

## PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E AUMENTO DA PERFORMANCE DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASES PARA PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS

Cristiane Moriwaki, Cassiana Mazzer, Rúbia Pazzetto e Graciette Matioli\*

Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

Recebido em 9/12/08; aceito em 27/5/09; publicado na web em 28/10/09

PRODUCTION, PURIFICATION AND PERFORMANCE IMPROVE OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYL TRANSFERASES TO CYCLODEXTRINS PRODUCTION. Biospecific affinity chromatography was used to purify three cyclodextrin glycosyl transferases (CGTases) obtained from microorganisms isolated of soil. The cyclodextrins (CDs) production by CGTases was evaluated using starches from different sources. CDs were measured through the Complexation Theory and by HPLC. CGTase from *Bacillus firmus* strain 7B showed the best production (30 mmol/L of  $\beta$ -CD and 4.3 mmol/L of  $\gamma$ -CD), and its cultivation conditions were optimized. The maximum enzymatic activity was achieved using lung peptone, soluble starch and agitation speed of 160 rpm. Studied CGTases were shown quite interesting for the industrial production of CDs.

Keywords: cyclodextrin; CGTase; biospecific affinity chromatography.

### INTRODUÇÃO

Ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) é a única enzima capaz de converter amido e substâncias relacionadas em ciclodextrinas (CDs) através de uma reação de transglicosilação intramolecular (ciclização). Também catalisa reações de transglicosilação intermolecular, tais como, acoplamento e desproporcionamento. É uma enzima geralmente extracelular, com fraca atividade de hidrólise e produzida por vários tipos de microrganismos, como *Thermoanaerobacterium*, *Klebsiella oxytoca* e algumas espécies de *Bacillus*, como *B. macevans*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. firmus*, *B. stearothermophilus* e *B. lentus*.<sup>1</sup>

As CDs são oligossacarídeos cíclicos contendo seis ( $\alpha$ -CD), sete ( $\beta$ -CD), oito ( $\gamma$ -CD) ou mais unidades de glicopiranosas unidas por ligações  $\alpha$ -(1,4). A molécula de CD é descrita como um cone truncado, cujo interior é hidrofóbico e a superfície hidrofílica.<sup>2</sup> As características estruturais das mesmas são conhecidas com base em investigações por cristalografia de raios-X,<sup>3</sup> entretanto, Britto e colaboradores<sup>4</sup> mostraram que o método da mecânica molecular é o mais indicado para determinação da estrutura geométrica das CDs. Devido esta estrutura, as CDs podem formar complexos de inclusão com várias moléculas orgânicas e inorgânicas, sendo que as propriedades físicas, químicas e/ou biológicas da molécula hospede podem ser alteradas. As CDs são amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêutica e na agricultura, atuando como agentes estabilizantes de substâncias voláteis e/ou instáveis, emulsificantes, antioxidantes, na solubilização de compostos insolúveis em água, em sistemas de liberação controlada de drogas, na imobilização de compostos tóxicos para proteção ambiental.<sup>3,5-7</sup>

As iniciativas para aplicação industrial das CDs foram bastante tímidas até a década de 70, devido à baixa disponibilidade e preços inacessíveis. Contudo, o consumo anual de CDs no mundo está crescendo em altas proporções como consequência da intensa pesquisa neste campo no sentido de melhorar a produção, recuperação e purificação deste oligossacarídeo cíclico.<sup>3</sup> Além disso, a busca por substratos abundantes e de baixo custo tem sido reportada por alguns pesquisadores.<sup>8</sup>

Vários tipos de amido podem ser utilizados como substrato para a CGTase, incluindo amido de milho, batata e mandioca. No Brasil,

o amido de mandioca é uma alternativa interessante como substrato para a produção de CDs, pois, quando comparado a outros tipos de amido, tem um baixo custo de produção e alto rendimento.<sup>9</sup>

Diversos trabalhos visando melhorar o rendimento na produção de CDs têm sido relatados na literatura. Para isto, ensaios são executados com o objetivo de otimizar o cultivo do microrganismo responsável pela produção da CGTase e determinar as condições ideais para se obter a atividade máxima da enzima.<sup>8-22</sup>

Considerando a atual necessidade de disponibilização de CDs para aplicação industrial e a vantagem do substrato de custo reduzido no Brasil, o objetivo deste trabalho foi produzir e purificar CGTases de *B. firmus* cepa 7B, *B. firmus* cepa 37 e *B. sphaericus* cepa 41, bem como confrontar a produção de CDs pelas enzimas purificadas e otimizar as condições de produção da CGTase, buscando gerar um incremento na produção de CDs.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Produção e purificação das CGTases por cromatografia de afinidade biospecífica (CAB)

As enzimas utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir de microrganismos alcalofílicos (*B. firmus* cepa 7B, *B. firmus* cepa 37 e *B. sphaericus* cepa 41), isolados de solo brasileiro de cultura de aveia, mandioca e soja, respectivamente. Os microrganismos foram semeados em meio sólido, pH 10,3, com a seguinte composição (% p/V): amido solúvel 1,0; polipeptona 0,5; extrato de levedura 0,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,02; corante vermelho do congo 0,01; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,0 e agar 1,5. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h, e as colônias transferidas para frascos de Erlenmeyer de 500 mL, contendo 250 mL de meio de cultivo líquido de mesma composição do meio sólido, exceto a presença do agar e corante, e o amido solúvel a 2,0% (p/V). Estes pré-inóculos foram cultivados a 37 °C por 48 h com agitação de 120 rpm. Em seguida, numa proporção de 5% (V/V), frascos de Erlenmeyer de 2000 mL, contendo 1000 mL de meio de cultivo líquido foram inoculados e mantidos a 37 °C por 5 dias e agitação de 120 rpm. As células e o material insolúvel foram removidos por centrifugação (6000 rpm, 15 min, 4 °C) e o sobrenadante livre de células utilizado como fonte de enzima para purificação.

\*e-mail: gmatioli@uem.br



de onda de 550 nm. O descoloramento da solução, devido à complexação das moléculas de  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD com a PHE, é muito mais marcante para a  $\beta$ -CD sendo, portanto, este método preferencialmente utilizado para a determinação desta CD. Quando a forma ionizada da PHE (vermelha) é encapsulada no interior da  $\beta$ -CD, este corante é forçado a se manter na sua estrutura lactonada (incolor). Portanto, como o complexo  $\beta$ -CD-PHE possui uma absorvância diferente da PHE livre, é possível quantificar a  $\beta$ -CD presente na amostra.<sup>27,28</sup>

Uma curva analítica foi construída conforme segue. Preparou-se uma solução estoque de PHE 3 mmol/L, pesando-se 0,4775 g de PHE e dissolvendo-se em 500 mL de etanol 95%. Foi preparada uma solução tampão carbonato 0,6 mol/L, pesando-se 50,88 g de carbonato de sódio e 10,08 g de bicarbonato de sódio e completando-se o volume final para 500 mL com água destilada. No momento da dosagem foi preparada uma solução de trabalho de PHE, misturando-se 2 mL da solução estoque de PHE 3 mmol/L, 20 mL de solução tampão carbonato 0,6 mol/L e completando-se o volume final para 100 mL com água destilada.

A solução de  $\beta$ -CD 1 mmol/L foi preparada dissolvendo-se 0,1135 g de  $\beta$ -CD e completando-se o volume final para 100 mL com água destilada, contendo 20% de solução tampão Tris-HCl 50 mmol/L e 10% de solução de  $\text{CaCl}_2$  50 mmol/L.

Em 21 tubos de ensaio foram colocadas concentrações conhecidas de  $\beta$ -CD, na faixa de 0 a 1 mmol/L. A diluição foi feita com água tamponada. A dosagem de  $\beta$ -CD foi realizada misturando-se 0,5 mL da amostra que continha a  $\beta$ -CD numa concentração conhecida, com 2,5 mL da solução trabalho de PHE. A leitura foi efetuada utilizando espectrofotômetro Tecnal SP 1105 a 550 nm e o branco correspondia à água destilada.

Considerando que a relação entre a absorvância e a concentração de  $\beta$ -CD somente permanece linear para concentrações até 0,4 mmol/L, fez-se necessário o uso da teoria da complexação,<sup>21,29</sup> que fornece a relação não linear entre a absorvância e a concentração de  $\beta$ -CD. Nesta teoria, assume-se a formação de um complexo com apenas uma molécula de PHE e uma molécula hospedeira ( $\beta$ -CD), e trata-se a formação do complexo como uma reação reversível que está em equilíbrio na solução de dosagem, chegando à definição de uma constante de equilíbrio termodinâmico ( $K_{\beta\text{-CD}}$ ). Esta constante foi determinada por regressão não linear da Equação 1, utilizando o método de Quasi-Newton do programa Statistica®, para a série de dados obtida na curva padrão.

Portanto, os resultados de absorvância em função da concentração de  $\beta$ -CD, ajustados pela teoria da complexação, foram calculados de acordo com a Equação 1. Também foram calculados os limites de quantificação e detecção.

$$C_{\beta\text{-CD}} = a \left( 1 - \frac{\text{Abs}_{550}}{\text{Abs}_{0,550}} \right) \left( 1 + \frac{\text{Abs}_{0,550}}{K_{\beta\text{-CD}} a \text{Abs}_{550}} \right) \quad (1)$$

onde,  $C_{\beta\text{-CD}}$  é a concentração de  $\beta$ -CD (mmol/L),  $a$  é a concentração total de PHE na cubeta do ensaio,  $\text{Abs}_{550}$  e  $\text{Abs}_{0,550}$  são as absorvâncias em 550 nm das amostras e do branco, respectivamente.

#### Determinação espectrofotométrica de $\gamma$ -CD

A concentração de  $\gamma$ -CD foi determinada pelo aumento da absorção a 620 nm de uma solução de verde de bromocresol (VBC) após a complexação com  $\gamma$ -CD.<sup>29</sup> O VBC é um corante específico para determinação de  $\gamma$ -CD, uma vez que este corante tem estrutura maior que a cavidade das CDs menores ( $\alpha$ -CD e  $\beta$ -CD).<sup>30</sup> A formação do complexo resulta na troca do equilíbrio de protonação, pois as suas formas ácida e básica têm diferentes estabilidades. Considerando que a reação acontece numa solução de pH 4,2, transição ácido-base do corante, a complexação promoverá um aumento no espectro de absorção com mudança na coloração do indicador.<sup>26</sup>

A curva analítica foi construída a partir da preparação de uma solução estoque de VBC 5 mmol/L, pesando-se 1,8 g de VBC e dissolvendo-se em 100 mL de etanol 96% e completando-se o volume final para 500 mL com água destilada. Foi preparada uma solução de ácido cítrico 2 mol/L, pesando-se 210,14 g de ácido cítrico mono-hidratado e completando-se o volume final para 500 mL com água destilada. Também a solução de hidróxido de sódio 2 mol/L foi preparada pesando-se 40 g de NaOH e completando-se o volume final para 500 mL com água destilada. No momento da dosagem foi preparada uma solução de trabalho de VBC, misturando-se 10 mL da solução estoque de VBC 5 mmol/L, 10 mL da solução de ácido cítrico 2 mol/L e 5 mL da solução de NaOH 2 mol/L, completando-se o volume final para 100 mL com água destilada.

A solução de  $\gamma$ -CD 2 mmol/L foi preparada dissolvendo-se 0,2594 g de  $\gamma$ -CD e completando-se o volume total para 100 mL com água destilada, contendo 20% de solução tampão Tris-HCl 50 mmol/L e 10% de solução de  $\text{CaCl}_2$  50 mmol/L.

Em 21 tubos de ensaio foram colocadas concentrações conhecidas de  $\gamma$ -CD, na faixa de 0 a 2 mmol/L. A diluição foi feita com água tamponada. A dosagem de  $\gamma$ -CD foi realizada misturando-se 0,5 mL da amostra que continha a  $\gamma$ -CD numa concentração conhecida, com 2,5 mL da solução trabalho de VBC. A leitura foi efetuada utilizando espectrofotômetro Tecnal SP 1105 a 620 nm e o branco correspondia à solução do primeiro tubo, que continha uma concentração nula de  $\gamma$ -CD.

Os resultados de absorvância em função da concentração de  $\gamma$ -CD foram ajustados por regressão linear e calculados os limites de quantificação e detecção.

#### Determinação cromatográfica de CDs

A concentração de  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD produzidas pelas CGTases purificadas foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando cromatógrafo líquido CG-480C equipado com detector de índice de refração IR-CG 410, coluna aminopropilsilano SGE com tamanho de partícula 5  $\mu\text{m}$ , comprimento 25 cm e diâmetro interno 4,6 mm, acetonitrila e água (65:35) como fase móvel e fluxo de 0,7 mL/min à temperatura ambiente. Os padrões e as amostras foram filtrados em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . Foram construídas curvas analíticas para  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD com diferentes faixas de concentração. Para a  $\alpha$ -CD os valores variaram de 1 a 7 mg/mL, para a  $\beta$ -CD de 1 a 11 mg/mL e para a  $\gamma$ -CD de 1 a 3 mg/mL. Os resultados da área dos respectivos picos em função da concentração de CDs foram ajustados por regressão linear e os limites de quantificação e detecção foram calculados.

As curvas analíticas obtidas tanto pelo método espectrofotométrico quanto cromatográfico foram realizadas em duplicata.

#### Determinação da atividade enzimática

A atividade da CGTase foi determinada de acordo com a produção de  $\beta$ -CD ou  $\gamma$ -CD pela enzima, que foi medida pelo método espectrofotométrico anteriormente citado.

Uma unidade de atividade (U) corresponde à quantidade de CGTase que libera 1  $\mu\text{mol}$  de CD/min nas condições reacionais. As condições do ensaio de atividade consistiram na solução de substrato contendo 1% (p/v) de maltodextrina em tampão Tris-HCl 10 mmol/L e  $\text{CaCl}_2$  5 mmol/L, a 50 °C. O ponto zero foi obtido colocando-se 1 mL da enzima em tubo de ensaio com rosca dentro de um banho a 100 °C por 5 min, para inativação. Após esse tempo, adicionou-se 1 mL da solução de substrato e o tubo permaneceu por mais 5 min no banho fervente. O tubo foi resfriado e conservado em geladeira até o momento da dosagem. Para os demais pontos, colocou-se 1,0 mL da solução de substrato em tubo de ensaio com rosca dentro de um banho a 50 °C, aguardou-se a estabilização da temperatura e adicionou-se

1,0 mL de enzima diluída. Em intervalos de tempos de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min, os tubos foram retirados do banho a 50 °C, transferidos para banho a 100 °C por 10 min, para parar a reação. Todos os tubos foram resfriados e conservados em geladeira para posterior dosagem espectrofotométrica de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD produzidas.

O cálculo da atividade foi realizado de acordo com a Equação 2:

$$A = \frac{K' \times V_R \times D}{V_E} \quad (2)$$

onde, A é a atividade enzimática em  $\mu\text{mol}$  de CD/(min x mL), K' é a inclinação da reta de concentração de CDs em função do tempo (min x mmol/L),  $V_R$  é o volume total de reação (volume de substrato + volume da enzima), D é a diluição da enzima e  $V_E$  é o volume da enzima diluída.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Curvas padrão de CDs

Os dados da concentração de  $\beta$ -CD em função da absorbância foram ajustados utilizando a Equação 1, na qual o valor da constante de equilíbrio do complexo  $\beta$ -CD-PHE ( $K_{\beta\text{-CD}}$ ) foi estimado em  $21627 \pm 85$  L/mol, para um intervalo de confiança de 95%. A substituição das constantes "a" e  $K_{\beta\text{-CD}}$  na Equação 1 resulta na Equação 3, utilizada para a determinação das concentrações de  $\beta$ -CD nas amostras.

$$C_{\beta\text{-CD}} = 0,3 \left( 1 - \frac{\text{Abs}_{550}}{\text{Abs}_{0/550}} \right) \left( 1 + 1,0813 \frac{\text{Abs}_{0/550}}{\text{Abs}_{550}} \right) \quad r^2 = 0,9992 \quad (3)$$

Os limites de quantificação e detecção calculados para a dosagem espectrofotométrica da  $\beta$ -CD foram de 0,1576 e 0,0472 mmol/L, respectivamente.

A Figura 1S, material suplementar, apresenta os dados experimentais de concentração de  $\beta$ -CD em função da absorbância, ajustados com a Equação 1 e a Figura 2S, material suplementar, os dados experimentais de concentração de  $\gamma$ -CD em função da absorbância, ajustados por regressão linear, na qual se obteve a Equação 4, utilizada para a determinação das concentrações de  $\gamma$ -CD das amostras.

$$C_{\gamma\text{-CD}} = \frac{(\text{Abs}_{620} + 0,0171)}{0,1945} \quad r^2 = 0,9974 \quad (4)$$

Os limites de quantificação e detecção calculados para a dosagem espectrofotométrica da  $\gamma$ -CD foram de 0,3598 e 0,1079 mmol/L, respectivamente.

A dosagem cromatográfica de  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD por CLAE apresentou curvas analíticas cujas equações, coeficiente de correlação, limite de quantificação e limite de detecção estão abaixo relacionados. Na Figura 3S, material suplementar, observa-se o cromatograma da solução padrão de  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD.

Para a determinação da concentração de  $\alpha$ -CD:

$$C_{\alpha\text{-CD}} = \frac{(\text{Area pico} + 64727)}{364073} \quad r^2 = 0,9992 \quad (5)$$

Limite de quantificação = 0,5203 mmol/L; Limite de detecção = 0,1561 mmol/L.

Para a determinação da concentração de  $\beta$ -CD:

$$C_{\beta\text{-CD}} = \frac{(\text{Area pico} + 117267)}{399214} \quad r^2 = 0,9878 \quad (6)$$

Limite de quantificação = 1,7385 mmol/L; Limite de detecção = 0,5215 mmol/L.

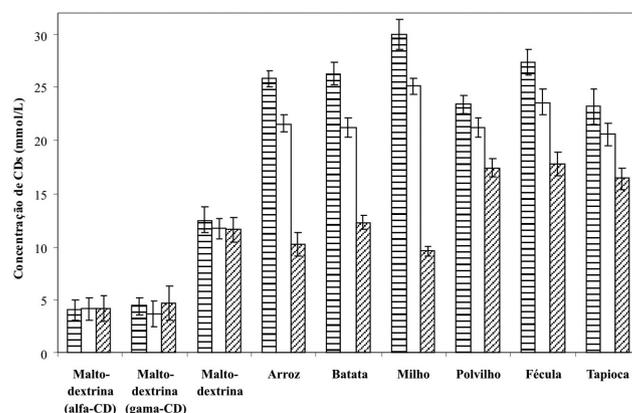
Para a determinação da concentração de  $\gamma$ -CD:

$$C_{\gamma\text{-CD}} = \frac{(\text{Area pico} - 31041)}{3757425} \quad r^2 = 0,9970 \quad (7)$$

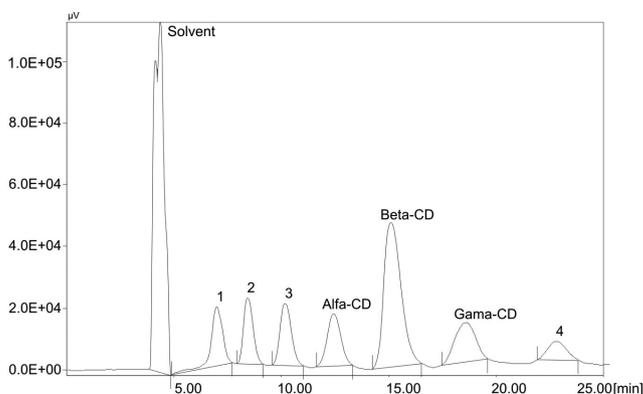
Limite de quantificação = 0,0542 mmol/L; Limite de detecção = 0,0162 mmol/L.

### Comparação das CGTases purificadas através da produção de CDs utilizando diferentes substratos e pH

O rendimento na produção de  $\beta$ -CD por meio da utilização das CGTases purificadas de *B. firmus* cepa 7B, *B. firmus* cepa 37 e *B. sphaericus* cepa 41, utilizando como fonte de amido maltodextrina, amido de arroz, amido de batata, amido de milho, polvilho, fécula e tapioca, está demonstrado na Figura 2. A CGTase purificada e obtida a partir de *B. firmus* cepa 7B foi a enzima que apresentou o melhor desempenho, resultando numa produção maior de  $\beta$ -CD para todas as fontes de amido. O amido de milho foi o substrato que proporcionou melhor rendimento na produção de  $\beta$ -CD, com exceção da CGTase obtida da cepa 41. Na Figura 3 observa-se o cromatograma da produção de CDs utilizando amido de milho como substrato pela CGTase de *B. firmus* cepa 7B.



**Figura 2.** Efeito dos diferentes tipos de amido na produção de  $\beta$ -CD pelas CGTases purificadas obtidas a partir de *B. firmus* cepa 7B (▨), *B. firmus* cepa 37 (□) e *B. sphaericus* cepa 41 (▩) e da maltodextrina na produção de  $\alpha$ -CD e  $\gamma$ -CD. As barras representam o desvio padrão para determinações em duplicata



**Figura 3.** Cromatograma do teste de produção de CDs utilizando amido de milho como substrato e a CGTase purificada de *B. firmus* cepa 7B após 24 h de reação

A CGTase de *B. firmus* cepa 7B produziu 30 mmol/L de  $\beta$ -CD a partir do substrato amido de milho, 29,3% maior quando da utilização do substrato amido de tapioca (23,2 mmol/L). Também Sian e colaboradores,<sup>15</sup> para a CGTase do *Bacillus* sp. G1, observaram a máxima produção de  $\beta$ -CD com o amido de tapioca (3,2 mmol/L). Higuti e colaboradores,<sup>16</sup> utilizando uma CGTase obtida a partir de *B. firmus* cepa 31, avaliaram a produção de  $\beta$ -CD a partir de amido de milho Sigma e féculas comerciais. O uso de féculas comerciais de milho (2,0 mmol/L), mandioca (0,8 mmol/L) e batata (1,3 mmol/L) diminuiu a produção de  $\beta$ -CD comparada com amido Sigma (2,3 mmol/L). Isto demonstra que amidos de diferentes origens podem afetar a produção de CDs e este fenômeno é provavelmente devido a diferenças na estrutura física dos grânulos de amido e às suas propriedades.<sup>15</sup>

Embora em nossa pesquisa a fécula de mandioca não tenha demonstrado o melhor rendimento, este produto pode ser um substrato promissor para a produção industrial de  $\beta$ -CD, em razão da alta disponibilidade desta matéria-prima no Brasil e por apresentar um rendimento muito próximo ao obtido a partir da utilização do amido de milho. Bertolini e colaboradores<sup>17</sup> também constataram que a produção de CDs usando farelo e fécula de mandioca como substrato é viável, concluindo que o farelo é um substrato adequado quando se visa a produção de  $\alpha$ -CD, enquanto que a fécula pode ser empregada tanto para a produção de  $\alpha$ -CD como a de  $\beta$ -CD.

A produção de  $\alpha$ -CD e  $\gamma$ -CD também foi avaliada utilizando maltodextrina como substrato e as CGTases purificadas de *B. firmus* cepa 7B, *B. firmus* cepa 37 e *B. sphaericus* cepa 41 (Figura 2). Para produção de  $\alpha$ -CD, as três CGTases apresentaram resultados semelhantes, em torno de 4,1 mmol/L. Os melhores rendimentos para a produção de  $\gamma$ -CD foram obtidos com a utilização das CGTases obtidas a partir de *B. firmus* cepa 7B e *B. sphaericus* cepa 41. Após 24 h de ensaio ambas resultaram na produção de aproximadamente 4,5 mmol/L de  $\gamma$ -CD.

De fato, a  $\beta$ -CD foi o produto predominante para todas as CGTases utilizadas neste trabalho. A alta proporção de  $\beta$ -CD obtida está provavelmente relacionada à origem da enzima.<sup>18</sup> Estes dados estão em concordância com os resultados obtidos por Sian e colaboradores,<sup>15</sup> que obtiveram uma maior produção de  $\beta$ -CD a partir de uma CGTase obtida do microrganismo *Bacillus* sp. G1.

Considerando que CGTase purificada de *B. firmus* cepa 7B foi a que apresentou maior rendimento em função das diferentes fontes de substrato, esta enzima foi utilizada na determinação da concentração de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD produzida em função do pH. Na Figura 4 observa-se que no pH 8,0 ocorreu a máxima atividade da enzima, sendo que no intervalo de tempo de 24 h produziu 12,2 mmol/L de  $\beta$ -CD. Nesta Figura pode-se observar que em um tempo de produção acima de 24 h, a quantidade de  $\beta$ -CD provavelmente seria maior.

O mesmo valor do pH ótimo não foi obtido para a produção de  $\gamma$ -CD. Neste caso, a máxima atividade ocorreu em pH 6,0, fornecendo 4,0 mmol/L de  $\gamma$ -CD, o que está de acordo com outra CGTase purificada de *Bacillus* sp. G1.<sup>15</sup> Cao e colaboradores<sup>19</sup> observaram um pH ótimo de 8,5 para a CGTase de *Bacillus* sp. 7-12 e para Charoenlap e colaboradores<sup>9</sup> a CGTase do *B. circulans* atuou melhor na faixa de pH de 4,5 a 5,0. Nos estudos realizados por Higuti e colaboradores,<sup>16</sup> a atividade da CGTase obtida a partir do *B. firmus* diminuiu 2,1 vezes quando o pH inicial foi abaixado de 10,3 para 7,4.

#### Otimização da produção da CGTase de *B. firmus* cepa 7B através de diferentes fontes de nitrogênio, carbono e velocidades de rotação

A produção de CGTase por *B. firmus* cepa 7B foi avaliada empregando-se no meio de cultivo peptonas e amidos de diferentes origens, bem como diversas velocidades de rotação. Os resultados estão expressos na Figura 5A, 5B e 5C, respectivamente.

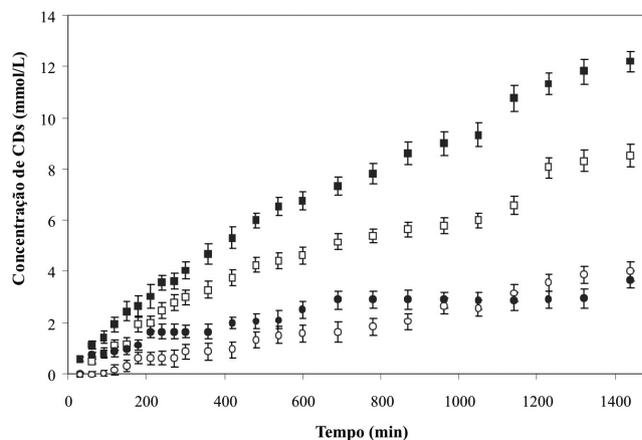


Figura 4. Atividade enzimática para a produção de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD em função do pH por meio da CGTase purificada obtida de *B. firmus* cepa 7B. Produção de  $\beta$ -CD: ■ pH 8,0 e □ pH 6,0. Produção de  $\gamma$ -CD: ● pH 8,0 e ○ pH 6,0. As barras representam o desvio padrão para determinações em duplicata

A maior atividade enzimática encontrada foi de 0,114 U/mL, obtida no sobrenadante livre de células do meio de cultivo que empregou peptona de pulmão como fonte de nitrogênio, apresentando resultados melhores do que aqueles obtidos com a peptona padrão (carne e caseína), que foi de 0,100 U/mL (Figura 5A). A partir da utilização da peptona de carne foi obtida a maior concentração celular, correspondente à maior densidade óptica, porém, se obteve a menor atividade quando comparada com as outras peptonas testadas. Gawande e colaboradores<sup>20</sup> testaram a influência de fontes de nitrogênio orgânico na produção da CGTase por *B. firmus*. Entre as fontes orgânicas testadas, a caseína mostrou-se a mais efetiva, com uma atividade enzimática de 0,48 U/mL, enquanto que a peptona apresentou uma atividade de 0,37 U/mL.

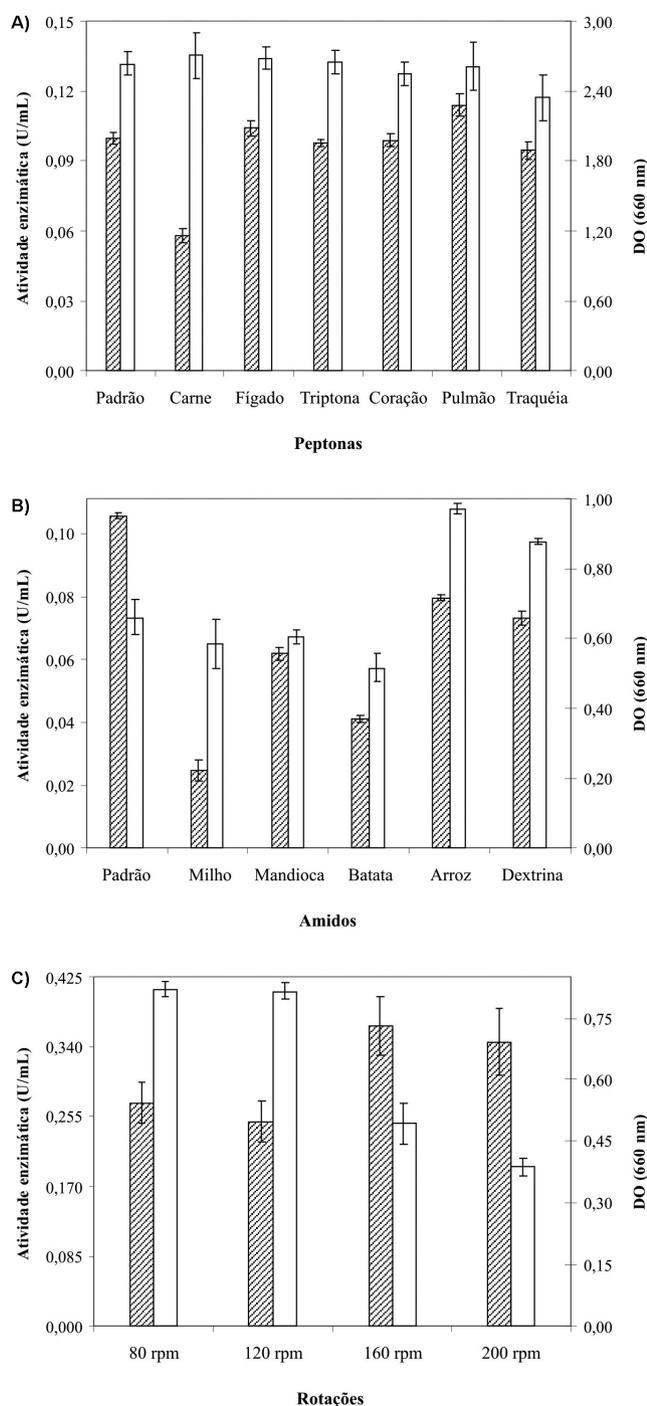
Com relação à influência de diferentes fontes de carbono, a maior atividade obtida foi a partir da utilização do padrão (amido solúvel), seguida pelo amido de arroz e a dextrina (Figura 5B). Gawande e colaboradores<sup>20</sup> observaram a máxima atividade de CGTase de *B. firmus* com o amido de milho (1,05 U/mL).

Quando foi avaliado o efeito das diferentes velocidades de rotação do meio de cultivo para otimização da produção de CGTase de *B. firmus* cepa 7B, observou-se que ao aumentar a velocidade de rotação também ocorreu um incremento na atividade da enzima, atingindo seu máximo de atividade com 160 rpm (Figura 5C). Igualmente, a CGTase de *Bacillus* sp. TS1-1<sup>22</sup> teve um aumento na sua produção (15%) quando a velocidade de rotação de 200 rpm passou para 400 rpm. Em nosso estudo também foi observado que o aumento da velocidade de rotação levou a menores valores de densidade óptica. Segundo Zain e colaboradores,<sup>22</sup> altas concentrações de biomassa tornam o meio de cultura viscoso, o que leva a uma redução do conteúdo de oxigênio dissolvido e, conseqüentemente, uma produção reduzida da enzima.

## CONCLUSÕES

A cromatografia de afinidade bioespecífica, utilizada na purificação das CGTases de *B. firmus* cepa 7B, *B. firmus* cepa 37 e *B. sphaericus* cepa 41 mostrou-se trabalhosa, contudo, com desempenho bastante efetivo.

Para a produção de  $\beta$ -CD a CGTase de *B. firmus* cepa 7B apresentou o melhor desempenho e o substrato amido de milho, o melhor rendimento. A concentração de  $\beta$ -CD obtida com esta enzima e este substrato foi de 30 mmol/L após 24 h de ensaio. A fécula de mandioca apresentou um rendimento em CDs próximo ao obtido com



**Figura 5.** Otimização da produção da CGTase de *B. firmus* cepa 7B. A - Influência das diferentes peptonas. B - Influência dos diferentes amidos. C - Influência das diferentes velocidades de rotação. ▨ Atividade enzimática (U/mL) e □ Densidade óptica (660 nm). As barras representam o desvio padrão para determinações em duplicata

amido de milho, o que torna este produto um substrato promissor para a produção industrial de CDs no Brasil em razão da sua alta disponibilidade, possibilitando a introdução das mesmas no mercado nacional com preços competitivos.

Os valores ótimos de pH para produção de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD pela enzima purificada de *B. firmus* cepa 7B foram diferentes. No caso da  $\beta$ -CD a máxima produção ocorreu em pH 8,0 e da  $\gamma$ -CD foi em pH 6,0. Este resultado é bastante interessante, possibilitando o direcio-

namento da produção de CDs e facilitando as etapas de separação e purificação das mesmas.

As condições de produção de CGTase proveniente de *B. firmus* cepa 7B foram otimizadas e a máxima atividade enzimática foi obtida utilizando peptona de pulmão como fonte de nitrogênio, amido solúvel como fonte de carbono e velocidade de agitação de 160 rpm para produção da enzima.

As CGTases de *B. firmus* cepa 7B, *B. firmus* cepa 37 e *B. sphaericus* cepa 41 mostraram-se bastante interessantes para a produção industrial das CDs. Depois da otimização da produção de enzima, o próximo passo para melhorar a aplicação da CGTase em nível industrial é o estudo da imobilização em diferentes suportes e por diferentes métodos.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

As Figuras 1S a 3S encontram-se disponíveis em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso gratuito.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Biwer, A.; Antranikian, G.; Heinzle, E.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *59*, 609.
2. Singh, M.; Sharma, R.; Banerjee, U. C.; *Biotechnol. Adv.* **2002**, *20*, 341.
3. Venturini, C. G.; Nicolini, J.; Machado, C.; Machado, V. G.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 360.
4. Britto, M. A. F. O.; Nascimento Jr, C. S.; Santos, H. F.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 882.
5. Del Valle, E. M. M.; *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1033.
6. Szente, L.; Szejtli, J.; *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1988.
7. Loftsson, T.; Duchêne, D.; *Int. J. Pharm.* **2007**, *329*, 1.
8. Szman, N.; Schroh, I.; Rossi, A. L.; Rosso, A. M.; Krymkiewicz, N.; Ferrarotti, S. A.; *Bioresour. Technol.* **2006**, *98*, 2886.
9. Charoenlap, N.; Dharmstithi, S.; Sirisansaneyakul, S.; Lertsiri, S.; *Bioresour. Technol.* **2004**, *92*, 49.
10. Matioli, G.; Zanin, G. M.; Guimarães, M. F.; Moraes, F. F.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1998**, *70-72*, 267.
11. Matioli, G.; Zanin, G. M.; Moraes, F. F.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2000**, *84-86*, 955.
12. Matioli, G.; Zanin, G. M.; Moraes, F. F.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2001**, *91-93*, 643.
13. Matioli, G.; Zanin, G. M.; Moraes, F. F.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2002**, *98-100*, 947.
14. Moriwaki, C.; Costa, G. L.; Pazzetto, R.; Zanin, G. M.; Moraes, F. F.; Portilho, M.; Matioli, G.; *Process Biochem.* **2007**, *42*, 1384.
15. Sian, H. K.; Said, M.; Hassan, O.; Kamaruddin, K.; Ismail, A. F.; Rahman, R. A.; Mahmood, N. A. N.; Illias, R. M.; *Process Biochem.* **2004**, *40*, 1101.
16. Higuti, I. H.; Silva, P. A.; Nascimento, A. J.; *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2004**, *47*, 135.
17. Bertolini, A. C.; Cereda, M. P.; Chuzel, G.; *Cienc. Tecnol. Aliment.* **1998**, *18*, 2.
18. Bovetto, L. J.; Backer, D. P.; Villette, J. R.; Sicard, P. J.; Bouquetel, S. J. L.; *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1992**, *15*, 48.
19. Cao, X. Jin, Z.; Wang, X.; Chen, F.; *Food Res. Int.* **2005**, *38*, 309.
20. Gawande, B. N.; Singh, R. K.; Chauhan, A. K.; Goel, A.; Patkar, A. Y.; *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *22*, 288.

21. Tardioli, P. W.; Zanin, G. M.; Moraes, F. F.; *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 1270.
22. Zain, W. S. W. M.; Illias, R. M.; Salleh, M. M.; Hassan, O.; Rahman, R. A.; Hamid, A. A.; *Biochem. Eng. J.* **2007**, *33*, 26.
23. Berna, P.; Moraes, F. F.; Barbotin, J. N.; Thomas, D.; Vijayalaskhmi, M. A.; *Adv. Mol. Cell Biol.* **1996**, *15B*, 521.
24. Bradford, M. M.; *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
25. Lima, H. O. S.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1998**, *70-72*, 789.
26. Barcza, L.; Buvári-Barcza, A.; *Carbohydr. Res.* **1989**, *192*, 103.
27. Vikmon, M.; *The First International Symposium on Cyclodextrins*, Dordrecht, The Netherlands, 1981.
28. Taguchi, K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2705.
29. Hamon, V.; Moraes, F. F.; Etude Préliminaire à L'immobilisation de L'enzyme CGTase WACKER. In Research Report, Laboratoire de Technologie Enzymatique. Compiègne, France: Université de Technologie de Compiègne; 1990.
30. Meier, M. M.; Luiz, M. T. B.; Farmer, P. J.; Szpoganicz, B.; *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2001**, *40*, 291.