

INFLUÊNCIA DO pH NA PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE (CGTase) POR *Paenibacillus* sp. F37

C. D. PRADO¹, L. SELDIN², R. G. SILVA¹, P. W. TARDIOLI¹

¹ Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química

² Universidade do Rio de Janeiro, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia

E-mail para contato: professorcleitonquim@hotmail.com; pwtardioli@ufscar.br

RESUMO – Ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase – EC 2.4.1.19) é uma enzima de grande interesse industrial por catalisar a produção de ciclodextrinas (CDs) a partir de amido. CDs são oligossacarídeos cíclicos formados por unidades de glicose unidas por ligações α -1,4-glicosídicas. As mais comuns possuem 6, 7 ou 8 unidades de glicose, sendo denominadas de α -, β - e γ -CD, respectivamente. As CDs, por possuírem superfície externa hidrofílica e cavidade interna hidrofóbica, permitem o encapsulamento ao nível molecular de grande número de moléculas orgânicas, podendo melhorar a solubilidade e a estabilidade da molécula encapsulada. Devido à grande importância industrial da CGTase, esse trabalho teve por objetivo avaliar a produção dessa enzima por *Paenibacillus* sp. F37 em diferentes pH's de cultivo. A produção de CGTase foi realizada em meio Horikoshi com amido solúvel 1%, m/v (indutor da enzima). Sob condições padronizadas (37°C, 120 rpm, 16 h e meio de produção preparado em tampão tris-HCl 0,1 M, pH inicial 9,0) a atividade volumétrica obtida foi da ordem de 800 U/L (produtividade aproximada de 50 U/L.h⁻¹). CGTase de *Paenibacillus* sp. F37 apresentou atividade máxima de ciclização em 50°C e pH 6,0. A enzima não purificada mostrou-se pouco estável nas condições ótimas de ciclização e nas condições de cultivo. A quantificação das CDs produzidas em reator batelada permitiu a classificação da enzima como uma β -CGTase.

1. INTRODUÇÃO

Ciclodextrina glicosiltransferase (1,4- α -D-glicopiranosil transferase; EC 2.4.1.19; CGTase) é uma enzima, geralmente extracelular, da família das α -amilases (Kuo *et al.*, 2009), produzida por bactérias do gênero *Bacillus* (Nakamura e Horikoshi, 1976; Kitayska *et al.*, 2011). Bactérias do gênero *Paenibacillus* têm sido reportadas como produtoras de CGTase (Charoensakdi *et al.*, 2007; Kaulpiboon *et al.*, 2010). Essas bactérias podem ser isoladas do solo, fontes vegetais, água, larvas de insetos, sedimentos marinhos contaminados com petróleo, etc. Produzem enzimas extracelulares e compostos antimicrobianos e antifúngicos inibidores de vários patógenos animais e vegetais (Lorentz, 2005). A CGTase catalisa a síntese de oligossacarídeos cíclicos, não redutores, conhecidos como ciclodextrinas (CDs), a partir de amido ou substratos similares (Szejtli, 1990; Fromming e Szejtli, 1994). As CDs mais comuns possuem 6, 7 ou 8 unidades de glicose, denominadas α -CD, β -CD ou γ -CD, respectivamente. As

CGTases apresentam diferentes propriedades catalíticas, tais como, temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica e o tipo de CD produzida.

As CDs possuem a capacidade de encapsulamento ao nível molecular de grande número de moléculas orgânicas (aromas, fragrâncias, fármacos, etc.), possuindo aplicação em indústrias de alimentos, cosméticos, fármacos e etc. (Tardioli *et al.*, 2006). A inclusão molecular visa estabilizar compostos voláteis, desodorizar fármacos e alimentos, proteger princípios ativos contra oxidação e fotodegradação, aumentar a solubilidade de medicamentos insolúveis em água, mascarar gostos amargos de alimentos e fármacos, etc. (Kitayska *et al.*, 2011). Muitos países têm aprovada a utilização de CDs ou derivados de CDs em alguns produtos, tais como, Voltaren oftálmico (complexo diclofenaco sódico/hidroxipropil γ -CD), Flogene (complexo Piroxicam/ β -CD), Nicorette (completo nicotina/ β -CD), gomas de mascar, xampus, etc. (Loftsson e Masson, 2001; Szejtli, 2004). Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de CGTase por microrganismo do gênero *Paenibacillus* sp. por fermentação submersa em diferentes pH's e testar essa enzima na produção de CDs.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo

Paenibacillus sp. F37, gentilmente doada pela Profa. Dra. Lucy Seldin do Instituto de Microbiologia da UFRJ. Essa linhagem foi armazenada em criotubos a -80°C contendo 210 μ L de meio de cultura e 90 μ L de glicerol estéril/água 80% (v/v).

Meio de cultivo

O inóculo foi preparado em câmara incubadora a 37°C, 120 rpm por 16 h a partir de um único criotubo em meio (volume total de 50 mL) composto por peptona G (5 g.L⁻¹, Acumedia®), extrato de levedura (5 g.L⁻¹, Himedia®), K₂HPO₄ (1 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (0,2 g.L⁻¹), Na₂CO₃ (10 g.L⁻¹), pH 8,0. Uma alíquota (5ml) do inóculo foi transferido para 45 mL do meio de produção contendo amido solúvel (5 g.L⁻¹, Qhemis®), peptona G (2,5 g.L⁻¹), extrato de levedura (2,5 g.L⁻¹), K₂HPO₄ (0,5 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (0,1 g.L⁻¹) (Nakamura e Horikoshi, 1976). O pH foi variado dependendo do estudo. O meio foi mantido em câmara incubadora rotativa a 120 rpm, 37 °C por 48 h.

2.2 Caracterização da enzima bruta

CGTase bruta foi caracterizada quanto ao pH e temperatura ótima de ciclização e estabilidade térmica nas condições ótimas de ciclização e nas condições de cultivo do microrganismo. O pH ótimo foi determinado por medidas de atividade de ciclização a 50°C, pH 5,0 (citrato de sódio 0,1M), 6,0 e 7,0 (fosfato de sódio 0,1M), 8,0 e 9,0 (Tris-HCl 0,1M) e 10,0 (Glicina/NaOH 0,1M), usando dextrina 1% (m/v) como substrato.

A temperatura ótima de ciclização foi determinada em pH 6,0 (citrato de sódio 0,1 M) na faixa de temperaturas de 30 a 70°C, usando dextrina 1% (m/v) como substrato.

A estabilidade térmica foi avaliada nas condições de máxima atividade de ciclização (50°C, pH 6,0) e nas condições de cultivo do microrganismo (37°C, pH 9,0).

As atividades residuais eram medidas de acordo com o protocolo padrão de atividade de ciclização, descrito na seção 2.4.

2.3 Atividade de ciclização

A atividade de ciclização era calculada pela taxa de produção de β -CD a 50°C, pH 8,0 (tampão tris-HCl 0,1 M, contendo 5 mM de CaCl_2), usando dextrina 1% (m/v) como substrato. A reação era iniciada pela adição de 0,5-1,0 mL de extrato enzimático em 20 mL de solução de dextrina. A reação era monitorada por 20 min, coletando-se 2 mL do meio reacional a cada 5 min para dosagem colorimétrica de β -CD/fenolftaleína (Tardioli *et al.*, 2006). Uma unidade de CGTase (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol de β -CD por min nas condições do ensaio.

2.4 Produção de CDs

CDs foram produzidas a 50°C, pH 8,0 (tampão tris-HCl 0,1 M), usando dextrina 5% (m/v), em reator do tipo batelada. A reação era iniciada pela adição de 10 mL de extrato enzimático bruto com aproximadamente 800 U/L a 100 mL de meio reacional (relação enzima/substrato \approx 1,6 U/g). A reação foi monitorada por 92 h por medidas de concentração CDs por métodos colorimétricos β -CD/fenolftaleína e γ -CD/verde de bromocresol (Tardioli *et al.*, 2006).

As concentrações de CDs foram confirmadas por CLAE, usando um cromatógrafo Waters, equipado com detector de índice de refração (IR) ajustado em 45°C e auto-injetor ajustado em 4°C. As amostras de CDs (padrões e meio reacional) eram filtradas em membrana de 0,2 μm e um volume de 20 μL era injetado em uma coluna Shodex Sugar KS-802 a 80°C. As CDs (α -, β -, e γ -CD) eram separadas com água como fase móvel a uma vazão de 1 mL/min. Os tempos de retenção de cada CD, bem como suas curvas padrões foram determinados com padrões de α -, β -, e γ -CD (Sigma-Aldrich), maltose e glicose (Synth). A análise de CDs a partir do meio reacional de produção sofria interferência por dextrinas residuais. Assim, as amostras (1 mL) eram tratadas com 0,5 mL de amiloglicosidase de *Aspergillus oryzae* (AMG 300LTM, Sigma-Aldrich) a 60°C, por 1 h, a fim de se hidrolisar as dextrinas residuais a glicose e maltose, principalmente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de CGTase

De acordo com a literatura (Prado *et al.* 2002; Mاتيoli *et al.* 2000) embora as máximas produções de CGTase são obtidas em pH's alcalinos, optou-se por realizar cultivos de *Paenibacillus* sp. F37 em diferentes pH's iniciais (6,0 a 11,0) sem o tamponamento do meio. Os resultados de atividade enzimática após 24 h de cultivo são mostrados na Figura 1(a).

Os resultados mostraram que as maiores atividades volumétricas ocorreram em valores alcalinos de pH (9,0 a 11,0), corroborando com trabalhos previamente reportados (Mahat *et al.*, 2004; Mاتيoli *et al.* 2000). Entretanto, observou-se em todos os cultivos uma grande diminuição de pH após 24 h, atingindo valores finais de 5,5 a 6,0.

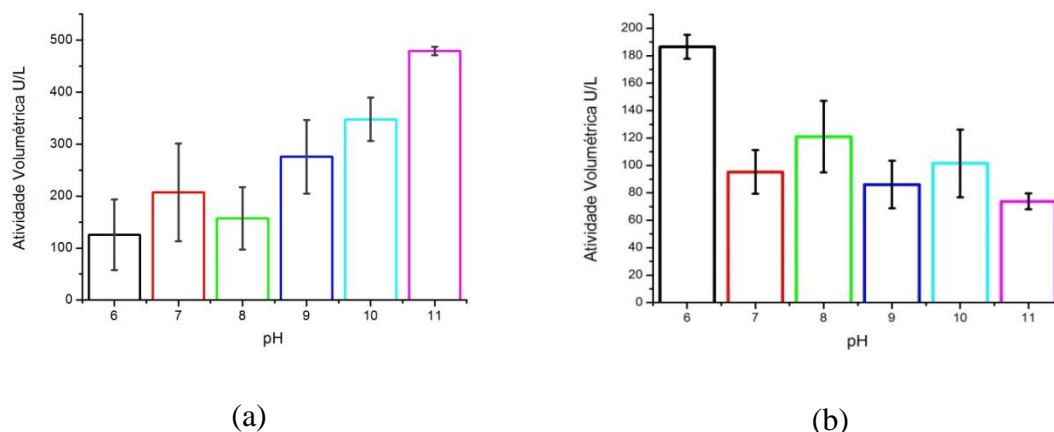


Figura 1 - Atividade enzimática de CGTase em cultivos de *Paenibacillus* sp. F37 a 37°C.
 (a) em diferentes valores iniciais de pH e (b) em pH do meio tamponado em diferentes valores.

Diante dessa diminuição de pH, realizaram-se cultivos com meio de produção preparados em pH's 8,0, 9,0 (Tris-HCl 0,1M) e 10,0 (Na₂CO₃ 0,1M). Nestes cultivos (resultados não mostrados), o maior valor de atividade enzimática (aproximadamente 700 U/L após 16 h) foi obtido em pH inicial 9,0. Entretanto, embora o pH tenha permanecido por mais tempo em valores alcalinos, após 16 h reduziu-se para 6,5.

Novos cultivos foram realizados com meio de produção preparados em tampões com maior força iônica para garantir o tamponamento do meio no pH desejado. Os cultivos foram realizados em pH's 6,0, 7,0 e 8,0 (fosfato de sódio 0,5M), 9,0 (Tris-HCl 0,5M), 10,0 (Na₂CO₃ 0,1M) e 11,0 (glicina/NaOH 0,5M). Nessas condições, os meios de cultivo se mantiveram tamponados nos pH's desejados.

A Figura 1(b) mostra que para os cultivos em meios tamponados, a máxima produção de CGTase foi obtida em pH 6,0. Entretanto, as atividades volumétricas foram inferiores às obtidas em meios não tamponados (Figura 1a).

O estudo da influência do pH no meio de produção de CGTase por *Paenibacillus* sp. F37 mostrou que a maior produção da enzima ocorreu pH inicial 9,0, com esse decrescendo para valores neutros ao longo do cultivo (pH final 6,5). Esse comportamento levou-se a suspeitar que o crescimento do microrganismo e a produção da enzima eram favorecidos em pH alcalino, enquanto a estabilidade da enzima ao pH era favorecida em pH neutro. Dessa forma, realizaram-se cultivos em pH 9,0 com os meios de produção preparados em tampão tris-HCl com duas concentrações distintas: 0,1 M para manter o pH em valores alcalinos nas primeiras horas de cultivo e em valores neutros no restante, e 0,5 M para garantir o tamponamento durante todo o cultivo. O resultados mostraram (Figura 2) que após 16 h de cultivo a primeira condição conduziu a uma atividade volumétrica em torno de 800 U/L, aproximadamente 4 vezes superior à obtida na segunda condição.

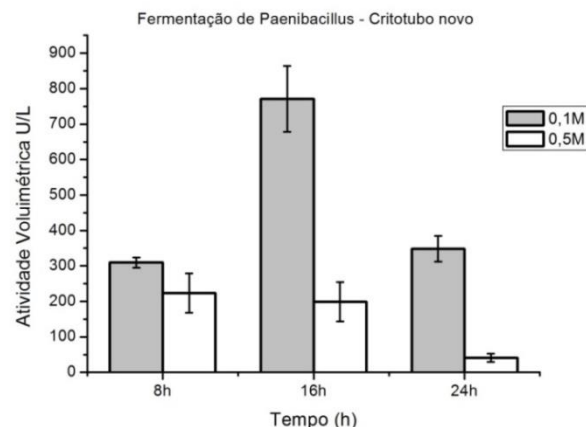


Figura 2 - Atividade enzimática de CGTase em cultivos de *Paenibacillus* sp. F37 a 37°C em pH 9,0 em tampão Tris-HCl 0,1M e Tris-HCl 0,5M.

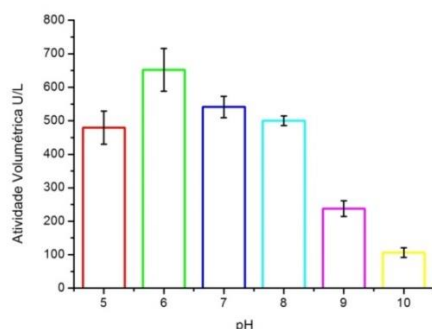
Conclui-se que a melhor condição estabelecida nesse trabalho para produção de CGTase de *Paenibacillus* sp. F37 foi iniciar o cultivo em pH 9,0, permitindo que esse decresça a valores neutros ao longo do cultivo. Essa condição pode ser alcançada preparando-se o meio de cultivo em tampão tris-HCl 0,1 M, mantendo-se o meio por 16 h a 37°C, 120 rpm.

3.2 Caracterização da CGTase

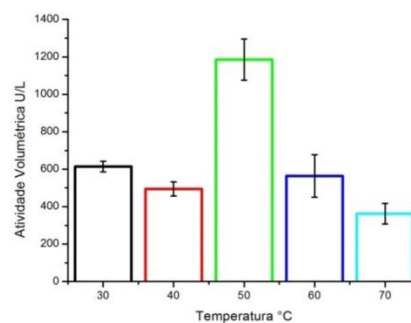
As atividades de ciclização a 50°C e diferentes valores de pH mostraram (Figura 3a) máxima atividade em pH 6,0, similarmente ao pH ótimo de algumas CGTases produzidas por outros microrganismos: CGTase de *Bacillus* sp. *alcalophilus* E16 (Alves-Prado, 2000), CGTase de *Bacillus* sp. G1 (Sian *et al.*, 2005) e CGTase de *Paenibacillus macerans* (Li *et al.*, 2010).

As atividades de ciclização em pH 6,0 e diferentes temperaturas mostraram (Figura 3b) máxima atividade em 50°C (1200 U/L). Cucolo *et al.*, 2006, reportaram temperatura ótima de 55°C para CGTase de *Bacillus* sp. alcalofílico E16. Li *et al.*, 2010 obtiveram temperatura ótima de 45°C para CGTase de *Paenibacillus macerans*.

As Figuras 4(a) e 4(b) mostram os resultados de estabilidade térmica da CGTase de *Paenibacillus* sp. F37 a 50°C, pH 6,0 (condições de máxima atividade de ciclização) e 37°C, pH 6,0 (condições de cultivo), respectivamente. Observa-se baixa estabilidade da enzima em ambas as condições (meias-vidas de 2 e 3 h, respectivamente). É importante ressaltar que a baixa estabilidade da enzima nas condições de cultivo (perda de quase 80% de atividade em 5 h) corrobora com a hipótese de que é importante iniciar o cultivo do microrganismo em pH alcalino para favorecer o seu crescimento e, por conseguinte, a produção da enzima, mas manter o pH ao longo do cultivo em valores próximos da neutralidade para manter a atividade da enzima secretada.

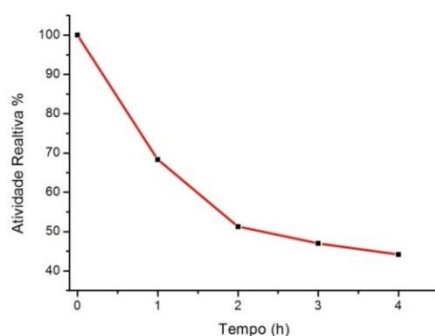


(a)

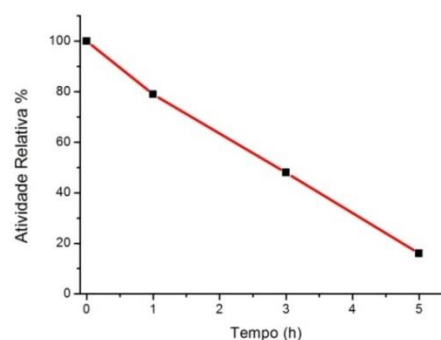


(b)

Figura 3 – Atividade volumétrica de CGTase produzida por *Paenibacillus* sp. F37. (a) atividade volumétrica a 50°C e diferentes valores de pH (5,0 a 10,0). (b) atividade volumétrica a pH 6,0 e diferentes valores de temperatura (30 a 70°C).



(a)



(b)

Figura 4 - Estabilidade de CGTase de *Paenibacillus* sp. F37 (atividade inicial de ciclização foi considerada 100%). (a) pH 6,0 e 50°C e (b) pH 9,0 e 37°C

3.3 Produção de CDs

Trabalhos reportados na literatura (Larsen *et al*, 1998) indicam que CGTase produzida por bactérias do gênero *Paenibacillus* é preferencialmente produtora de β -CD, sendo assim classificada como β -CGTase. A fim de classificar a CGTase produzida por *Paenibacillus* sp. F37 foram realizados ensaios de produção de CDs em reator batelada, a 50°C e pH 8,0, usando solução de dextrina 5% (m/v) como substrato. As concentrações de β - e γ -CD ao longo da reação foram monitoradas por dosagem colorimétrica, e as concentrações finais, após 92 h de reação, foram confirmadas por cromatografia líquida.

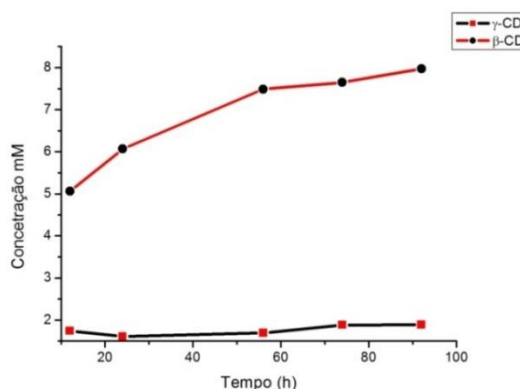


Figura 5 – Produção de CDs a 50°C, usando como substrato solução de dextrina 5%, m/v, preparada em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, 92 h de reação, relação enzima/substrato de 1,6 U/g.

A Figura 5 mostra que a enzima produziu preferencialmente β-CD, sendo a concentração desta CD (7,9 mM) aproximadamente 4 vezes maior do que a de γ-CD (1,8 mM) após 92 h de reação.

A metodologia adotada para a quantificação de CDs por CLAE permitiu somente a identificação de β-CD, sendo a concentração desta igual a 8,6 mM, valor este em torno de 10% superior ao encontrado por dosagem colorimétrica. Não foi possível quantificar as outras CDs (α- e γ-CD) por serem produzidas em baixa quantidade e o método cromatográfico não ter permitido a separação adequada dessas CDs. Esta técnica requer estudos adicionais para uma separação adequada das CDs produzidas.

Com base nos resultados de dosagem colorimétrica pode-se classificar a CGTase produzida por *Paenibacillus* sp. F37 como β-CGTase. CGTases produtoras de β-CD são atrativas do ponto de vista industrial, pois devido a baixa solubilidade desta CD, esta é facilmente separada e purificada por cristalização a partir do meio de produção (Pongawasdi e Yagisawa, 1987, Tardioli, 1998).

4. CONCLUSÃO

O cultivo de *Paenibacillus* sp. F37 em câmara incubadora rotativa (120 rpm) a 37°C atingiu maiores atividades volumétricas de CGTase em meio de produção contendo amido solúvel 1% (m/v), preparado em tampão tris-HCl 0,1 M, com pH inicial de 9,0, decrescendo para 6,2 após 16 h de cultivo. A enzima não purificada apresentou máxima atividade de ciclização (formação de β-CD) a 50°C, pH 6,0, tendo nessas condições baixa estabilidade (meia-vida em torno de 2 h). Igualmente, baixa estabilidade foi verificada a 37°C e pH 9,0 (perde de 80% da atividade em 5 h), mostrando que um cultivo de *Paenibacillus* sp. F37 com pH controlado em 9,0 conduziria a grande perda de atividade por inativação da enzima. A produção de CDs em reator batelada permitiu a classificação da enzima como uma β-CGTase, pois o meio de produção apresentou 74% (base mássica) de β-CD.

5. REFERÊNCIAS

- ALVES-PRADO, H.F. **Estudo da produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) por *Bacillus sp. alcalofílico***. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, 144f, 2000.
- CHAROENSAKDI, R. et al. **Cloning and expression of cyclodextrin glycosyltransferase gene from *Paenibacillus sp. T16* isolated from hot spring soil in northern Thailand**. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 40(3), 333-340, 2007.
- CUCOLO, G.R.; ALVES-PRADO, H.F.; GOMES, E.; SILVA, R. **Otimização da produção de CGTase de *Bacillus alcalophilus* E16 em polvilho doce em fermentação submersa**, São José do Rio Preto, v.9, n.3, p. 201-208, jul./set 2006.
- FRÖMMING, K.H.; SZEJTLI, J. **Cyclodextrins in Pharmacy**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 1-81, 1994.
- KAULPIBOON, J. et al. **Expression and characterization of a fusion protein-containing cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus sp.* A11**. Journal of Basic Microbiology, 50(5), 427-435, 2010.
- KITAYSKA, T. et al. **Purification and properties of a new Thermostable cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB**. Applied Biochemistry and Biotechnology, 165, 1285-1295, 2011.
- KUO, C.C. et al. **Production of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus sp.* by pH-stat fed-batch fermentation**. Biotechnology Letters, 31, 1723-1727, 2009.
- LARSEN, K.L. et al. **Purification and characterisation of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus sp.* F8**. Carbohydrate Research, 310, 211-219, 1998.
- LI, Z. et al. **Extracellular expression and biochemical characterization of alpha-cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans***. In Carbohydrate Research, v. 345, Elsevier Science Publishers Ltd, pp. 886-892, 2010.
- LOFTSSON, T.; MASSON, M. **Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice**. Int. J. Pharm., 225, 15-30, 2001.
- LORENTZ, R.H. **Seleção de isolados de *Paenibacillus sp.* com atividade enzimática e antimicrobiana**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia. Dissertação, Porto Alegre, 2005.
- MAHAT, M. K. et al. **Production of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) from alkalophilic *Bacillus sp.* TS1-1: media optimization using experimental design**. Appl. Enzyme and Microbial Technology, 467-473, 2004.
- MATIOLI, G. et al. **Estudos de parâmetros que influenciam na produção da enzima CGTase de *Bacillus firmus*, cepa nº 37**. In: Acta Scientiarum, v. 22, pp 311-316, 2000.
- NAKAMURA, N; HORIKOSHI, K. **Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase-producing alkalophilic *Bacillus sp.*** Agric. Biol. Chem., 40, 753-757, 1976.
- PONGAWASDI, P.; YAGISAWA, M. **Screening and Identification of a Cyclomaltodextrin Glucanotransferase-Producing Bacteria**. Journal Fermentation Technology, v. 65, n. 4, pp. 463-467. 1987.
- PRADO, H.F.A; HILARIO E; SILVA, E.G. **Seleção de Microrganismos Produtores de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) e produção e caracterização da enzima**. Braz. J. Technol, n 98, 2002.
- SIAN, H.K. et al. **Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus sp* G1**. Process Biochemistry, v. 40, n. 1-2, p. 1101-1111, 2005.
- SZEJTLI, J. **The cyclodextrins and their applications in biotechnology**. In: Carbohydrate Polymers, v. 12, Elsevier Science Publishers Ltd, pp. 375-392, 1990.
- TARDIOLI, P.W.; ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. **Characterization of Thermo anaerobactercy clomaltodextrin glucanotransferase immobilized on glyoxyl-agarose**, Enzyme Microb. Technology, v.39, p.1270-1278, 2006.
- TARDIOLI, Paulo. **Produção de ciclodextrinas em reator de leito fluidizado com a enzima ciclodextrina glicosiltransferase Imobilizada**. 1998. 194 f. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1998.
- SZEJTLI, J. **Past, present, and future of cyclodextrin research**. Pure Appl. Chem., 76, 1825-1845, 2004.