



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA  
E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

GUSTAVO PIRES COSTA

IMOBILIZAÇÃO DE  $\alpha$ -ACETOLACTATO DESCARBOXILASE E APLICAÇÃO  
NO PROCESSO DE MATURAÇÃO DE CERVEJAS

Porto Alegre

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA  
E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

GUSTAVO PIRES COSTA

IMOBILIZAÇÃO DE  $\alpha$ -ACETOLACTATO DESCARBOXILASE E APLICAÇÃO  
NO PROCESSO DE MATURAÇÃO DE CERVEJAS

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Porto Alegre

2019

## CIP - Catalogação na Publicação

Costa, Gustavo  
IMOBILIZAÇÃO DE  $\alpha$ -ACETOLACTATO DESCARBOXILASE E  
APLICAÇÃO NO PROCESSO DE MATURAÇÃO DE CERVEJAS /  
Gustavo Costa. -- 2019.

92 f.

Orientador: Plinho Francisco Hertz.

Coorientador: Vitor Manfroi.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. alpha-acetolactato descarboxilase. 2. imobilização de enzimas. 3. cerveja, off-flavor. I. Hertz, Plinho Francisco, orient. II. Manfroi, Vitor, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA  
E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese “Imobilização De  $\alpha$ -Acetolactato Descarboxilase, Aplicação No Processo De Maturação De Cervejas”, elaborada por Gustavo Pires Costa, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comissão examinadora:

---

Profª Dra Giandra Volpato (IFRGS)

---

Profº Dr Juliano Garavaglia (UFCSPA)

---

Profª Dra Juliane Elisa Welke (UFRGS)

## Agradecimentos

Primeiramente agradeço à minha família, que me apoiaram incondicionalmente na decisão de dar continuidade aos meus estudos. Também agradeço aos meus pais e irmã que compreenderam minhas ausências em muitos momentos difíceis.

A Michele Utpott, que divide comigo os desafios e as conquistas, me apóia nos momentos de angústias, com quem posso conversar sobre ciência ou coisas bobas aleatórias. A pessoa que me faz querer viver, que me faz feliz, com todo meu amor, Obrigado!

Aos colegas que tive durante doutorado que se tornaram amigos, conselheiros, consultores e foram extremamente importantes nessa etapa. Principalmente aos colegas de laboratório, Jéssie, Lovaine, Carla, Eli e Camila. Os bolsistas do laboratório 210, principalmente ao Leonardo que no último ano trabalhou diretamente nesse projeto.

Ao Orientador Prof. Dr. Plinho Hertz, que aceitou me orientar nessa área nova, surpreendente e principalmente desafiadora, que foi um orientador, um amigo e um conselheiro. Deixo meus agradecimentos e minhas sinceras desculpas pelas dificuldades que apresentei em transpor os desafios encontrados na execução deste trabalho.

Ao Professor Dr. Rafael Rodrigues pelas conversas e disponibilidade para sanar dúvidas. E ao corpo de técnicos do ICTA que contribuíram na realização de partes do trabalho.

## RESUMO

A cerveja está entre as três bebidas mais consumidas mundialmente, sua elaboração é complexa, e falhas nessas etapas podem gerar aromas desagradáveis (*off-flavors*). Cervejas do tipo *Lager* são submetidas a etapa de maturação por longos períodos a baixas temperaturas para eliminar o principal *off-flavor*, aroma de manteiga, gerado pela presença de diacetil. A enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase (ALDC) apresenta a capacidade de converter  $\alpha$ -acetolactato, composto precursor de diacetil, diretamente em acetoina evitando a formação do *off-flavor*. A indústria utiliza essa enzima na forma livre visando a redução do tempo de maturação, assim reduzindo custos e garantindo a qualidade sensorial do produto final. Este trabalho teve como objetivo realizar a imobilização covalente da enzima ALDC em esferas de quitosana e de alginato/gelatina ativadas com glutaraldeído. A qualidade da imobilização foi verificada através da análise de rendimento, eficiência e atividade recuperada, avaliar a estabilidade das enzimas livre e imobilizada em diversas temperaturas e pH. Também foi estudada a capacidade de atividade das enzimas imobilizadas quando aplicadas diretamente em cerveja e sua estabilidade operacional. Os melhores resultados para a imobilização em esferas de quitosana, foram 84% de rendimento, 10,8% de eficiência e 9,1% de atividade recuperada. A enzima imobilizada apresentou maior estabilidade térmica, em todas as temperaturas testadas, quando comparada à enzima em sua forma livre e também a variação de pH. A enzima imobilizada apresentou de 80% da atividade inicial após 12 ciclos consecutivos quando aplicada a cerveja. No trabalho utilizando esferas de alginato/gelatina, resíduo de cápsulas da indústria nutracêutica, ativadas com glutaraldeído, foram obtidos 95,6%, 27,0% e 23,6%, respectivamente, para rendimento, eficiência e atividade recuperada. A imobilização proporcionou elevada atividade em uma ampla faixa de pH e estabilidade térmica nas temperaturas de 50° e 60° C. O derivado imobilizado apresentou capacidade de reutilização, 45% de atividade após 30 ciclos de utilização e sua forma desidratada foi estocada por 180 dias mantendo 75% da atividade. Resultados promissores para sua futura comercialização e aplicação na indústria cervejeira.

Palavras chaves: Imobilização, quitosana, alginato/gelatina, ALDC e diacetil.

## ABSTRACT

Beer is among the three most consumed drinks worldwide, its elaboration is complex, and failures in these steps can generate off-flavors. Lager beers are subjected to maturation stage for long periods at low temperatures to eliminate the main off-flavor, butter aroma, generated by the presence of diacetyl. The enzyme  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase (ALDC) has the ability to convert  $\alpha$ -acetolactate, diacetyl precursor compound, directly into acetoin avoiding the formation of off-flavor. The industry uses this enzyme in the free form aiming at reducing the maturation time, thus reducing costs and ensuring the sensorial quality of the final product. This work aims to immobilize the ALDC enzyme in glutaraldehyde activated chitosan and alginate / gelatin beads, to evaluate the quality of the immobilization through the analysis of yield, efficiency and recovered activity, to evaluate the stability of free and immobilized enzymes at various temperatures and pH. The activity capacity of immobilized enzymes when applied directly to beer and its operational stability was also studied. The best results for the immobilization in chitosan beads were 84% yield, 10.8% efficiency and 9.1% recovered activity. The immobilized enzyme presented higher thermal stability, in all the tested temperatures, when compared to the enzyme in its free form and also the pH variation. The immobilized enzyme presented 80% of the initial activity after 12 consecutive cycles when the beer was applied. In the work using alginate/gelatin beads, residue of capsules of the nutraceutical industry, activated with glutaraldehyde, 95.6%, 27.0% and 23.6%, respectively, were obtained for yield, efficiency and recovered activity. The immobilization provided high activity in a range of wide pH and thermal stability at temperatures of 50° and 60° C. The immobilized derivative showed reuse capacity 45% of activity after 30 cycles of use and its dehydrated form was stored for 180 days maintaining 75% of activity. Promising results for its future commercialization and application in the brewing industry.

Keywords: Immobilization, chitosan, alginate/gelatin, ALDC and diacetyl.

## Lista de Figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Fluxograma da produção de cerveja. ....   | 17 |
| <b>Figura 2.</b> Reação de formação e redução de diacetil, adaptado de Wainwright, (1973).<br>.....  | 19 |
| <b>Figura 3.</b> Conformação da ALDC de <i>Bacillus brevis</i> , em vermelho o íon zinco, e lisina em destaque amarelo. Fonte: Marlow <i>et al.</i> , (2013). ....   | 23 |
| <b>Figura 4.</b> Principais métodos de imobilização: (A) fixação ou adsorção em sólidos; (B) aprisionamento em matriz porosa; (C) floculação (natural ou artificialmente induzida), e (D) contenção atrás de barreiras. Fonte: KOURKOUTAS <i>et al.</i> ; 2004. ....                         | 24 |
| <b>Figura 5.</b> Estruturas de quitina e quitosana. Fonte: (KRAJEWSKA, 2004). ....   | 26 |
| <b>Figura 6.</b> Atividade enzimática relativa das esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído 1% (□), 3% (●) e 5% (Δ), após incubação em cerveja por 24 horas. ....   | 44 |
| <b>Figura 7.</b> Efeito do pH na atividade de ALDC livre (○) e imobilizada (■), em 37°C. ....  | 46 |
| <b>Figura 8.</b> Comparação entre atividades de ALDC livre e imobilizada, à 37° C. ALDC livre em tampão (■) e em cerveja (□), ALDC imobilizada em tampão (■) e em cerveja (□). ....  | 46 |
| <b>Figura 9.</b> Estabilidade térmica para ALDC em diferentes temperaturas, 40° C (◆,◇); 50° C (▼, ); 60° C (▲,Δ); 70° C (●,○) e 80° C (■,□). (a) enzima livre (b) enzima imobilizada; (c) comparação entre enzimas livre (símbolos abertos) e imobilizada (símbolos fechados) a 60° C. .... | 48 |
| <b>Figura 10.</b> Conversão de α-acetolactato em de acetoina (■) e diacetil (□) em mg/L, em cerveja comercial por ALDC imobilizada e atividade enzimática relativa (▼). ....   | 50 |
| <b>Figura 11.</b> Atividade relativa para ALDC livre (□) e imobilizada (▪) determinada em diferentes pH, à 37° C. ....   | 65 |
| <b>Figura 12:</b> Estabilidade térmica para ALDC em diferentes temperaturas, 50° C (■,□); 60° C (●,○); 70° C (▲,Δ) e 80° C (◇,◆). (a) enzima livre (b) enzima imobilizada; enzima livre (símbolos abertos) e imobilizada (símbolos fechados). ....   | 67 |
| <b>Figura 13.</b> Análise Termogravimétrica de esferas de alginato/gelatina ativadas com glutaraldeído (2,5%). ....  | 69 |
| <b>Figura 14.</b> Gráfico da Análise de DSC de ALDC imobilizadas em esferas de alginato/gelatina. ....   | 70 |
| <b>Figura 15.</b> Atividade relativa da ALDC imobilizada na conversão de α-acetolactato em acetoina. ....  | 71 |
| <b>Figura 16.</b> Avaliação da estabilidade de ALDC imobilizada a cerveja, durante ciclos de exposição. ....   | 72 |
| <b>Figura 17.</b> Avaliação da qualidade da ALDC imobilizada desidratada durante a estocagem da ALDC imobilizada (▪) liofilizada e (○) desidratada a vácuo. ....   | 73 |

## Lista de Tabelas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.</b> Resumo dos trabalhos publicados utilizando HS-SPME na avaliação de voláteis em cerveja.....   | 32 |
| <b>Tabela 2.</b> Efeito da ativação de três concentrações de glutaraldeído na ativação das esferas de quitosana, e atividade de ALDC ofertada. ....  | 42 |
| <b>Tabela 3.</b> Resultados das condições de Imobilização de ALDC em suportes de alginato/gelatina, avaliando quantidade de enzima oferecida e percentual de glutaraldeído na ativação do suporte..... | 63 |
| <b>Tabela 4.</b> Comparativo de tempos de meia vida entre ALDC livre e imobilizada. ....   | 67 |

## Sumário

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 12 |
| 2.1 Geral .....  | 14 |
| 2.2 Específicos .....  | 14 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....   | 15 |
| 3.1 Cerveja.....   | 15 |
| 3.1.1 Produção .....   | 16 |
| 3.1.2 Composição volátil da Cerveja .....                                | 18 |
| 3. 1. 3 Diacetil .....   | 19 |
| 3. 2 $\alpha$ -Acetolactato Descarboxilase (ALDC).....                   | 21 |
| 3. 3 Imobilização de enzimas .....                                       | 23 |
| 3.4 Suportes Utilizados para Imobilização de Enzimas.....                | 25 |
| 3. 4.1 Quitosana .....   | 25 |
| 3. 4. 2 Alginato .....   | 27 |
| 3. 4. 3 Gelatina .....   | 28 |
| 3. 5 Alternativas para imobilização.....                                 | 29 |
| 3. 6 Determinação de voláteis.....                                       | 31 |
| 4. Materiais e Métodos .....   | 33 |
| 5 Resultados e Discussão.....  | 33 |
| 6.1 RESUMO .....   | 34 |
| 6.2 INTRODUÇÃO .....   | 35 |
| 6. 3 MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 36 |
| 6. 3.1 Reagentes .....   | 36 |
| 6. 3. 2 Preparo dos Suportes .....                                       | 37 |
| 6. 3. 3 Imobilização da ALDC .....                                       | 37 |
| 6. 3. 4 Atividade da ALDC.....   | 38 |
| 6. 3. 5 Estabilidade térmica.....  | 39 |
| 6. 3. 6 Efeito do pH na atividade enzimática.....                        | 40 |
| 6. 3. 7 Determinação de Acetoína e Diacetil.....                         | 40 |
| 6. 3. 8 Estabilidade operacional de ALDC imobilizada aplicada a cerveja. | 41 |
| 6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 42 |
| 6. 4. 1 Resultados da Imobilização .....                                 | 42 |
| 6. 4. 2 Estabilidade de ALDC aplicadas a cerveja .....                   | 43 |

|  |    |
|--|----|
| 6. 4. 3 Efeito do pH sobre a atividade de ALDC .....   | 45 |
| 6. 4. 4 Estabilidade térmica.....  | 47 |
| 6. 5. 5 Estabilidade Operacional .....   | 49 |
| 6. 6 CONCLUSÕES .....  | 51 |
| 7.1 RESUMO .....   | 55 |
| 7. 3 MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 58 |
| 7. 3. 1 Reagentes .....  | 58 |
| 7. 3. 2 Preparo das esferas.....   | 58 |
| 7. 3. 3 ALDC imobilizada em esferas de alginato/gelatina.....                                  | 59 |
| 7. 3. 4 Atividade da ALDC.....   | 59 |
| 7. 3. 5 Estabilidade térmica, a variação de pH e estocagem .....                               | 60 |
| 7. 3. 6 Quantificação de Acetoina e Diacetil .....   | 61 |
| 7. 3. 7 Estabilidade operacional da ALDC imobilizado aplicado à cerveja. 62                    |    |
| 5. 3. 8 Propriedades Térmicas do Imobilizado.....  | 62 |
| 7. 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 63 |
| 7. 4. 1 Resultados de Imobilização.....  | 63 |
| 7. 4. 2 Efeito do pH .....   | 65 |
| 7. 4. 3 Estabilidade Térmica .....   | 66 |
| 7. 4. 4 Análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria de varredura<br>diferencial (DSC) ..... | 68 |
| 7. 4. 5 Estabilidade Operacional .....   | 70 |
| 7. 4. 6 Estabilidade durante o armazenamento .....   | 72 |
| 7. 5 CONCLUSÕES .....  | 73 |
| 9. CONCLUSÕES .....  | 81 |

## 1. INTRODUÇÃO

A legislação brasileira define, segundo o DECRETO Nº 6.871, DE 4 DE JUNHO DE 2009, Art. 36, que “cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo”.

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida e a terceira no ranking de consumo entre todas as bebidas, ficando atrás apenas do consumo de água e chá. A produção mundial no ano de 2017 foi cerca de 190,9 milhões de quilolitros. Os três maiores produtores são o EUA, China e Brasil (BARON, 2018; KIRIN, 2018). Por suas características a cerveja do tipo *lager* domina o mercado, estima-se que o volume de produção seja equivalente a soma dos outros tipos (Ale, Stout, Porter, Malt e outros)(SINHA, 2018).

Durante a produção, há uma sequência de procedimentos que são necessários para a obtenção de produtos com padrões de qualidade aceitáveis. Falhas na elaboração podem gerar *off-flavors* (aromas desagradáveis), esses acabam por depreciar o produto, além de gerar custos adicionais a produção. Entre os principais defeitos encontra-se a formação de dimetil sulfeto (DMS), que confere aromas de vegetais cozidos, sabor de levedur, formação de acetaldeído que gera aromas de maçã, e principalmente de diacetil que sensorialmente produz aroma de manteiga. Na etapa de maturação da cerveja ocorrem transformações que auxiliam no aperfeiçoamento da qualidade sensorial da cerveja, com destaque para o aspecto aromático, eliminando ou minimizando os *off-flavor*.

A etapa de maturação pode ser uma etapa crítica para a produção industrial de cerveja, pois demanda de longos períodos (3 à 5 semanas) em tanques com controle de temperaturas entre 5 e 10° C, que gera um gasto energético elevado além de pode ser um gargalo da produção.

Ao longo das últimas décadas pesquisas vêm buscando alternativas para a redução do tempo de maturação, sem afetar a qualidade final do produto, para eliminar *off-flavor* gerado pela formação de diacetil. Tem-se

selecionado cepas de leveduras com menor potencial de formação desse composto. Outros, estudos tem testado aplicação de calor, mas os melhores resultados obtidos pelas industria são a aplicação da enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase (ALDC) (EC 4.1.1.5). Essa é capaz de converter  $\alpha$ -acetolactato em acetoina diretamente, sem formar diacetil como composto intermediário da reação.

O uso de enzimas livres pode gerar inconvenientes, como a difícil remoção do meio reacional, baixa estabilidade térmica, a variação de pH, ou ainda compostos presentes no meio. A imobilização é uma alternativa que tem demonstrado grande potencial, e diversos casos aumentando a estabilidade da enzima e ainda possibilitando a reutilização, ou ainda possibilidade de utilização de forma contínua em bioreatores.

Diante das novas possibilidades da aplicação da ALDC na redução do tempo de maturação, da possibilidade de criar um derivado mais estável, da capacidade de controlar a reações enzimáticas e principalmente de reutilizar a enzima, estudos sobre a imobilização de ALDC apresentam grande potencial para a ciência e para a indústria cervejeira.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar a Imobilização covalentemente  $\alpha$ -actolactato descarboxilase para aplicação no processo de maturação de cerveja *Lager*.

### 2.2 Específicos

- a) Aperfeiçoar o método de imobilização covalente de  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase.
- b) Determinar as características da enzima imobilizada comparando com a livre.
- c) Aplicar as enzimas imobilizadas e avaliar a estabilidade diretamente em cerveja por processo descontínuo.
- d) Avaliar a influência da utilização da  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase durante a maturação nos níveis de diacetil e acetoína.
- e) Desenvolver e avaliar o potencial do suporte de alginato/gelatina para a imobilização de  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Cerveja

O surgimento das bebidas alcoólicas está encoberto por mistérios, existem indícios da utilização de frutos fermentados por leveduras selvagens no período neolítico. Diferentes dos frutos, os cereais possuem carboidratos complexos que necessitam de hidrólises para conversão em monossacarídeos, tornando-os biodisponíveis para as leveduras. Historicamente, existem duas formas de realizar essa conversão: através da mastigação hidrolisando amido por meio da ptialina, uma amilase presente na saliva, ou pela malteação onde as enzimas ativadas durante a germinação são utilizadas (NELSON, 2005).

A definição legal da cerveja no Brasil no DECRETO Nº 6.871, DE 4 DE JUNHO DE 2009, Art. 36., estabelece que “cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo”. Esse decreto faz considerações como: parte do malte de cevada poderá ser substituído por adjuntos cervejeiros, cujo emprego não poderá ser superior a quarenta e cinco por cento em relação ao extrato primitivo; e considera adjuntos cervejeiros a cevada cervejeira, e os demais cereais aptos para o consumo humano, malteados ou não-malteados, bem como os amidos e açúcares de origem vegetal.

Cerveja é uma bebida amplamente difundida e consumida, sua produção mundial no ano de 2017 foi cerca de 190,9 milhões de quilolitros e os três maiores produtores são o EUA, China e Brasil (BARON, 2018; KIRIN, 2018). Por suas características, a cerveja do tipo *Lager* domina o mercado, estima-se que o volume de produção seja equivalente a soma dos outros tipos: *Ale*, *Stout*, *Porter*, *Malt* e outros (SINHA, 2018). O setor cervejeiro brasileiro apresenta indicadores significativos, sendo responsável por 2% do Produto Interno Bruto (PIB) e representando 15% da indústria de transformação nacional, apresentando ainda um crescimento anual superior ao PIB (CervaBrasil, 2014).

### 3.1.1 Produção

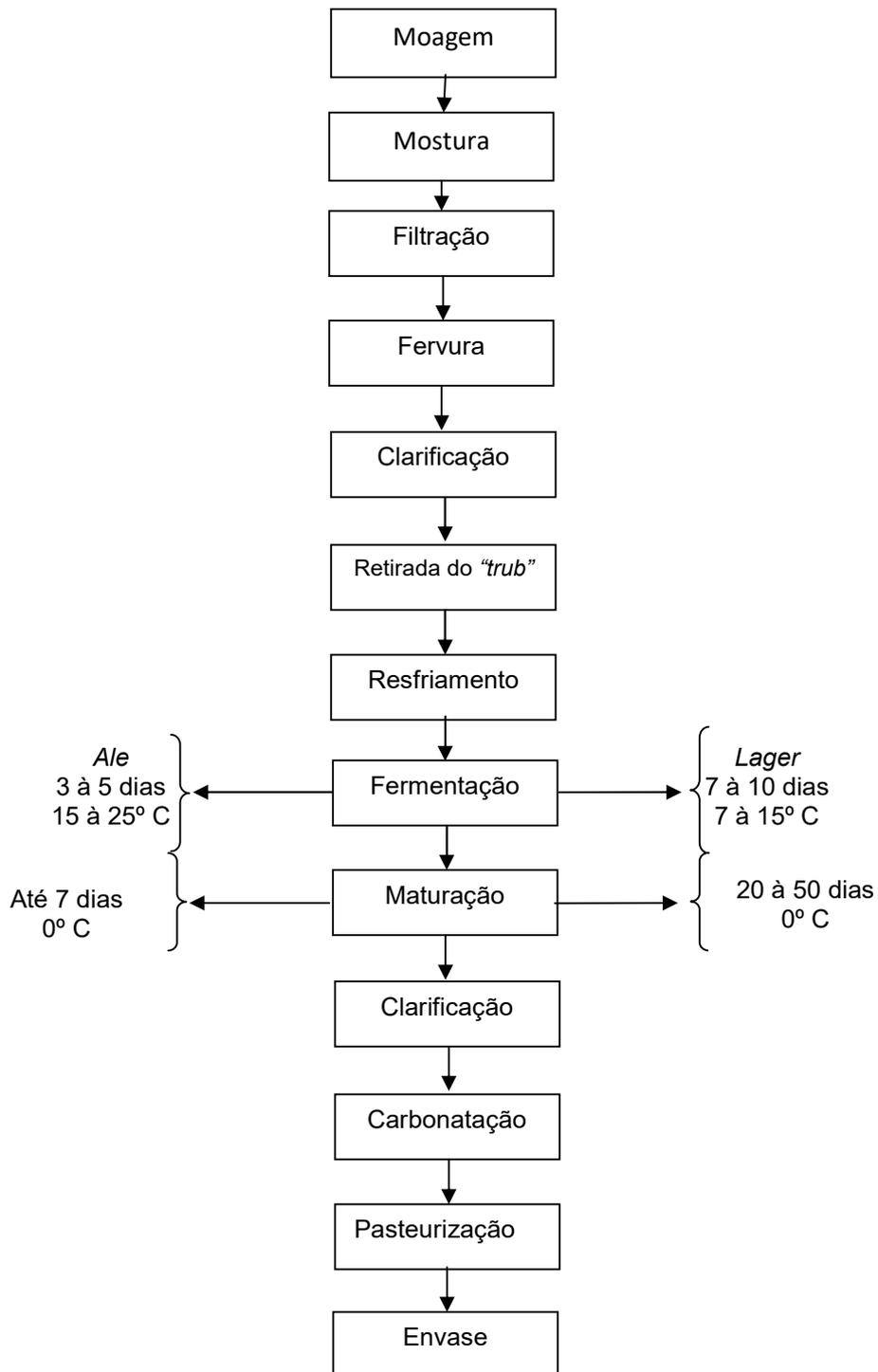
A etapa de moagem do malte consiste em romper os grãos para expor o amido para que durante a mostura ocorra a transformação em açúcares fermentescíveis. Este processo tem grande influência nas demais etapas, como fermentação e separação do mosto, além de influenciar diretamente na qualidade final do produto (MOUSIA et al., 2004). Durante a mostura o malte moído é misturado com água e aquecido através de um perfil de temperatura predeterminado, permitindo que várias enzimas completem a hidrólise das reservas de endosperma iniciadas no processo de malteação (VAN NIEROP et al., 2004).

Na seqüência do processo é realizada a filtração (*lautering*), que consiste na separação da fração insolúvel do mosto quente para produzir o mosto doce, após a separação o mosto passa pela etapa de fervura, para inativar enzimas, remover componentes de sabores indesejáveis, esterilizar, isomerizar os  $\alpha$ -ácidos presentes no lúpulo e precipitar proteínas e polifenóis. Esse precipitado denominado de “*trub*” é retirado, e o mosto é resfriado e inoculada a levedura cervejeira (FILHO, 2016; MOUSIA et al., 2004; VAN NIEROP et al., 2004).

Teoricamente as duas principais leveduras utilizadas na elaboração de cervejas são *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*, a utilização dessas produzirão cervejas do tipo *Ale* e *Lager* industrialmente, respectivamente. A temperatura e o tempo de fermentação serão de 3 à 5 dias e 15 à 25° C para as *Ale* e de 7 à 10 dias e de 7 à 15° C para as cervejas *Lager*. A etapa de maturação é realizada mantendo o mosto fermentado a temperaturas próximas de 0° C por até 7 dias para as *Ale* e de 3 à 5 semanas para as *Lager*, essa etapa é necessária para que ocorra a redução dos níveis de diacetonas vicinais produzidas durante a fermentação que podem gerar *off-flavor* (BAMFORTH, 2017; FILHO, 2016).

Após a fermentação a cerveja apresenta elevada turbidez devido à presença de levedura e resíduos de malte triturado, para produzir uma bebida clara, as partículas coloidais devem ser removidas pelo processo de filtração para obter uma boa aparência visual e adequadas características sensoriais

(BENÍTEZ et al., 2013; KUPETZ et al., 2018). As etapas subseqüentes na elaboração da cerveja são a carbonatação, pasteurização e envase, o fluxograma da elaboração é apresentado na Figura 1.



**Figura 1.** Fluxograma da produção de cerveja.

### 3.1.2 Composição volátil da Cerveja

Trabalhos realizados identificaram grande número de compostos voláteis em cerveja, incluindo aldeídos, ésteres, éteres, cetonas, alcoóis, terpenos e sesquiterpenos (BRÁNYIK et al., 2008; TRESSL et al., 1978). Tais compostos são oriundos do malte (ceral, malteação e mostura), lúpulo ou metabólitos provenientes da fermentação.

O lúpulo é ingrediente essencial à característica organoléptica e a qualidade da cerveja, adicionando as características de amargor e contribuindo significativamente com o perfil aromático da cerveja. Trabalhos publicados por Kishimoto et al., (2005), Steenackers, De Cooman e De Vos, (2015) identificaram diversos voláteis presentes no lúpulo e em seus óleos essenciais, destacando principalmente a presença de terpenos e sesquiterpenos

Durante a etapa de mosturação ocorre a oxidação de lipídeos, gerando aldeídos de cadeias lineares, tais como pentanal e hexanal. A degradação de Strecker produz compostos de grande importância ao perfil aromático da cerveja, onde se destacam a formação de aldeídos como 2-metil-propanal, 3-metil-butanal, 2-metil-butanal, benzaldeído, metional e fenilacetaldéido. A Reação de Maillard gera compostos como furfural e hidroximetilfurfural, que são encontrados em análises de voláteis de mostos e cervejas (DE SCHUTTER et al., 2008; HIDALGO; ZAMORA, 2004; HOFMANN; SCHIEBERLE, 2000).

A síntese de ésteres pela ação das leveduras durante o processo de fermentação gera um grande número de compostos, que imprimem características sensoriais à cerveja, principalmente aromas frutados. Os ésteres com maior importância no aroma de cerveja são acetato de etila, acetato de isoamila (frutado, banana), caproato de etila e caprilato de etila (maçã), e fenil acetato de etila (floral, rosas, mel), (BRÁNYIK et al., 2008; VERSTREPEN et al., 2003).

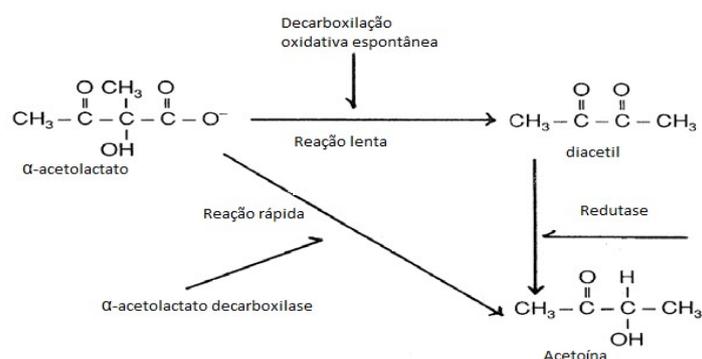
Dicetonas vicinais são compostos produzidos durante o processo fermentativo, normalmente estão presentes em cervejas, mas são considerados como defeitos (*off-flavours*). Dentro desse grupo de compostos o

diacetil e a 2,3-pentanodiona são os de maior destaque. Estes compostos são comumente encontrados em alimentos fermentados, como bebidas alcoólicas e produtos lácteos (BAMFORTH; KANAUCHI, 2004; LANDAUD; LIEBEN; PICQUE, 1998). Diacetil e 2,3-pentanodiona são originários de  $\alpha$ -acetolactato e  $\alpha$ -acetohidroxitirato, respectivamente, por meio de uma descarboxilação oxidativa. Estes precursores são intermediários na síntese de valina, leucina e isoleucina (BRÁNYIK et al., 2008; WAINWRIGHT, 1973).

### 3. 1. 3 Diacetil

O aroma de manteiga pode estar presente em cerveja como um *off-flavour* (aroma desagradável) causado pela presença de diacetil em concentrações superiores a 0,15 mg/L. Esse composto é formado por uma descarboxilação oxidativa espontânea do  $\alpha$ -acetolactato, posteriormente sendo reduzido a acetoína pela ação de redutases naturalmente presentes na cerveja (BAMFORTH; KANAUCHI, 2004; BRÁNYIK et al., 2008; WAINWRIGHT, 1973). A Figura 2 exemplifica a seqüência de reações possíveis durante a transformação  $\alpha$ -acetolactato em diacetil e acetoína.

A maturação da cerveja é realizada tradicionalmente em temperaturas de -1 a 10°C, por um período de 3 à 5 semanas, para que ocorra a redução dos teores de diacetil (GODTFREDSSEN et al., 1984a; GODTFREDSSEN; LORCK; SIGSCAARD, 1983). O limiar olfativo descrito na literatura para concentração de acetoina presente em cerveja é de 17 mg/L, concentração cerca de 100 vezes maior a de diacetil (HAUKELI; LIE, 1975).



**Figura 2.** Reação de formação e redução de diacetil, adaptado de Wainwright, (1973).

Trabalho publicado por Brányik *et al.*, (2008) indica que a quantidade de diacetil total formado durante a fermentação contínua de cerveja, tende a alcançar concentrações superiores desse composto, quando comparado a cervejas jovens fermentadas tradicionalmente antes da maturação. Shindo *et al.* (1993), comparando a produção do precursor do diacetil, em fermentações de cerveja utilizando leveduras livre e imobilizadas em alginato, encontraram respectivamente valores de 0,2 mg/L e 0,94 mg/L de  $\alpha$ -acetolactato.

Na produção de cerveja utilizando bioreator contínuo, com tempo de residência 12,75 horas, foram encontrados valores entre 0,067 e 0,093 mg/L de diacetil, superiores aos 0,043 mg/L verificados no processo fermentativo tradicional (SMOGROVICOVÁ *et al.*, 1997). Avaliando as características analíticas de cervejas fermentadas com leveduras imobilizadas Brányik *et al.*, (2006), encontraram valores satisfatórios para todos os parâmetros avaliados, exceto para a concentração de diacetil quando comparados a cervejas comerciais.

Em trabalho avaliando a viabilidade da produção de cerveja obtida por fermentação primária contínua do mosto de alta densidade, utilizando biorreator “*airlift*” com biomassa floculada, Pires e colaboradores (2015), observaram que nas melhores condições de fermentação obtiveram 3,75 g/L por hora de etanol. Mas com altos níveis de diacetil presentes na cerveja verde, fazendo-se necessário uma maturação de 10 à 20 dias, para reduzir a concentração à valores abaixo dos limite olfativo. Esses autores ainda observaram que a produção de diacetil foi fortemente correlacionada com a composição do mosto utilizada.

Pesquisas realizadas têm buscado alternativas para acelerar o processo de maturação da cerveja. A utilização de calor com objetivo de reduzir o tempo de maturação tem sido testada há varias décadas, Yamauchi e colaboradores (1995), utilizaram o tratamento térmico em cervejas jovens, em condições anaeróbias, obtiveram 80% de conversão de  $\alpha$ -acetolactato em acetoína e os demais 20% em diacetil.

Outra alternativa, é a utilização de tecnologia enzimática, em particular o uso da  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase para acelerar a transformação do  $\alpha$ -

acetolactato em acetoina de forma mais rápida e controlada (CHOI; AHN; KIM, 2015; GODTFREDSSEN; OTTESEN, 1982)

A literatura apresenta escassos trabalhos relacionados à imobilização de  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase, segundo Datta, Christena e Rajaram (2013) a imobilização proporciona a possibilidade de aumentar a relação enzima/substrato, tempo de utilização (reusos) e facilidade de purificação do processo. O modelo de maturação contínua utilizando enzimas imobilizadas em esferas de polieletrólitos foi estudado por Dulieu *et. al.* (2000), que se mostraram apropriadas para o uso em bioreator, permitindo o processamento de cinco vezes o volume de cerveja quando comparado ao processo usual com enzimas livres em batelada. A imobilização de  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase em nanopartículas paramagnéticas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2 \text{NH}_2$ ), embora apresentando atividade menor, quando comparadas a enzima livre, foi satisfatória por apenas cinco reutilizações (QIAN *et al.*, 2015).

### 3. 2 $\alpha$ -Acetolactato Descarboxilase (ALDC)

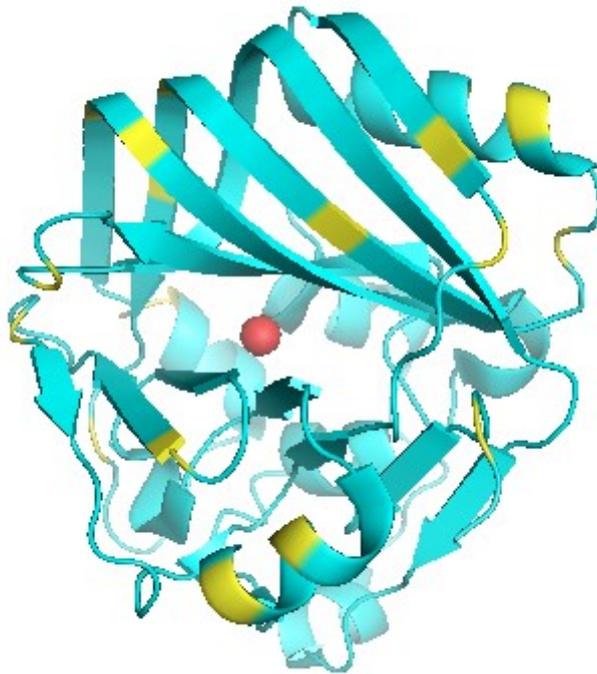
Diversas bactérias apresentam enzimas específicas para a decarboxilação do  $\alpha$ -acetolactato, que estão associadas diretamente a biossínteses dos aminoácidos valina e isoleucina (ARFIN; HILL; SAWADA, 1979). A enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase (EC 4.1.1.5) vem sendo purificada e caracterizada a partir de diversas espécies de bactérias, *Brevibacterium acetylicum* (OHSHIRO; AISAKA; UWAJIMA, 1989), *Lactobacillus casei* DSM 2547 (RASMUSSEN *et al.*, 1985), *Lactococcus lactis* (KISRIEVA *et al.*, 2000), *Leuconostoc lactis* NCW1 (O'SULLIVAN *et al.*, 2001), *Klebsiella pneumoniae* (WU *et al.*, 2018b).

No que se refere à aplicação Godtfredsen e Ottesen (1982), obtiveram resultados satisfatórios no processo de maturação da cerveja adicionando ALDC, purificada a partir de *Enterobacter aerogenes*, por um período de 24 horas a 10° C, reduzindo a concentração de dicetonas, diacetil e 2,3-pentanodiona à valores inferiores ao limiar olfativo, sem afetar demais características sensoriais do produto.

Em trabalho de “*screening*”, buscando encontrar microrganismos com potencial de produção de ALDC para a utilização no processo de maturação de cerveja Godtfredsen, Lorck e Sigsgaard (1983), testaram 325 cepas bacterianas de 79 espécies, 34 gêneros e 16 famílias, das quais a atividade de acetatolactato descarboxilase foi detectada em 11 famílias, 20 gêneros e 40 espécies bacterianas diferentes. Esses autores sugerem a utilização da ALDC originária de *Bacillus* e *Lactobacillus*, pois estas espécies são amplamente utilizadas na indústria de alimentos, principalmente na indústria de laticínios, ou na produção de enzimas direcionadas a aplicação em alimentos, estando classificados como microrganismos geralmente considerado como seguro (GRAS, do inglês “*Generally regarded as safe*”).

O *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA), classifica a enzima  $\alpha$ -acetolactate descarboxylase do microrganismo *Bacillus brevis* expressa em *Bacillus subtilis* através de DNA recombinante, como não-patogênica e não-toxigênica. A enzima é extracelular, produzida através de fermentação submersa, filtrada e estabilizada. O preparado enzimático líquido de cor marrom, com aproximadamente 2% de sólidos orgânicos, é direcionado para a aplicação na indústria cervejeira (FAO, 2016).

A enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase (EC 4.1.1.5) do microrganismo *Bacillus brevis* tem peso molecular de 29,093 KDa, e consiste de 260 resíduos de aminoácidos dispostos em uma única cadeia de peptídeos, sem ligações dissulfetos (SVENDSEN; JENSEN; OTTESEN, 1989). Para essa enzima os resultados de cristalografia de raio-X demonstraram que três histidinas altamente conservadas (194, 196 e 207) coordenam um íon  $Zn^{+2}$ , juntamente com um glutamato conservado (253) no carbono terminal (MARLOW et al., 2013), demonstrado na Figura 3. E Ji et al., (2018) encontraram um íon zinco coordenado por histidinas altamente conservadas (191, 193 e 204) e glutamatos conservados (62 e 251) para ALDC oriunda de *Bacillus subtilis*. Esses trabalhos vem a reforçar pesquisas anteriores onde ficou comprovada a correlação de dependência de íons bivalentes, adicionados ao meio de cultura, na produção de ALDC por *Bacterium acetylicum* (OHSHIRO; AISAKA; UWAJIMA, 1989), que a atividade relativa foi de 470%, quando suplementado com zinco.



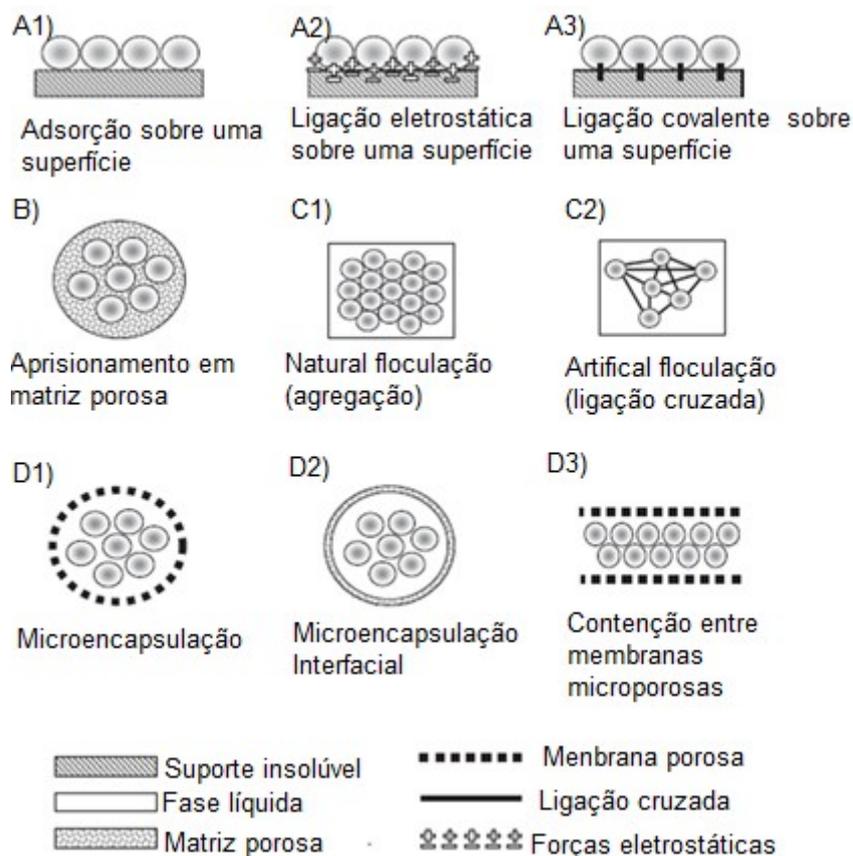
**Figura 3.** Conformação da ALDC de *Bacillus brevis*, em vermelho o íon zinco, e lisina em destaque amarelo. Fonte: Marlow *et al.*, (2013).

Choi, Ahn e Kim (2015) avaliaram dois tipos de cervejas, a “Jinyang” e a “Dahyang” elaboradas com dois e seis tipos de cevada respectivamente, com adição de ALDC em três concentrações (0,02; 0,04 e 0,06 U/mL). Os teores de diacetil foram reduzidos proporcionalmente a adição da enzima, os melhores resultados foram a redução de 15% na cerveja “Jinyang” e de 25% para a “Dahyang”. Tais autores concluíram que a utilização da enzima ALDC, reduz a concentração de diacetil e por consequência o tempo necessário para a maturação, sem alterar as demais características de qualidade da cerveja.

### 3. 3 Imobilização de enzimas

Diversos processos biotecnológicos são favorecidos através de técnicas de imobilização e, portanto, várias dessas técnicas e materiais de apoio têm sido propostos. Na Figura 4 são apresentadas as técnicas normalmente utilizadas para imobilização, que podem ser divididas em quatro grandes categorias com base no mecanismo físico empregado: fixação ou adsorção em sólidos, aprisionamento em uma matriz porosa, floculação (natural ou

artificialmente induzida), e contenção por barreiras (KOURKOUTAS et al., 2004; PILKINGTON et al., 1998).



**Figura 4:** Principais métodos de imobilização: (A) fixação ou adsorção em sólidos; (B) aprisionamento em matriz porosa; (C) flocculação (natural ou artificialmente induzida), e (D) contenção atrás de barreiras. Fonte: KOURKOUTAS et al.; 2004.

Os métodos de imobilização podem ser divididos basicamente em três, ligação a um suporte, aprisionamento (encapsulamento) e *cross-linking*. A ligação a um suporte pode ser química (tal como interações hidrofóbicas e de van der Waals), ou de natureza iônica ou covalente. O encapsulamento, basicamente é o aprisionamento de uma enzima dentro de uma rede de polímeros orgânicos ou inorgânicos, tais como poliacrilamida e sílica sol-gel, respectivamente, ou um dispositivo de membrana, tal como uma fibra oca ou uma micro-cápsula. O método *cross-linking* (ligação cruzada) baseia-se na formação de agregado de enzimas reticulados (*cross-linked enzyme aggregates* - CLEAs) ou cristais (*cross-linked enzyme crystals* - CLECs),

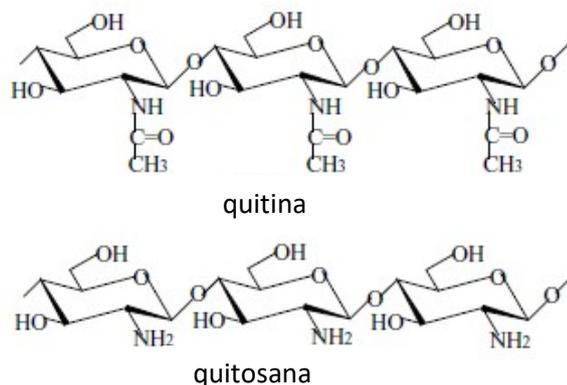
obtidos através do emprego de um reagente bifuncional, usado para realizar ligações entre duas ou mais enzimas (SHELDON; VAN PELT, 2013).

### 3.4 Suportes Utilizados para Imobilização de Enzimas

De maneira simplificada podemos dividir os materiais utilizados como suportes para imobilização de enzimas em dois grupos de materiais: orgânicos e inorgânicos. Entre os suportes inorgânicos destacam-se as sílicas, óxido inorgânicos (alumínio, titânio e zircônio), materiais minerais (bentonite, halosite, caulinite, montmorilonite, sepiolite e hidroxiapatita), celite, cerâmicas e carvão/carbono ativado. Suportes orgânicos sintéticos como: poliamida, polianilina, poliestireno, poliuretano, resinas comerciais (Amberlite, Sepabeads e DEAE celulose) e orgânicos naturais ou biopolímeros: alginato, quitosana, gelatina, carragena, pectina, amido, celulose e agarose (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013; ZDARTA et al., 2018).

#### 3.4.1 Quitosana

Quitina e quitosana são polissacarídeos aminados naturais, a quitina é um recurso biológico renovável importante, estando presente como constituinte das carapaças de crustáceos, dos exoesqueletos de insetos e das paredes celulares de fungos, proporcionando resistência e estabilidade. Quimicamente, a quitina é composta de ligações do tipo (1 → 4) 2-acetamido-2-desoxi-β-D-glicose (ou N-acetil-D-glicosamina), formando uma cadeia de polímero linear, demonstrada na Figura 5. A quitosana é o principal derivado da quitina, obtido através da N-desacetilação, de grau variável, caracterizada como copolímero de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina (KRAJEWSKA, 2004).



**Figura 5:** Estruturas de quitina e quitosana. Fonte: (KRAJEWSKA, 2004).

Os agentes bifuncionais que se destacam na ativação de suportes são 3-aminopropiltrimetoxissilano, 3-aminopropiltriethoxissilano e 3-cloropropiltrimetoxissilano, epicloridrina, glutaraldeído, glioxal, formaldeído, 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida, etilenodiamina, glicidol e carbonildiimidazol, genipina, epicloridrina (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014; MENDES et al., 2011).

A reação glutaraldeído com a amina primária produz ligações covalentes cruzadas, essa capacidade vêm sendo utilizada com diversas finalidades, entre elas como ligante em matrizes poliméricas. A utilização do glutaraldeído com a finalidade de modificar a estrutura de quitosana, devido principalmente a capacidade de imobilizar proteínas, tem ganho destaque em pesquisas (MONTEIRO; AIROLDI, 1999).

Segundo o Regulamento da União Européia (UE) 1759 de 2015, o glutaraldeído esta autorizada para uso em biocidas do tipo 4, que são os aplicados em superfícies em contato com os gêneros alimentícios e alimentos para animais. A *Food and Drug Administration* (FDA, Agência Regulamentadora dos Estados Unidos da América), autoriza o uso de glutaraldeído como agente intercruzamento e conservação de microcápsulas de flavorizantes (FDA, 2018).

Trabalhos realizados pelo Grupo de Biotecnologia, Bioprocessos e Biocatálise (BBB-UFRGS), veem obtendo bons resultados utilizando suportes

de quitosana ativados com glutaraldeído para imobilizando diferentes enzimas. São exemplos dessa aplicação, a imobilização de  $\beta$ -galactosidase para hidrólise de lactose (KLEIN et al., 2012) e síntese de lactosacarose (DUARTE et al., 2017), a imobilização de ciclodextrina glicosiltransferase para síntese de cilodextrinas a partir de amido (SCHÖFFER et al., 2013) e da  $\beta$ -fructofuranosidase para a hidrólise de sacarose (VALERIO et al., 2013) e síntese de frutooligosacarídeos (LORENZONI et al., 2014). Esses trabalhos demonstraram bons resultados de estabilidade do agregado enzimático, possibilidade de diversos reusos e características adequadas à utilização em bioreatores contínuos (leito fixo ou fluidizados).

### 3. 4. 2 Alginato

O alginato pertence a um grupo de polímeros usados nas indústrias alimentícia e farmacêutica como modificadores de propriedades de soluções e agentes gelificantes. Polissacarídeo extraído de algas marinhas marrons, copolímero de estrutura linear formado por unidades de ácidos L-gulurônico e D-manurônico, o alginato (ácido algínico) é aniônico, biodegradável, atóxico e de baixo custo (LUPO et al., 2015; WU et al., 2018a). Alginato na forma de alginato de sódio apresenta a capacidade de aumentar a viscosidade em soluções aquosa, mas quando ocorre a substituição do íon sódio por um bivalente, comumente cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ), ocorre uma dimerização de cadeias poliméricas por coordenação por esse íon, de acordo com o modelo *egg-box* (caixa de ovo)(SIKORSKI et al., 2007).

Essa propriedade vêm sendo estudada para imobilizações, por aprisionamento em matriz porosa, de leveduras para fermentação de cerveja (SHINDO et al., 1993; SMOGROVICOVÁ et al., 1997), segunda fermentação de espumante pelo método tradicional (COSTA et al., 2018; GÒDIA; CASAS; SOLÀ, 1991), para imobilização de enzimas, ciclodextrina glicosiltransferase (RAKMAI; CHEIRSILP; PRASERTSAN, 2015), xilanases (PAL; KHANUM, 2011), lacase (MOGHARABI et al., 2012); para retenção de ingredientes funcionais, como a curcumina um antioxidante natural (SARIKA; JAMES, 2016), e extrato de cacau (LUPO et al., 2015).

A possibilidade de realizar *blends* de alginato e outros polímeros aumentando a capacidade de produzir compósitos com características distintas para novas aplicações. A elaboração de filmes de alginato/gelatina apresentou melhoras significativas nas propriedades mecânicas e estabilidade térmica, quando comparado aos filmes contendo apenas por alginato e gelatina (XIAO et al., 2001), para utilização em engenharia de tecidos do miocárdio (ROSELLINI et al., 2009) e alginato/quitosana para criar sistemas de liberação controlada de fármacos (TAPIA et al., 2004).

### 3. 4. 3 Gelatina

A gelatina é uma proteína funcional solúvel em água, que possui a capacidade de formar géis transparentes sob condições específicas. Sua obtenção é realizada através da hidrólise parcial de colágeno de peles de animais, ossos e tendões, com aplicação de calor em pH alcalino ou ácido. Propriedades físicas, estruturais e variações químicas ocorrem devido a diferentes fontes de colágeno e o método de preparo (DJAGNY; WANG; XU, 2001). Diferente de outros hidrocolóides, sendo maioria polissacarídeos, a gelatina é uma proteína digestível contendo todos os aminoácidos essenciais, exceto o triptofano (MARIOD; ADAM, 2013).

Devido a suas características, esse hidrocolóide está sendo aplicado na indústria farmacêutica, na confecção de cápsulas, formação de emulsões, usos em cosméticos, entre outros, e na indústria de alimento principalmente na elaboração de sobremesas, doces, sorvetes, produtos cárneos e lácteos (DJAGNY; WANG; XU, 2001; GOMEZ-GUILLEN et al., 2011; MARIOD; ADAM, 2013). Na elaboração de vinhos é utilizada na etapa de clarificação, ajudando a precipitar ou na filtração de impurezas, além de aumentar a estabilidade coloidal e tartárica (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

Nas últimas décadas pesquisas desenvolvendo filmes biodegradáveis estão ganhando destaques, a utilização de gelatina em *blends* tem alcançado bons resultados, incluindo filmes de alginato/gelatina (DOU et al., 2018; XIAO et al., 2001), gelatina/quitosana/nanoceluloses (NOORBAKHS-SOLTANI;

ZERAFAT; SABBAGHI, 2018), e utilizando resíduos gelatinosos de cápsulas da indústria nutracêutica (DE CAMPO et al., 2017; DE MORAES CRIZEL et al., 2018; IAHNKE et al., 2016).

A polivalência está além da utilização na indústria de alimentos, farmacêutica, ou na produção de filmes biodegradáveis, pesquisas vêm sendo realizadas utilizando a gelatina no desenvolvimento de suportes para a imobilização de enzimas. Como por exemplo, a imobilização de lacase para descoloração de corantes sintéticos em suporte de gelatina/alginato (MOGHARABI et al., 2012),  $\alpha$ -galactosidase em suporte de alginato/gelatina para a redução de oligossacarídeos não digeríveis em “leite de soja” (NAGANAGOUDA; MULIMANI, 2006),  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* (TANRISEVEN; DOGAN, 2002),  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* para hidrolises de lactose presente em soro de leite (MÖRSCHBÄCHER; VOLPATO; SOUZA, 2016), ciclodextrina glicosiltransferase para produção de  $\beta$ -ciclodextrina (RAKMAI; CHEIRSILP; PRASERTSAN, 2015), com *blends* para imobilização de lípases (FADNAVIS et al., 2003).

### 3. 5 Alternativas para imobilização

Buscando melhorar a capacidade de imobilização de enzimas nos suportes, tem se buscado diversas alternativas, uma das possibilidades é utilizar nanopartículas como suportes, essas apresentam uma relação de área superficial/volume do suporte elevada, muito superiores as das macropartículas, o que pode garantir uma maior concentração de enzimas por massa ou volume de suporte utilizado (ANSARI; HUSAIN, 2012; KLEIN et al., 2012). O uso de enzimas imobilizadas em nanopartículas pode apresentar desvantagens, como perda de atividade por aglomerações e precipitações do suporte, e dificuldades de separar do meio reacional (MERYAM SARDAR, 2015).

Pesquisas têm demonstrado que a imobilização em macropartículas apresenta maior estabilização da enzima quando comparado a imobilização em nanopartículas. Os resultados para estabilidade térmica da  $\beta$ -galactosidase

imobilizada em macro e nanopartículas de quitosana demonstram que as macropartículas estabilizam melhor as enzimas, as quais ficam menos suscetíveis às ações da temperatura (KLEIN et al., 2012). Por outro lado, Valerio *et al* (2013) não observaram alterações na estabilidade térmica e a variações de pH, comparando invertase livre e imobilizada em nanopartículas de quitosana. Também não foi observado alteração na estabilidade a variações de pH em ALDC imobilizada em nanopartículas paramagnéticas (QIAN et al., 2015).

Outra possibilidade de melhorar a capacidade de imobilização de enzimas aos suportes é a utilização de materiais porosos, que aumentam significativamente a relação área/volume ou área/por massa de suporte. A sílica é um dos materiais de suporte inorgânicos mais utilizados para a imobilização enzimática, devido as suas propriedades físicas, esse material oferece adequadas propriedades de sorção devido à sua estrutura porosa com elevada área superficial (ZDARTA et al., 2018).

A imobilização em matrizes porosas pode ser via adsorção, como por exemplo, lipase Novozym 435 imobilizada em resina acrílica macroporosa, ou através de ligações covalentes entre o suporte funcionalizado e a enzima, como Eupergit<sup>®</sup>s C, no primeiro método pode ocorrer a perda de atividade por lixiviação das enzimas, o que não ocorre quando se estabelece uma ligação covalente (SHELDON; VAN PELT, 2013).

No item anterior foi abordado a possibilidade de imobilização em biopolímeros ativados com agentes bifuncionais, pesquisas estão sendo realizadas para avaliar a capacidade de produção desses suportes com área superficial elevada através da criação de poros. Microesferas porosas de sílica/quitosana foram sintetizadas e testadas para a absorção de metais pesados em águas residuais (ZHAO et al., 2013). Micropartículas porosas de alginato/gelatina apresentaram bons resultados para microencapsulação de bioativos alimentares (DEVI; KAKATI, 2013). Esferas de quitosana porosas, produzidas adicionando carbonato de sódio na solução de coagulação, obtiveram aumento da atividade entre 1,6 e 1,9 vezes em relação a esfera controle para a imobilização de  $\beta$ -galactosidase (WAHBA, 2017).

### 3. 6 Determinação de voláteis

Para determinar os compostos voláteis de cervejas é necessária a realização de etapas de extração, e/ou limpeza das amostras. Na literatura estão descritas diversas técnicas utilizadas com essa finalidade. Anderhaegen et al., (2003) utilizaram a técnica de “*Purge & Trap*”, sistema onde amostras aquosas tem seus compostos voláteis e aromas são purgados por um gás de arraste e posteriormente retidos em material adsorvente, após são dessorvidos e analisados, para estudos da evolução dos voláteis durante o envelhecimento.

A metodologia de extração por sorção em barra de agitação (SBSE do inglês *stir bar sorptive extraction*) foi utilizada por Kishimoto et al., (2005) para análises em GC/MS, pesquisando a presença de terpenos em cervejas, oriundos do lúpulo e sua evolução. Associando essa técnica a extração líquido-líquido (LLE), possibilitou a otimização da determinação de ésteres característicos no *flavours* de cervejas (HORÁK et al., 2007).

Buscando diferenciar os perfis, de compostos com grupos carbonilas, de cervejas *lager* tchecas e espanholas, Andrés-Iglesias et al., (2016) utilizaram extração por microextração em fase sólida no espaço de cabeça (HS-SPME do inglês *Headspace Solid Phase Microextraction*) com derivatização por O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil) hidroxilamina (PFBOA), encontrando diferenças significativas principalmente pela concentração de diacetil e E-2-nonenal. Em trabalho similar, otimizaram a determinação de compostos com grupos carbonilas, derivatizando com composto diferente, o O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil) hidroxilamina hidrocloreto (PFBHA), com extração por HS-SPME, e determinados por cromatografia gasosa com detector de espectro de massa com armadilha de íon (GC-IT/MS do inglês *Gas Chromatography ion trap mass spectrometry detection*) (MOREIRA et al., 2013).

A técnica de extração de compostos voláteis em cerveja por HS-SPME vem sendo amplamente utilizada, os resultados publicados vêm demonstrando grande potencial. Na Tabela 1, está apresentado um resumo de diversos trabalhos que utilizaram essa técnica de extração concomitantemente a métodos de identificação e/ou quantificação de compostos voláteis.

**Tabela 1.** Resumo dos trabalhos publicados utilizando HS-SPME na avaliação de voláteis em cerveja.

| <b>Matriz Analisada</b>               | <b>Fibra Utilizada</b>                                 | <b>Compostos Identificados/quantificados</b>                            | <b>Método Analítico</b> | <b>Referência</b>                                |
|---------------------------------------|--|---|-------------------------|--|
| Cervejas Comerciais                   | DVB-CAR-PDMS   | 59 compostos identificados  | GC-MS                   | Riu-Aumatell et al., (2014)                      |
| Mosto                                 | PDMS<br>PDMS-DVB<br>CW-DVB<br>CAR-PDMS<br>DVB-CAR-PDMS | 12 compostos quantificados  |                         | De Schutter et al., (2008)                       |
| Cervejas comerciais                   | PDMS<br>PA<br>CAR-PDMS                                 | 182 compostos identificados   | GC-MS                   | Pinho, Ferreira e Santos (2006)                  |
| Cervejas industriais e artesanais     | PDMS-DV  | Ésteres, alcoóis, cetonas, ácidos carboxílicos, Hidrocarbonetos         | GC-MS                   | Rossi et al., (2014)                             |
| Cerveja comercial (Pilsen, 4% álcool) | PDMS   | Mais de 30 compostos, entre eles mirceno, linalool e humulonas.         | CG-MS                   | Kleinova e Klejdus (2014)                        |
| Cerveja Pilsen Comercial              | DVB/CAR/PDMS   | Acetato de etila, acetato de isoamila, etilhexanoato e 2,3-butanediona. | GC-MS<br>GC-ECD         | Da Silva et al., (2015)                          |
| Cerveja lager Comercial               | PDMS/DVB   | 39 Compostos  | GC-IT/MS                | Moreira et al., (2013)                           |
| Cerveja Comercial                     | DVB/CAR/PDMS<br>CAR/PDMS<br>PDMS                       | 9 compostos de interesse  | GC-FID/MS               | Charry-Parra, DeJesus-Echevarria e Perez, (2011) |

PDMS= Polidimetilsiloxano; DVB= Divinilbenzeno; CAR= Carboxen; PA= Polacrilato; CW= Carbowax; GC= Cromatografia gasosa; FID= Detector por ionização de chamas;MS= espectrometria de massas; IT= armadilha de íons; ECD= detector por captura de elétrons.

#### 4. Materiais e Métodos

A presente tese esta dividida em introdução, objetivos, revisão bibliográfica e em dois artigos, que serão apresentados nos capítulos 6 e 7. Em cada artigo os materiais e métodos estão descritos em subitens, detalhando os materiais necessários e as metodologias aplicadas para a execução do trabalho.

#### 5. Resultados e Discussão

Os resultados do presente trabalho serão apresentados sob a forma de artigos. O Capítulo 6 é uma versão em português do artigo submetido à revista *Process Biochemistry*, intitulado: “*Imobilização De  $\alpha$ -Acetolactato Descarboxilase Em Esferas De Quitosana. Aplicação Em Cerveja Para Prevenção De Off-Flavour*”. Resumidamente um trabalho onde imobilizou-se covalentemente ALDC em esferas de quitosana, com auxílio do agente bifuncional glutaraldeído.

O segundo artigo esta apresentado no Capítulo 7, intitulado como “*Utilização De Gelatina, Resíduo Da Indústria Nutraceutica, Como Agente De Corpo Em Esferas De Alginato Para Imobilização Covalente De  $\alpha$ -Acetolactato Descarboxilase*”. Nesse segundo artigo desenvolve-se um suporte híbrido de alginato/gelatina com a capacidade de imobilizar ALDC covalentemente através do uso de glutaraldeído.

## 6. ARTIGO 1: IMOBILIZAÇÃO DE $\alpha$ -ACETOLACTATO DESCARBOXILASE EM ESFERAS DE QUITOSANA. APLICAÇÃO EM CERVEJA PARA PREVENÇÃO DE OFF-FLAVOUR

Gustavo P. Costa, Luiza S. Spolidoro, Rafael C. Rodrigues, Vitor Manfroi e Plinho F. Hertz.

### 6.1 RESUMO

Este trabalho tem como objetivo imobilizar a enzima  $\alpha$  – acetolactato descarboxilase em esferas de quitosana. Além de avaliar a qualidade da imobilização por meio da análise de rendimento, eficiência e atividade recuperada, avaliar a estabilidade das enzimas livre e imobilizada em diversas temperaturas e pH. Também foi estudada a capacidade de atividade das enzimas imobilizadas quando aplicadas diretamente em cerveja e sua estabilidade operacional. As esferas de quitosana foram ativadas utilizando solução de glutaraldeído em água destilada (1%, 3% e 5%). A imobilização, quanto a variação de glutaraldeído, que melhor apresentou resultados foi a solução de 3%, tendo 84% de rendimento, 10,8% de eficiência e 9,1% de atividade recuperada. Embora nos dois casos tenha sido obtido um pH ótimo de 6,0, em pHs inferiores, a enzima imobilizada foi mais ativa. A enzima imobilizada manteve aproximadamente 70% atividade em pH 4,5, enquanto que a livre não alcançou nem 40% da atividade observada no pH 6,0. A enzima imobilizada também apresentou maior estabilidade térmica, em todas as temperaturas testadas, quando comparada à enzima em sua forma livre. A enzima imobilizada apresentou estabilidade operacional quando aplicada em cerveja, observando-se manutenção de 80% da atividade inicial após 12 ciclos consecutivos reusos.

Palavras chaves: Imobilização,  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase, *Off-Flavor* e esferas de quitosana.

## 6.2 INTRODUÇÃO

O aroma de manteiga na cerveja é um *off-flavour*, causado pela presença de diacetil o qual pode ser percebido a partir de concentrações superiores a 0,15 mg/L. Esse composto é formado pela descarboxilação oxidativa espontânea do  $\alpha$ -acetolactato, o diacetil pode ser reduzido a acetoina pela ação de redutases naturalmente presentes na cerveja (BAMFORTH; KANAUCHI, 2004; BRÁNYIK et al., 2008; WAINWRIGHT, 1973). O limiar olfativo descrito na literatura para acetoina presente em cerveja é de 17 mg/L, concentração cerca de 100 vezes maior a de diacetil (HAUKELI; LIE, 1975).

A redução dos teores de diacetil durante a maturação da cerveja é lenta e realizada tradicionalmente em temperaturas de -1 a 10°C, por um período de 3 à 5 semanas (GODTFREDSSEN et al., 1984a; GODTFREDSSEN; LORCK; SIGSCAARD, 1983). Para reduzir o tempo de processo, são adicionadas enzimas comerciais capazes de catalisar a transformação do  $\alpha$ -acetolactato.

Diversas bactérias apresentam enzimas específicas para a descarboxilação do  $\alpha$ -acetolactato, que estão associadas diretamente a biossínteses dos aminoácidos valina e isoleucina (ARFIN; HILL; SAWADA, 1979). A enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase (EC 4.1.1.5) vem sendo purificada e caracterizada a partir de diversas bactérias, *Brevibacterium acetylicum* (OHSHIRO; AISAKA; UWAJIMA, 1989), *Lactobacillus casei* DSM 2547 (RASMUSSEN et al., 1985), *Lactococcus lactis* (KISRIEVA et al., 2000), *Leuconostoc lactis* NCW1 (O'SULLIVAN et al., 2001). Comercialmente é disponibilizado um preparado líquido de enzima  $\alpha$ -acetolactate descarboxilase de *Bacillus brevis* expressa em *Bacillus subtilis* (FAO, 2018).

A quitosana é o principal derivado da quitina, obtido através da N-desacetilação, de grau variável, caracterizada como co-polímerode N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina (KRAJEWSKA, 2004). Esse composto apresenta inúmeras aplicações conhecidas, com relação à bebidas, a quitosana pode ser uma alternativa à bentonita para aumentar a estabilidade tartárica e minimizar o escurecimento em vinhos brancos (COLANGELO et al., 2018). Este composto também é utilizado na produção de biossensores para determinação de glicose em suco de laranja (GUADARRAMA-FERNÁNDEZ et al., 2018), e para

monitoramento de sacarose em frutos de café verde (STREDANSKY et al., 2018).

A reação glutaraldeído com a amina primária produz ligações covalentes cruzadas, devido a essa propriedade, o glutaraldeído vem sendo utilizado como ligante em matrizes poliméricas com capacidade de imobilizar proteínas (MONTEIRO; AIROLDI, 1999). Diversos estudos têm demonstrado excelentes resultados com a imobilização de diversas enzimas em suportes de quitosana, como a  $\beta$ -galactosidase para hidrólise de lactose (KLEIN et al., 2012), a ciclodextrina glicosiltransferase na síntese de ciclodextrinas (SCHÖFFER et al., 2013), a  $\beta$ -fructofuranosidase para hidrólise de sacarose (VALERIO et al., 2013) e para síntese de frutooligossacarídeos (LORENZONI et al., 2014), a catalase (BAŞAK; AYDEMIR, 2013) e a pepsina para coagulação de leite na produção de queijos (ALTUN; CETINUS, 2007).

O objetivo do presente trabalho foi obter um agregado enzimático de ALDC em esferas de quitosana, através de ligações covalentes. Determinar a qualidade da imobilização através de análises de rendimento, eficiência e atividade recuperada. Avaliar a estabilidade das enzimas livre e imobilizada em diversas temperaturas e pH. Também foram estudadas a capacidade de atividade das enzimas imobilizadas e sua estabilidade operacional, quando aplicadas diretamente em cerveja.

## 6.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.3.1 Reagentes

A enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase (EC 4.1.1.5) do microrganismo *Bacillus brevis* (Maturex 2000L) da empresa Novozyme. Quitosana (baixo peso molecular), Etil 2- acetoxi -2- metil-acetolactato, creatina anidra,  $\alpha$ -naftol, acetoína ( $\geq 95\%$ ), diacetil ( $>97\%$ ), 2 pentanone (99,5%) foram obtidos da Sigma Aldrich (Brasil). Glutaraldeído 25%, ácido cítrico, cloreto de zinco e cloreto de sódio fornecido pela Nuclear (Brasil). Os reagentes hidróxido de sódio, fosfato de sódio bibásico, fosfato sódio monobásico foram adquiridos da empresa Neon (São Paulo, Brasil), etileno glicol da empresa Dinamica (São Paulo,

Brasil). Os reagentes utilizados na preparação de soluções e tampões são de grau de pureza analítica (P.A).

### 6. 3. 2 Preparo dos Suportes

As esferas de quitosanas foram preparadas por precipitação em solução de hidróxido de sódio 1 M, onde a solução de quitosana (3% w/v) em ácido acético 2% em água foi gotejada. A solução de quitosana foi mantida em banho de ultrassom por 60 minutos para melhor homogeneização e eliminação das bolhas de ar. Com auxílio de uma bomba peristáltica a solução de quitosana/ácido acético foi gotejada na solução de hidróxido de sódio sob agitação branda. Após o término da etapa de coagulação, as partículas de quitosana foram lavadas com água destilada até obter-se neutralidade do pH. As esferas de quitosanas foram ativadas utilizando solução de glutaraldeído em água destilada (1%, 3% e 5%), na proporção de 50 µL por esfera, mantidas em banho termostático à 37° C por 3 horas, sob agitação suave. Após o término as esferas foram lavadas exaustivamente com água destilada, esta metodologia foi adaptada de Klein e colaboradores (2012).

### 6. 3. 3 Imobilização da ALDC

As esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído foram incubadas com a enzima ALDC, em tampão fosfato citrato pH 6,0 e 0,02 M, acrescido de 5 µM de cloreto de zinco, em temperatura ambiente, sob agitação branda por 1 hora. Após o término dessa etapa, as esferas foram lavadas com uma seqüência de tampões para eliminar enzimas aderidas via interações iônicas e hidrofóbicas com o suporte: fosfato citrato pH 6,0 e 0,02 M; fosfato-citrato pH 6,0 e 0,02M e NaCl 1 M; e fosfato citrato pH 6,0 e 0,02 M com etileno glicol 30% v/v. Foram testadas diferentes quantidades de ALDC oferecidas com esferas de quitosana ativadas com três concentrações de glutaraldeído.

Para a caracterização da enzima imobilizada utilizou-se os conceitos de Rendimento, Eficiência e Atividade Recuperada, definidos pelos autores Sheldon e Van Pelt (2013).

$$\text{Rendimento (\%)} = 100 * (\text{Atividade Imobilizada} / \text{Atividade Inicial})$$

$$\text{Eficiência (\%)} = 100 * (\text{Atividade Observada} / \text{Atividade Imobilizada})$$

$$\text{Atividade Recuperada (\%)} = 100 * (\text{Atividade Observada} / \text{Atividade Inicial})$$

#### 6.3.4 Atividade da ALDC

A atividade de ALDC livre e imobilizada foi determinada em 0,4 mL de tampão fosfato (pH 6,0; 0,2M e 5  $\mu$ M de cloreto de zinco), a 37° C por 5 min, com 0,1 ml de  $\alpha$ -acetolactato, preparado segundo protocolo de Kisrieva e colaboradores (2000) com modificações, em que 10  $\mu$ L de etil 2-acetoxi-2-metilacetoacetato, com dois equivalentes alcalinos, (1 mL, 0,1 M de NaOH), tempo de reação de 30 minutos e temperatura de 37° C, e após tamponado com 1 mL de tampão fosfato (pH 6,0 e 0,2 M). A reação foi interrompida com a adição de 0,4 mL da solução de hidróxido de sódio 2,5 N.

Uma unidade de  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase (U) é definida como a quantidade necessária para a conversão de 1  $\mu$ Mol de  $\alpha$ -acetolactato em acetoína por minuto, em pH 6,0 e temperatura de 37° C (GARMYN et al., 1996). A quantidade de acetoína formada foi quantificada via método colorimétrico proposto por Westerfeldt, (1945) com adaptações. Água destilada (1 mL) é o adicionados à 0,1 de amostra e 0,4 mL da solução de creatina (0,5% w/v em água destilada) e  $\alpha$ -naftol (5% w/v em hidróxido de sódio 2,5N) na proporção de 1:1, e foram mantidas a 37° C por 45 minutos, em que produz coloração vermelha e medida através da absorbância em 525 nm. A quantificação foi realizada por curva de padrão externo de acetoína, com dez concentrações variando entre 0,09 e 3,8  $\mu$ M/mL, onde se obteve equação linear com  $R^2 = 0,9982$  e esta foi ajustada para a realização da quantificação da atividade de ALDC expressa em U e demonstrada na equação 1, abaixo.

Equação 1:

$$U = \frac{Abs(corrígida) - 0,035}{0,986} \times Vf \times Fd \times \frac{1}{T}$$

Onde:

*Vf*: Volume final da reação

*Fd*: Fator de diluição

*T*: Tempo de reação

*Abs(corrígida)*: (R1-B1)-(R2-B2)

R1= Absorbância da reação enzimática (0,3 mL de tampão pH 6,0 e 0,2M e 0,1 ml de enzima diluída neste mesmo tampão ou 0,4 mL de tampão pH 6,0 e 0,2M e enzima imobilizada: 0,1 mL da solução de  $\alpha$ -acetolactato, e 0,4 mL de hidróxido de sódio 2,5N) ;

B1= Branco da enzima (0,4 mL de tampão pH 6,0 e 0,2M e 0,1 ml de enzima diluída neste mesmo tampão ou 0,5 mL de tampão pH 6,0 e 0,2M e enzima imobilizada: e 0,4 mL de hidróxido de sódio 2,5N);

R2= Branco do substrato (0,4 mL de tampão pH 6,0 e 0,2M; 0,1 mL da solução de  $\alpha$ -acetolactato, e 0,4 mL de hidróxido de sódio 2,5N) e;

B2= Branco dos reagentes (0,5 mL de tampão pH 6,0 e 0,2M e 0,4 mL de hidróxido de sódio 2,5N).

### 6. 3. 5 Estabilidade térmica.

A enzima imobilizada e a forma livre foram mantidas em tampão fosfato citrato pH 6,0 e 0,02 M acrescido de 5  $\mu$ M de cloreto de zinco, incubadas em banho maria nas temperaturas de 40° C, 50° C, 60° C, 70° C e 80° C, por tempo determinado, alíquotas eram retiradas e mantidas em banho de gelo por 5 minutos, após a atividade foi determinada segundo metodologia descrita anteriormente. Em geral a inativação de enzimas pode ser descrita por uma equação de primeira ordem, tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ), equivale ao tempo

necessário para reduzir 50% a atividade inicial da enzima. O tempo de meia vida da ALDC livre e imobilizada foi determinada a 60° C, segundo equações demonstradas por Lorenzoni e colaboradores (2014).

#### 6. 3. 6 Efeito do pH na atividade enzimática

A estabilidade a variação de pH foram determinadas através da avaliação da atividade enzimática da ALDC livre e imobilizada em diferentes tampões fosfato-citrato 0,2M nos pH (4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0), e tampão fosfato 0,2 M para o pH 6,5; acrescidos de 5 µM de cloreto de zinco. Também foi realizada atividade enzimática, na forma livre e imobilizada, na condição ótima de temperatura, em presença de cerveja comercial desgaseificada, pH 6,0 e 5,5° GL.

#### 6. 3. 7 Determinação de Acetoína e Diacetil

Os voláteis da cerveja foram extraídos através da técnica de HS-SPME (Headspace Solid Phase Microextraction), em que utilizou-se frascos de 20 mL, específicos para análise de headspace, 0,2 g de cloreto de sódio e 0,5 mL da amostra e 50 µL de 2-pentanone (1000 mg/L) padrão interno, mantidos em banho maria à 50° C, com extração por fibra polidimetilsiloxisano/divinilbenzeno (PDMS-DVB, SPME fiber Stableflex 65 µm, Supelco) por 30 minutos. A quantificação foi realizada em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (GC-FID), modelo GC-2010 Plus, Shimadzu. Utilizando coluna polar RTx<sup>®</sup>Wax (30m, 025 mm ID e 0,25 µm) da marca Restek. Foi utilizado o forno na temperatura de 30° C por 10 min, após 20° C/min até 200° C e mantido por 3,5 min. A temperatura utilizada no injetor foi de 240° C, modo de injeção de splitless com *sampling time* de 1min, fluxo total de 8,3 mL/min e fluxo na coluna de 1,06 mL/min. Detector FID, foi mantido temperatura de 250° C.

A curva pelo método de adição de padrão foi realizada utilizando cerveja comercial desgaseificada, comprada no mercado local, da marca Polar Export produzidas pela empresa Ambev (Viamão, Rio Grande do Sul) em que não

foram detectado sinais dos analitos, dosando quantidades conhecidas de diacetil e acetoína (*spiking*), sendo dez níveis entre 2 mg/L e 250 mg/L. Onde o limite de detecção e quantificação foram de 2,0 mg/L e 5,7 mg/L para diacetil e 2,0 mg/L e 5,5 mg/L para acetoína, respectivamente. O modelo de regressão linear apresentou adequados coeficientes de determinação, onde a curva apresentou  $R^2 = 0,9986$  para diacetil e  $R^2 = 0,9999$  para acetoína.

### 6.3.8 Estabilidade operacional de ALDC imobilizada aplicada a cerveja

Foram utilizadas duas metodologias para averiguar a estabilidade da ALDC imobilizadas em esferas de quitosana em condições operacionais. Primeira metodologia, as esferas imobilizadas foram mantidas imersas em cerveja comercial desgaseificada com agitação por 24 horas à temperatura ambiente, após eram retiradas e lavadas com água destilada, drenadas, e mantidas em tampão pH 6,0 e 0,02 M por dez minutos e medida a atividade segundo procedimento descrito no item 2.3. Repetiu-se esse procedimento por dezoito ciclos, onde se avaliou o percentual de atividade residual após cada ciclo.

Na segunda metodologia procurou-se quantificar a capacidade de síntese de acetoína e minimizar a produção de diacetil *in loco*. Em cerveja convencional desgaseificada adicionou-se 2 U de ALDC imobilizada por litro de cerveja juntamente com uma quantidade conhecida de  $\alpha$ -acetolactato, mantidas por 1,5 h em temperatura ambiente, sob agitação. Após esse tempo a cerveja era recolhida e preparada para as análises GC-FID, segundo descrito no item 6.5, e as esferas eram lavadas com água destilada, drenadas, e mantidas em tampão pH 6,0 e 0,02 M por cinco minutos, drenadas novamente e adicionadas a um novo volume cerveja desgaseificada e repetido o ciclo por doze vezes.

## 6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.4.1 Resultados da Imobilização

Os resultados dos testes para diferentes quantidades de enzima ofertada ao suporte de quitosana ativados com diferentes concentrações de glutaraldeído estão apresentados na Tabela 2, assim como os resultados de rendimento, eficiência e atividade recuperada.

**Tabela 2.** Efeito da ativação de três concentrações de glutaraldeído na ativação das esferas de quitosana, e atividade de ALDC ofertada.

| Concentração De Glutaraldeído (%) | Quantidade Ofertada de Enzima (mg proteína/g suporte) | Quantidade Ofertada de Enzima (U/g de suporte) | Atividade de Enzima Imobilizada (U/g de suporte) | Rendimento (%) | Eficiência (%) | Atividade Recuperada (%) |
|-----------------------------------|---|--|--|----------------|----------------|--------------------------|
| 1,0                               | 0,15 ± 0,029  | 13,27 ± 2,34                                   | 1,59±0,16 ab                                     | 79,8           | 15,1           | 12,0                     |
| 3,0                               | 0,15 ± 0,029  | 13,27 ± 2,34                                   | 1,54±0,31 ab                                     | 92,9           | 12,5           | 11,6                     |
| 5,0                               | 0,15 ± 0,029  | 13,27 ± 2,34                                   | 1,77±0,18 ab                                     | 92,6           | 14,5           | 13,4                     |
| 1,0                               | 0,27 ± 0,047  | 24,27 ± 4,14                                   | 2,11±0,38 ab                                     | 72,5           | 12,0           | 8,7                      |
| 3,0                               | 0,27 ± 0,047  | 24,27 ± 4,14                                   | 2,21±0,40bc                                      | 84,9           | 10,8           | 9,1                      |
| 5,0                               | 0,27 ± 0,047  | 24,27 ± 4,14                                   | 2,06±0,18 ab                                     | 92,6           | 9,1            | 8,5                      |
| 1,0                               | 0,60 ± 0,054  | 52,43 ± 4,83                                   | 2,75±0,42 c                                      | 59,8           | 8,8            | 5,3                      |
| 3,0                               | 0,60 ± 0,054  | 52,43 ± 4,83                                   | 2,84±0,28 c                                      | 83,3           | 6,5            | 5,4                      |
| 5,0                               | 0,60 ± 0,054  | 52,43 ± 4,83                                   | 2,75±0,33 c                                      | 88,4           | 5,9            | 5,3                      |

O experimento e as análises foram realizados em triplicata, letras iguais não existem diferenças significantes Teste de Tukey ( $p>0,05$ ).

Os melhores resultados de atividade imobilizada (U/g sup) foram obtidos para os testes que se ofertaram maior quantidade de proteína e por consequencia maior U de atividade. Na Tabela 2 pode se observar que a concentração de glutaraldeído utilizado na ativação do suporte não apresentou influência sobre a atividade imobilizada. Avaliando os resultados

apresentados, nos grupos de experimentos que foram ofertados as mesmas quantidades de enzimas, houve um aumento no rendimento proporcional à concentração de glutaraldeído utilizado na ativação dos suportes e, inversamente proporcional para os parâmetros eficiência e atividade recuperada.

O presente trabalho é o primeiro a utilizar os parâmetros propostos por Sheldon e Van Pelt (2013) para caracterização do processo de imobilização da ALDC. Em trabalho imobilizando ALDC em nanopartículas paramagnéticas Qian e colaboradores (2015) obtiveram 69% de atividade recuperada e Zhao e colaboradores (2017) conseguiram obter valores entre 65 e 100% de eficiência de imobilização, mas em ambos os trabalhos foram utilizadas metodologias baseadas na diferença de proteína oferecida e retidas ao suporte.

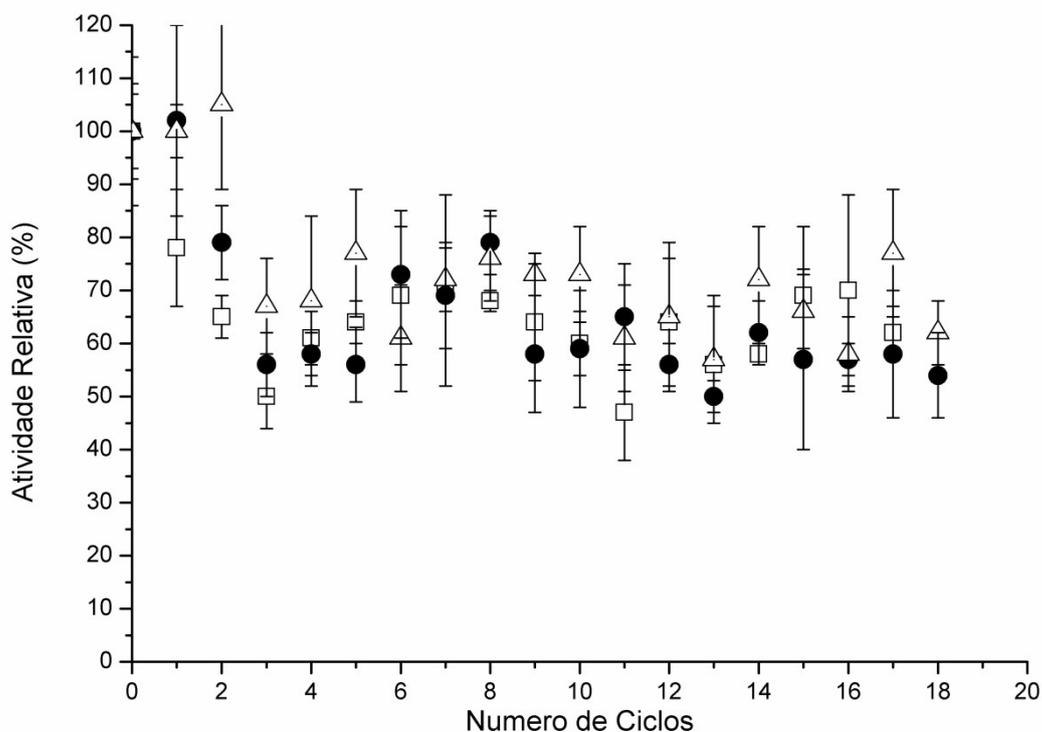
Em trabalhos utilizando macropartículas de quitosana ativadas com glutaraldeído para imobilização de ciclodextrina glicosiltransferase (SCHÖFFER et al., 2013), obtiveram valores para rendimento entre 47,6% e 95,8% enquanto Klein *et al.*, (2012), avaliando macro e nano partículas de quitosana para a imobilização de  $\beta$ -galactosidase apresentaram valores entre 31,1 e 90%. Esses valores são semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Para os parâmetros eficiência e atividade recuperada foram obtidos valores entre 5,9 e 15,1% e valores entre 5,3 e 13,4%, respectivamente. Tais valores foram superiores aos descritos por Schöffner e colaboradores (2013) para eficiência de imobilização que variaram entre 1,4% e 6,7%, e aos descritos por Klein e colaboradores (2012) que foram entre 3 e 6% para as macropartículas, mas inferiores aos apresentados pelas nanopartículas que ficaram entre 46,5% e 98,7%.

#### 6. 4. 2 Estabilidade de ALDC aplicadas a cerveja

As enzimas imobilizadas foram testadas conforme descrito no item 6.2.6. Os resultados são mostrados na Figura 6 onde se pode observar que houve uma redução significativa entre o primeiro e o terceiro ciclos, mantendo-se

então uma atividade residual de aproximadamente 60% do quarto ao décimo oitavo ciclo.

Esse resultado é superior ao obtido por Qian *et al.* (2015) para a ALDC imobilizada em nanopartículas magnéticas, em que o armazenamento a 4° C por 14 dias em tampão com pH 6,0 manteve 65% da atividade inicial. Após cinco ciclos em cerveja, a enzima apresentou apenas 30% de sua atividade inicial. Esses autores sugerem que o meio complexo deste último teste acelerou a desativação da enzima quando comparado ao armazenamento em tampão.



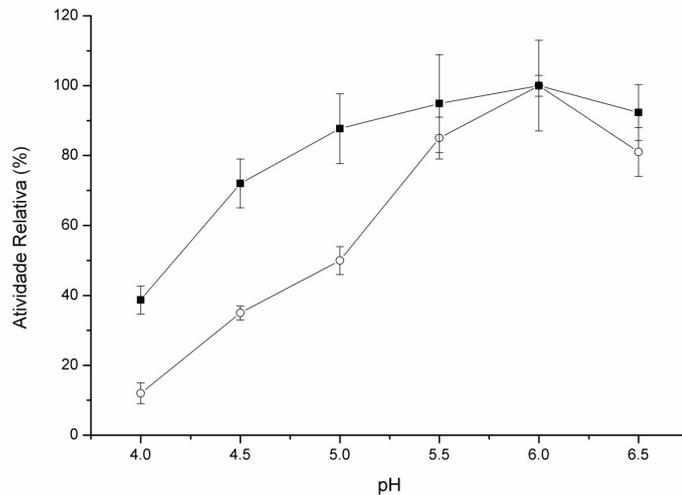
**Figura 6:** Atividade enzimática relativa das esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído 1% (□), 3% (●) e 5% (△), após incubação em cerveja por 24 horas.

Para as próximas etapas do estudo, as condições de imobilização utilizadas foram glutaraldeído a 3% e 0,27 mg de proteína oferecida por grama de suporte seco, o que levou a 84,9% de rendimento, 10,8% de eficiência e 9,1% de recuperação de atividade.

#### 6. 4. 3 Efeito do pH sobre a atividade de ALDC

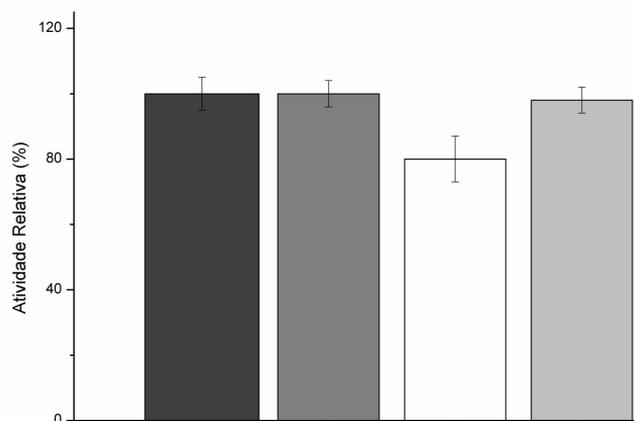
Estudos demonstram que a imobilização pode alterar o pH ótimo de atividade de uma enzima, possivelmente devido a alterações na conformação das mesmas. A Figura 5 apresenta a atividade relativa em relação ao pH para ALDC livre e imobilizada em quitosana, ambas apresentaram pH ótimo de 6,0. Tais resultados diferem dos descrito por Qian e colaboradores (2015) que determinaram o pH 6,5 como sendo o ideal para a ALDC de *Bacillus brevis*, livre e imobilizada em nanopartículas. O pH ideal de atividade de ALDC pode variar de acordo com a origem da enzima, por exemplo, ALDC produzida pelo microrganismo *Brevibacterium acetylicum*, apresentou pH ideal de 6,0 (OHSHIRO; AISAKA; UWAJIMA, 1989). ALDC de origem de *Lactobacillus casei* DSM 2547, apresentou pH entre 4,5 e 5,0 (RASMUSSEN et al., 1985), e pH entre 6,2 e 6,4 para ALDC purificada a partir de *Aerobacter aerogene* (LOKEN; STROMER, 1970).

Através da Figura 7 podemos observar que ocorreu uma redução mais acentuada na atividade da enzima livre quando analisada em pH diferente do ótimo, também se observa que para a enzima imobilizada se formou uma faixa de pH (5,0 e 6,5) onde a atividade enzimática apresentou pequena alteração. No trabalho de Qian e colaboradores (2015) não foi observado tal característica a ALDC de *Bacillus brevis* imobilizada em nanopartículas paramagnéticas. Também para a invertase de *Saccharomyces cerevisiae*, imobilizada em nanopartículas de quitosana, Valerio e colaboradores (2013) não observaram maior estabilidade a variação de pH.



**Figura 7.** Efeito do pH na atividade de ALDC livre (○) e imobilizada (■), em 37°C.

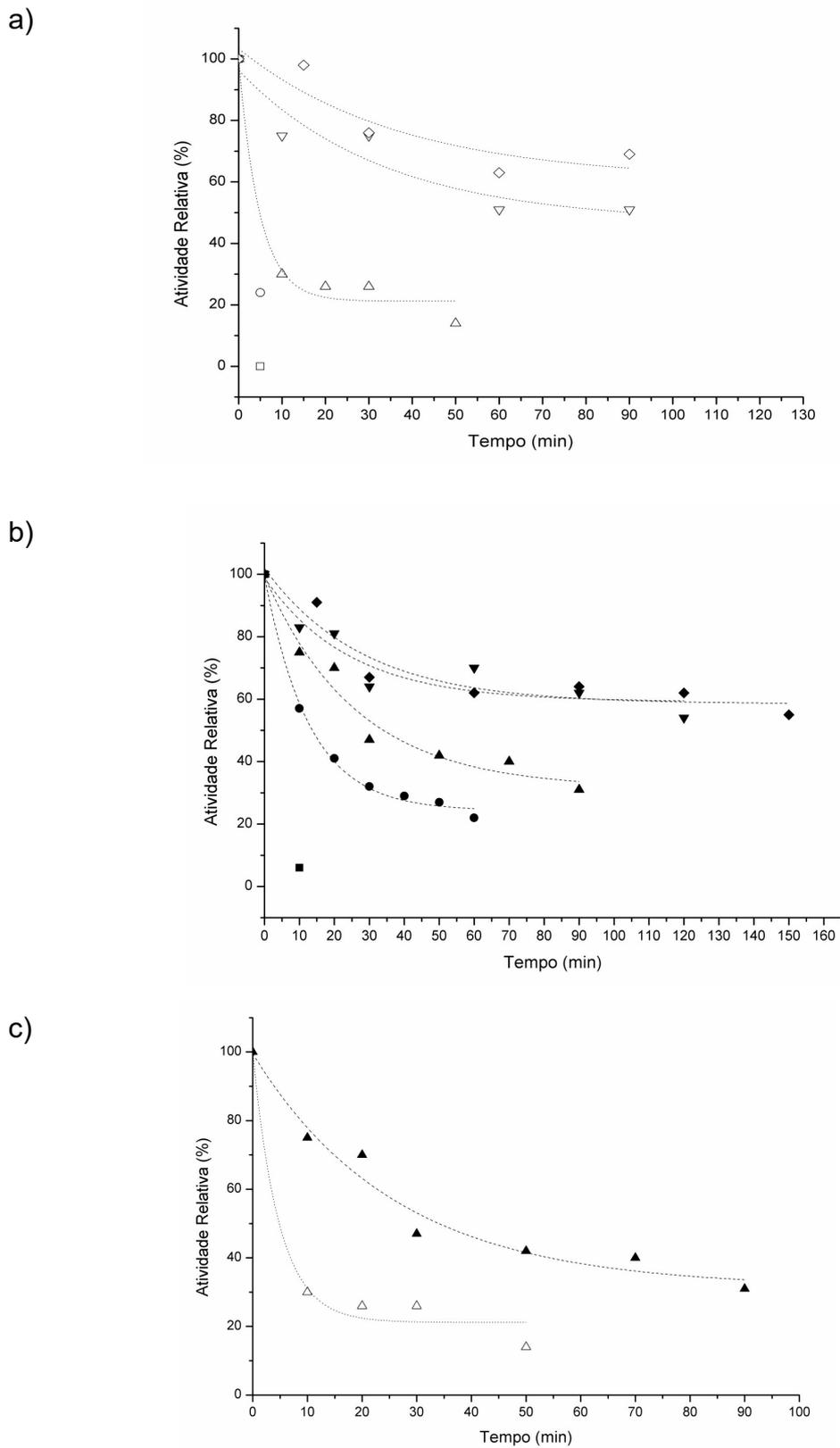
Utilizando cerveja comercial desgaseificada (pH 6,0 e 5,5<sup>o</sup> GL) como meio reacional, mantendo as condições do ensaio em 37° C, para a verificação da capacidade de conversão do  $\alpha$ -acetolactato, e comparando com a reação realizada em tampão pH 6,0, pode-se observar que a ALDC imobilizada apresentou melhores resultados, demonstrado na Figura 8. Observou-se que a enzima livre, apresentou  $80\pm 7\%$  e enzima imobilizada apresentou  $98\pm 4\%$  da atividade em cerveja, quando comparada a medida realizada em tampão, resultados demonstrados na Figura 8. Possivelmente, a mesma capacidade que o suporte de quitosana apresentou estabilizando a enzima com a variação de pH, minimizando os possíveis efeitos danosos gerados a enzima por compostos presentes na cerveja.



**Figura 8.** Comparação entre atividades de ALDC livre e imobilizada, à 37° C. ALDC livre em tampão (■) e em cerveja (□), ALDC imobilizada em tampão (■) e em cerveja (■).

#### 6. 4. 4 Estabilidade térmica

Na Figura 9(a), pode-se observar uma rápida inativação da enzima livre nas temperaturas de 70° C e 80° C, e para a temperatura de 60° C houve redução acentuada nos primeiros 10 minutos e uma redução branda subsequente. Para enzima imobilizada houve inativação na temperatura de 80° C nos primeiros 20 minutos, nas demais temperaturas ocorreram reduções na atividade residual, apresentando maior estabilidade quando comparada a enzima livre. Tais resultados condizem com os descritos para  $\beta$ -galactosidase imobilizadas em esferas de quitosana entrecruzada com genipina (KLEIN et al., 2016) e para  $\beta$ -galactosidase imobilizadas nano e macro esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído (KLEIN et al., 2012).



**Figura 9.** Estabilidade térmica para ALDC em diferentes temperaturas, 40° C (◆,◇); 50° C (▼,▽); 60° C (▲,△); 70° C (●,○) e 80° C (■,□). (a) enzima livre (b) enzima imobilizada; (c) comparação entre enzimas livre (símbolos abertos) e imobilizada (símbolos fechados) a 60° C.

Realizando uma regressão exponencial da curva de atividade enzimática relativa referente a temperatura de 60° C para a enzima livre e imobilizada (Figura 9, (c)), foi possível estimar o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ), e calcular o fator de estabilidade térmica entre enzima imobilizada e livre. O tempo de meia vida estimado de 7,7 min e 53,41 min para a ALDC livre e imobilizada respectivamente, demonstram o aumento significativo da estabilidade térmica, à 60° C da enzima imobilizada em quitosana, resultando em um fator de estabilidade 6,93 vezes. Tais resultados estão de acordo com os encontrados por Lorenzoni e colaboradores (2014), para o mesmo suporte. Pedroche e colaboradores (2007), sugerem que o aumento de ligações covalentes multiponto entre as enzimas tripsina, quimiotripsina e carboxipeptidase, e o suporte de glicoxil-agarose, sejam o responsável pelo aumento da estabilidade térmica. Em trabalho de imobilização de ciclodextrina glicosiltransferase Schöffner e colaboradores (2017), sugerem que a maior estabilidade operacional e térmica apresentada pela enzima imobilizada pela ligação do grupo amino com suporte ativado com glutaraldeído, quando comparada a imobilização via ligação dissulfeto através da cisteína, possivelmente ocorre devido a ligação multipontual com amino das lisinas encontradas próximas ao amino terminal.

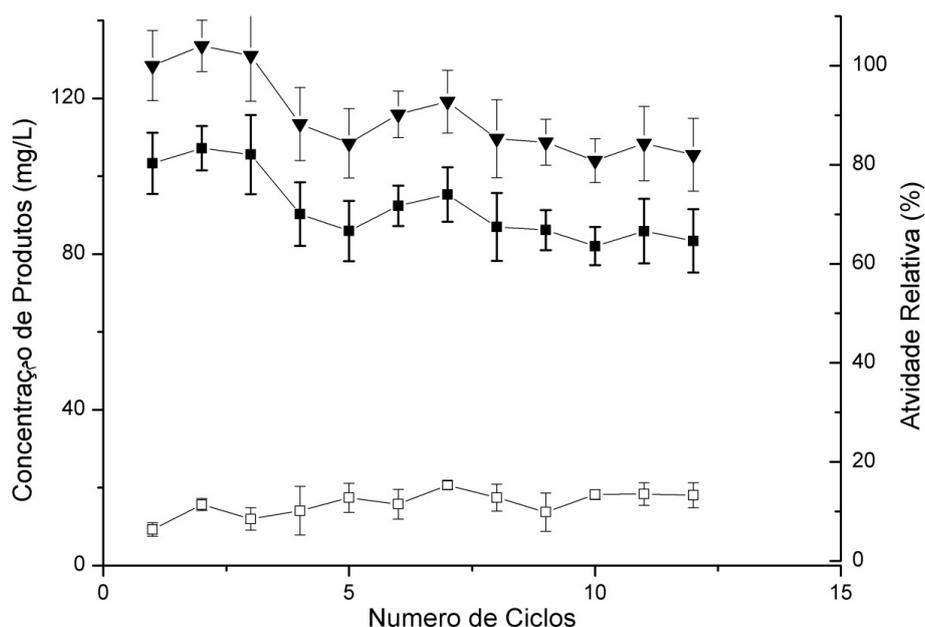
O grupo amino da lisina apresenta  $pK_a > 9,5$ , mas estudos têm encontrado valores diferentes de  $pK_a$  para lisina protegida pelo microambiente promovido pela estrutura da proteína, Richman, Majumdar e García-Moreno (2015) encontraram valores de  $pK_a$  entre 6,2 e 9,0 para resíduos lisina em proteína. Desse modo, além da porção amino terminal da enzima, também é possível que outras lisinas da cadeia polipeptídica possam estar reativas e aptas a se ligar ao suporte via ligação covalente mediada pelo glutaraldeído, aumentando assim o número de ligações da enzima com o suporte (ligação multipontual)

#### 6. 5. 5 Estabilidade Operacional

A estabilidade das enzimas imobilizadas foi testada segundo descrito no item 6.2.6, onde a desempenho foi medido em cerveja com adição de  $\alpha$ -

acetolactato, e a conversão em acetoína e diacetil foi analisada durante doze ciclos de 90 minutos.

Como no primeiro experimento com cerveja (Figura 5), observou-se diminuição da atividade enzimática nos primeiros ciclos e posterior estabilização (Figura 10), e após décimo segundo ciclo, manteve uma atividade residual de aproximadamente 80%. Esse resultado de estabilidade é superior ao descrito por Qian e colaboradores (2015) que para ALDC imobilizada em nanopartículas magnéticas em 14 dias estocadas em tampão pH 6,0 a 4°C, mantiveram 65% da atividade inicial, e em 5 ciclos em cerveja apresentaram 30% da atividade inicial, os mesmos autores sugerem que o meio complexo deste último teste acelerou a desativação da enzima quando comparado as estocadas em tampão.



**Figura 10.** Conversão de  $\alpha$ -acetolactato em de acetoina (■) e diacetil (□) em mg/L, em cerveja comercial por ALDC imobilizada e atividade enzimática relativa (▼).

Foi possível observar, ao longo do experimento, que a ALDC imobilizada foi efetiva na transformação do  $\alpha$ -acetolactato adicionado em acetoína. No entanto, uma quantidade de diacetil foi também detectada. Embora seja bem conhecido que, dependendo das condições de pH, concentração de álcool e temperatura, o  $\alpha$ -acetolactato é decomposto espontaneamente em acetoína e

diacetil (DULIEU; PONCELET, 1999; KOBAYASHI et al., 2005) este resultado não era esperado. Para evitar resultados falsos, um branco sem presença de ALDC foi realizado e as quantidades de acetoína e diacetil produzidas foram subtraídas dos experimentos na presença da enzima. Então, sugerimos que parte do  $\alpha$ -acetolactato não convertido pela ALDC imobilizada foi convertido em diacetil durante a etapa de extração de HS-SPME, onde a amostra foi mantida a 50 ° C por 30 minutos.

## 6. 6 CONCLUSÕES

A imobilização de ALDC em esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído apresentou resultados satisfatórios quanto à rendimento, eficiência e recuperação de atividade. A imobilização através de ligações covalentes resultou em um derivado mais robusto, em termos de resistência a variações de pH e estabilidade térmica, quando comparado com a enzima livre. Outro resultado que indica a robustez da enzima imobilizada foi a manutenção de sua alta atividade quando aplicada diretamente à cerveja, uma característica importante para aplicações industriais. A estabilidade operacional da enzima imobilizada foi confirmada pela manutenção da atividade após doze ciclos, permitindo a reutilização deste biocatalisador em batelada com efetiva transformação de  $\alpha$ -acetolactato em acetoína, e vislumbrando novos estudos focados em aplicações utilizando processos contínuos.

## 6.7 REFERÊNCIAS

ALTUN, Gamze Durgun; CETINUS, Senay Akkus. Immobilization of pepsin on chitosan beads. *Food Chemistry*, [s. l.], v. 100, n. 3, p. 964–971, 2007.

ARFIN, Stuart M.; HILL, RICHARD K.; SAWADA, SEIJI. Stereochemistry of Valine and Isoleucine Biosynthesis. *BIOORGANIC CHEMISTRY*, [s. l.], v. 189, p. 175–189, 1979.

BAMFORTH, C. W.; KANAUCHI, M. Enzymology of vicinal diketone reduction in brewer's yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, [s. l.], v. 110, n. 2, p. 83–

93, 2004. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/j.2050-0416.2004.tb00187.x/asset/j.2050-0416.2004.tb00187.x.pdf?v=1&t=i8j70217&s=2268b2d464798c075a01bea477d39bd2ba98f9a>>

BAŞAK, Esra; AYDEMİR, Tülin. Immobilization of catalase on chitosan and amino acid-modified chitosan beads. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 269–275, 2013.

BRÁNYIK, Tomáš et al. A Review of Flavour Formation in Continuous Beer Fermentations. *Journal Of The Institute Of Brewing*, [s. l.], v. 114, n. 1, p. 3–13, 2008.

COLANGELO, Donato et al. The use of chitosan as alternative to bentonite for wine fining: Effects on heat-stability, proteins, organic acids, colour, and volatile compounds in an aromatic white wine. *Food Chemistry*, [s. l.], v. 264, n. May, p. 301–309, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.005>>

DULIEU, Claire; PONCELET, Denis. Spectrophotometric assay of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase. *Enzyme and Microbial Technology*, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 537–542, 1999.

GARMYN, Dominique et al. Cloning and sequencing of the gene encoding  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase from *Leuconostoc oenos*. *FEMS Microbiology Letters*, [s. l.], v. 145, n. 3, p. 445–450, 1996. Disponível em: <<http://femsle.oxfordjournals.org/content/145/3/445.abstract>>

GODTFREDSSEN, Sven Erik et al. Application of the acetolactate decarboxylase from *Lactobacillus casei* for accelerated maturation of beer. *Carlsberg Research Communications*, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 69–74, 1984.

GODTFREDSSEN, Sven Erik; LORCK, Henning; SIGSCAARD, Poul. On the Occurrence of  $\alpha$ -Acetolactate decarboxylases Among Microorganisms. *Carlsberg Res. Commun.*, [s. l.], v. 48, p. 239–247, 1983.

GUADARRAMA-FERNÁNDEZ, Leonor et al. A disposable, simple, fast and low-cost paper-based biosensor and its application to the determination of glucose in commercial orange juices. *Food Chemistry*, [s. l.], v. 265, n. July 2017, p. 64–69, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.082>>

HAUKELI, A. D.; LIE, S. Formation and Removal of Acetoin During Yeast Fermentation. *J. Inst. Brew.*, [s. l.], v. 81, p. 58–64, 1975.

KISRIEVA, Yu S. et al. Isolation and Purification of Acetolactate Synthase and Acetolactate Decarboxylase from the Culture of *Lactococcus lactis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 109–114, 2000.

KLEIN, Manuela P. et al. Effect of the support size on the properties of  $\beta$ -galactosidase immobilized on chitosan: Advantages and disadvantages of

macro and nanoparticles. *Biomacromolecules*, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 2456–2464, 2012.

KLEIN, Manuela P. et al. High stability of immobilized  $\beta$ -d-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. *Carbohydrate Polymers*, [s. l.], v. 95, n. 1, p. 465–470, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.044>>

KLEIN, Manuela P. et al. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and  $\beta$ -d-galactosidase immobilization. *Carbohydrate Polymers*, [s. l.], v. 137, p. 184–190, 2016.

KOBAYASHI, Ken et al. Method for the simultaneous assay of diacetyl and acetoin in the presence of alpha-acetolactate: application in determining the kinetic parameters for the decomposition of alpha-acetolactate. *Journal of bioscience and bioengineering*, [s. l.], v. 99, n. 5, p. 502–507, 2005.

KRAJEWSKA, Barbara. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, [s. l.], v. 35, n. 2–3, p. 126–139, 2004.

LOKEN, Jan P.; STROMER, Fredrik C. acetolactate Decarboxylase from *Aerobacter aerogenes* Purification and Properties. *European Journal of Biochemistry*, [s. l.], v. 14, p. 133–137, 1970.

LORENZONI, André S. G. et al. Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. *Carbohydrate Polymers*, [s. l.], v. 103, n. 1, p. 193–197, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.038>>

MONTEIRO, Oyrton A. C.; AIROLDI, Claudio. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *International Journal of Biological Macromolecules*, [s. l.], v. 26, n. 2–3, p. 119–128, 1999.

O'SULLIVAN, S. M. et al. Purification and characterisation of acetolactate decarboxylase from *Leuconostoc lactis* NCW1. *FEMS Microbiol Lett*, [s. l.], v. 194, n. 2, p. 245–249, 2001. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11164316](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11164316)>

OHSHIRO, Takashi; AISAKA, Kazuo; UWAJIMA, Takayuki. Purification and characterization of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase from *brevibacterium acetylicum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, [s. l.], v. 53, n. 7, p. 1913–1918, 1989.

PEDROCHE, Justo et al. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. *Enzyme and Microbial Technology*, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 1160–1166, 2007.

- QIAN, Siriguleng et al. Synthesis and characterization of surface-functionalized paramagnetic nanoparticles and their application to immobilization of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase. *Process Biochemistry*, [s. l.], v. 50, n. 9, p. 1388–1393, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.012>>
- RASMUSSEN, Anne M. et al. Purification of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase from *Lactobacillus casei* DSM 2547. *Carlsberg Res. Communi.*, [s. l.], v. 50, p. 73–82, 1985.
- RICHMAN, Daniel E.; MAJUMDAR, Ananya; BERTRAND GARCÍA-MORENO, E. Conformational Reorganization Coupled to the Ionization of Internal Lys Residues in Proteins. *Biochemistry*, [s. l.], v. 54, n. 38, p. 5888–5897, 2015.
- SCHÖFFER, Jéssie da Natividade et al. Directed immobilization of CGTase: The effect of the enzyme orientation on the enzyme activity and its use in packed-bed reactor for continuous production of cyclodextrins. *Process Biochemistry*, [s. l.], v. 58, n. May, p. 120–127, 2017.
- SCHÖFFER, Jéssie Da Natividade et al. Continuous production of  $\beta$ -cyclodextrin from starch by highly stable cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on chitosan. *Carbohydrate Polymers*, [s. l.], v. 98, n. 2, p. 1311–1316, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.044>>
- SHELDON, Roger A.; VAN PELT, Sander. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev. Chem. Soc. Rev*, [s. l.], v. 42, n. 42, p. 6223–6235, 2013.
- STREDANSKY, Miroslav et al. Rapid sucrose monitoring in green coffee samples using multienzymatic biosensor. *Food Chemistry*, [s. l.], v. 254, n. July 2017, p. 8–12, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.171>>
- VALERIO, Sheila G. et al. High operational stability of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, [s. l.], v. 92, n. 1, p. 462–468, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.001>>
- WAINWRIGHT, T. Diacetyl- A Review. *Journal of the Ins*, [s. l.], v. 79, p. 451–470, 1973.
- WESTERFELDT, W. W. A colorimetric. *J. Biol. Chem*, [s. l.], v. 161, p. 495–502, 1945.
- ZHAO, Fuhua et al. Enzyme-inorganic nanoflowers/alginate microbeads: An enzyme immobilization system and its potential application. *Process Biochemistry*, [s. l.], v. 57, n. March, p. 87–94, 2017.

## 7. UTILIZAÇÃO DE GELATINA, RESÍDUO DA INDÚSTRIA NUTRACEUTICA, COMO AGENTE DE CORPO EM ESFERAS DE ALGINATO PARA IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE $\alpha$ - ACETOLACTATO DESCARBOXILASE

Gustavo P. COSTA, Leonardo B. QUEIROZ, Rafael C. RODRIGUES, Vitor MANFROI e Plinho Francisco HERTZ.

### 7.1 RESUMO

Os objetivos do presente trabalho foram desenvolver um suporte utilizando gelatina, resíduo de cápsulas da indústria nutraceutica para imobilizar a enzima ALDC. Para isso foram avaliados o rendimento, eficiência e atividade recuperada, e a estabilidade das enzimas livre e imobilizada em diversas temperaturas e pH. Avaliar a capacidade das enzimas imobilizadas quando aplicadas diretamente em cerveja e sua estabilidade operacional. Foram testadas três concentrações de glutaraldeído (1%, 2,5% e 5%) em água destilada como agente inter cruzante. Os melhores resultados obtidos foram 95,6%, 27,0% e 23,6%, respectivamente, para rendimento, eficiência e atividade recuperada. A imobilização proporcionou elevada atividade em uma ampla faixa de pH. A enzima imobilizada apresentou maior estabilidade nas temperaturas de 50° e 60° C. O derivado imobilizado apresentou adequada capacidade de reutilização, e sua forma desidratada excelente atividade após longos períodos de estocagem.

Palavras chaves: ALDC, imobilização, alginato, resíduo de gelatina.

## 7. 2 INTRODUÇÃO

Cerveja é uma bebida mundialmente apreciada, apresenta o maior consumo entre as bebidas alcoólicas e a terceira entre todas as bebidas, ficando atrás apenas do consumo de água e chá. A produção mundial no ano de 2017 foi de cerca de 190,9 milhões de quilolitros. Os três maiores produtores são o EUA, China e Brasil (BARON, 2018; KIRIN, 2018). Devido alta taxa de aceitação entre os consumidores a cerveja do tipo *Lager* domina o mercado, estima-se que o volume de produção seja equivalente a soma dos outros tipos (Ale, Stout, Porter, Malt e outros)(SINHA, 2018).

A produção de cerveja é complexa e dependente de varias etapas, que para a tipo *Lager* resumidamente são: a moagem dos grãos de malte; mostura, conversão de açúcares complexos em fermentescíveis; separação do mosto (líquido doce) dos grãos; fervura e adição de lúpulo; retirado de resíduos de malte e lúpulo; resfriamento; fermentação (temperatura lager); maturação (3 à 5 semanas, 0° à 5° C); filtração; carbonatação; pasteurização e envase (FILHO, 2016).

O *off-flavor* de manteiga relatado em cervejas deve-se a presença do diacetil, uma dicetona vicinal, formado a partir da descarboxilação do  $\alpha$ -acetolactato, produto intermediário da sínteses do aminoácido valina durante a fermentação (KROGERUS; GIBSON, 2013). A reação de descarboxilação do  $\alpha$ -acetolactato em diacetil ocorre na cerveja na fase de maturação de forma lenta e espontânea, enquanto a transformação de diacetil em acetoína e posteriormente em 2,3 butenodiol, ocorre de forma rápida catalizada por reductases, oriundas da levedura, presentes na cerveja durante a maturação (BAMFORTH; KANAUCHI, 2004; BRÁNYIK et al., 2008; WAINWRIGHT, 1973). A descarboxilação espontânea do  $\alpha$ -acetolactato, atua como um limitante da redução do tempo de maturação da cerveja. Desde dos anos 80 são publicados trabalhos aplicando tecnologia enzimática para a redução do tempo de maturação, onde a conversão de  $\alpha$ -acetolactato em diacetil é catalizada pela enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase (ALDC) (EC 4.1.1.5)(GODTFREDSSEN; OTTESEN, 1982; GODTFREDSSEN et al., 1984b).

Alginato de sódio é um polissacarídeo utilizado para a preparação de hidrogéis, que com substituição por cátions divalentes (principalmente  $\text{Ca}^{+2}$ ) formaram géis. Pesquisas demonstram a polivalência do alginato de cálcio, aplicando-o na produção de filmes (BÁEZ et al., 2017; ROSELLINI et al., 2009; XIAO et al., 2001), para imobilização de extratos (LUPO et al., 2015), leveduras (CALLONE et al., 2008; COSTA et al., 2018) e enzimas (AWAD et al., 2017; RAKMAI; CHEIRSILP; PRASERTSAN, 2015; ZHAO et al., 2017). Existe a possibilidade de formar géis complexos adicionando outras substâncias para mudar as características do alginato, como por exemplo gelatina. O complexo alginato/gelatina vem sendo estudado na encapsulação de betalaínas (OTÁLORA et al., 2018), microencapsulação de ácido ascórbico (vitamina C) (DEVI; KAKATI, 2013) e curcumina (SARIKA; JAMES, 2016), para a elaboração de filmes (DOU et al., 2018; KAZEMI; REZAEI, 2015; ROSELLINI et al., 2009) e imobilização de enzimas (FADNAVIS et al., 2003; RAKMAI; CHEIRSILP; PRASERTSAN, 2015; STOLARZEWICZ; ZABORNIK, 2017). Os resíduos de cápsulas descartados pela indústria nutracêutica podem ser reutilizados como fonte de gelatina, pois são constituídas por 48,4 % de gelatina, 30% de água e 21,8% de glicerol, estudos demonstram a eficiência desse resíduo na elaboração de filme (DE CAMPO et al., 2017; DE MORAES CRIZEL et al., 2018; IAHNKE et al., 2016).

O presente trabalho buscou desenvolver um suporte alginato/gelatina, utilizando o resíduo de cápsulas da indústria nutracêutica, que possa ser utilizado para imobilização covalente de ALDC e glutaraldeído como agente inter cruzante. Durante o processo foram avaliados rendimento, eficiência, atividade recuperada e parâmetros referentes a qualidade da imobilização. A atividade da enzima livre e imobilizada foi testada em diferentes pH, além da estabilidade térmica em diferentes temperaturas. A estabilidade da ALDC imobilizada, operacional e de armazenamento foi testada aplicando diretamente na cerveja e quantificando a atividade durante período de estocagem respectivamente.

## 7. 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 7. 3. 1 Reagentes

Foi adquirida a enzima Maturex 2000L da empresa Novozymes, que é a forma comercial da  $\alpha$ -acetolactato decarboxilase enzyme (EC 4.1.1.5) de *Bacillus brevis*; alginato de sódio obtido da empresa Cromato Produtos Químicos Ltda (São Paulo, Brazil); gelatina, resíduo de cápsulas, fornecido pelo Laboratório Químico Farmacêutico Tiaraju (Santo Ângelo, RS, Brasil); etil 2-acetoxi-2-metil-acetolactato, creatina anidra,  $\alpha$ -naftol, acetoina ( $\geq 95\%$ ), acetato de etila ( $>99,5\%$ ), diacetil ( $> 97\%$ ) e 2-pentanona (99.5%) foram obtidas da Sigma Aldrich (Brazil); glutaraldeído (25%), ácido cítrico, cloreto de zinco, cloreto de cálcio diidratado e cloreto de sódio foram fornecidos pela Nuclear (Brazil); hidróxido de sódio, fosfato de sódio monobásico e bibásico foram comprados de Neon (São Paulo, Brazil), e etilenoglicol e glicerol fornecido pela Synth (São Paulo, Brazil). Todos reagentes utilizados no presente trabalho foram de grau analítico.

### 7. 3. 2 Preparo das esferas

O preparo das esferas de alginate/gelatina foi adaptado da metodologia descritas por Callone *et al.* (2008) e Costa *et al.* (2018). Foram utilizados resíduos de cápsulas de gelatina na proporção de 15% m/v, e alginato de sódio 1,5% m/v dissolvidos em água destilada 50° C, após homogeneização manteve-se em banho de ultrassom para eliminação de bolhas de ar. A solução alginato/gelatina foi gotejada através de uma ponteira fina, com o auxílio de uma bomba peristáltica, em uma solução 0,1 M de cloreto de cálcio em banho de gelo sob agitação leve. Após a completa gelatinização das esferas, drenou-se a solução de cloreto de cálcio e foram estocadas à aproximadamente 7° C até a posterior etapa. Foram usados 5 mL de solução de glutaraldeído (1%, 2,5% e 5%) em solução aquosa de cloreto de cálcio 0,02 M para 100 esferas, onde essas foram mantidas em banho termostático 37° C por 3 horas para completa ativação, lavou-se 12 vezes com 5 de ml água destilada, para remoção completa de glutaraldeído não ligado ao suporte.

### 7. 3. 3 ALDC imobilizada em esferas de alginato/gelatina

Imediatamente após a ativação com glutaraldeído, 100 esferas foram incubadas com enzima ALDC diluída em 4 mL pH 6,0, tampão fosfato-citrato 0,02 M mais 5 µM de cloreto de zinco a 25° C sob agitação lenta por 1 hora. Na etapa seguinte da imobilização, as gotas foram lavadas com uma sequência de tampões: fosfato-citrato pH 6,0, 0,02M; citrato de sódio pH 6,0, 0,02M e CaCl 1M; e citrato de fosfato pH 6,0, 0,02M com 30% v/v de etilenoglicol, com o objetivo de eliminar enzimas com interações fracas com suporte, mantendo apenas as ligadas covalentemente. As esferas de alginato/gelatina ativas com três concentrações de glutaraldeído (1%, 2,5% e 5%) foram testadas com diferentes concentrações de ALDC.

Os parâmetros definidos por Sheldon e Van Pelt (SHELDON; VAN PELT, 2013), calculados de acordo com as equações 1, 2 e 3, foram utilizados para determinar a qualidade das imobilizações, foram utilizados os conceitos de rendimento, eficiência e recuperação de atividade.

Equações:

(1) Rendimento de imobilização (%) = 100\*(Atividade Imobilizada/Atividade Inicial)

(2) Eficiência de Imobilização (%) = 100\*(Atividade observada/Atividade Imobilizada)

(3) Atividade Recuperada = 100\*(Atividade imobilizada/Atividade Inicial)

### 7. 3. 4 Atividade da ALDC

Garmyn *et al.* (1996) define a unidade de  $\alpha$ -acetolactato descarboxilase (U) como a quantidade necessaria para converter 1 µMol of  $\alpha$ -acetolactato em acetoina em um minuto, na temperatura de 37° C e pH 6,0. A atividade de ALDC foi quantificada em 0,4 mL de tampão fosfato citrato (pH 6,0, 0,2 M, com 5 µM cloreto de zinco), em banho termostático a 37° C por 6 min, com substrato 0,1 mL de  $\alpha$ -acetolactato, preparado conforme descrito por Kisrieva *et*

al. (2000). Foram adicionados 10  $\mu$ L de 2-acetoxi-2-metilacetoacetato de etila, com dois equivalentes alcalinos, (1 ml, NaOH 0,1 M), modificando o tempo de reação para 30 minutos e temperatura para 37 °C, tamponando com 1 mL de fosfato de citrato (pH 6,0, 0,2 M). A atividade enzimática foi interrompida com a adição de 0,4 ml de solução de hidróxido de sódio a 2,5 N.

O método colorimétrico descrito por Westerfeldt (1945), foi empregado com adaptações, para quantificação de acetoína formada, sendo que utilizou-se 1,1 mL de amostra diluída em água destilada (1:10), 0,4 mL de solução de creatina (0,5% m/v em água destilada) e  $\alpha$ -naftol (5% m/v em hidróxido de sódio 2,5 N) na proporção de 1:1. Esta solução foi mantida em estufa 37° C por 45 minutos. A reação da acetoína e diacetil com os grupos guanidinos da creatina, na presença de  $\alpha$ -naphthol produz coloração vermelha, podendo ser medido no intervalo de 520-530 nm, onde em testes preliminares obtiveram a máxima absorvância em 525 nm. Padrões de acetoína com concentrações entre 0,10 e 3,5  $\mu$ M/mL foram analisados e obteve-se uma curva de calibração externa, com as concentrações posteriormente determinadas por uma equação linear que obteve coeficiente de correlação  $R^2 > 0,998$ .

### 7. 3. 5 Estabilidade térmica, a variação de pH e estocagem

As enzimas imobilizadas e livres foram incubadas em banho-maria a 50° C, 60° C, 70° C e 80° C, por períodos de tempo determinados, em pH 6,0, tampão fosfato 0,02M acrescido de 5  $\mu$ M de cloreto de zinco. As frações foram coletadas e resfriadas em banho de gelo por 5 minutos. A atividade relativa foi determinada através da razão entre a atividade residual mantida após tratamento térmico e a atividade inicial da enzima livre e imobilizada, determinadas segundo metodologia descrita anteriormente. A inativação enzimática foi descrita por uma equação de primeira ordem, onde o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) definido como o tempo necessário para reduzir a atividade enzimática inicial em 50% (LORENZONI et al., 2014).

Foram utilizados diferentes tampões fosfato-citrato 0,2 M em diferentes pH (4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0), e tampão fosfato 0,2 M em pH (6,5; 7,0 e 7,5) mais

5  $\mu\text{M}$  de cloreto de zinco, foram utilizados para determinar a influencia do pH na estabilidade da atividade da ALDC livre e imobilizada.

Para a avaliação da estabilidade no armazenamento, as esferas imobilizadas com ALDC, ao armazenamento, foram secas e a atividade foi determinada pelo período de 180 dias. As esferas foram secas de duas formas: á vácuo em temperatura ambiente ou foram liofilizadas. As esferas foram hidratadas previamente com tampão pH 6,0 e 0,02 M por 4 horas, após eram lavadas 3 vezes e drenadas, na sequencia eram quantificadas a atividade enzimática segundo descrito no item 7. 3. 4.

#### 7. 3. 6 Quantificação de Acetoína e Diacetil

Acetoína e diacetil foram quantificados simultaneamente utilizando o método descrito por Kobayashi *et al.* (2005), com adaptações, onde 0,5 mL de amostra eram adicionado 50  $\mu\text{L}$  2-pentanona (1000 mg/L) como padrão interno e 0,5 mL de acetato de etila, mantendo a solução em agitação vigorosa por 5 min, após foram centrifugadas (3000g por 2min) e a fase era orgânica recolhida. A quantificação foi realizada com cromatógrafo gasoso acoplado detector de ionização por chama (GC-FID) modelo Shimadzu GC-2010 Plus, utilizando coluna polar Restak RTx®Wax (30 m, 025 mm ID, 0,25  $\mu\text{m}$ ). O forno foi mantido a 30° C por 10 minutos, após uma taxa de 20° C/min até 200° C, mantendo a temperatura final por 3,5 minutos. A temperatura utilizada no injetor foi de 240° C e no detector de 250° C, 1  $\mu\text{l}$  de amostra foi injetado usando *splitless*, com tempo de amostragem de 1 min, fluxo total de 8,3 mL/min e fluxo de coluna de 1,06 mL/min.

A quantificação de acetoína e diacetil foi realizada através do uso de uma curva padrão externa, com adições dos analitos em cerveja *lager pilsen* comercial degaseificada, comprada em mercado local, produzida pela Heineken Brasil (Jacareí, São Paulo, Brasil), com 4,5% abv que não apresentou sinal de acetoína e diacetil. O padrão interno 2-pentanona foi adicionado na concentração de 100 mg/L enquanto acetoína e diacetil foram adicionados em dez níveis com concentrações entre 10 e 400 mg/L e 8 e 380

mg/L respectivamente. Para acetoina o limite de detecção 4 mg/L e de quantificação de 8,2 mg/L, enquanto para o diacetil o limite de detecção foi de 3,0 mg/L e 6,6 mg/L para quantificação. Os coeficientes de regreção da curva padrão foram de  $R^2=0,9897$  para acetoina e de  $R^2=0,9879$  para diacetil.

### 7. 3. 7 Estabilidade operacional da ALDC imobilizado aplicado à cerveja

A estabilidade da ALDC imobilizada em esferas de alginato/gelatina á cerveja, foi determinada imergindo as mesmas em cerveja comercial desgaseificada, sob agitação, durante 2 horas à temperatura ambiente. As esferas eram coletadas, lavadas com água destilada, escorridas e mantidas em pH 6,0, tampão 0,02 M durante dez minutos. Esta etapa foi repetida por 30 ciclos e a atividade foi medida de acordo com o procedimento descrito no item 7.3.4, nos ciclos (0, 3, 6, 9, 12, 20, 25, e 30),

A capacidade de converter  $\alpha$ -acetolactato, na presença de cerveja, em acetoina inibindo a formação de diacetil foi avaliada adicionando 1 U por litro de ALDC imobilizado em cerveja desgaseificada padrão. Adicionou-se uma quantidade pré-determinada de  $\alpha$ -acetolactato, agitando por 1 h à temperatura ambiente. Após essa etapa, era feita uma extração líquido/líquido, descrita no item 2.6 e na sequência foi realizada a análise por GC-FID conforme descrito, as esferas foram reutilizadas como descrito no parágrafo anterior.

### 5. 3. 8 Propriedades Térmicas do Imobilizado

A ALDC imobilizada em esferas de alginato/gelatina foram submetidas a análise termogravimétrica (TGA), utilizando metodologia descrita em trabalho publicado por De Campo e colaboradores (2017), com alterações. As análises foram realizadas no equipamento Perkin Elmer, TGA 6000 (Wellesly, USA), onde 10 mg de amostra liofilizadas foram aquecidas de 50° C até 700° C com taxa 10° C/min, utilizando atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 20 mL/min. Utilizou-se a metodologia de análise calorimetria diferencial de varredura (DSC) descrita por de Amadori e colaboradores (2015), com modificações. Foi

realizada em equipamento Perkin Elmer, DSC 8500 (Wellesly, USA), calibrado com Indium, com curva de aquecimento de 0° C à 100° C, seguido de resfriamento de 100° C à 0° C, com taxa de 10° C/min, com fluxo de 20 mL/min de nitrogênio, onde foram analisadas de 5-10 mg de amostra em cápsulas de alumínio hermeticamente fechadas.

## 7. 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7. 4. 1 Resultados de Imobilização

Avaliando o rendimento, a eficiência e a atividade recuperada, propostos por Sheldon e Van Pelt (2013), verificou-se a qualidade da imobilização da ALCD nos suportes de alginato/gelatina. Na Tabela 3 observam-se os resultados obtidos para as diferentes condições de imobilização, onde foram avaliados a quantidade de enzima ofertada (mg de proteína/por g de suporte) e o percentual de glutaraldeído utilizado na ativação do suporte.

**Tabela 3.** Resultados das condições de Imobilização de ALDC em suportes de alginato/gelatina, avaliando quantidade de enzima oferecida e percentual de glutaraldeído na ativação do suporte.

| Tratamento | Enzima (mg/ g suporte) | Glutaraldeído (%) | Rendimento (%) | Eficiência (%) | Atividade Recuperada (%) |
|------------|------------------------|-------------------|----------------|----------------|--------------------------|
| P1G1       | 0,42 ± 0,02            | 1,0               | 36,4 a         | 14,5 a         | 5,3 a                    |
| P1G2       | 0,42 ± 0,02            | 2,5               | 81,7 c         | 13,3 a         | 10,8 b                   |
| P1G5       | 0,42 ± 0,02            | 5,0               | 83,4 c         | 17,9 a,b       | 14,9 c                   |
| P2G1       | 0,62± 0,07             | 1,0               | 52,6 b         | 22,0 b,c       | 11,6 b                   |
| P2G2       | 0,62± 0,07             | 2,5               | 79,3 c         | 26,6 c,d       | 21,1 d                   |
| P2G5       | 0,62± 0,07             | 5,0               | 95,6 d         | 21,9 b,c,d     | 21,0 d                   |
| P3G1       | 0,84 ± 0,09            | 1,0               | 78,6 c         | 16,6 a,b       | 13,0 b,c                 |
| P3G2       | 0,84 ± 0,09            | 2,5               | 82,7 c         | 26,2 c,d       | 21,7 d                   |
| P3G5       | 0,84 ± 0,09            | 5,0               | 87,4 c, d      | 27,0 d         | 23,6 d                   |

Resultados apresentados como percentual, onde letras iguais nas colunas não apresentam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) para o Teste de Tukey.

Observou-se que nos grupos em que foram ofertadas baixas e médias quantidade de enzima (P1 e P2) ocorreram diferenças significativas no rendimento. Entre as quantidade de glutaraldeído utilizados na ativação do suporte, no nível mais elevado de enzima oferecido (P3), não encontrou-se diferenças no rendimento, possivelmente se deve a ter ultrapassado a capacidade de imobilização do suporte testado. Os resultados obtidos nos tratamentos P2G2, P2G5, P3G2 e P3G5 para eficiência e atividade recuperada destacaram-se em comparação aos demais tratamentos.

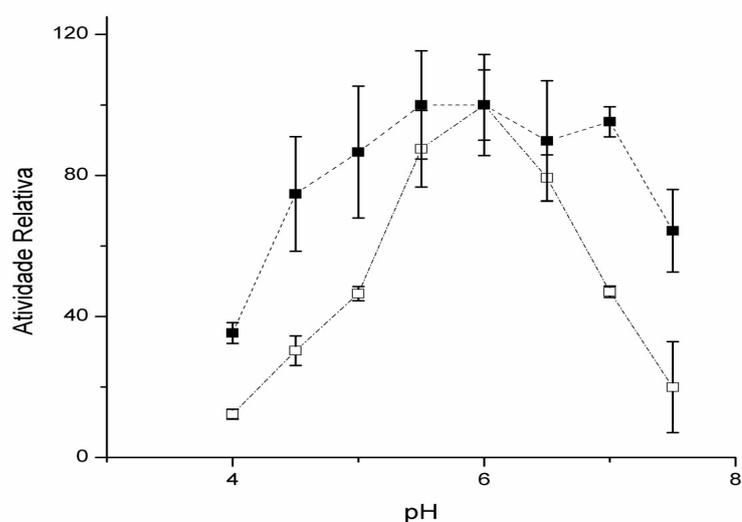
Os resultados de eficiência encontrados variaram entre 36,4 e 95,6%, tais resultados estão adequados com outros estudos de desenvolvimento de enzimas imobilizadas, Adriano *et al.* (2008) avaliando suportes de quitosana, quitosana/gelatina, quitosana/alginato e quitosana/carragena, obteve eficiências entre 24 e 82% na imobilização de quimiotripsina. Em trabalho utilizando  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* Tanriseven e Dogan (2002) obtivera, rendimento de 56% alginato/gelatina entrecruzada com glutaraldeído, enquanto Naganagouda e Mulimani (2006) atingiram 71,75% para  $\alpha$ -galactosidase usando fibras gelatinosas mistas de alginato e gelatina. Atualmente são raros os trabalhos com imobilização de ALDC, para que consigamos comparar adequadamente os resultados, Qian *et al.* (2015) obteve 69% de atividade recuperada imobilizando ALDC em nanopartículas paramagnéticas e Zhao *et al.* (2017) conseguiram eficiência de 65-100% imobilizando ALDC em *nanoflowers* de alginato. Ambos trabalhos utilizaram metodologias diferentes das propostas por Sheldon e Van Pelt (2013), o que impede uma comparação direta.

Os valores encontrados para eficiência foram entre 13,3 e 27,0%, valores superiores aos encontrado por Duarte *et al.* (2017), entre 2,17 e 11,03%, imobilizando  $\beta$ -galactosidase de *Bacillus circulans* em esferas de quitosana para a obtenção de lactosucrose, e similar ao encontrado por Lorenzoni *et al.* (2014), 33% de eficiência na imobilização de  $\beta$ -fructofuranosidase de *Aspergillus aculeatus*.

#### 7. 4. 2 Efeito do pH

A imobilização pode gerar alterações na atividade da enzima em relação ao pH, a imobilização podendo criar uma faixa de pH onde a atividade da enzima não é afetada. O pH ideal de atividade da ALDC pode variar dependendo da origem, por exemplo a enzima de origem de *Lactobacillus casei* DSM 2547 apresenta pH ideal entre 4,5 e 5,0 (RASMUSSEN et al., 1985), de *Brevibacterium acetylicum* pH 6,0 (OHSHIRO; AISAKA; UWAJIMA, 1989), e Monnet et al (MONNET et al., 1994) para *Lactococcus spp.* e *Leuconostoc spp.* determinaram o pH ideal entre 5,0 e 5,5 exceto para *Leuconostoc lactis* NCW1 pH 6,0-6,5.

A Figura 11 demonstra o efeito do pH na atividade da enzima livre e imobilizada, a atividade ótima observada foi no pH 6,0 em ambos os casos. Devemos destacar que a enzima imobilizada apresentou uma faixa de pH entre 4,5 e 7,0, onde a atividade enzimática foi muito próxima à atividade quantificada em pH ótimo, dessa maneira o derivado enzimático apresenta a capacidade de ser utilizado em diferentes tipos de cervejas dentro da faixa de pH citada anteriormente. No trabalho de Qian et al. (2015) não foi observado aumento significativo da faixa de pH de atuação da ALDC de *Bacillus brevis* imobilizada em nanopartículas paramagnéticas, além de ser encontrado a melhor condição pH 6,5 para enzima livre e imobilizada.

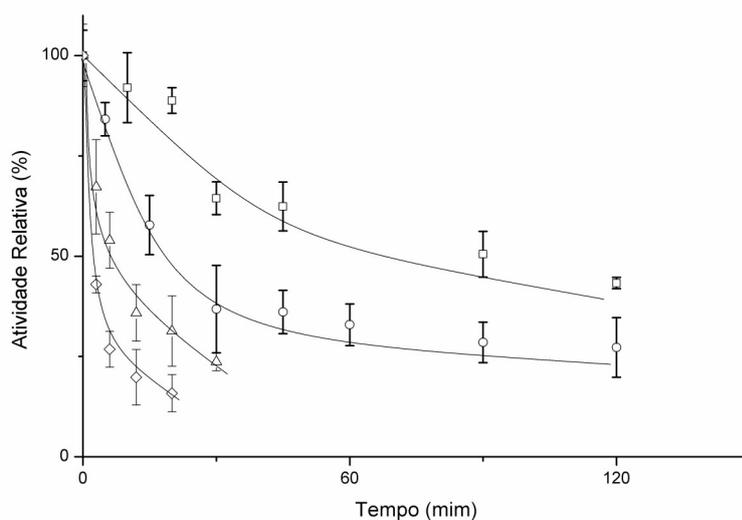


**Figura 11:** Atividade relativa para ALDC livre (□) e imobilizada (■) determinada em diferentes pH, à 37° C.

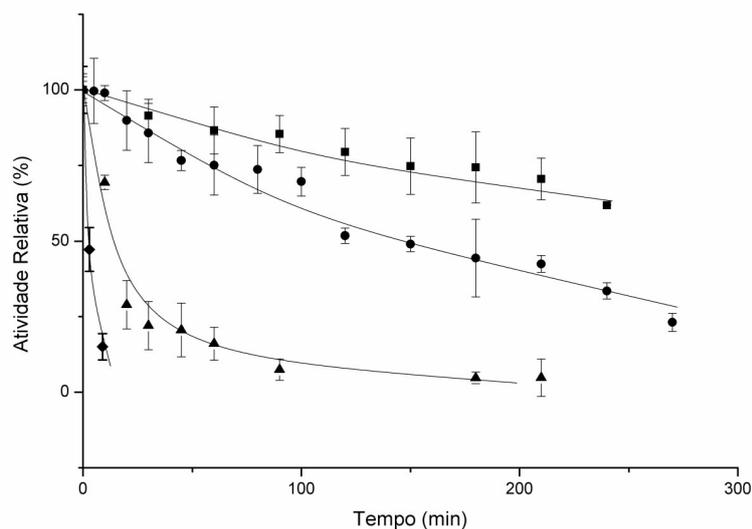
#### 7. 4. 3 Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica foi avaliada como descrito no item 7.2.5 em diferentes temperaturas e os resultados obtidos para a cinética de inativação para a enzima livre e imobilizada podem ser observados nas Figura 12 (a) e 12 (b) respectivamente. Para a enzima imobilizada em temperaturas de 50° e 60° C, ocorreu uma maior estabilização, uma tendência diferenciada das demais temperaturas avaliadas. Tal fenômeno pode ser evidenciado fortemente quando comparado os tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ) estimados, para a enzima livre e imobilizada, demonstrados na tabela 4, onde destacamos que o fator de estabilidade gerado pela imobilização foi de 6,32 e 6,45 para as temperaturas de 50 e 60° C, respectivamente e de 1 quando utilizada a temperatura de 70° C, o que demonstra a capacidade de estabilização da enzima pelo suporte em temperaturas menores e que possivelmente na temperaturas superiores alguma perturbação na estrutura do suporte deve ter ocasionado a liberação da enzima imobilizadas, deixando-as suscetível a desnaturação pelo calor.

a)



b)



**Figura 12:** Estabilidade térmica para ALDC em diferentes temperaturas, 50° C (■,□) ; 60° C (●,○); 70° C (▲,△) e 80° C (◆,◇). (a) enzima livre (b) enzima imobilizada; enzima livre (símbolos abertos) e imobilizada (símbolos fechados).

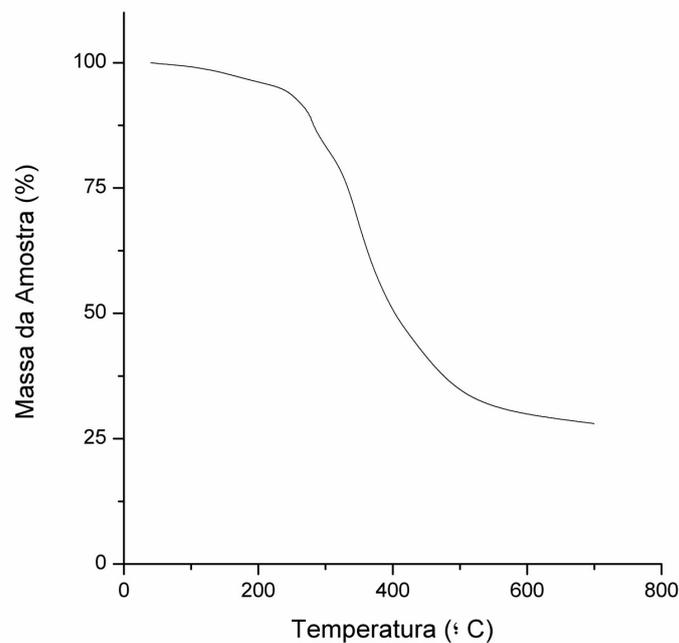
**Tabela 4.** Comparativo de tempos de meia vida entre ALDC livre e imobilizada.

| Temperatura (° C) | Enzima Livre ( $t_{1/2}$ ) (minutos) | Enzima Imobilizada ( $t_{1/2}$ ) (minutos) | Fator de estabilização |
|-------------------|--------------------------------------|--|------------------------|
| 50                | 61,3                                 | 387,31                                     | 6,32                   |
| 60                | 22,8                                 | 146,98                                     | 6,45                   |
| 70                | 17,1                                 | 17,1                                       | 1                      |

Os resultados de estabilização térmica e fator de estabilização nas temperaturas de 50 e 60 °C são similares a trabalhos utilizando esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído immobilizando  $\beta$ -galactosidase (KLEIN et al., 2012), invertase (LORENZONI et al., 2014), e quitosana ativada com genipina immobilizando  $\beta$ -galactosidase (KLEIN et al., 2016), essa estabilização térmica não foi verificada em invertase immobilizada em nanopartículas de quitosana (VALERIO et al., 2013). Pedroche *et al.* (2007) sugerem que o aumento da estabilização térmica está associada ao aumento do número de ligações covalentes entre a enzima e o suporte.

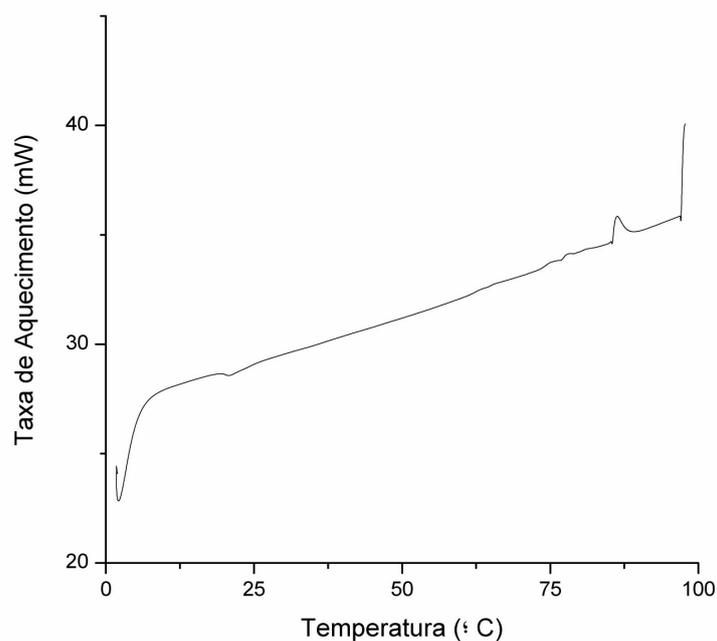
#### 7. 4. 4 Análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria de varredura diferencial (DSC)

Através da análise do gráfico de TGA (Figura 13), pode-se observar três faixas principais de decaimento de massa, na primeira parte do gráfico entre 100° C e 240°C ocorre um decaimento de apenas 5 %, o primeiro decaimento significativo ocorre na faixa de 240° à 300°C com redução de mais 20 % da massa da amostra, de 300° C á 400° C mais 30 %, e na ultima etapa de 400°C à 550° C redução de mais 15%. De Campo *et al.*, (2017), trabalhando com filmes de gelatina observaram uma grande redução, cerca de 20%, na faixa de 0 á 150°C, sugerindo que ocorreu degradação ou decomposição de frações de proteína de baixo peso molecular e do glicerol. A maior estabilidade observada possivelmente é devido ao intercruzamento do glutaraldeído com a gelatina impregnadas na malha de gel de alginato de cálcio. Efeito similar foi observado por Danial, Elnashar e Awad (2010) avaliando esferas de alginato/polietilenoimina, e em alginato/celulose (CMC)/polietilenoimina (AWAD et al., 2017), ambas ativadas com glutaraldeído.



**Figura 13.** Análise Termogravimétrica de esferas de alginato/gelatina ativadas com glutaraldeído (2,5%).

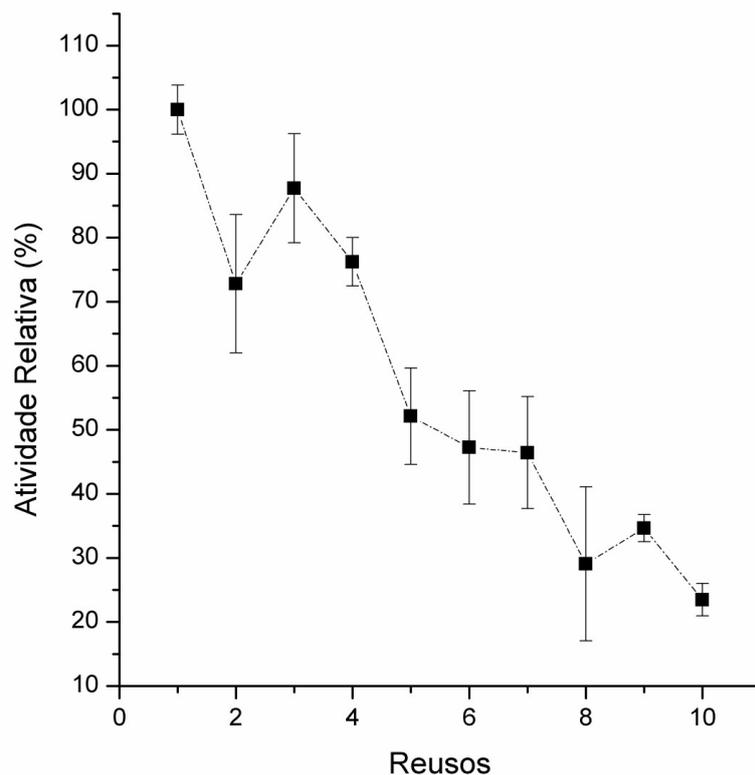
Os termogramas da DSC (Figura 14), em que as esferas de alginato/gelatina ativadas e ALDC imobilizada em esferas de alginato/gelatina foram avaliadas, demonstram sutis picos endotérmicos nas temperaturas de aproximadas 75 e 78° C, e um pico pronunciado em aproximadamente 84° C, tais resultados podem justificar a perda de estabilidade térmica da ALDC imobilizada em temperaturas igual ou superiores a 70° C, demonstrados no item 7.4.3. A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) de gelatina depende da origem e forma de preparo Rahman *et al.*, (2010). A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) para gelatina de origem bovina hidratada analisadas pelo método de DSC variou entre 70 e 90° C, em filmes de nano-cristais de celulose (10%)/quitosana (30%) com amido (60%) ou gelatina (60%), foi determinado a temperatura de  $T_g$  para a gelatina de 75,8 °C (NOORBAKHSH-SOLTANI; ZERAFAT; SABBAGHI, 2018).



**Figura 14.** Gráfico da Análise de DSC de ALDC immobilizadas em esferas de alginato/gelatina.

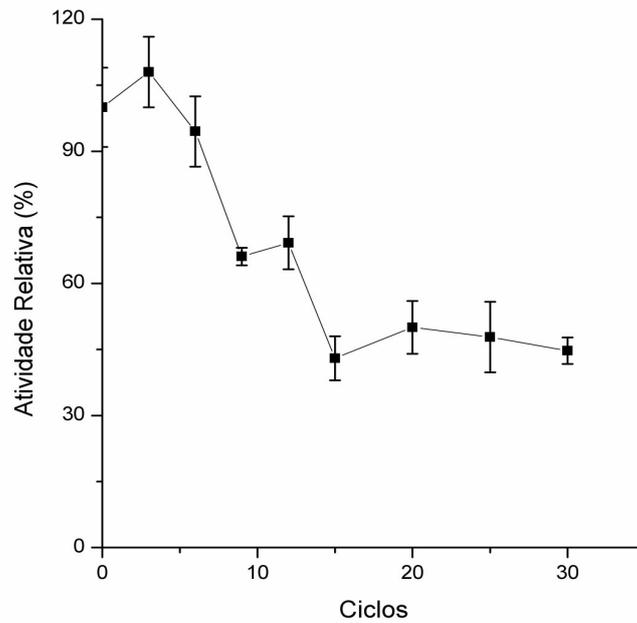
#### 7. 4. 5 Estabilidade Operacional

A capacidade de conversão de  $\alpha$ -acetolactato foi medida aplicando ALDC immobilizada diretamente em cerveja conforme item 7. 2. 7 e quantificando a acetoína formada conforme descrito no item 7. 2. 6, durante dez ciclos. Os resultados dos reusos estão dispostos na figura 15, onde pode ser observado que nos três primeiros ciclos a atividade relativa foi superior a 75%, no final dos dez ciclos a atividade relativa foi cerca de 25% da inicial. Em ALDC immobilizadas em microesferas  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-ALDC@Alg}$ , no primeiro reuso atividade relativa alcançou apenas 45% e no sexto cerca de 24% da atividade inicial (ZHAO et al., 2017). As perdas da capacidade do agregado enzimático devem-se possivelmente a carga de sódio ofertadas com o substrato que é preparado com NaOH, gerando a perda do íon cálcio e desestruturando o gel de alginato. Nas condições do experimento não ocorreu conversão espontânea de  $\alpha$ -acetolactato em diacetil em quantidades detectáveis pelos métodos analíticos aplicados.



**Figura 15:** Atividade relativa da ALDC immobilizada na conversão de  $\alpha$ -acetolactato em acetoína.

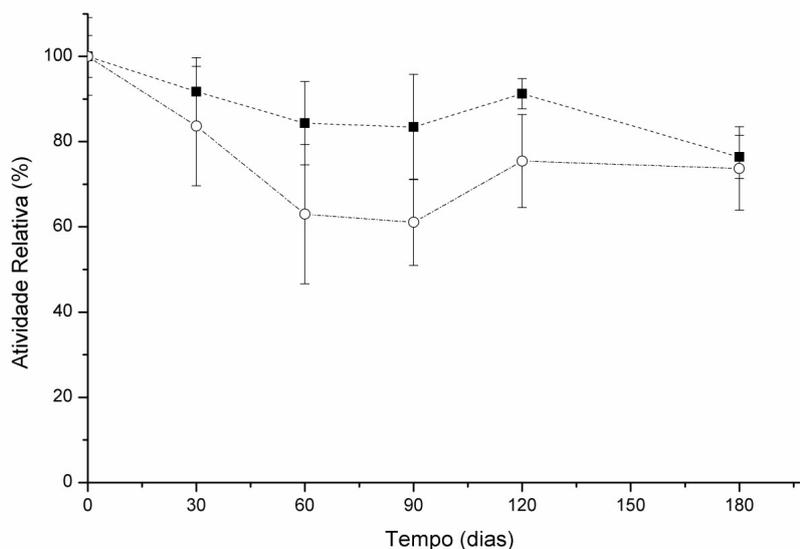
A estabilidade do agregado enzimático na cerveja analisada através da atividade medida durante 30 ciclos e resultados estão apresentados na Figura 16. A atividade relativa residual após 30 ciclos foi de 45%, possivelmente as perdas se devem à interações hidrofílicas e hidrofóbicas das proteínas presentes na cerveja com o suporte, dificultando o acesso do substrato ao sítio catalítico da enzima.



**Figura 16:** Avaliação da estabilidade de ALDC imobilizada a cerveja, durante ciclos de exposição.

#### 7. 4. 6 Estabilidade durante o armazenamento

A estabilidade ao armazenamento foi realizada segundo descrito no item 7.2.5, após a liofilização e a secagem à vácuo, o derivado enzimático manteve a atividade de 63,4 % e 59,4 %, respectivamente. A Figura 17 demonstra o acompanhamento da atividade durante o período de estocagem, os agregados desidratados apresentaram, após 180 dias de estocagem, aproximadamente 75 % da atividade. Esses resultados são superiores aos encontrados por Qian *et al.*, (2015), que para ALDC imobilizada em nanopartículas magnéticas estocadas em tampão, pH 6,0, em temperatura de 4° C, por 14 dias manteve 70 % da atividade.



**Figura 17.** Avaliação da qualidade da ALDC imobilizada desidratada durante a estocagem da ALDC imobilizada (•) liofilizada e (○) desidratada a vácuo.

## 7.5 CONCLUSÕES

As esferas de alginato/gelatina apresentaram características diferenciadas para a produção de ALDC imobilizada, garantindo uma ampla faixa de pH para a utilização dessa enzima, e estabilidade térmica elevada nas temperaturas de 50 e 60° C. Além de apresentar resultados satisfatório para rendimento, eficiência e atividade recuperada. A possibilidade de reutilização foi comprovada pelos testes de reusos e estabilidade na cerveja. Outro ponto importante é a possibilidade de secar a enzima já imobilizada ao suporte, mantendo sua atividade durante longos períodos de armazenamento.

## 7.8 REFERÊNCIAS

ADRIANO, Wellington S. et al. Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. *Biomacromolecules*, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 2170–2179, 2008.

AMADORI, Sofia et al. Effect of sterilization and crosslinking on gelatin films. *Journal of materials science. Materials in medicine*, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 69, 2015.

AWAD, Ghada E. A. et al. A novel alginate–CMC gel beads for efficient covalent inulinase immobilization. *Colloid and Polymer Science*, [s. l.], v. 295, n. 3, p. 495–506, 2017.

BÁEZ, Germán D. et al. Physicochemical Characterization of a Heat Treated Calcium Alginate Dry Film Prepared with Chicken Stock. *Journal of Food Science*, [s. l.], v. 82, n. 4, p. 945–951, 2017.

BAMFORTH, C. W.; KANAUCHI, M. Enzymology of vicinal diketone reduction in brewer's yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, [s. l.], v. 110, n. 2, p. 83–93, 2004. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/j.2050-0416.2004.tb00187.x/asset/j.2050-0416.2004.tb00187.x.pdf?v=1&t=i8j70217&s=2268b2d464798c075a01bea477dd39bd2ba98f9a>>

BARON, Christof. Beer production worldwide from 1998 to 2017 (in billion hectoliters). 2018. Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production/>>. Acesso em: 7 fev. 2019.

BRÁNYIK, Tomáš et al. A Review of Flavour Formation in Continuous Beer Fermentations. *Journal Of The Institute Of Brewing*, [s. l.], v. 114, n. 1, p. 3–13, 2008.

CALLONE, Emanuela et al. Immobilization of yeast and bacteria cells in alginate microbeads coated with silica membranes: procedures, physico-chemical features and bioactivity. *Journal of Materials Chemistry*, [s. l.], v. 18, n. 40, p. 4839, 2008.

COSTA, Gustavo P. et al. Volatile profile of sparkling wines produced with the addition of mannoproteins or lees before second fermentation performed with free and immobilized yeasts. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, [s. l.], v. 29, n. 9, p. 1866–1875, 2018.

DANIAL, Enas N.; ELNASHAR, Magdy M. M.; AWAD, Ghada E. A. Immobilized inulinase on grafted alginate beads prepared by the one-step and the two-steps methods. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, [s. l.], v. 49, n. 7, p. 3120–3125, 2010.

DE CAMPO, Camila et al. Gelatin capsule waste: new source of protein to develop a biodegradable film. *Polímeros*, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 100–107, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0104-1428.2371>>

DE MORAES CRIZEL, Tainara et al. Biodegradable Films Based on Gelatin and Papaya Peel Microparticles with Antioxidant Properties. *Food and Bioprocess Technology*, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 536–550, 2018.

DEVI, Nirmala; KAKATI, Dilip Kumar. Smart porous microparticles based on gelatin/sodium alginate polyelectrolyte complex. *Journal of Food Engineering*,

[s. l.], v. 117, n. 2, p. 193–204, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.02.018>>

DOU, Lixue et al. Physical properties and antioxidant activity of gelatin-sodium alginate edible films with tea polyphenols. *International Journal of Biological Macromolecules*, [s. l.], v. 118, p. 1377–1383, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.121>>

DUARTE, Lovaine Silva et al. A new bioprocess for the production of prebiotic lactosucrose by an immobilized  $\beta$ -galactosidase. *Process Biochemistry*, [s. l.], v. 55, p. 96–103, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.01.015>>

FADNAVIS, Nitin W. et al. Gelatin blends with alginate: Gels for lipase immobilization and purification. *Biotechnology Progress*, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 557–564, 2003.

FILHO, Waldemar Gastoni Venturini. *Bebidas Alcoólicas*. 2a ed. São Paulo.

GARMYN, Dominique et al. Cloning and sequencing of the gene encoding  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase from *Leuconostoc oenos*. *FEMS Microbiology Letters*, [s. l.], v. 145, n. 3, p. 445–450, 1996. Disponível em: <<http://femsle.oxfordjournals.org/content/145/3/445.abstract>>

GODTFREDSSEN, S. E.; OTTESEN, M. Maturation of beer with  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase. *Carlsberg research communications*, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 93–102, 1982. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0006553313&partnerID=40&md5=9bf83cf123d879edd1e3d311ca483cfa>>

GODTFREDSSEN, Sven Erik et al. Occurrence of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylases among lactic acid bacteria and their utilization for maturation of beer. *Applied Microbiology and Biotechnology*, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 23–28, 1984.

IAHNKE, Aline Oliveira E. Silv. et al. Antioxidant films based on gelatin capsules and minimally processed beet root (*Beta vulgaris* L. var. *Conditiva*) residues. *Journal of Applied Polymer Science*, [s. l.], v. 133, n. 10, 2016.

KAZEMI, Seyede Marzieh; REZAEI, Masoud. Antimicrobial Effectiveness of Gelatin-Alginate Film Containing Oregano Essential Oil for Fish Preservation. *Journal of Food Safety*, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 482–490, 2015.

KIRIN. Kirin Beer University Report Global Beer Production by Country in 2017. 2018. Disponível em: <[https://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2018/0809\\_01.html](https://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2018/0809_01.html)>. Acesso em: 7 fev. 2019.

KISRIEVA, Yu S. et al. Isolation and Purification of Acetolactate Synthase and Acetolactate Decarboxylase from the Culture of *Lactococcus lactis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 109–114, 2000.

KLEIN, Manuela P. et al. Effect of the support size on the properties of  $\beta$ -galactosidase immobilized on chitosan: Advantages and disadvantages of macro and nanoparticles. *Biomacromolecules*, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 2456–2464, 2012.

KLEIN, Manuela P. et al. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and  $\beta$ -d-galactosidase immobilization. *Carbohydrate Polymers*, [s. l.], v. 137, p. 184–190, 2016.

KOBAYASHI, Ken et al. Method for the simultaneous assay of diacetyl and acetoin in the presence of alpha-acetolactate: application in determining the kinetic parameters for the decomposition of alpha-acetolactate. *Journal of bioscience and bioengineering*, [s. l.], v. 99, n. 5, p. 502–507, 2005.

KROGERUS, Kristoffer; GIBSON, Brian R. 125th anniversary review: Diacetyl and its control during brewery fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, [s. l.], v. 119, n. 3, p. 86–97, 2013.

LORENZONI, André S. G. et al. Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. *Carbohydrate Polymers*, [s. l.], v. 103, n. 1, p. 193–197, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.038>>

LUPO, Bryshila et al. Characterization of alginate beads with encapsulated cocoa extract to prepare functional food: Comparison of two gelation mechanisms. *Food Hydrocolloids*, [s. l.], v. 49, p. 25–34, 2015.

MONNET, Christophe et al. Comparison of  $\alpha$ -Acetolactate Synthase and  $\alpha$ -Acetolactate Decarboxylase in *Lactococcus* SPP, and LWC5N5ST5C SPP. *biothecnology Letters*, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 257–262, 1994.

NAGANAGOUDA, K.; MULIMANI, V. H. Gelatin blends with alginate: Gel fibers for  $\alpha$ -galactosidase immobilization and its application in reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk. *Process Biochemistry*, [s. l.], v. 41, n. 8, p. 1903–1907, 2006.

NOORBAKHS-SOLTANI, S. M.; ZERAFAT, M. M.; SABBAGHI, S. A comparative study of gelatin and starch-based nano-composite films modified by nano-cellulose and chitosan for food packaging applications. *Carbohydrate Polymers*, [s. l.], v. 189, n. January, p. 48–55, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.012>>

OHSIRO, Takashi; AISAKA, Kazuo; UWAJIMA, Takayuki. Purification and characterization of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase from *brevibacterium acetylicum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, [s. l.], v. 53, n. 7, p. 1913–1918, 1989.

OTÁLORA, María Carolina et al. Encapsulated betalains (*Opuntia ficus-indica*) as natural colorants. Case study: Gummy candies. *Lwt*, [s. l.], v. 103, n.

December 2018, p. 222–227, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643818311411>>

PEDROCHE, Justo et al. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. *Enzyme and Microbial Technology*, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 1160–1166, 2007.

QIAN, Siriguleng et al. Synthesis and characterization of surface-functionalized paramagnetic nanoparticles and their application to immobilization of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase. *Process Biochemistry*, [s. l.], v. 50, n. 9, p. 1388–1393, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.012>>

RAHMAN, Mohammad Shafiur et al. Development of state diagram of bovine gelatin by measuring thermal characteristics using differential scanning calorimetry (DSC) and cooling curve method. *Thermochimica Acta*, [s. l.], v. 509, n. 1–2, p. 111–119, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tca.2010.06.011>>

RAKMAI, Jaruporn; CHEIRSILP, Benjamas; PRASERTSAN, Poonsuk. Enhanced thermal stability of cyclodextrin glycosyltransferase in alginate-gelatin mixed gel beads and the application for  $\beta$ -cyclodextrin production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 717–726, 2015.

RASMUSSEN, Anne M. et al. Purification of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase from *Lactobacillus casei* DSM 2547. *Carlsberg Res. Communi.*, [s. l.], v. 50, p. 73–82, 1985.

ROSELLINI, Elisabetta et al. Preparation and characterization of alginate/gelatin blend films for cardiac tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 447–453, 2009.

SARIKA, P. R.; JAMES, Nirmala Rachel. Polyelectrolyte complex nanoparticles from cationised gelatin and sodium alginate for curcumin delivery. *Carbohydrate Polymers*, [s. l.], v. 148, p. 354–361, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.073>>

SHELDON, Roger A.; VAN PELT, Sander. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev. Chem. Soc. Rev*, [s. l.], v. 42, n. 42, p. 6223–6235, 2013.

SINHA, Biswa. Beer Market by Type (Lager, Ale, Stout & Porter, Malt, and Others), Category (Popular-Priced, Premium, and Super Premium), Packaging (Glass, PET Bottle, Metal Can, and Others), and Production (Macro-brewery, Micro-brewery, Craft Brewery, and Others) - Glo. 2018. Disponível em: <<https://www.alliedmarketresearch.com/beer-market>>. Acesso em: 7 fev. 2019.

STOLARZEWICZ, I. A.; ZABORNIAK, P. Study on the Properties of Immobilized Biocatalysts with Lipase Activity Produced by *Yarrowia lipolytica* in Batch Culture. [s. l.], v. 31, n. 3, p. 251–259, 2017.

TANRISEVEN, Aziz; DOGAN, Senay. A novel method for the immobilization of  $\beta$ -galactosidase. *Process Biochemistry*, [s. l.], v. 38, n. v, p. 27–30, 2002.

VALERIO, Sheila G. et al. High operational stability of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, [s. l.], v. 92, n. 1, p. 462–468, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.001>>

WAINWRIGHT, T. Diacetyl- A Review. *Journal of the Ins*, [s. l.], v. 79, p. 451–470, 1973.

WESTERFELDT, W. W. A colorimetric. *J. Biol. Chem*, [s. l.], v. 161, p. 495–502, 1945.

XIAO, C. et al. Blend films from sodium alginate and gelatin solutions. *Journal of Macromolecular Science - Pure and Applied Chemistry*, [s. l.], v. 38 A, n. 3, p. 317–328, 2001.

ZHAO, Fuhua et al. Enzyme-inorganic nanoflowers/alginate microbeads: An enzyme immobilization system and its potential application. *Process Biochemistry*, [s. l.], v. 57, n. March, p. 87–94, 2017.

## 8. DISCUSSÃO GERAL

A cerveja está entre as bebidas de maior consumo *per capita*, e o Brasil entre os três maiores produtores mundiais. Entre as etapas de elaboração a maturação é apontada como crucial para a garantia da qualidade sensorial, mas também pode ser um fator limitante da produção, devido ao longo tempo necessário principalmente para cervejas do tipo *Lager*, além do custo de energético da manutenção dos tanques de maturação em temperaturas baixas.

A indústria está utilizando a tecnologia enzimática para acelerar o processo de maturação, assim reduzindo custos e garantindo a qualidade sensorial do produto. Comercialmente é disponibilizada a enzima ALDC na forma líquida, que usualmente reduz o tempo de maturação de cerca de quatro semanas para aproximadamente de 48 h. A imobilização de enzimas tem se mostrado como uma importante tecnologia, capaz de aumentar a estabilidade operacional, além de possibilitar a reutilização, quando em processos em batelada, ou em longos períodos em processos contínuos.

A utilização de enzimas imobilizadas apresenta vantagens, mas a recuperação da atividade enzimática após a imobilização pode ser baixa, sendo dependente da enzima utilizada, suporte, agente funcional, entre outros. Essa perda pode estar associada a mudança da conformação da enzima, disposição do sítio ativo e forma de acesso do substrato ao sítio ativo. Dessa maneira o presente trabalho avaliou as condições de imobilização da ALDC em esferas de quitosana e alginato/gelatina.

A imobilização da ALDC em esferas de quitosana apresentou os melhores resultados quando ativadas com solução aquosa de glutaraldeído 3%, obtendo 84% de rendimento, 10,8% de eficiência e 9,1% de atividade recuperada. As enzimas livres e imobilizadas apresentaram maiores atividades em pH 6,0, mas em pHs inferiores, a enzima imobilizada foi mais ativa. A enzima imobilizada manteve aproximadamente 70% da atividade em pH 4,5, enquanto que a livre foi inferior a 40% da atividade observada no pH 6,0.

A enzima imobilizada também apresentou maior estabilidade térmica, em todas as temperaturas testadas. Ao avaliar o tempo de meia-vida à 60° C, a enzima imobilizada apresentou um fator de estabilidade de 6,93 em relação à enzima livre nas mesmas condições.

A enzima imobilizada apresentou estabilidade operacional quando aplicada em cerveja, observando-se manutenção de 80% da atividade inicial após 12 ciclos consecutivos. Este fato indica a eficiente imobilização covalente entre o suporte e a enzima possibilitando a reutilização de derivado enzimático.

Foram desenvolvidas esferas de alginato/gelatina, utilizando gelatina descartada de cápsulas da indústria nutraceutica. Os melhores resultados obtidos para rendimento, eficiência e atividade recuperada foram 95,6%, 27,0% e 23,6%, respectivamente. A imobilização proporcionou elevada atividade em uma faixa ampla de pH.

A enzima imobilizada apresentou maior estabilidade nas temperaturas de 50° e 60° C, obtendo fatores de estabilidade de 6,32 e 6,45, respectivamente. Estes valores são similares ao encontrado para ALDC imobilizada em esferas de quitosana. Em temperaturas superiores não ocorreu essa estabilização, mas isso não afeta a aplicação, pois a aplicação em cerveja deve ocorrer em temperaturas baixas.

O derivado imobilizado apresentou adequada capacidade de reutilização. Apesar de quando realizados testes de reusos, o aporte de sódio adicionado na preparação do substrato e nos tampões utilizados, afetou a estrutura do alginato de cálcio. Possivelmente fator que limitou os reusos desse suporte, pois o suporte apresentou boa estabilidade aos ciclos de aplicação em cerveja.

A liofilização e a desidratação à vácuo desse agregado provocaram redução da atividade e após essas operações foram detectadas 63,4 % e 59,4 % da atividade respectivamente. No entanto, essas operações permitiram um armazenamento por 180 dias, com manutenção de cerca de 80 % da atividade. Essa característica possibilita o desenvolvimento de outros agregados enzimáticos que possam ser comercializados liofilizados.

## 9. CONCLUSÕES

O presente trabalho comprova que a imobilização covalente da ALDC é uma excelente alternativa para melhorar as características da enzima. Através dessa metodologia obteve-se um agregado enzimático com maior estabilidade térmica e a variação de pH. Esse aumento da robustez possibilita a reutilização desse preparado em sistema de batelada ou em processos contínuos, além da possibilidade de utilizar alta concentração, visando reduzir significativamente o tempo de maturação.

A imobilização da ALDC em esferas de quitosana apresentou altas atividades quando aplicadas diretamente em cerveja. E também manteve a atividade após doze ciclos, apresentando a capacidade de reduzir a formação de diacetil.

A utilização do suporte de alginato/gelatina, a última sendo resíduo da indústria nutracêutica, demonstrou resultados adequados de parâmetros de imobilização, estabilidade térmica e a variação de pH. Este apresenta potencial comercial devido a sua capacidade de estocagem após imobilização, por longos períodos, mantendo atividade enzimática.

A ALDC imobilizada covalentemente apresentou capacidade de impedir, ou no mínimo reduzir, a formação de diacetil, na presença de cerveja. Assim apresenta potencial para reduzir o tempo necessário de maturação.

## REFERÊNCIAS

ADRIANO, Wellington S. et al. Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 2170–2179, 2008.

ALTUN, Gamze Durgun; CETINUS, Senay Akkus. Immobilization of pepsin on chitosan beads. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 100, n. 3, p. 964–971, 2007.

AMADORI, Sofia et al. Effect of sterilization and crosslinking on gelatin films. **Journal of materials science. Materials in medicine**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 69, 2015.

ANDERHAEGEN, Bart et al. Evolution of Chemical and Sensory Properties during Aging of Top-Fermented Beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 51, p. 6782–6790, 2003.

ANDRÉS-IGLESIAS, Cristina et al. Comparison of carbonyl profiles from Czech and Spanish lagers: Traditional and modern technology. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 66, p. 390–397, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364381530284X>>

ANSARI, Shakeel Ahmed; HUSAIN, Qayyum. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 512–523, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.005>>

ARFIN, Stuart M.; HILL, RICHARD K.; SAWADA, SEIJI. Stereochemistry of Valine and Isoleucine Biosynthesis. **BIOORGANIC CHEMISTRY**, [s. l.], v. 189, p. 175–189, 1979.

AWAD, Ghada E. A. et al. A novel alginate–CMC gel beads for efficient covalent inulinase immobilization. **Colloid and Polymer Science**, [s. l.], v. 295, n. 3, p. 495–506, 2017.

BÁEZ, Germán D. et al. Physicochemical Characterization of a Heat Treated Calcium Alginate Dry Film Prepared with Chicken Stock. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 82, n. 4, p. 945–951, 2017.

BAMFORTH, C. W. Progress in Brewing Science and Beer Production. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 161–176, 2017. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-chembioeng-060816-101450>>

BAMFORTH, C. W.; KANAUCHI, M. Enzymology of vicinal diketone reduction in brewer's yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, [s. l.], v. 110, n. 2, p. 83–93, 2004. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/j.2050-0416.2004.tb00187.x/asset/j.2050-0416.2004.tb00187.x.pdf?v=1&t=i8j70217&s=2268b2d464798c075a01bea477dd39bd2ba98f9a>>

BARON, Christof. **Beer production worldwide from 1998 to 2017 (in billion hectoliters)**. 2018. Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production/>>.

Acesso em: 7 fev. 2019.

BAŞAK, Esra; AYDEMİR, Tülin. Immobilization of catalase on chitosan and amino acid-modified chitosan beads. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 269–275, 2013.

BENÍTEZ, Elisa I. et al. Turbidimetric Behavior of Colloidal Particles in Beer Before Filtration Process. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 1082–1090, 2013.

BRÁNYIK, Tomás et al. Continuous immobilized yeast reactor system for complete beer fermentation using spent grains and corncobs as carrier materials. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 33, n. 12, p. 1010–1018, 2006.

BRÁNYIK, Tomáš et al. A Review of Flavour Formation in Continuous Beer Fermentations. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [s. l.], v. 114, n. 1, p. 3–13, 2008.

CALLONE, Emanuela et al. Immobilization of yeast and bacteria cells in alginate microbeads coated with silica membranes: procedures, physico-chemical features and bioactivity. **Journal of Materials Chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 40, p. 4839, 2008.

CARVALHO, Nayara B. .; LIMA, Alvaro S. .; SOARES, F. Cleide M. Uso de Silicas Modificadas para Imobilização de Lipases. **Quimica Nova**, [s. l.], v. XY, n. 00, p. 1–11, 2014.

CHARRY-PARRA, Gustavo; DEJESUS-ECHEVARRIA, Maritza; PEREZ, Fernando J. Beer Volatile Analysis: Optimization of HS/SPME Coupled to GC/MS/FID. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 76, n. 2, p. 205–211, 2011.

CHOI, Eun Ji; AHN, Hyun Woo; KIM, Wang June. Effect of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase on diacetyl content of beer. **Food Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 1373–1380, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10068-015-0176-y>>

COLANGELO, Donato et al. The use of chitosan as alternative to bentonite for wine fining: Effects on heat-stability, proteins, organic acids, colour, and volatile compounds in an aromatic white wine. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 264, n. May, p. 301–309, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.005>>

COSTA, Gustavo P. et al. Volatile profile of sparkling wines produced with the addition of mannoproteins or lees before second fermentation performed with free and immobilized yeasts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 29, n. 9, p. 1866–1875, 2018.

DA SILVA, Gisele C. et al. Method development by GC-ECD and HS-SPME-GC-MS for beer volatile analysis. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 167, p. 71–77, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.033>>

DANIAL, Enas N.; ELNASHAR, Magdy M. M.; AWAD, Ghada E. A. Immobilized inulinase on grafted alginate beads prepared by the one-step and the two-steps methods. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, [s. l.], v. 49, n. 7, p. 3120–3125, 2010.

DATTA, Sumitra; CHRISTENA, L. Rene; RAJARAM, Yamuna Rani Sriramulu. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3**

**Biotech**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1–9, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13205-012-0071-7>>

DE CAMPO, Camila et al. Gelatin capsule waste: new source of protein to develop a biodegradable film. **Polímeros**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 100–107, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0104-1428.2371>>

DE MORAES CRIZEL, Tainara et al. Biodegradable Films Based on Gelatin and Papaya Peel Microparticles with Antioxidant Properties. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 536–550, 2018.

DE SCHUTTER, David P. et al. Optimisation of wort volatile analysis by headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1179, n. 2, p. 75–80, 2008.

DEVI, Nirmala; KAKATI, Dilip Kumar. Smart porous microparticles based on gelatin/sodium alginate polyelectrolyte complex. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 117, n. 2, p. 193–204, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.02.018>>

DJAGNY, K. B.; WANG, Z.; XU, S. Gelatin: A valuable protein for food and pharmaceutical industries: Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 481–492, 2001.

DOU, Lixue et al. Physical properties and antioxidant activity of gelatin-sodium alginate edible films with tea polyphenols. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 118, p. 1377–1383, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.121>>

DUARTE, Lovaine Silva et al. A new bioprocess for the production of prebiotic lactosucrose by an immobilized  $\beta$ -galactosidase. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 55, p. 96–103, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.01.015>>

DULIEU, Claire et al. Improved Performances and Control of Beer Fermentation Using Encapsulated  $\alpha$ -Acetolactate Decarboxylase and Modeling. [s. l.], p. 958–965, 2000.

DULIEU, Claire; PONCELET, Denis. Spectrophotometric assay of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 537–542, 1999.

FADNAVIS, Nitin W. et al. Gelatin blends with alginate: Gels for lipase immobilization and purification. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 557–564, 2003.

FDA; ADMINISTRATION, Food and Drug. **Code Of Federal Regulations**. 2018.

FILHO, Waldemar Gastoni Venturini. **Bebidas Alcoólicas**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo.

GARMYN, Dominique et al. Cloning and sequencing of the gene encoding  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase from *Leuconostoc oenos*. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 145, n. 3, p. 445–450, 1996. Disponível em: <<http://femsle.oxfordjournals.org/content/145/3/445.abstract>>

GÒDIA, Francesc; CASAS, Carles; SOLÀ, Carles. Application of Immobilized Yeast Cells to Sparkling Wine Fermentation. **Biotechnology Progress**, [s. l.],

v. 7, p. 468–470, 1991.

GODTFREDSSEN, S. E.; OTTESEN, M. Maturation of beer with  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase. **Carlsberg research communications**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 93–102, 1982. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0006553313&partnerID=40&md5=9bf83cf123d879edd1e3d311ca483cfa>>

GODTFREDSSEN, Sven Erik et al. Application of the acetolactate decarboxylase from *Lactobacillus casei* for accelerated maturation of beer. **Carlsberg Research Communications**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 69–74, 1984. a.

GODTFREDSSEN, Sven Erik et al. Occurrence of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylases among lactic acid bacteria and their utilization for maturation of beer. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 23–28, 1984. b.

GODTFREDSSEN, Sven Erik; LORCK, Henning; SIGSCAARD, Poul. On the Occurrence of  $\alpha$ - Acetolactate decarboxylases Among Microorganisms. **Carlsberg Res. Commun.**, [s. l.], v. 48, p. 239–247, 1983.

GOMEZ-GUILLEN, M. C. et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 25, n. 8, p. 1813–1827, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>>

GUADARRAMA-FERNÁNDEZ, Leonor et al. A disposable, simple, fast and low-cost paper-based biosensor and its application to the determination of glucose in commercial orange juices. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 265, n. July 2017, p. 64–69, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.082>>

HAUKELI, A. D.; LIE, S. Formation and Removal of Acetoin During Yeast Fermentation. **J. Inst. Brew.**, [s. l.], v. 81, p. 58–64, 1975.

HIDALGO, Francisco J.; ZAMORA, Rosario. Strecker-type degradation produced by the lipid oxidation products 4,5-epoxy-2-alkenals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 52, n. 23, p. 7126–7131, 2004.

HOFMANN, Thomas; SCHIEBERLE, Peter. Formation of aroma-active Strecker-aldehydes by a direct oxidative degradation of Amadori compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 48, n. 9, p. 4301–4305, 2000.

HORÁK, Tomáš et al. Determination of some beer flavours by stir bar sorptive extraction and solvent back extraction. **Journal of the Institute of Brewing**, [s. l.], v. 113, n. 2, p. 154–158, 2007.

IAHNKE, Aline Oliveira E. Silv. et al. Antioxidant films based on gelatin capsules and minimally processed beet root (*Beta vulgaris* L. var. *Conditiva*) residues. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 133, n. 10, 2016.

Jl, Fangling et al. Structural and enzymatic characterization of acetolactate decarboxylase from *Bacillus subtilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], p. 1–13, 2018.

KAZEMI, Seyede Marzieh; REZAEI, Masoud. Antimicrobial Effectiveness of Gelatin-Alginate Film Containing Oregano Essential Oil for Fish Preservation. **Journal of Food Safety**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 482–490, 2015.

KIRIN. **Kirin Beer University Report Global Beer Production by Country in 2017.** 2018. Disponível em:

<[https://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2018/0809\\_01.html](https://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2018/0809_01.html)>. Acesso em: 7 fev. 2019.

KISHIMOTO, TORU et al. Analysis of Hop-Derived Terpenoids in Beer and Evaluation of Their Behavior Using the Stir Bar – Sorptive Extraction Method with GC-MS. **J. Agric. Food Chem.**, [s. l.], v. 53, p. 4701–4707, 2005.

KISRIEVA, Yu S. et al. Isolation and Purification of Acetolactate Synthase and Acetolactate Decarboxylase from the Culture of *Lactococcus lactis*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 109–114, 2000.

KLEIN, Manuela P. et al. Effect of the support size on the properties of  $\beta$ -galactosidase immobilized on chitosan: Advantages and disadvantages of macro and nanoparticles. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 2456–2464, 2012.

KLEIN, Manuela P. et al. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and  $\beta$ -d-galactosidase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 137, p. 184–190, 2016.

KLEINOVA, Jana; KLEJDUS, Borivoj. Determination of Volatiles in Beer using Solid-Phase Microextraction in Combination with Gas Chromatography / Mass Spectrometry. **Czech Journal of Food Sciences**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 241–248, 2014.

KOBAYASHI, Ken et al. Method for the simultaneous assay of diacetyl and acetoin in the presence of alpha-acetolactate: application in determining the kinetic parameters for the decomposition of alpha-acetolactate. **Journal of bioscience and bioengineering**, [s. l.], v. 99, n. 5, p. 502–507, 2005.

KOURKOUTAS, Y. et al. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 377–397, 2004.

KRAJEWSKA, Barbara. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 35, n. 2–3, p. 126–139, 2004.

KROGERUS, Kristoffer; GIBSON, Brian R. 125th anniversary review: Diacetyl and its control during brewery fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, [s. l.], v. 119, n. 3, p. 86–97, 2013.

KUPETZ, M. et al. A new approach to assessing the crossflow membrane filtration of beer at laboratory scale. **Journal of the Institute of Brewing**, [s. l.], v. 124, n. 4, p. 450–456, 2018.

LANDAUD, S.; LIEBEN, P.; PICQUE, D. Quantitative analysis of diacetyl, pentanedione and their precursors during beer fermentation by an accurate GC/MS method. **Journal of the Institute of Brewing**, [s. l.], v. 104, n. April, p. 93–99, 1998.

LOKEN, Jan P.; STROMER, Fredrik C. acetolactate Decarboxylase from *Aerobacter aerogene* Purification and Propierties. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 14, p. 133–137, 1970.

LORENZONI, André S. G. et al. Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 103, n. 1, p. 193–197, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.038>>

- LUPO, Bryshila et al. Characterization of alginate beads with encapsulated cocoa extract to prepare functional food: Comparison of two gelation mechanisms. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 49, p. 25–34, 2015.
- MARIOD, Abdalbasit Adam; ADAM, Hadia Fadol. Review: Gelatin, source, extraction and industrial applications. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 135–147, 2013.
- MARLOW, Victoria A. et al. Structure and mechanism of acetolactate decarboxylase. **ACS Chemical Biology**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 2339–2344, 2013.
- MENDES, Adriano A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.
- MERYAM SARDAR, Razi Ahmad. Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 04, n. 02, 2015.
- MOGHARABI, Mehdi et al. Immobilization of laccase in alginate-gelatin mixed gel and decolorization of synthetic dyes. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, [s. l.], v. 2012, 2012.
- MONNET, Christophe et al. Comparison of  $\alpha$ -Acetolactate Synthase and  $\alpha$ -Acetolactate Decarboxylase in *Lactococcus* SPP, and LWC5N5ST5C SPP. **biothecnology Letters**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 257–262, 1994.
- MONTEIRO, Oyrton A. C.; AIROLDI, Claudio. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 26, n. 2–3, p. 119–128, 1999.
- MOREIRA, Nathalie et al. Optimization of the HS-SPME-GC-IT/MS method using a central composite design for volatile carbonyl compounds determination in beers. **Talanta**, [s. l.], v. 117, p. 523–531, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.09.027>>
- MORENO-ARRIBAS, M. Victoria; POLO, M. Carmen. **Wine chemistry and biochemistry**. New York: Springer Science+Business Media, 2009.
- MÖRSCHBÄCHER, Ana Paula; VOLPATO, Giandra; SOUZA, Cláudia Fernanda Volken De. **Kluyveromyces lactis  $\beta$ -galactosidase immobilization in calcium alginate spheres and gelatin for hydrolysis of cheese whey lactose** **Ciência Rural**, 2016. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782016000500921&lng=en&tling=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782016000500921&lng=en&tling=en)>
- MOUSIA, Z. et al. The effect of milling parameters on starch hydrolysis of milled malt in the brewing process. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 39, n. 12, p. 2213–2219, 2004.
- NAGANAGOUDA, K.; MULIMANI, V. H. Gelatin blends with alginate: Gel fibers for  $\alpha$ -galactosidase immobilization and its application in reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 41, n. 8, p. 1903–1907, 2006.
- NELSON, Max. **A History of Beer in Ancient Europe**. First ed. New York: Routledge, 2005. Disponível em: <<https://scholar.uwindsor.ca/llcpub>>
- NOORBAKHSH-SOLTANI, S. M.; ZERAFAT, M. M.; SABBAGHI, S. A

comparative study of gelatin and starch-based nano-composite films modified by nano-cellulose and chitosan for food packaging applications. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 189, n. January, p. 48–55, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.012>>

O'SULLIVAN, S. M. et al. Purification and characterisation of acetolactate decarboxylase from *Leuconostoc lactis* NCW1. **FEMS Microbiol Lett**, [s. l.], v. 194, n. 2, p. 245–249, 2001. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11164316](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11164316)>

OHSIRO, Takashi; AISAKA, Kazuo; UWAJIMA, Takayuki. Purification and characterization of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase from *brevibacterium acetylicum*. **Agricultural and Biological Chemistry**, [s. l.], v. 53, n. 7, p. 1913–1918, 1989.

OTÁLORA, María Carolina et al. Encapsulated betalains (*Opuntia ficus-indica*) as natural colorants. Case study: Gummy candies. **Lwt**, [s. l.], v. 103, n. December 2018, p. 222–227, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643818311411>>

PAL, Ajay; KHANUM, Farhath. Covalent immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated alginate beads using response surface methodology: Characterization of immobilized enzyme. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 46, n. 6, p. 1315–1322, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.02.024>>

PEDROCHE, Justo et al. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 1160–1166, 2007.

PILKINGTON, P. H. .. et al. Fundamentals of immobilised yeast cells for continuous beer fermentation: A review. **Journal of the Institute of Brewing**, [s. l.], v. 104, n. February, p. 19–31, 1998.

PINHO, Olivia; FERREIRA, Isabel M. P. L. V. O.; SANTOS, Lúcia H. M. L. M. Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1121, n. 2, p. 145–153, 2006.

PIRES, Eduardo J. et al. Continuous beer fermentation - diacetyl as a villain. **Journal of the Institute of Brewing**, [s. l.], v. 121, n. 1, p. 55–61, 2015.

QIAN, Siriguleng et al. Synthesis and characterization of surface-functionalized paramagnetic nanoparticles and their application to immobilization of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 50, n. 9, p. 1388–1393, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.012>>

RAHMAN, Mohammad Shafiur et al. Development of state diagram of bovine gelatin by measuring thermal characteristics using differential scanning calorimetry (DSC) and cooling curve method. **Thermochimica Acta**, [s. l.], v. 509, n. 1–2, p. 111–119, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tca.2010.06.011>>

RAKMAI, Jaruporn; CHEIRSILP, Benjamas; PRASERTSAN, Poonsuk.

Enhanced thermal stability of cyclodextrin glycosyltransferase in alginate-gelatin mixed gel beads and the application for  $\beta$ -cyclodextrin production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 717–726, 2015.

RASMUSSEN, Anne M. et al. Purification of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase from *Lactobacillus casei* DSM 2547. **Carlsberg Res. Communi.**, [s. l.], v. 50, p. 73–82, 1985.

RICHMAN, Daniel E.; MAJUMDAR, Ananya; BERTRAND GARCÍA-MORENO, E. Conformational Reorganization Coupled to the Ionization of Internal Lys Residues in Proteins. **Biochemistry**, [s. l.], v. 54, n. 38, p. 5888–5897, 2015.

RIU-AUMATELL, M. et al. Assessment of the aroma profiles of low-alcohol beers using HS-SPME-GC-MS. **Food Research International**, [s. l.], v. 57, p. 196–202, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.016>>

ROSELLINI, Elisabetta et al. Preparation and characterization of alginate/gelatin blend films for cardiac tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 447–453, 2009.

ROSSI, Serena et al. Characterization of the volatile profiles of beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 94, n. 5, p. 919–928, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23929274>>

SARIKA, P. R.; JAMES, Nirmala Rachel. Polyelectrolyte complex nanoparticles from cationised gelatin and sodium alginate for curcumin delivery. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 148, p. 354–361, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.073>>

SCHÖFFER, Jéssie da Natividade et al. Directed immobilization of CGTase: The effect of the enzyme orientation on the enzyme activity and its use in packed-bed reactor for continuous production of cyclodextrins. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 58, n. May, p. 120–127, 2017.

SCHÖFFER, Jéssie Da Natividade et al. Continuous production of  $\beta$ -cyclodextrin from starch by highly stable cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on chitosan. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 98, n. 2, p. 1311–1316, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.044>>

SHELDON, Roger A.; VAN PELT, Sander. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev. Chem. Soc. Rev**, [s. l.], v. 42, n. 42, p. 6223–6235, 2013.

SHINDO, Sho et al. Control of diacetyl precursor [ $\alpha$ -acetolactate] formation during alcohol fermentation with yeast cells immobilized in alginate fibers with double gel layers. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, [s. l.], v. 76, n. 3, p. 199–202, 1993.

SIKORSKI, Pawel et al. Evidence for egg-box-compatible interactions in calcium - Alginate gels from fiber x-ray diffraction. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 2098–2103, 2007.

SINHA, Biswa. **Beer Market by Type (Lager, Ale, Stout & Porter, Malt, and Others), Category (Popular-Priced, Premium, and Super Premium), Packaging (Glass, PET Bottle, Metal Can, and Others), and Production**



the covalent immobilization of enzymes. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 105, p. 894–904, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.102>>

WAINWRIGHT, T. Diacetyl- A Review. **Journal of the Ins**, [s. l.], v. 79, p. 451–470, 1973.

WESTERFELDT, W. W. A colorimetric. **J. Biol. Chem**, [s. l.], v. 161, p. 495–502, 1945.

WU, Tiantian et al. Formation of hydrogels based on chitosan/alginate for the delivery of lysozyme and their antibacterial activity. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 240, p. 361–369, 2018. a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.052>>

WU, Wenyue et al. Structural characterization of an acetolactate decarboxylase from *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 509, n. 1, p. 154–160, 2018. b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.12.094>>

XIAO, C. et al. Blend films from sodium alginate and gelatin solutions. **Journal of Macromolecular Science - Pure and Applied Chemistry**, [s. l.], v. 38 A, n. 3, p. 317–328, 2001.

YAMAUCHI, Yoshihiro et al. Rapid maturation of beer using an immobilized yeast bioreactor. 2. Balance of total diacetyl reduction and regeneration. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 109–116, 1995.

ZDARTA, Jakub et al. A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. **Catalysts**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 92, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2073-4344/8/2/92>>

ZHAO, Fuhua et al. Enzyme-inorganic nanoflowers/alginate microbeads: An enzyme immobilization system and its potential application. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 57, n. March, p. 87–94, 2017.

ZHAO, Hong et al. Microfluidic production of porous chitosan/silica hybrid microspheres and its Cu(II) adsorption performance. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 229, p. 82–89, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2013.05.093>>

