

Adaptação de método de extração e caracterização de proteínas em bactéria de importância para a indústria alimentícia

Marília Penteado Stephan¹
Kátia dos Santos Teixeira²

Introdução

Acetobacter diazotrophicus (antiga denominação de *Gluconacetobacter diazotrophicus*) é uma bactéria Gram negativa capaz de fixar nitrogênio atmosférico e utilizar o monossacarídeo glicose como fonte de carbono. O metabolismo utilizado para esta obtenção de energia é via fermentação oxidativa, sendo também possível haver concomitante fixação de nitrogênio para haver crescimento e multiplicação celular. Como produto intermediário do metabolismo de glicose por *G. diazotrophicus*, antes de ser observado aumento da biomassa há formação de ácido glicônico (STEPHAN et al., 1991). O ácido glicônico é um acidulante muito utilizado na indústria de alimentos que, como outros acidulantes, apresenta doze características relevantes para sua aplicação na indústria de alimentos: 1) atua como flavorizante acentuando o aroma dos alimentos (CHOTANI et al., 2000); 2) controla o pH dos alimentos atuando como tampão (EVANGELISTA, 1994); 3) previne o crescimento de microorganismos devido à sua ação bactericida e fungicida (BARBOZA; FREITAS; WASCZYNSKYJ, 2002); 4) apresenta efeito sinérgico em relação aos antioxidantes, prevenindo o escurecimento não enzimático do produto (BARBOZA; FREITAS; WASCZYNSKYJ, 2002); 5) causa modificação de textura em produtos de confeitaria (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1999); 6) modifica o ponto de fusão de produtos alimentícios, como, por exemplo, quando usado na fabricação de queijo mole (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1997); 7) realça a cor, sabor e atua como preservativo de carnes (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1998); 8) seqüestra metais prejudiciais que aceleram a deterioração da cor, sabor, além de causar turvação dos alimentos

(CARVALHO et al., 2005); 9) melhora a textura e sabor das geléias e gelatinas (CARVALHO et al., 2005); 10) causa a inversão de açúcares, evitando sua cristalização (AQUINO et al., 2004); 11) auxilia na extração de pectina e pigmentos naturais (ÍTAVO et al., 2000); 12) estabiliza o ácido ascórbico (BARBOZA; FREITAS; WASCZYNSKYJ, 2002). Neste trabalho, tem-se como objetivo a longo prazo, a utilização de *G. diazotrophicus* como ferramenta biotecnológica para produção de ácido glicônico em escala industrial. Para tal, visa-se obter a médio prazo mutantes aleatórios que mostrem amplificação na síntese deste ácido orgânico. A expressão diferencial de proteínas nestes mutantes são de importância porque podem ser identificadas cadeias polipeptídicas responsáveis pela regulação da transcrição, ativação/modulação de atividade ou diretamente envolvidas na via metabólica para produção deste ácido. A eletroforese em gel de poliácridamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é uma ferramenta muito útil para análise comparativa do perfil protéico destes mutantes. Entretanto, tem-se que desenvolver uma técnica para a extração das proteínas presentes em bactérias de modo a obter um número razoável de cadeias polipeptídicas. Este método permitirá, no futuro, fazer uma boa diferenciação dos mutantes obtidos através da técnica de eletroforese bidimensional e/ou identificação da cadeia polipeptídica por espectrometria de massa. Neste trabalho, teve-se como objetivo adaptar um método para a extração eficiente e caracterização do "pool" protéico das proteínas da bactéria *G. diazotrophicus*, visando poder fazer uma analogia da maior capacidade de síntese de ácido glicônico com a síntese de uma determinada proteína. Para isto foram utilizadas: uma cepa selvagem PAL5 e quatro cepas mutantes dessa bactéria denominadas como: K416, K417, IA5, 16 A11.

¹ Farmac.-bioquím., D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Av. das Américas, 29501- Guaratiba, CEP23.020-470 Rio de Janeiro – RJ. E-mail:stephan@ctaa.embrapa.br

² Bióloga, DSc., Embrapa Agrobiologia. Rodovia BR-465, Km 47 (Antiga Rio São Paulo), Seropédica, CEP23890-000-RJ. E-mail:katia@cnpab.embrapa.br

Eletroforese de proteínas

Para o presente estudo foi utilizado o sistema de eletroforese da Biorad e a metodologia de preparação dos géis descrita por Laemmli (1970). Para o gel de corrida foi utilizada acrilamida na concentração de 12% e de 4% no gel de aplicação da amostra. A corrida foi realizada durante sete horas sob uma tensão de 100V. Os marcadores de alta massa molecular foram obtidos a partir dos seguintes padrões de proteínas (em kDa): 200,0–miosina ; 116,2 - β -galactosidase; 66,2-soralbumina ; 45,0-ovalbumina. Os marcadores de baixa massa molecular foram obtidos a partir dos seguintes padrões de proteínas (em kDa): 97,4 -fosforilase b; 66,2 –soralbumina ; 45,0–ovalbumina; 31,0-anidrase carbônica; 21,5-inibidor de tripsina; 14,4- lisozima. As proteínas dos géis foram coradas com o reagente de cor “coomassie blue R250”, durante uma noite, e descoradas com uma solução de metanol/ácido acético/água (40: 10: 50), durante três horas.

Preparação de amostra de extrato protéico da bactéria *G. diazotrophicus* para análise das cadeias polipeptídicas em eletroforese (SDS-PAGE) e resultados

Para este estudo foram utilizados “pellet(s)” bacterianos provenientes de culturas obtidas de crescimento em 25 mL de meio líquido contendo por litro: 100g de glicose, 5g de extrato de levedura, 0,5g de $MgSO_4$ e pH 6,0. Este crescimento foi realizado em frasco de 125 mL durante 48 horas e sob forte agitação. Os “pellet(s)” foram solubilizados em 10 mL de tampão Tris-HCl pH 8,0 (0,1 M), acrescido de 100 mL de Triton X-100. Para realização da extração, inicialmente, os extratos foram homogeneizados em blender durante 2 minutos e posteriormente, em 3 ciclos de ultra-som de duração de 2 minutos. Após estas etapas de homogeneização o extrato bruto foi centrifugado a 4000 rpm durante 15 minutos. Dois mL do sobrenadante foram tratados com seis mL de acetona e colocado no congelador durante 1 noite, visando desengordurar o material e precipitar as proteínas. As proteínas precipitadas com acetona, após a centrifugação, foram solubilizadas em 200 μ L do tampão Tris-HCl pH 8,0 (0,1M). Desta amostra, aproximadamente 10 vezes concentrada, foram retirados 20 μ L e aplicados em gel de poli-acrilamida, utilizando-se as condições e padrões conforme descrito acima. Na Tabela 1 pode-se observar a massa molecular e o número de cadeias polipeptídicas obtidas nos extratos. Na Fig. 1 encontra-se o gel de poli-acrilamida contendo as cadeias polipeptídicas provenientes dos extratos das diferentes amostras da bactéria *G. diazotrophicus*, cepa selvagem PAL5 e de seus outros quatro mutantes (K416, K417, IA5, 16A11). É importante salientar que este estratégia metodológica foi utilizada tomando-se como base

trabalhos anteriores realizados com *G. diazotrophicus* e outras bactérias, tais como: 1) tampão glicina 0,2 M pH 2,2 com agitação de 20 min a temperatura ambiente (FUJIMOTO et al., 1991; McCOY; WILTBERGER; WINTER, 1976); 2) 0,05% Triton X-100 com incubação durante 2h e 4°C (BLANCO et al., 2005); e 3) 2% dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), variando tempo e temperatura de incubação (MERLE et al., 2003).

Tabela 1. Valores de massa molecular das cadeias polipeptídicas de extratos protéicos de *G. diazotrophicus*, separadas por eletroforese SDS-PAGE, com indicação de intensidade de coloração de suas bandas: a) altamente corada (+ + +), b) intensidade de coloração média (+ +), c) fracamente corada (+) e d) ausência de coloração.

Massa Molecular (kDa)	PAL5	K416	K417	IA5	16A11
70,3	++	+++	+++	+++	+++
68,3	++	+++	+++	+++	+++
64,3	++	+++	+++	+++	+++
60,6	++	+++	+++	+++	+++
52,2	++	+++	+++	+++	+++
51,6	+++	+++	+++	+++	+++
44,3	+++	+++	+++	+++	+++
39,5	+++	+++	+++	-	-
37,4	+++	+++	+++	++	++
32,9	+	+++	++	++	++
31,7	+	+++	+	+	+
28,4	+	+++	++	++	++
25,4	+	+++	++	++	++
22,7	+	+++	++	++	++
17,8	+	++	++	++	++
15,7	+	++	++	++	++

Desta forma, pode-se fazer os cálculos de massa molecular e fazer uma análise comparativa, tendo-se como amostra de referência a cepa selvagem denominada PAL5 (Tabela 1). Na Tabela 1 e Fig. 1 pode-se verificar que o extrato obtido da cepa selvagem PAL5 apresentou 16 cadeias polipeptídicas cujas massas moleculares variaram de 70,3 a 15,7 kDa. Entretanto, para o extrato da cepa PAL5 estas bandas em sua maioria se apresentaram com menos intensidade de coloração dos que as obtidas para os extratos das cepas mutantes. Isto pode ser explicado pelo fato desta cepa ser mais resistente a extração ou dela mostrar menor formação de biomassa no meio

utilizado. Outro fator que merece destaque é a ausência de uma cadeia polipeptídica (39,5 kDa) para as cepas mutantes IA5 e 16A11 (Tabela 1), tomando-se como referência a cepa PAL5. A cepa mutante K416 deve ser vista com atenção pelo fato da maior intensidade de bandas (+ + +) observada em seu extrato protéico. Finalmente que deve ser considerada a presença de material protéico de alta massa molecular no topo do gel (PAL5, K417, IA5, 16A11), indicando a presença de cadeia polipeptídica com massa molecular acima de 200 kDa. A existência desta bandas com massa molecular acima de 200 kDa junto com aquelas observadas abaixo de 14,4 kDa indicam a necessidade de no futuro fazer este mesmo estudo utilizando um gel com gradiente de concentração de acrilamida.

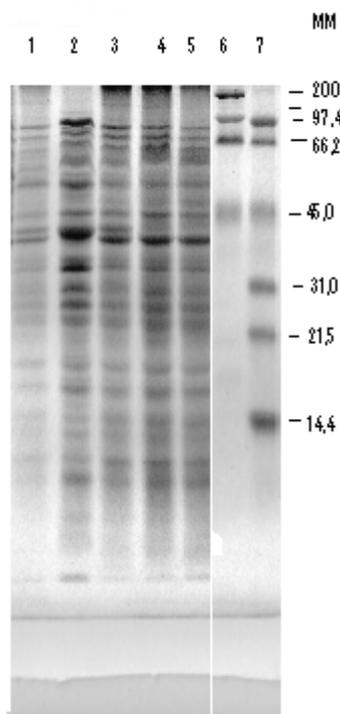


Fig. 1. Perfil eletroforético das proteínas extraídas de células de *Gluconoacetobacter diazotrophicus*, (1) PAL5, (2) K416, (3) K417, (4) IA5, (5) 16A11. Os marcadores de massa molecular estão nos poços 6 e 7 e (MM) refere-se aos valores de massa molecular em kDa

Conclusão

O método se mostrou adequado ao tipo de matriz utilizada e também se diferenciou de outros descritos na literatura que utilizam outros tampões. A utilização do detergente Triton X-100 junto com as etapas de homogeneização e concentração das amostras permitiu uma boa extração, solubilização e caracterização das cadeias polipeptídicas. O método se mostrou preciso e, com isto, pôde-se observar bandeamentos que permitem diferenciação da cepa selvagem em relação às cepas mutantes.

Referências Bibliográficas

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Portaria nº. 540, de 27 de outubro de 1997.** Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/540_97.htm>. Acesso em: 27 nov. 2007.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Portaria nº. 1.004, de 11 de dezembro de 1998.** Aprova o Regulamento Técnico: "Atribuição de função de aditivos, aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8 - Carne e Produtos cárneos". Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1004_98.htm>. Acesso em: 27 nov. 2007.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução nº. 383, de 5 de agosto de 1999.** Dispõe sobre o regulamento técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 7 - Produtos de panificação e biscoitos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/383_99.htm>. Acesso em: 27 nov. 2007.
- AQUINO, F. W. B. de; AMORIM, A. G. N.; PRATA, L. F.; NASCIMENTO, R. F. do. Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 32-38, jan./mar. 2004.
- BARBOZA, L. M. V.; FREITAS, R. J. S. de; WASCZYNSKYJ, N. A importância dos aditivos nas bebidas cítricas. **Brasil Alimentos**, n. 15, p. 32-37, ago. 2002.
- BLANCO, Y.; ARROYO, M.; LEGAZ, M. E.; VICENTE, C. Isolation from *Gluconoacetobacter diazotrophicus* cell walls of specific receptors from sugarcane glycoproteins, which act as recognition factors. **Journal of Chromatography A**, v. 1093, p. 204-211, 2005.

CARVALHO, W.; SILVA, D. D. V.; CANILHA, L.; MANCILHA, I. M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa. Parte 1: Ácidos orgânicos. **Revista Analytica**, n. 18, p. 70-76, ago./set. 2005.

CHOTANI, G.; DODGE, T.; HSU, A.; KUMAR, M.; LADUCA, R.; TRIMBUR, D.; WEYLER, W.; SANFORD, K. The commercial production of chemicals using pathway engineering. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, n. 2, p. 434-455, 2000.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1994.

FUJIMOTO, S.; TAKADE, A.; AMAKO, K.; BLASER, M. J. Correlation between molecular size of the surface array protein and morphology and antigenicity of *Campylobacter fetus* S Layer. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 6, p. 2017-2022, jun. 1991.

ÍTAVO, L. C. V.; SANTOS, G. T. dos; JOBIM, C. C.; VOLTOLINI, T. V.; BORTOLASSI, J. R.; FERREIRA, C. C. B. Aditivos na conservação do bagaço da laranja in natura na forma de silagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 5, p. 1474-1484, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

McCOY, E. C.; WILTBERGER, H. A.; WINTER, J. Major outer membrane protein of *Campylobacter fetus*: physical and immunological characterization. **Infection and Immunity**, v. 13, n. 4, p. 1258-1265, 1976.

MERLE, C.; FAURE, D.; URDACI, M.-C.; LE HÉNAFF, M. Purification and characterization of a membrane glycoprotein from fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 6, p. 1120-1127, 2003.

STEPHAN, M. P.; OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, K. R. S.; MARTINEZ-DRETS, G.; DÖBEREINER, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 77, n. 1, p. 67-72, jan. 1991

Comunicado Técnico, 113

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470 - Rio de Janeiro - RJ
Fone: (0XX21) 3622-9600
Fax: (0XX21) 2410-1090 / 2410-9713
Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>
E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2007): tiragem (50 exemplares)

Comitê de publicações

Presidente: *Virginia Martins da Matta.*
Membros: *Marcos José de Oliveira Fonseca, Marília Penteadó Stephan, Soraya Pereira, Ronoel Luiz de O. Godoy, Renata Torrezan e André Luis do Nascimento Gomes.*

Expediente

Secretárias: *Renata Maria Avilla Paldês e Célia Gonçalves Fernandes.*
Revisão editorial: *Soraya Pereira.*
Revisão de texto: *Comitê de Publicações.*
Normalização bibliográfica: *Luciana S. de Araújo.*
Editoração eletrônica: *André Luis do N. Gomes e Filipe Loureiro Rebelo.*