

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

M. R. BUENO¹, A.D. D CAVALCANTI¹, J. MELO¹, J.E. OLIVO¹ e G.M. ZANIN¹

¹ Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Engenharia Química
E-mail para contato: mramonbueno@hotmail.com

RESUMO – Com o objetivo exploratório de encontrar melhores condições de produção da enzima Ciclomaltodextrina-Glucano-Transferase (GTase) para formação de Ciclodextrinas, realizou-se cultivo do micro-organismo *Bacillus firmus* CEPA 37, em batelada utilizando o biorreator BioFlo III, perfazendo um total de 124 horas de fermentação. Para análise de açúcares redutores, as amostras foram submetidas a um processo prévio de hidrólise ácida, 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. A atividade enzimática foi determinada pelo método das velocidades iniciais envolvendo a complexação da beta-ciclodextrina, produzida pela enzima CGTase com a fenoltaleína e também pela complexação da gama-ciclodextrina com o corante de verde de bromocresol. A Atividade específica é a razão entre a atividade enzimática e a concentração de proteínas solúveis no meio. Para este experimento, a máxima atividade específica obtida em relação a beta-CD foi de 1,8 U/mg de proteína em 120 horas de cultivo, e para gama-CD, obteve-se 0,24 U/mg de proteína em 103 horas de cultivo.

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 em que o produto resultante provém 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 (CGTase), 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 ciclomaltodextrina glucanotransferase, e são conhecidos como ciclodextrinas (FRÖMMING; SZEJTLI, 1994; DEL VALLE, 2004; COSTA *et al.*, 2007). As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos não redutores compostos principalmente por 6, 7 e 8 unidades de glicose, as quais são denominadas de alfa, beta e gama-CDs, respectivamente (TONKOVA 1998; CEREDA *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*,

2009; SEON *et al.*, 2009). Devido à reação de ciclização, a extremidade redutora e não redutora se ligam, de forma que todas as CDs são não redutoras. Elas apresentam uma cavidade interna hidrofóbica e a região externa hidrofílica. Tal característica favorece sua interação com uma variedade de substâncias, formando complexos de inclusões que alteram as características físicas e químicas da molécula hóspede. 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 (TONKONVA, 1998; SZENTE, *et al.*, 2004; AZEREDO, 2005). Segundo Bertolini *et al.*, (1998), alguns dos efeitos da encapsulação de compostos por CDs são a proteção contra oxidação, degradação pela luz, calor, perdas por volatilidade, a redução ou eliminação de sabores ou odores desagradáveis, estabilização de drogas, cores, vitaminas, aromatizantes e saborizantes, a produção de emulsões, o aumento de solubilidade de produtos fármacos e alteração de características químicas (ABDEL-SHAFI, *et al.*, 2009; SEON *et al.*, 2009; PROVENZI *et al.*, 2006; MACHADO, 2008).

A CGTase catalisa as reações de transglicosilação intramolecular (ciclização) e intermolecular (ligação, desproporcionamento), bem como apresenta atividade hidrolítica sobre amido e ciclodextrinas (VAN DER VEEN, *et al.*, 2000a; JOGDAND, 2008). A reação de transglicosilação da CGTase é operada pelo mecanismo “PingPong”, fato verificado por NAKAMURA, HAGA e YAMANAKE (1994). GAWANDE *et al.*, (1999) obteve atividade máxima de CGTase igual a 7,05 U/mL, usando *Bacillus firmus* em meio com amido de milho, extrato de levedura e pH inicial de 9,8. O *Bacillus firmus* cepa 37 é um micro-organismo alcalofílico, foi isolado de solo brasileiro, e apresentou maior atividade em testes de precipitação segundo MATIOLI *et al.*, (1998). (AGUIAR 2001; SANTOS *et al.*, 2013).

Com o objetivo exploratório de encontrar melhores condições de produção da enzima Ciclomaltodextrina-Glucano-Transferase (GTase) para formação de Ciclodextrinas, realizou-se cultivo do micro-organismo *Bacillus firmus* CEPA 37, em batelada utilizando o biorreator BioFlo III, perfazendo um total de 124 horas de fermentação. Para análise de açúcares redutores, as amostras foram submetidas a um processo prévio de hidrólise ácida, 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. A atividade enzimática foi determinada pelo método das velocidades iniciais envolvendo a complexação da beta-ciclodextrina, produzida pela enzima CGTase com a fenolftaleína e também pela complexação da gama-ciclodextrina com o corante de verde de bromocresol. A Atividade específica é a razão entre a atividade enzimática e a concentração de proteínas solúveis no meio. Para este experimento, a máxima atividade específica obtida em relação a beta-CD foi de 1,8 U/mg de proteína em 120 horas de cultivo, e para gama-CD, obteve-se 0,24 U/mg de proteína em 103 horas de cultivo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Primeiramente o micro-organismo, *Bacillus firmus* CEPA 37, já isolado e adequadamente armazenado, foi semeado em um total de 12 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 coletada e transferida assepticamente para o pré-inóculo, cuja composição

assemelha-se ao meio semi-sólido, exceto ágar apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição do meio semi-sólido, pré-inóculo e meio de cultivo utilizados durante as etapas da fermentação

Componentes (% p/v)	Semi-sólido	Pré-Inóculo	Meio de Cultivo
Amido	1,0	1,0	4,0
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	-	-

Todo este procedimento foi realizado dentro de câmara esterilizada. 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 micro-organismo 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 (aproximadamente 150 mL) foi transferida para o fermentador já com o meio de cultivo preparado e devidamente esterilizado, assim o volume total de meio de cultivo mais pré-inóculo foi de 1000 mL, não excedendo o volume total do biorreator que possui capacidade máxima de 1500 mL. Também foi coletada amostra do pré-inóculo para análises posteriores.

O meio foi mantido a 37 °C e 300 rpm, por um período de 124 horas com controle de pH acima de 8,5 em biorreator BioFlo III, responsável por controlar variáveis importantes no processo, como temperatura, agitação, aeração (1vvm) e pH. 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, 1990) e também pela complexação da gama-ciclodextrina com o corante de verde de bromocresol conforme metodologia descrita por KATO e HORIKOSHI (1984) e modificada por HAMON & MORAES (1990) (COSTA *et al.*, 2007; MORIWAKI *et al.*, 2009; CARMELO 2011; SANTOS *et al.*, 2013).

Após as análises as curvas de concentração celular (X), atividade enzimática (A), atividade

específica (AE), Proteínas Solúveis (PS) e pH foram construídas. Todos os reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico P.A.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando os resultados, observou-se que o pH do meio de cultivo permaneceu próximo a 10 ao longo das 124 horas de fermentação (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, não sendo necessário utilizar o sistema de controle do BioFlo III, e assim minimizando interferências externas como adição de ácido ou base para controle do pH do meio. Deve-se salientar que para o pH, valores abaixo de 8,5, dificultam o consumo dos açúcares pelo micro-organismo.

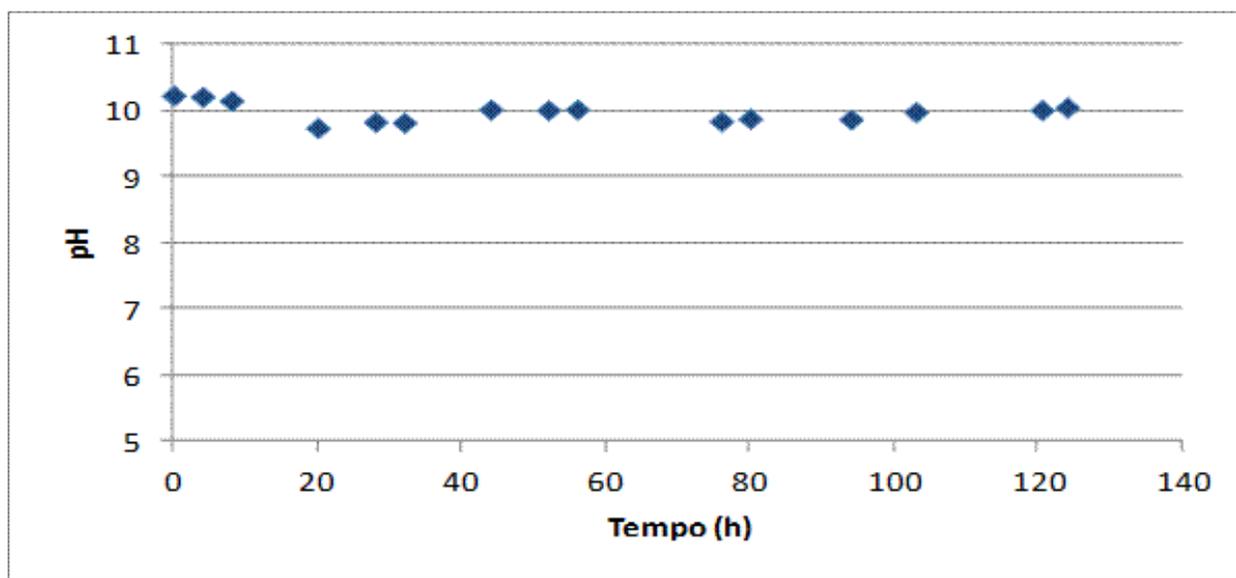


Figura 1 – Variação do pH ao longo da fermentação.

Observa-se na Figura 2 que a concentração de açúcares redutores se manteve baixa (inferior a 5 g/L) em todo o cultivo, caindo para valores próximos a zero, evidenciando grande atividade metabólica do *Bacillus firmus*.

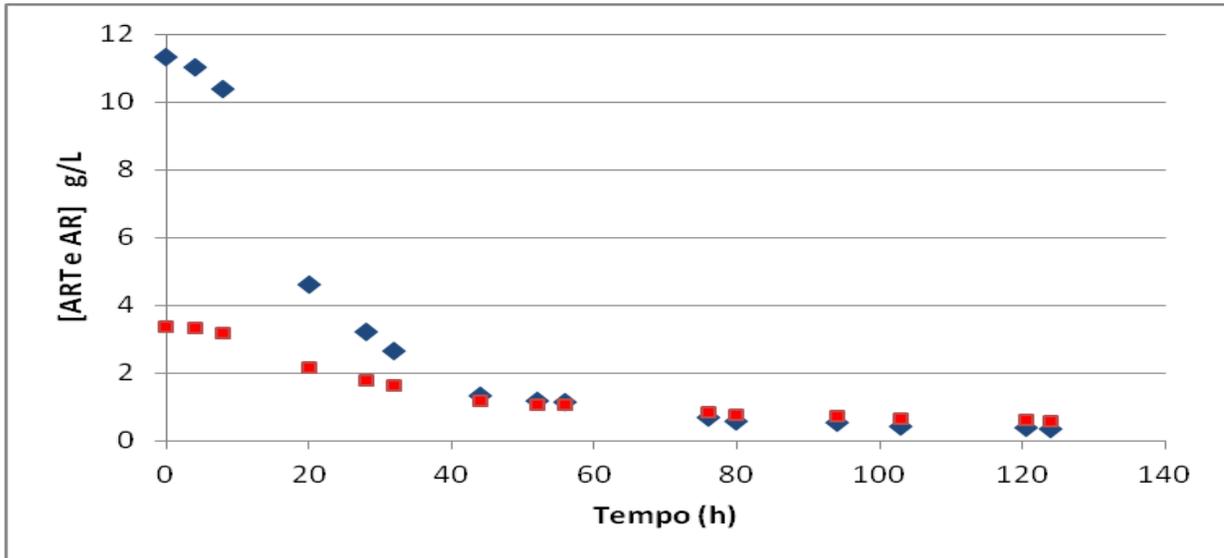


Figura 2 – Variação dos Açúcares redutores totais e açúcares redutores durante a fermentação

Quanto à concentração celular (Figura 3), observa-se um ligeiro aumento após as primeiras 8 horas de fermentação, observa-se que quando os níveis de açúcares redutores estão baixos, há queda na concentração celular. Para este experimento os valores máximos de concentração celular foram atingidos em 1,8 g/L em 32 horas de cultivo e 1,4 g/L em 103 horas.

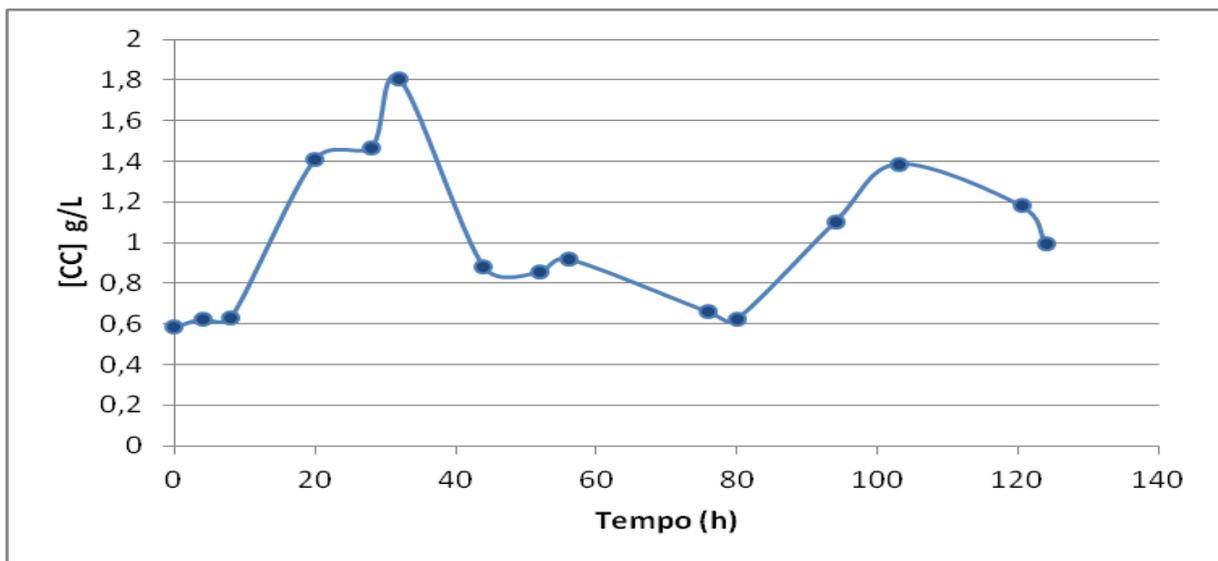


Figura 3 – Comportamento crescimento celular ao longo do cultivo

Na Figura 4 estão representadas as variações da concentração de proteínas solúveis no decorrer da fermentação, esta análise é importante, pois a atividade enzimática específica é dada pela razão entre a atividade enzimática e a concentração de proteínas solúveis no meio. Verifica-se que houve

aumento da concentração de proteínas solúveis no início da fermentação, sendo que os valores apresentaram tendência de queda a partir 56 horas de cultivo. Provavelmente, o *Bacillus firmus* produziu proteases para solubilizar as proteínas presentes no meio de cultura, pois a fonte de nitrogênio não foi suplementada durante a fermentação, também acredita-se que o mesmo tenha consumido as proteínas solúveis disponíveis para utilizar como fonte de nitrogênio para seu crescimento, uma vez que este nutriente não foi repostado ao longo da fermentação.

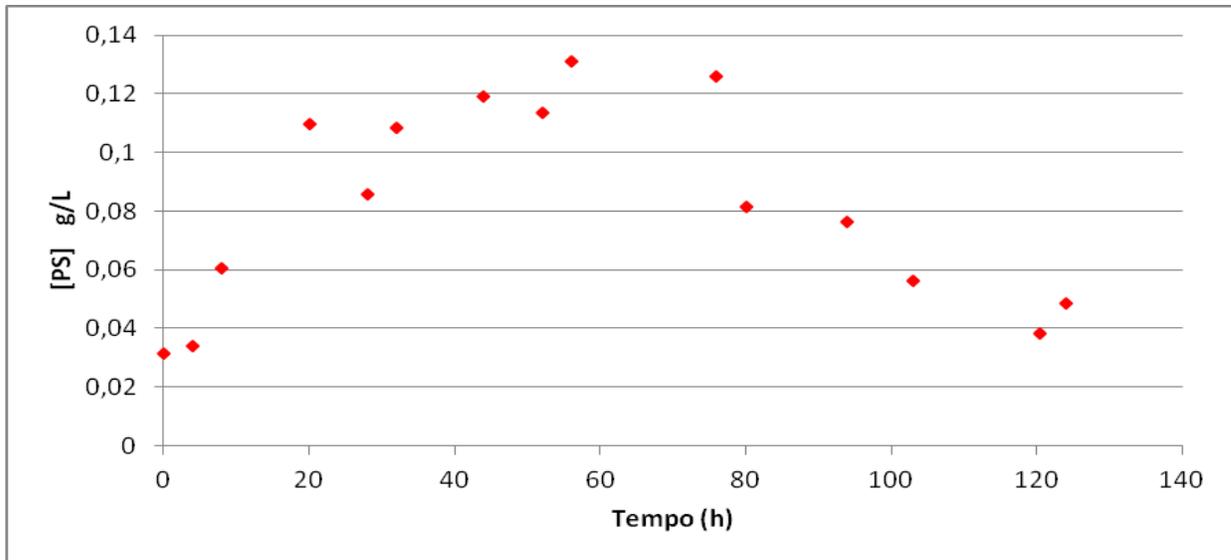


Figura 4 – Variação de proteínas solúveis ao longo da fermentação

Nas Figuras 5 e 6 são apresentadas as variações da atividade enzimática e atividade enzimática específica ao longo do cultivo. É interessante notar que nestas condições de cultivo, o *Bacillus firmus* CEPA 37 produziu maior quantidade de beta-CGTase do que gama-CGTase, sendo que a atividade máxima para a beta-CGTase foi em torno de 0,07 U/mL. A máxima atividade específica obtida foi de 1,8 U/mg de proteína com relação a beta-CD, observa-se também que, com relação a gama-CD, os resultados obtidos foram muito inferiores, atingindo um valor máximo de 0,24 U/mg de proteína. Deve-se lembrar, que o micro-organismo produz preferencialmente beta-CD.

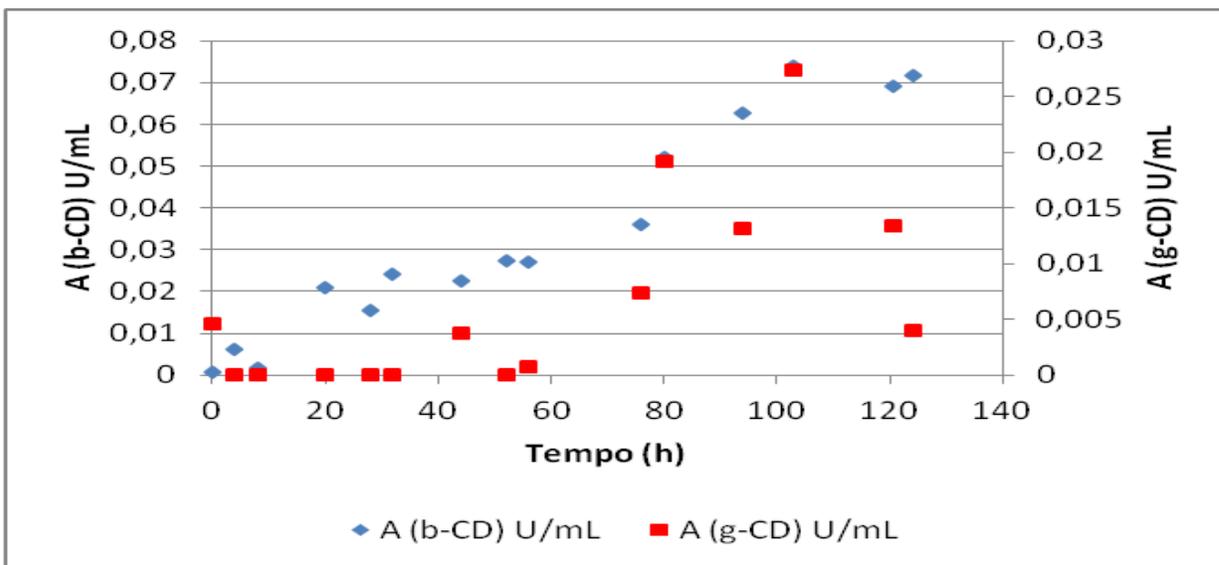


Figura 5 - Variação da atividade enzimática. Onde (■) representa a concentração de Beta-Ciclodextrina e (■) a concentração de Gama-Ciclodextrina em U/mL

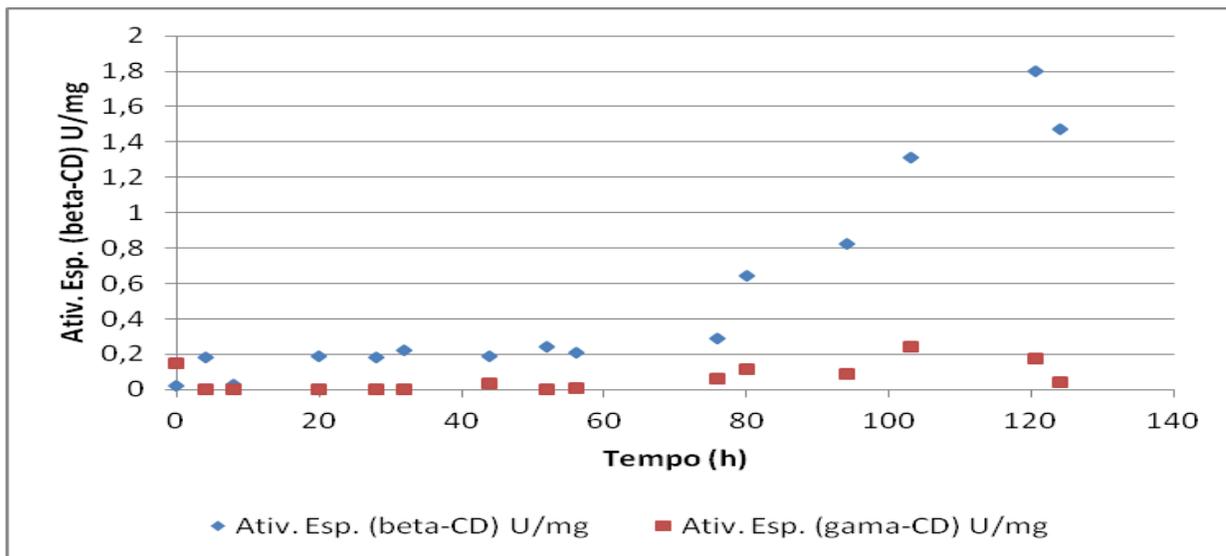


Figura 6 - Variação da atividade enzimática específica. Onde (■) representa a atividade específica de Beta-Ciclodextrina e (■) a atividade específica de Gama-Ciclodextrina, ambas dadas em U/mg

Desta forma, mesmo os experimentos sendo em caráter exploratório, buscando encontrar melhores condições de fermentação para alcançar melhores níveis na produção da enzima CGTase para a obtenção de Ciclodextrinas, permitiu concluir que, houve alta atividade metabólica pelo microorganismo *Bacillus firmus* CEPA 37, da mesma forma, observa-se que houve bom crescimento

celular. A atividade enzimática de CGTase atingiu picos de 0,07 U/mL em 124 horas de cultivo, com uma atividade específica de 1,8 U/mg de proteínas com relação a beta-CD em 120 horas de cultivo, com relação a produção de gama-CD, a atividade foi menos representativa alcançando valor máximo de 0,24 U/mg de proteínas em 103 horas de cultivo, isto evidencia que as condições de cultivo utilizadas favoreceram a produção de beta-CGTase ao invés de gama-CGTase. Carmello *et al.*(2011), atingiu valores máximos para atividade enzimática de 0,22 U/mL em 24 horas de cultivo, utilizando um meio de cultura com 2,0% de amido, como este ensaio foi realizado com uma concentração de 4,0% de amido, possivelmente pode ter ocorrido inibição por substrato, fato que explicaria a discrepância entre estes valores. Outro ponto importante que pode ser destacado é que pode ter havido consumo das proteínas solúveis do meio de cultura, como forma de reposição de fonte de nitrogênio, adotada pelo micro-organismo, o que também evidencia a elevada atividade metabólica do *Bacillus firmus* CEPA 37 nestas condições de cultivo, pois não foram feitas reposições de nutrientes no decorrer da fermentação.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e a CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro no desenvolvimento desta pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

- ABDEL-SHAFI, A.A.; AL-SHIHRY. S.S. Fluorescence enhancement of 1-naphthol-5-sulfonate by forming inclusion complex with β -cyclodextrin in aqueous solution. *Spectrochim. Acta A.*, v.72, p.533-537, 2009.
- AGUIAR.L.C. Ciclodextrina Glicosiltransferase, produção, ação e aplicação. *B.CEPPA*, v.9, n.1, 2001.
- AZEREDO, H.M.C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alim. Nutr.*, v.16, p.89-97, 2005.
- BERTOLINI, A.C.; CEREDA,M.P;CHUZEL, G. Fécula e farelo de mandioca como substrato na produção de ciclodextrinas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*,v.18, p.224-229,1998.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic. Biochem*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CARMELLO, J.B.; WINTER, C.; ZANIN, G.M.; OLIVO, J. E. Estudo do efeito do extrato de levedura e do amido de milho no cultivo de *Bacillus firmus* cepa 37 para a produção da enzima ciclomaltodextrina-glicano-transferase (CGTASE). *In: VII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar*, Maringá-PR, 2011.
- CEREDA, P.M.; VILPOUX, O. Processamentos de amiláceas latino americanas, cultura de tuberosas amiláceas latino americanas. Fundação Cargil, p.475-495, São Paulo-SP, 2004.
- COSTA, G. L.; PAZZETTO, R.; BROL, F.; MATIOLI, G. Metodologia de seleção de cepas para

- produção da ciclodextrina glicosiltransferase e para purificação da enzima. *Acta Sci. Health. Sci.*, v.29, p.45-50, 2007.
- DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.*, v.39, p.1033-1046, 2004.
- FALCONE, M.; MARQUES, A. B. Estudo sobre as condições de hidrólise do HCl na dosagem de açúcares redutores totais (A.R.T.). *Tecnol. Alim. Beb.* v. 4, p. 24-30, 1965.
- FERREIRA, V.F.; DA ROCHA, D.R.; DA SILVA, F.C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. *Quim. Nova*, v.32, p.623-638, 2009.
- FRÖMMING, K. H.; 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*. *App. Microbiol. Biotechnol.*, v. 51, 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, T.; HORIKOSHI, K. Colorimetric determination of γ -Cyclodextrin. *Analytic. Chem.*, v. 56, p. 1738-1740, 1984.
- MATIOLI, G.; MAZZER, C.; FERREIRA, L.R.; RODELLA, J.R.T.; MORIWAKI, C. Cyclodextrin production by *Bacillus firmus* strain 37 immobilized on inorganic matrices an alginate gel. *Biochem. Eng. J.*, v.41, p.79-86, 2008.
- MATIOLI, G.; ZANIN, G. M.; GUIMARÃES, M. F.; MORAES, F. F. Production and purification of CGTase of alkalophilic *Bacillus* isolated from Brazilian soil. *App. Biochem. Biotechnol.*, v. 70-72, p. 267-275, 1998.
- 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. *Biochem.*,v. 33, p. 9929- 9936, 1994.
- 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 rapa de mandioca. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.
- PROVENZI, G.; FALCÃO, L.D.; FETT, R.; LUIZ, M.T.B. Estabilidade de antocianinas de uvas cabernet sauvignon com β - e γ -ciclodextrinas. *Brazilian J. Food. Technol*, v.9, p.165-170, 2006.
- SANTOS, J. B.C.; ZANIN, G.M.; OLIVO, J.E. Influence of culture medium pH on the production of CGTase by *Bacillus firmus* Strain No. 37. *Acta Sci.*, v.35, p.413-416, 2013.
- SAVERGAVE, L.,S.; DHULE, S.,S.; JOGDAND, V.V.; NENE, S. N.; GANDRE, R.,V. Production and single step purification of cyclodextrin glycosyltransferase from alkalophilic *Bacillus firmus*

by ion exchange chromatography. *Biochem. Eng. J.*, v.39, p.510–515, 2008.

SEON, K.H.; AHN, J.; KWAK, H.S. The accelerated ripening of cholesterol- reduced cheddar cheese by crosslinked β -cyclodextrin. *J. Dairy Sci.*, v.92, p.49-57, 2009.

SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends Food Sci. Technol.*, v.15, p.137-142, 2004.

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

UITDEHAAG, J. C. M.; MOSI, R.; KALK, K. H.; VAN DER VEEN, B. A.; DIJKHUIZEN, L.; WITHERS, S. G.; DIJKSTRA, B. W. X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glucosyltransferase elucidate catalysis in the alpha-amylase family. *Nat. Struct. Biol.*, v. 6, p.432-436, 1999.

VENTURINI C. DE G.; NICOLINI J.; MACHADO C.; MACHADO V.G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Quim. Nova*, v.31, p.360-368, 2008.