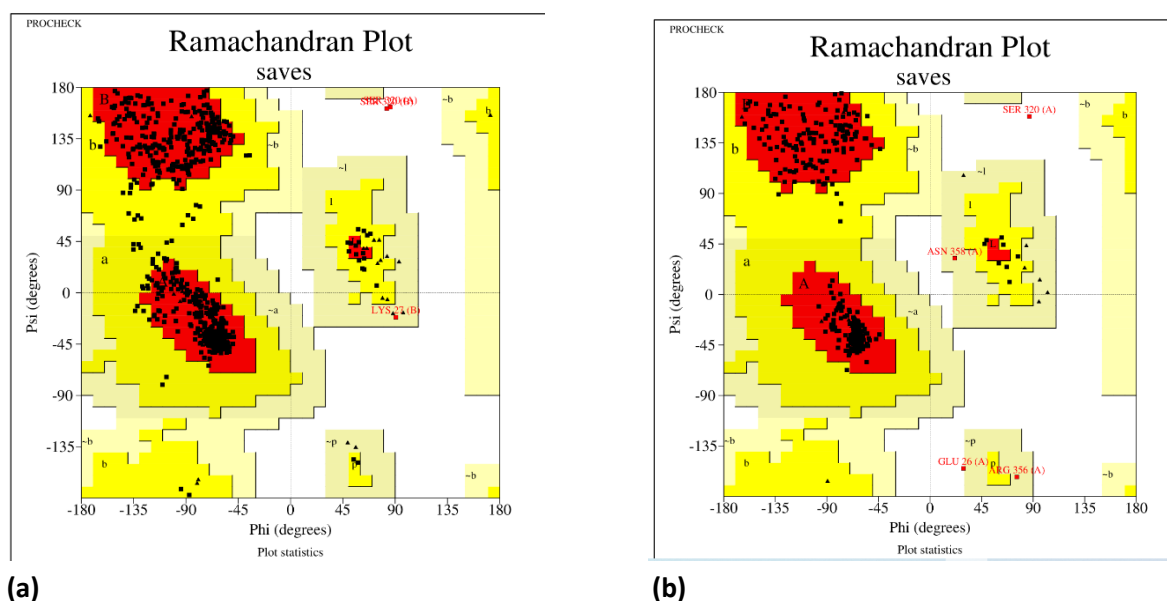
Selecionou-se a proteína de maior similaridade com o peptídeo modelo, referente à 97.17%, onde, seu código de acesso “3dzz” foi utilizado como parâmetro de busca na plataforma pdb. Após esse primeiro momento, promoveu-se o acesso no programa de Modelagem de Proteínas (Modeller), na qual, foram fornecidos os dados do caminho, onde o arquivo da proteína bem como o programa e os denominados align2d.py (em formato python) e TvLDH.ali (sequência alinhada), compartilhavam uma pasta em comum. O próximo comando fornecido foi o model-single.py, onde após submetido, gerou 5 novos arquivos do tipo pdp na pasta: TvLDH.B99990001.pdb

A análise das sequências pdps geradas foram adicionadas no campo de busca da plataforma UCLA-DOE LAB — SAVES v6.0 e analisadas utilizando a função PROCHECK para análise do gráfico de Ramachandran, o qual promove um mapeamento acerca das conformações geométricas favoráveis dos aminoácidos em relação aos ângulos phi e psi, de maneira a verificar sua compatibilidade com os princípios da bioquímica.

Assim sendo: a sequência de número 4, foi selecionada por apresentar 94.3% dos aminoácidos em posições favoráveis ao funcionamento da enzima.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Figura 2- Análise das proteínas, através do gráfico de Ramachandran: (a) proteína molde e (b) proteína aberta no programa Modeller



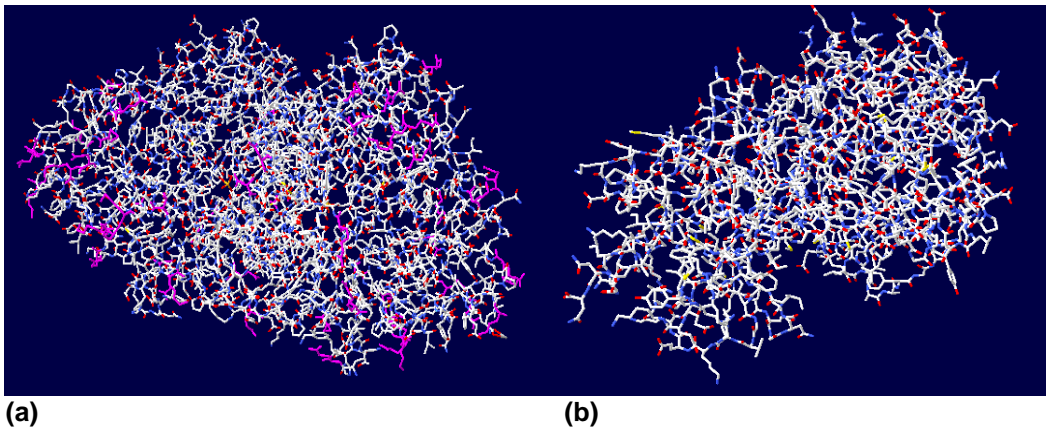
Fonte: Autoria própria, 2023

O Gráfico A, evidencia os resultados obtidos a partir da proteína modelo, enquanto o gráfico B, se refere à enzima de número 1, gerada pelo aplicativo Modeller. Assim sendo, obteve-se que no primeiro caso, 90% dos aminoácidos estavam em conformações favoráveis, enquanto que a proteína modelada, apresentou 94.3%. Em ambos os casos, um resíduo de aminoácido do tipo Serina, foi detectado na região de cor branca, a qual representa conformação desfavorável. Após abertas as moléculas no programa Deep View Swiss-pdb-Viewer, deu-se a comparação estrutural entre ambas as moléculas.

Neste sentido, a figura 3 explicita a disposição geral da proteína a qual se configura em uma estrutura quaternária e a figura 4 evidencia a presença de estruturas secundárias do tipo dupla-hélice, as quais contribuem para a conformação geral da proteína. As estruturas do tipo dupla-hélice, se mostraram em regiões compatíveis com as localidades, onde ligações de hidrogênio se mostram presentes e ambas as estruturas secundárias, presentes em maior quantidade na proteína modelo. Além disso, na figura 5, procurou-se evidenciar a presença de fitas-beta ao longo das moléculas:

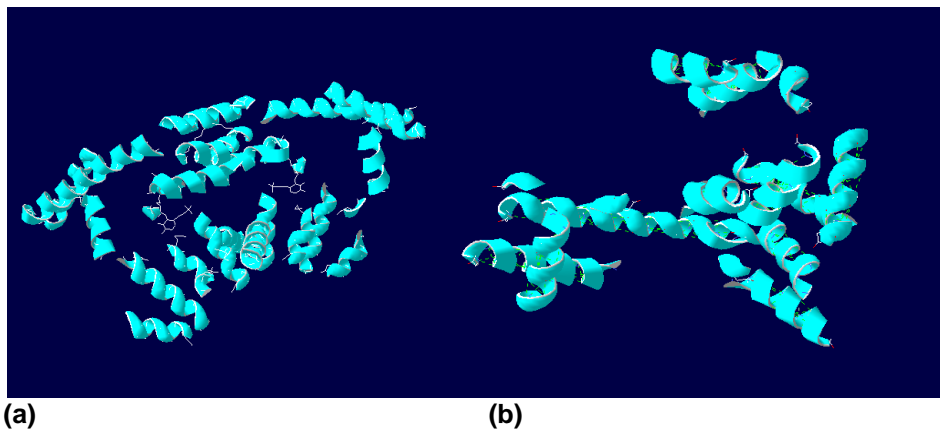


Figura 3- Visão geral das proteínas: (a) proteína molde e (b) proteína aberta no programa Modeller



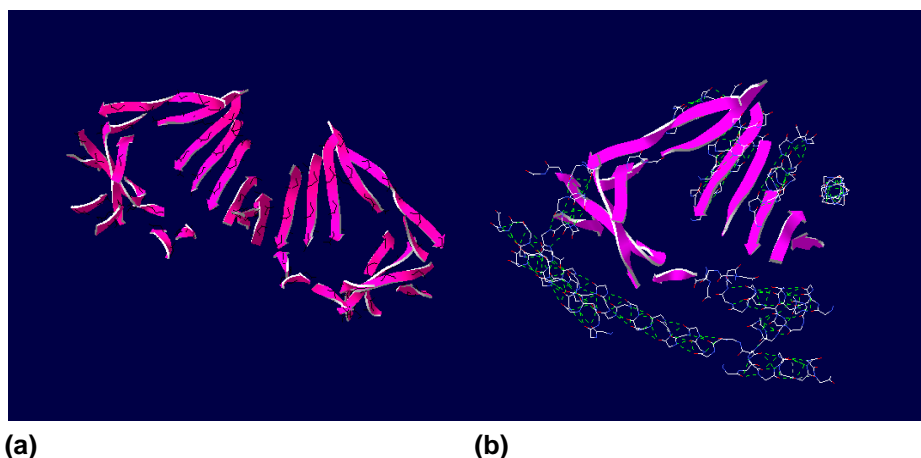
Fonte: Autoria própria, 2023

Figura 4- Visão geral das duplas-hélices: (a) proteína molde e (b) proteína aberta no programa Modeller



Fonte: Autoria própria, 2023

Figura 5- Visão geral das duplas-hélices: (a) proteína molde e (b) proteína aberta no programa Modeller



Fonte: Autoria própria, 2023



CONCLUSÃO

Dessa forma, pode-se concluir que o estudo da enzima Cistationina Beta-liase de bactérias do ácido láctico, tais como *Lactobacillus Delbrueckii*, ainda se mostra insipiente, porém, se trata de um alternativa pertinente para a otimização dos processos de liberação de tióis durante a produção de cerveja.

Neste contexto, o conhecimento acerca de suas propriedades biomoleculares se torna importante, visando aplicações biotecnológicas futuras na produção de aromas singulares durante a fabricação dos produtos supracitados.

Agradecimentos

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná e aos Professores: Márcio Silva, Guataçara dos Santos Junior, Sabrina Rodrigues Ávilla, Juliana Vitória Messias Bittencourt e Jorge Iulek

Conflitos de interesse

Não há conflitos de interesse

REFERÊNCIAS

ALLEGRI, A et al. Characterization of CS lyase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC BAA-365 and its potential role in food flavour applications. **The journal of biochemistry**, v. 161, n. 4, p. 349-360, 2017. Acesso em: 13 set, 2023

BONNAFFOUX, Hugo et al. Spotlight on release mechanisms of volatile thiols in beverages. **Food Chemistry**, v. 339, p. 127628, 2021. Acesso em: 10 set, 2023

CHENOT, C et al. Ability of Exogenous or Wort Endogenous Enzymes to Release Free Thiols from Hop Cysteinylated and Glutathionylated S-Conjugates. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 81, n. 1, p. 33-44, 2023. Acesso em: 12 set, 2023.

KROGERUS, K; RETTBERG, N; GIBSON, B. Increased volatile thiol release during beer fermentation using constructed interspecies yeast hybrids. **European Food Research and Technology**, v. 249, n. 1, p. 55-69, 2023. Acesso em: 15 set, 2023

MOLITOR, Richard W. et al. The Sensorial and Chemical Changes in Beer Brewed with Yeast Genetically Modified to Release Polyfunctional Thiols from Malt and Hops. **Fermentation**, v. 8, n. 8, p. 370, 2022. Acesso em: 12 set, 2023