

OBTENÇÃO DE CICLOMALTODEXTRINA-GLUCANO-TRANSFERASE EM PROCESSO FERMENTATIVO POR *BACILLUS FIRMUS* CEPA 37 PARA PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS.

Maicon Ramon Bueno (Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - UEM).

E-mail: mramonbueno@hotmail.com

Luana Thais Varize (Aluna de Iniciação Científica do Programa de Engenharia Química – UEM).

E-mail: willeluana@hotmail.com

José Eduardo Olivo (Professor Dr. do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - UEM).

E-mail: olivo@deq.uem.br

Gisella Maria Zanin (Professora Dr^a. do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - UEM).

E-mail: gisella@deq.uem.br

Resumo: Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos contendo um mínimo de 6 unidades de D-(+)-glicopiranosose unidas por ligações alfa-1,4. Possuem capacidade de formar complexos de inclusão com grande variedade de moléculas hóspedes em solução. Com o objetivo exploratório de aumentar a produção da CGTase para formação de gamaCD, realizou-se cultivo de *Bacillus firmus* CEPA 37, em reator batelada com pulsos de amido em 48 e 96 horas de cultivo. Observou-se a manutenção do pH 8,9 e 10, houve um bom consumo de substrato e um bom crescimento celular (em torno de 8 g/L). A atividade enzimática de γ -CGTase atingiu um pico de 0,11 U/mL após 59 horas de cultivo, bem como uma atividade específica de 1,4 U/mg de proteínas com 200 horas de cultivo

Palavras-chave: Amido Solúvel, *Bacillus firmus*, CGTase, Pulso.

OBTAINING CYCLOMALTODEXTRIN GLYCOSYL TRANSFERASE IN FERMENTATION PROCESS BY *BACILLUS FIRMUS* CEPA 37 FOR CYCLODEXTRINS PRODUCTION.

Abstract: Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides containing a minimum of 6 units of D-(+)-glucopyranose linked by alpha-1, 4. They are capable of forming inclusion complexes with a variety of guest molecules in solution. With the exploratory objective of increasing production of CGTase for forming gamaCD it was held a cultivation of *Bacillus firmus* CEPA 37 in batch reactor with pulses of starch at 48 and 96 hours of culture. It was observed maintaining pH 8.9 and 10, there was good substrate consumption and a good cell growth (approximately 8 g / L). The enzymatic activity of γ -CGTase peaked at 0.11 U / ml after 59 hours of cultivation, and a specific activity of 1.4 U / mg protein to 200 hours of cultivation.

Keywords: Soluble starch, *Bacillus firmus*, CGTase, Pulse.

1. INTRODUÇÃO

A degradação enzimática do amido geralmente resulta na produção de glicose, maltose, maltotriose, etc., isto é, maltooligômeros de cadeias lineares ou ramificadas, conhecidos como dextrinas. Esse tipo de degradação do amido é um processo de hidrólise, onde o produto resultante provem da quebra da ligação glicosídica acompanhada da adição de uma molécula de água, contudo, se o amido é degradado por uma enzima do tipo glicosiltransferase (CGT), o produto resultante da quebra da cadeia é submetido a uma reação intramolecular sem a participação da molécula de água. Produtos cíclicos de ligação alfa-1,4 são formados se a enzima for uma ciclodextrina glicosiltransferase, e são conhecidos como ciclodextrinas (FRÖMMING e SZEJTLI, 1994).

Uma das propriedades mais importantes das CDs é a sua capacidade de formar complexos de inclusão com uma grande variedade de moléculas hóspedes em solução. Estes complexos de inclusão vêm sendo utilizados em produtos farmacêuticos, alimentícios e agrícolas. Nesses

produtos, as CDs agem principalmente como veículos de solubilização em água, porque as substâncias apolares estão no interior do cone, e a interação com a água ocorre com a parte polar, que fica no exterior do tronco.

A CGTase é considerada uma enzima da família das amilases devido à sua similaridade estrutural com a enzima α -amilase, apresentando uma sequência de aminoácidos. A CGTase catalisa transglicosilação intramolecular (ciclização) e intermolecular (ligação, desproporcionamento), bem como apresenta atividade hidrolítica sobre amido e ciclodextrinas. Na ciclização, a enzima converte amido e alfa-1,4 glicanos em ciclodextrinas, as quais são amplamente utilizadas em alimentos, fármacos e outros produtos químicos (TONKOVA,1998). A reação de transglicosilação da CGTase é operada pelo mecanismo “PingPong”, fato verificado por NAKAMURA(1994) . GAWANDE (1999) obteve atividade máxima de CGTase igual a 7,05 UI.mL⁻¹, usando *Bacillus firmus* em meio com amido de milho, extrato de levedura e pH inicial de 9,8.

A enzima CGTase é produzida por diversas linhagens de bactérias, são citadas 15 espécies na literatura, entre elas está a *Bacillus firmus*, que apresentou maior atividade em testes de precipitação segundo MATIOLI et al (1998). Com o objetivo exploratório de aumentar a produção da CGTase para formação de gamaCD, realizou-se cultivo de *Bacillus firmus* CEPA 37, em reator batelada com pulsos a 48 e 96 horas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Primeiramente o microorganismo, *Bacillus firmus* CEPA 37, foi semeado em placas de Petri contendo meio semi-sólido, cuja composição está apresentada na Tabela 1. As placas foram mantidas em estufa incubadora a 37 °C por 72 horas, para o desenvolvimento das células no estado vegetativo. Após 72 horas, a massa celular presente nas placas foi transferida assepticamente para o pré-inóculo, cuja composição é semelhante ao meio semi-sólido, exceto ágar (Tabela 1).

Adicionou-se a enzima alfa-amilase ao pré-inóculo e também ao meio de cultivo, fazendo com que parte do amido de milho reduzisse a açúcar fermentescível, disponível ao microorganismo para seu consumo imediato. O pré-inóculo foi colocado em agitador rotativo, onde permaneceu por 48 horas a 37 °C e sob agitação de 150 rpm. Na sequência uma alíquota do pré-inóculo foi transferida para o fermentador já com o meio de cultivo preparado e devidamente esterilizado.

O meio foi mantido a 37 °C e 300 rpm com controle de pH acima de 8,5 em biorreator BioFlo III, por 340 horas. Após 48 e 96 horas de cultivo, um pulso de solução de amido estéril com concentração de 2,0 % foi aplicado ao meio. Amostras de 20 mL foram retiradas a cada 8 horas, sendo centrifugadas, as frações líquidas foram analisadas e o precipitado ressuspenso para análise de concentração celular, com leitura direta em espectrofotômetro a 610 nm, conforme descrito por OLIVO (1985).

Para análise de açúcares redutores totais, as amostras foram submetidas a um processo prévio de hidrólise ácida (FALCONE & MARQUES, 1965), com posterior neutralização e reação com DNS (ácido 2,5-dinitrosalicílico), procedendo-se a leitura espectrofotométrica a 600 nm

Para a medida do teor de proteínas solúveis, utilizou-se o método colorimétrico de Bradford (1976). A atividade enzimática foi determinada pelo método das velocidades iniciais envolvendo a complexação da beta-ciclodextrina, produzida pela enzima CGTase com a fenolftaleína (HAMON & MORAES, 1986) e também pela complexação da gama-

ciclodextrina com o corante de verde de bromocresol conforme metodologia descrita por Kato & Horikoshi (1984) e modificada por Hamon e Moraes (1986).

Tabela 1: Composição do meio semi-sólido, pré-inóculo e meio de cultivo.

Componentes (%p/v)	Semi-sólido	Pré-Inóculo	Meio de Cultivo
Amido	1,0	1,0	2,0
Peptona	0,5	0,5	1,0
Extrato de Levedura	0,5	0,5	2,0
MgSO ₄	0,02	0,02	0,02
K ₂ HPO ₄	0,1	0,1	0,1
Na ₂ CO ₃	1,0	1,0	1,0
Ágar	1,5		

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando os resultados, observou-se que o pH do meio de cultivo permaneceu acima de 8,5 ao longo das 340 horas (Figura 1), devido ao fato do carbonato de sódio, utilizado como tampão do meio, ter sido adicionado proporcionalmente à concentração de amido de milho inicial, mostrando atividade tamponante eficaz. A resposta aos pulsos aplicados com 48 e 96 horas pode ser notada devido ao ligeiro aumento da concentração de açúcares redutores (Figura 2). Observa-se também na Figura 2 que os açúcares redutores são quase completamente consumidos até a aplicação do pulso de amido, evidenciando grande atividade metabólica do *Bacillus firmus*.

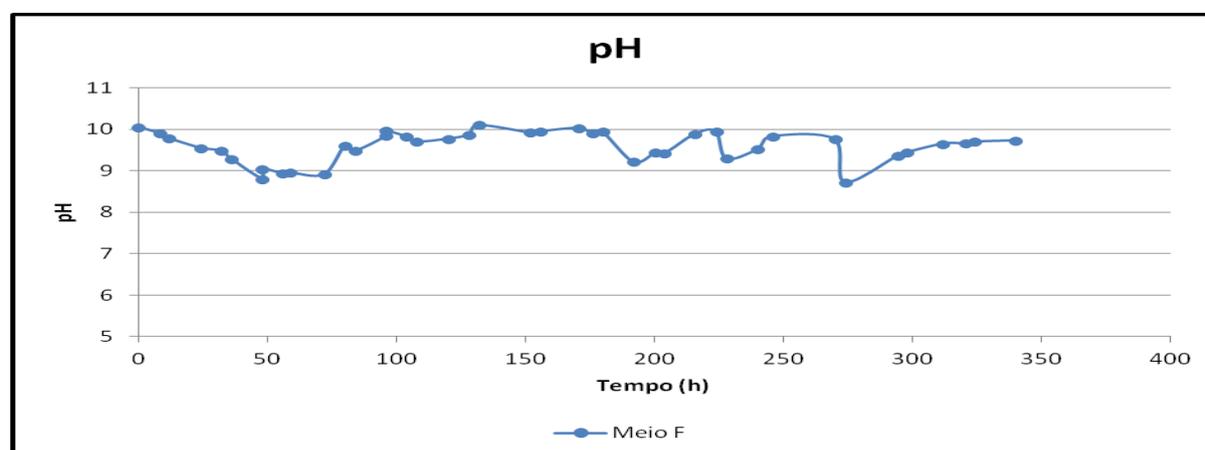


Figura 1 – Variação de pH ao longo da fermentação

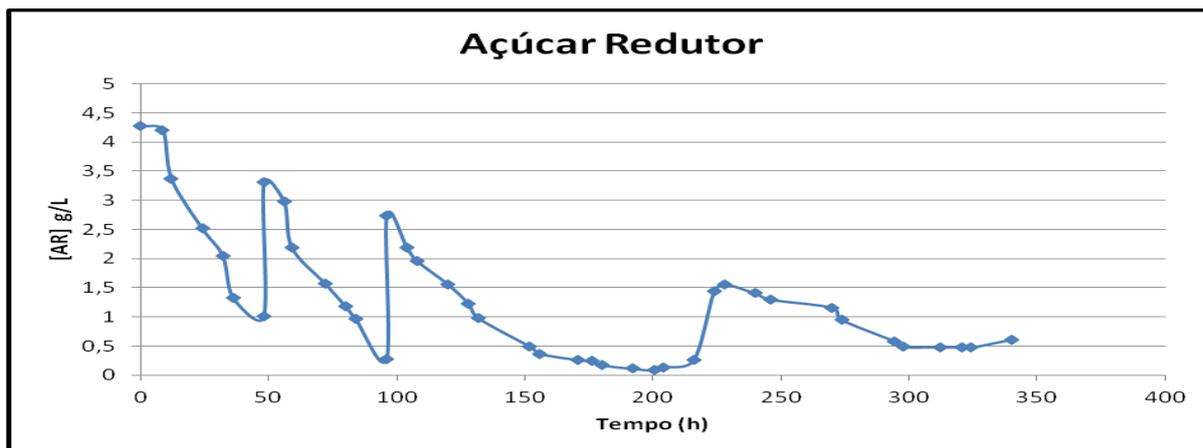


Figura 2 – Variação do Açúcar Redutor

Quanto à concentração celular (Figura 3), observa-se um ligeiro aumento após os pulsos aplicados, fato que já era esperado devido à disponibilidade de açúcares para o consumo, visível também na Figura 4. Obteve-se uma concentração celular de aproximadamente 8,5 g/L em 55 horas de fermentação.

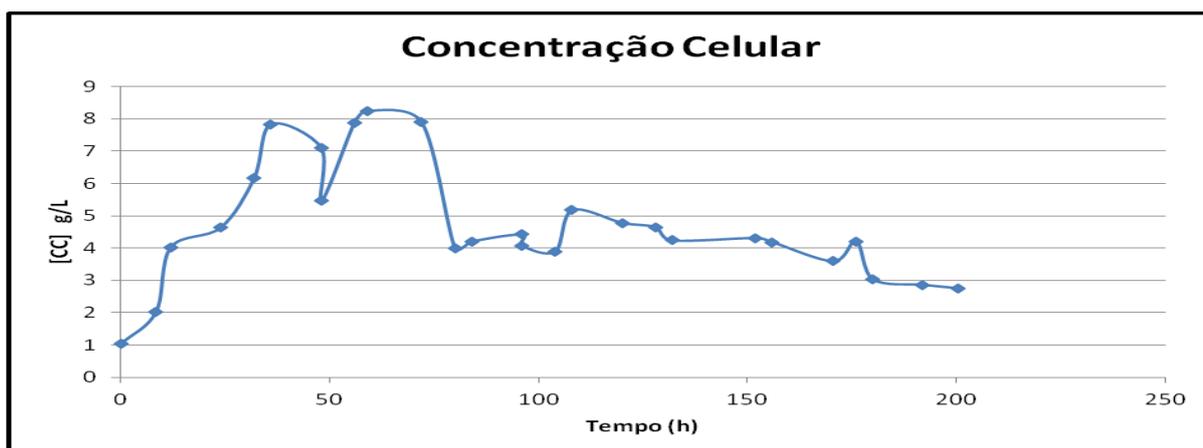


Figura 3 – Variação da Concentração Celular ao decorrer da fermentação.

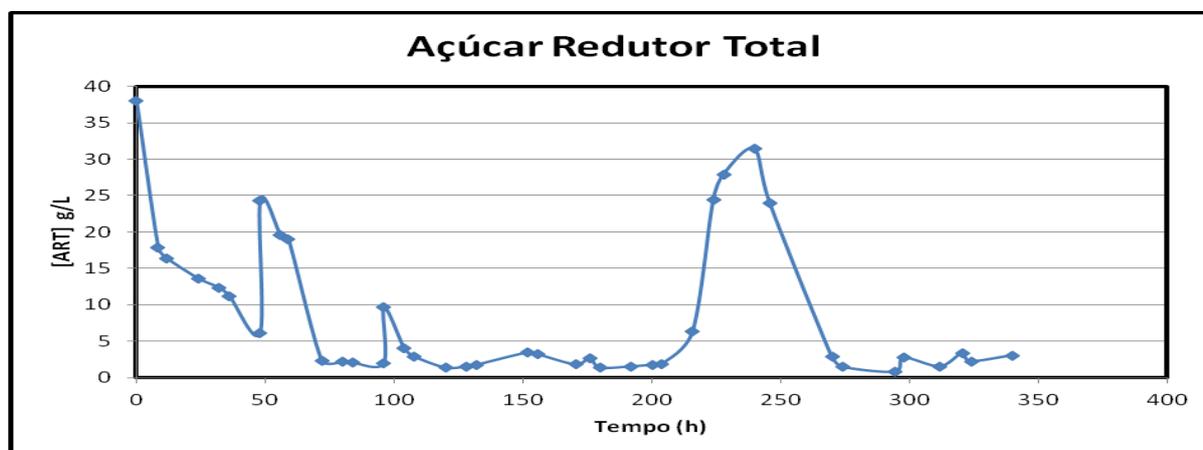


Figura 4 – Variação dos teores de Açúcar Redutor Total.

Neste trabalho, a determinação da atividade das CGTases se baseou na formação de CDs, ou seja, na reação de ciclização.

A atividade enzimática das amostras foi determinada a partir da quantificação das CDs produzidas, usando-se o método espectrofotométrico do verde de bromocresol. A concentração de gama-CD foi determinada pelo aumento da absorção a 620 nm de uma solução de verde de bromocresol após a complexação com gama-CD.

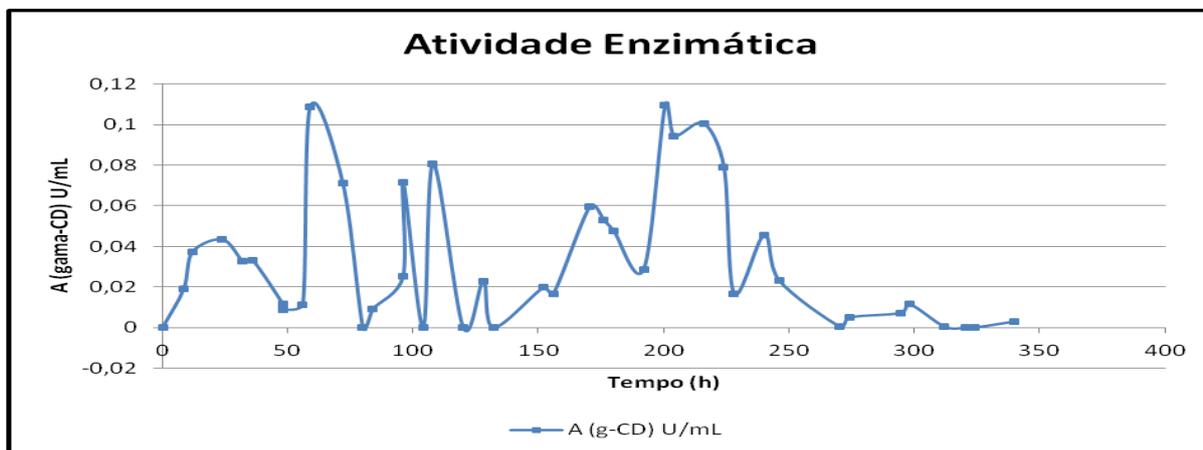


Figura 5 – Variação da Atividade Enzimática

Nas Figuras 5 e 6 são apresentadas as variações da atividade enzimática e atividade específica ao longo do cultivo, para a determinação da atividade específica é necessário conhecer-se a concentração de proteína da enzima, que neste trabalho foi determinado pelo método de BRADFORD, sendo a atividade específica a razão entre a atividade enzimática e a concentração de proteínas solúveis no meio.

A máxima atividade específica obtida foi de 1,4 U/mL.

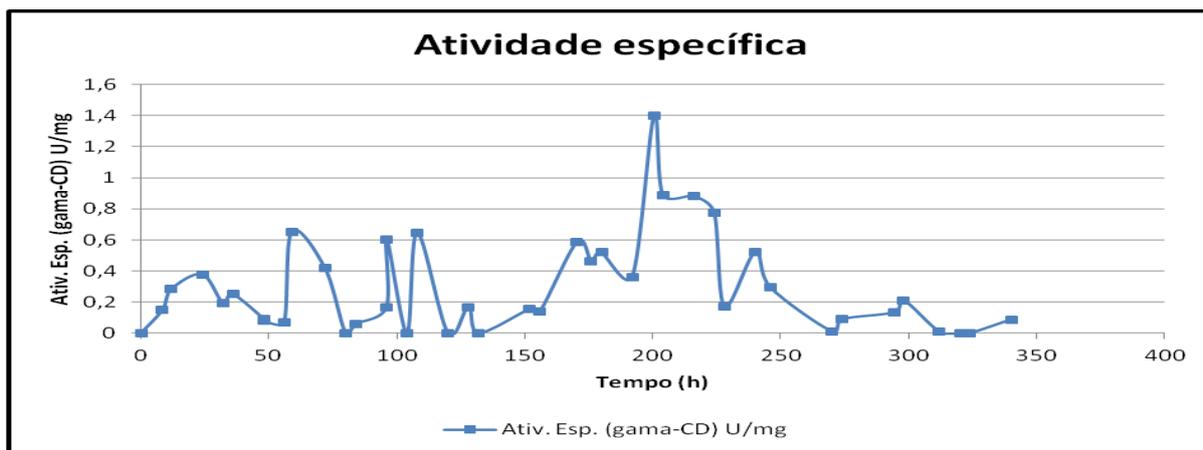


Figura 6 – Atividade Enzimática Específica.

4. CONCLUSÕES

Os experimentos foram realizados em caráter exploratório, buscando encontrar melhores condições de fermentação para alcançar melhores concentrações de gama-ciclodextrina, podendo-se concluir que os pulsos de amido resultaram em efeitos positivos sobre o

crescimento celular, a quantidade de açúcares redutores disponíveis no início da fermentação e em cada pulso de amido foi rapidamente consumida, evidenciando alta atividade metabólica do micro-organismo, da mesma forma, observa-se que houve bom crescimento celular.

A atividade enzimática de CGTase atingiu um pico de 0,11 U/mL em 59 horas de cultivo, com uma atividade específica de 1,4 U/mg de proteínas em 200 horas de cultivo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e a CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio recebido para desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

BRADFORD, M. M. *Analyt. Biochem.* v. 72, p. 248-254, 1976.

DELBOURG, M. F. - *Modulation de l'activité de cyclodextrine glucosyltransférases en présence de polyéthylène glycol. Tese de Doutorado, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, França, 1991.*

FALCONE, M. & MARQUES, A. B. *Tecnologia de Alimentos e Bebidas*, v. 4, p. 24-30, 1965.

FRÖMMING, K. H. e SZEJTLI, J. - *Cyclodextrins in Pharmacy. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 224 p., 1994.*

GAWANDE, B. N.; GOEL, A.; PATKAR, A. Y.; NENE, S. N. *Purification and properties of a novel raw starch degrading cyclomaltodextrin glucanotransferase from Bacillus firmus. Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 51, n. 4, p. 504-509 1999.

HAMON, V. & MORAES, F. F. *Etude Preliminare a L'Immobilisation de L'Enzime CGTase WACKER. Relatório de Pesquisa, Laboratoire de Technologie Enzymatique, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France, 234 p., 1990.*

KATO, C. AND HORIKOSHI, H. (1984). *AnaL Chem.*, 56: 1738-1740.

NAKAMURA, A.; HAGA, K.; YAMANE, K. *Four aromatic residues in the activecenter of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic Bacillus sp. 1011. Effects of replacements on substratebinding and cyclization characteristics. Biochemistry*, v. 33, n. 33, p. 9929- 9936, 1994a.

OLIVO, J. E. *Efeito da Concentração Inicial de Microrganismos (S.cerevisiae) e da Recirculação de Células em Parâmetros Cinéticos de Processos Simultâneos de Sacarificação e Fermentação de Meios Preparados a Partir de Farinha de Raspa de Mandioca. Dissertação (Mestrado). Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.*

TONKOVA, A. *Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, n. 8, p. 678-686, 1998.

YIM, D. K. - *Caracterização de ciclodextrina glicosiltransferase de Bacillus firmus no 324 alcalofílico - produção de ciclodextrinas ramificadas. Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, 108 p., 1996.*