

Estudos de parâmetros que influenciam na produção da enzima CGTase de *Bacillus firmus*, cepa n° 37

Graciette Matioli^{1*}, Cristiane Moriwaki¹, Regiane Barbieri Mazzoni¹, Gisella Maria Zanin² e Flávio Faria de Moraes²

¹Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá-Paraná, Brazil. e-mail: gmatioli@uem.br ²Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá-Paraná, Brazil. *Author for correspondence.

RESUMO. As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos formados por resíduos de glucopiranosose unidos por ligação α -1,4. As mais comuns são α -, β - e γ -CD contendo 6, 7 e 8 resíduos de glucopiranosose, respectivamente. Elas são produzidas a partir do amido pela ação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). Frequentemente, β -CD é produzida em maior quantidade. Um estudo da otimização da produção da CGTase de *Bacillus firmus* cepa n° 37 (β -CGTase) foi realizado. A produção da enzima ocorreu durante a fase de crescimento exponencial do microrganismo e a máxima atividade foi observada com três dias de cultivo a 37°C. O melhor rendimento na produção da enzima foi obtido quando da utilização de pré-inóculo com absorbância entre 0,5 e 1,0 (660 nm). O uso do substrato maltodextrina para produção da enzima proporcionou uma atividade enzimática ao redor de 31% menor que o substrato amido solúvel. Portanto, o substrato maltodextrina não é adequado para melhorar a produção da enzima estudada.

Palavras-chave: ciclodextrina glicosiltransferase, CGTase, ciclodextrinas.

ABSTRACT. Study of parameters that influence the production of the enzyme CGTase from *Bacillus firmus*, strain no. 37. The cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides formed by residues of glucopyranose linked by α -1,4. The most common are the α -, β - and γ -CD that present 6, 7 and 8 units of glucopyranose, respectively. They are produced from starch by the action of the enzyme cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase). Frequently, β -CD is produced in larger amount. A study of optimization of the production of the CGTase from *Bacillus firmus*, strain no. 37 (β -CGTase) was performed. The production of the enzyme occurred during the phase of exponential growth of the microorganism and the maximum activity was observed within three days of cultivation at 37°C. The best production of the enzyme was obtained with inoculum of optical density between 0.5 and 1.0 (660 nm). The use of the maltodextrin for production of the enzyme provided an enzymatic activity at 31% lower than the substrate, soluble starch. Therefore, the substrate maltodextrin is not appropriate to improve the production of the studied enzyme.

Key words: cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase, cyclodextrins.

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos constituídos de um número variável de unidades de glucose unidas por ligações α -1,4. As CDs são obtidas pela degradação do amido com a enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). As CDs mais comuns apresentam seis, sete ou oito unidades de glucose e são denominadas α -CD, β -CD ou γ -CD, respectivamente. (Duchêne *et al.*, 1984; Lee e Kim, 1991). O anel formado pelas CDs é mais hidrofílico externamente e relativamente hidrofóbico

no seu interior. Em meio líquido ou eventualmente sólido, estas moléculas são capazes de formar compostos de inclusão com numerosas substâncias orgânicas e inorgânicas, tais como: fármacos (ácido acetil salicílico, piroxicam, albendazol, etc.), corantes (vermelho do congo, fenolftaleína, etc.), íons metálicos, adoçantes, aromas, óleos, vitaminas, dentre outros (Szejtli, 1988).

Na prática, a inclusão pode aumentar a estabilidade da molécula hóspede. Esta estabilidade

pode ser diante do calor, redução da volatilidade, maior resistência térmica, resistência à hidrólise. Uma maior estabilidade pode igualmente se manifestar diante da oxidação. Para substâncias relativamente insolúveis em água, a inclusão pode melhorar sua solubilidade ou a sua cinética de dissolução (Duchêne e Vaution, 1986). Estas propriedades fazem das CDs uma grande atração para um variado número de aplicações industriais. Elas são usadas em alimentos, fármacos, cosméticos, pesticidas, tecnologia química, química analítica, etc. (Duchêne *et al.*, 1984; Duchêne e Vaution, 1986; Pszczola, 1988; Bekers *et al.*, 1991; Matioli, 2000).

A produção de CDs consiste em duas fases. Primeiro, a enzima CGTase é produzida por um microrganismo (*Bacillus macerans*, *Bacillus* sp alcalofílico, etc.). O meio de cultivo contendo a enzima é filtrado para retirada das células microbianas. Posteriormente, o meio é concentrado e a enzima purificada. O amido parcialmente pré-hidrolizado é tratado com esta enzima produzindo uma mistura de α -, β - e γ -CDs, juntamente com uma série de dextrinas lineares. Dependendo de qual CD é o principal produto da reação, a enzima é chamada de α -, β - ou γ -CGTase. Os produtos cíclicos e acíclicos, provenientes da degradação enzimática do amido devem ser separados. Diferentes processos são utilizados para este propósito. A separação da mistura pode ser realizada pela adição de um apropriado solvente orgânico, resultando na precipitação dos complexos cristalinos, enquanto as dextrinas acíclicas permanecem livres no meio. Depois de uma filtração, os compostos cristalinos são decompostos pela remoção do solvente orgânico incluso por destilação (Frömming e Szejtli, 1994).

A produção de CGTase é, normalmente, realizada em condições aeróbias e, geralmente, em reator batelada com agitação. O tempo de cultura depende da velocidade de crescimento do microrganismo. No geral, o cultivo demora de dois a três dias, à temperatura de 30°C a 37°C para os mesófilos, e superior a 50°C para os termófilos. A faixa de pH varia de 6 a 10. A quantidade de CGTase presente no filtrado do meio de cultivo varia de 5 mg/L a 430 mg/L (Bender (1981) *in* Delbourg, 1991).

Atualmente são conhecidos três tipos de reações catalisadas pela CGTase: ciclização, acoplamento e desproporcionamento. As CDs são produzidas a partir do processo conhecido como ciclização ou transglicosilação intramolecular e neste processo o substrato deve conter acima de seis unidades de glucose, e ainda estar na sua forma helicoidal (Bender, 1986). Se o substrato tiver peso molecular inferior a seis unidades de glucose e superior à

maltose, a CGTase é capaz de sintetizar oligômeros de maior peso molecular até superior a seis unidades de glucose, através das reações de desproporcionamento e, então, produzir CDs (Mäkelä e Korpela, 1988). A reação de acoplamento, também conhecida como transglicosilação intermolecular, consiste na abertura do anel da CD com transferência dos maltooligossacarídeos produzidos para moléculas receptoras. Esta reação ocorre na presença de CDs e certos co-substratos, existindo uma certa competição entre esta reação e aquela de ciclização (Bender, 1985; Klein *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1994).

O estudo das CDs, sua produção e utilização estão em forte ascensão mundial, uma vez que as aplicações são muitas e justificam seu grande interesse. O avanço tecnológico na produção das CDs tem alcançado reduções significativas nos seus custos. Todavia, várias das aplicações potenciais só poderão concretizar em larga escala, caso se consiga reduzir ainda mais o seu custo de produção (Bender, 1986; Matioli, 2000).

Apesar da utilização usual de CGTase que produz normalmente uma mistura de CDs, a seleção de cepas que produzam CGTases específicas com alta seletividade para α , β ou γ -CD, facilitaria muito o processamento e reduziria os custos de produção. Este é um dos caminhos para os quais a pesquisa da CGTase e seleção de cepas têm sugerido (Horikoshi, 1988).

Considerando o mercado potencial das CDs enzimaticamente formadas, este trabalho teve por objetivo aumentar a produção de CGTase produzida pela cepa número 37 de *Bacillus firmus* isolada de solo brasileiro (Matioli *et al.*, 1998). Estudou-se a fase de crescimento microbiano em que a enzima é produzida, o tempo de fermentação e a quantidade de inóculo adequados para maximizar a produção da CGTase. Também foi analisada a influência dos substratos amido solúvel e maltodextrina na produção da enzima.

Material e métodos

Enzima. CGTase foi obtida de microrganismo alcalofílico isolado de solo brasileiro (*Bacillus firmus*, cepa n^o 37). O microrganismo foi cultivado em 250 mL de meio líquido, pH 10, com a seguinte composição (% p/v): amido solúvel ou maltodextrina (D.E. 10) 1,0; polipeptona 0,5; extrato de levedura 0,5; K₂PO₄ 0,1; MgSO₄.7H₂O 0,02; Na₂CO₃ 1,0. O cultivo foi realizado a 37°C durante seis dias, com agitação de 150 rpm (Matioli, 1997; Matioli *et al.*, 1998).

Determinação de proteínas. O teor de proteína do meio de cultivo antes da centrifugação, e do sobrenadante, após a centrifugação (8800xg/10 minutos) do meio de cultivo e eliminação das células microbianas, foi determinado pelo método colorimétrico de Bradford, o qual utiliza o corante azul de comassie (Bradford, 1976).

Atividade da CGTase. Uma unidade de atividade (U) corresponde à quantidade de CGTase que produz um micromol de β -CD por minuto nas condições de reação. Os ensaios de atividade foram conduzidos em solução de maltodextrina 1 % (p/v) em tampão Tris-HCl 50 mM e CaCl_2 5 mM, pH 8,0 e 50°C. Para as determinações de β -CD formadas utilizou-se uma diluição do meio de cultivo ou sobrenadante de 1:5. Os tubos de dosagem contendo 0,5 mL de solução de maltodextrina 1 % (p/v) foram colocados em banho aquecido à temperatura de 50°C. 0,5 mL do meio de cultivo ou sobrenadante convenientemente diluídos foi adicionado ao substrato de cada tubo. Após o tempo desejado de reação, os tubos foram levados a um banho de 100°C por 5 min para inativação da enzima e então resfriado. Para cada tubo dosado foi preparado um branco, o qual foi submetido a um banho de 100°C por 5 minutos para a inativação da enzima antes da adição do substrato maltodextrina, e então resfriado (Matioli *et al.*, 1998). A β -CD produzida na reação foi determinada pelo método da extinção da cor da fenoltaleína a 550nm, que ocorre após a complexação com a β -CD (Hamon e Moraes, 1990).

Estudo da curva de crescimento celular e produção da enzima CGTase. Cultivou-se em placa por 48 h/37°C a cepa n° 37 de *Bacillus firmus* contendo meio sólido com a seguinte composição (% p/v): amido solúvel 2,0; polipeptona 0,5; extrato de levedura 0,5; K_2PO_4 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02; Na_2CO_3 1,0, vermelho do congo 0,01 e agar 1,5. Preparou-se um pré-inóculo com absorvância 1,0 e cultivou-se por mais 48 h/37°C sob agitação. Após este período transferiu-se 50 mL do pré-inóculo para 1 L de meio líquido (definido anteriormente), o qual foi mantido sob agitação por 6 dias/37°C. Alíquotas de 8 mL foram coletadas a cada 8 horas e mantidas sob refrigeração para posterior análise. Terminado o cultivo, fez-se à determinação da atividade da enzimática de cada alíquota. Posteriormente, centrifugou-se as alíquotas e, a partir do sedimento lavado três vezes com água destilada, fez-se a leitura das células em espectrofotômetro a 660 nm (Yim, 1996).

Pesquisa da quantidade de inóculo adequado para maximizar a produção da enzima. Realizado o cultivo da cepa n° 37 de *Bacillus firmus* em meio sólido, foram preparados pré-inóculos de absorvância 0,5; 1,0; 1,5 e 1,75 em espectrofotômetro a 660 nm. Após 48 h/37°C de cultivo, 50 mL dos pré-inóculos foram vertidos para 1 L de meio líquido e mantido sob agitação durante 6 dias a 37°C. A cada intervalo de 24 horas, foram coletadas alíquotas das quais foram feitas as determinações do teor de proteína do meio de cultivo antes da centrifugação, e do sobrenadante, após a eliminação das células microbianas, e também da atividade enzimática.

Influência dos substratos amido solúvel e maltodextrina D.E. 10 (dextrose equivalente) na produção da enzima. Após o crescimento da cepa n° 37 de *Bacillus firmus* em placa, preparou-se um inóculo com absorvância 1,0 e realizou-se o cultivo por 48 h/37°C sob agitação. Posteriormente, duas alíquotas de 25 mL do pré-inóculo foram adicionadas em dois meios líquidos de 500 mL cada, um contendo amido solúvel como substrato e outro contendo maltodextrina D.E. 10. Estes meios permaneceram sob agitação por 6 dias/37°C. Terminado o cultivo, determinou-se a atividade enzimática e o teor de proteína do meio de cultivo. Posteriormente, centrifugou-se 3 alíquotas de 5 mL de cada meio para avaliação do crescimento celular.

Resultados e discussão

Com a fermentação a 37°C por 6 dias, verificou-se que a enzima foi produzida na fase exponencial do crescimento microbiano, atingindo a atividade máxima após 72 horas de fermentação (0,186 μmol de β -CD/min x mL), como pode ser observado nas Figuras 1 e 2.

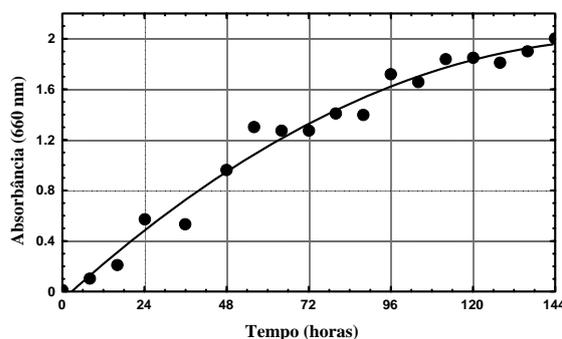


Figura 1. Absorvância das células da cepa n° 37 de *Bacillus firmus* cultivada durante seis dias a 37°C. Alíquotas coletadas a cada 8 horas

A Figura 3 apresenta os resultados da quantidade de inóculo adequado para maximizar a produção da CGTase de *Bacillus firmus*, cepa n° 37. Verificou-se que o maior teor de proteína tanto no meio de cultivo antes da centrifugação, quanto no sobrenadante após centrifugação, foi obtido quando da análise do pré-inóculo de absorvância 0,5 e também 1,0 (Figuras 3a e 3b, respectivamente). A maior atividade enzimática foi observada para o inóculo de absorvância 1,0 até o tempo de 72 horas. Após este período, a maior atividade enzimática foi obtida para o inóculo de absorvância 0,5 (Figura 3c).

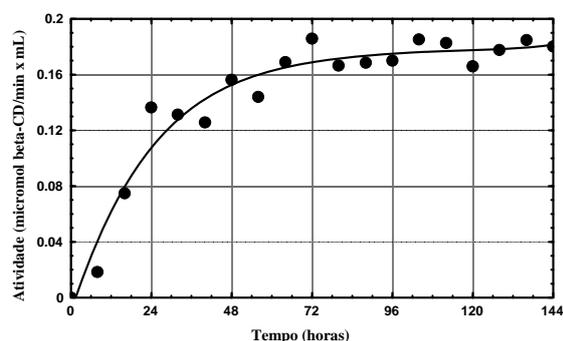
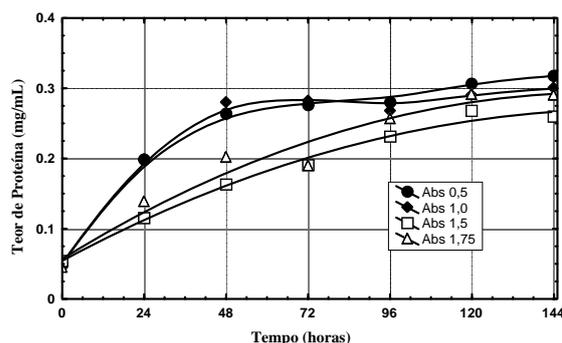


Figura 2. Atividade da enzima CGTase produzida pela cepa n° 37 de *Bacillus firmus*, durante seis dias a 37°C. Alíquotas coletadas a cada 8 horas

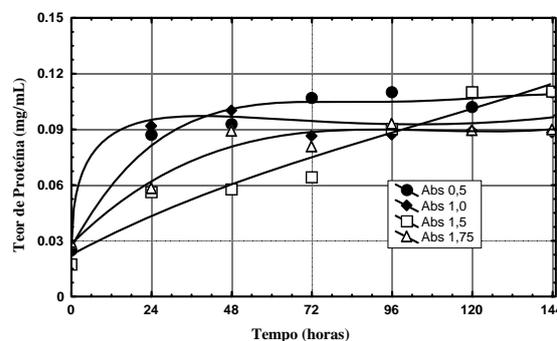
No estudo feito para analisar a influência dos substratos amido solúvel e maltodextrina D.E. 10 na produção da enzima CGTase de *Bacillus firmus* cepa n° 37, verificou-se que não ocorreu diferença significativa no crescimento celular (Figura 4a). Contudo, o teor de proteína do meio de cultivo contendo o substrato amido solúvel (0,2380 mg/mL) foi maior do que o do substrato maltodextrina D.E. 10 (0,2090 mg/mL), como pode ser observado no Figura 4b. O mesmo ocorreu com a atividade enzimática: para o substrato amido solúvel, a atividade no meio de cultivo foi 0,2134 μmol de $\beta\text{-CD}/\text{min} \times \text{mL}$, enquanto para a maltodextrina D.E. 10 a atividade no meio de cultivo foi de 0,1460 μmol de $\beta\text{-CD}/\text{min} \times \text{mL}$ (Figura 4c).

Com os resultados obtidos, observou-se que a produção da CGTase de *Bacillus firmus*, cepa n° 37, ocorreu durante a fase de crescimento exponencial do microrganismo e que a máxima atividade foi observada com três dias de cultivo a 37°C. Yim et al., (1997) estudou a CGTase de uma linhagem de *Bacillus firmus* n° 324 e verificou que a enzima também foi produzida na fase exponencial de crescimento, atingindo a atividade máxima após 24 horas de fermentação. Nos estudos realizados por Sabione e Park (1992), verificou-se que a produção da CGTase de *Bacillus lentus* n° 42 ocorreu na fase estacionária do crescimento

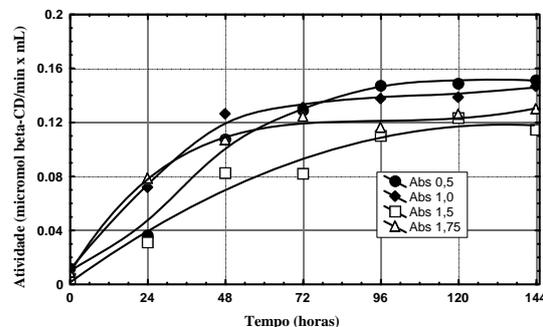
microbiano, após 96 horas de fermentação. Mäkelä et al. (1988) estudaram a produção de CGTase durante o crescimento do *Bacillus circulans* var. *alkalophilus*. A liberação da CGTase no meio de cultivo foi ativa desde o início do crescimento microbiano, alcançando 65% da sua produção na transição entre as fases log e estacionária da curva de crescimento. A produção da CGTase aumentou 20% na fase estacionária e o restante da CGTase foi liberada lentamente durante a fase de morte microbiana, provavelmente devido à liberação da CGTase intracelular.



a) Teor de proteína do meio de cultivo antes da centrifugação para eliminação das células microbianas



b) Teor de proteína do sobrenadante após centrifugação do meio de cultivo e eliminação das células microbianas

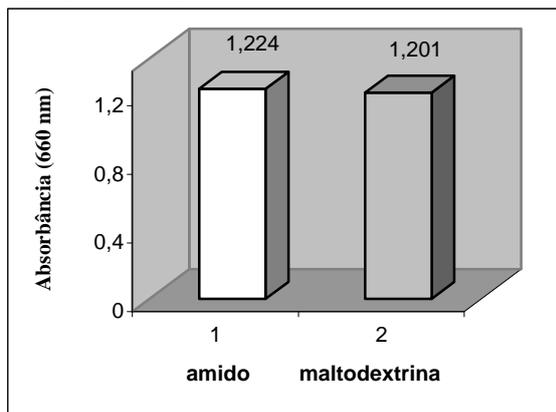


c) Atividade da enzima CGTase em função do tempo

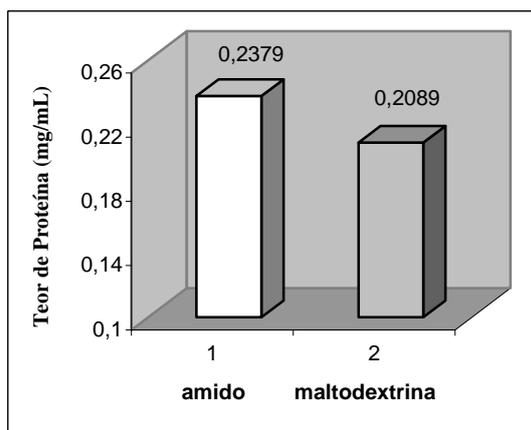
Figura 3. Pesquisa da quantidade de inóculo adequado para maximizar a produção da enzima CGTase produzida pela cepa n°

37 de *Bacillus firmus*. Absorbâncias analisadas: 0,5; 1,0; 1,5; 1,75. Aliquotas coletadas a cada 24 horas

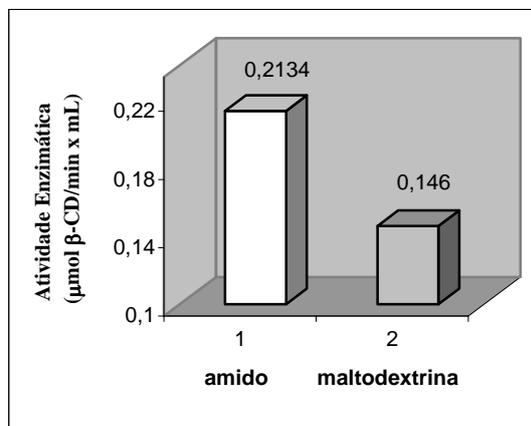
Observou-se que o melhor rendimento na produção da enzima foi obtido quando da utilização de um pré-inóculo com absorbância 1,0 até o tempo de 72 horas, e para tempos maiores, o ideal é o emprego de um pré-inóculo de absorbância 0,5.



a) Absorbância das células de *Bacillus firmus*, cepa n° 37



b) Teor de proteína dos meios de cultivo



c) Atividade da enzima CGTase em função do substrato

Figura 4. Influência dos substratos amido solúvel e maltodextrina D.E. 10 na produção da enzima CGTase de *Bacillus firmus*, cepa n° 37, após seis dias de cultivo a 37°C em meio líquido contendo substrato amido ou maltodextrina D.E. 10

Com relação ao estudo feito com os substratos amido solúvel e maltodextrina D.E. 10 para melhorar a produção da CGTase de *Bacillus firmus*, verificou-se que a atividade enzimática obtida quando do uso do substrato maltodextrina D.E. 10 no meio de cultivo foi 31,58% menor do que quando do uso do substrato amido solúvel. Portanto, o uso de maltodextrina D.E. 10 em substituição ao amido solúvel no meio de fermentação para melhorar a produção da enzima não é adequada. Um estudo do efeito de diversas fontes de carbono sobre a produção da CGTase de *Bacillus firmus* foi realizado por Sabione e Park (1992). Este estudo demonstrou que amilopectina, maltodextrina e amido solúvel foram os carboidratos mais efetivos, nesta ordem. Portanto, os resultados obtidos por estes autores são diferentes dos obtidos neste trabalho, uma vez que a produção de CGTase foi ao redor de 10% maior quando do uso de maltodextrina (68 U/mL) do que quando do uso de amido solúvel (61 U/mL). Segundo estes autores, uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir em 10% por minuto a cor azul do complexo iodo-amido.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas.

Referências bibliográficas

- Bekers, O.; Uijtendaal, E.V.; Beijnen, J.H.; Bult, A.; Underberg, W.J.M. Cyclodextrins in the pharmaceutical field. *Drug Develop. Ind. Pharm.*, 17:1503-1549, 1991.
- Bender, H. Studies on the inhibition by malto-oligosaccharides of the cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M 5 al with glycogen. *Carbohydr. Res.*, 153:291-302, 1985.
- Bender, H. Production, characterization and application of CDs. *Adv. Biotechnol. Proces.*, 6:31-71, 1986.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, 72:248-254, 1976.
- Delbourg, M.F. Modulation de l'activité de cyclodextrine glucosyltransferase en presence de polyethylene glycol.

- Compiègne, 1997. (Doctoral Thesis in Biochemistry) - Université de Technologie de Compiègne.
- Duchêne, D.; Debruères, B.; Brétilon, A. les cyclodextrines nature, origine, et intérêt en pharmacie galénique. *Labo-Pharma - Probl. Tech.*, 32:842-850, 1984.
- Duchêne, D.; Vaution, C. Les cyclodextrines: une possibilité d'amélioration des qualités pharmacotechniques des principes actifs. *Les Entretiens du Carla - Tome VII*, Conférence donnée le 24 juin, 1986.
- Frömming, K.H.; Szejtli, J. *Cyclodextrins in pharmacy*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. 224 p.
- Hamon, V.; Moraes, F.F. de. *Étude Préliminaire a L'immobilisation de la CGTase WACKER*. Laboratoire de Technologie Enzymatique, Université de Technologie de Compiègne. 1990. (Relatório de pesquisa).
- Horikoshi, K. Enzymology and molecular genetics of CD-forming enzymes. In: Huber, O.; Szejtli, J. (eds.). *Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 7-17.
- Klein, C.; Hollender, J.; Bender, H.; Schuiz, G.E. Catalytic center of cyclodextrin glycosyltransferase derived from X-ray structure analysis combined with site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 31:8740-8746, 1992.
- Lee, J.; Kim, H.S. Enhancement of enzymatic production of cyclodextrin by organic solvents. *Enz. Microb. Technol.*, 13:499-503, 1991.
- Mäkelä, M.; Korpela, T.K. Determination of the catalytic activity of cyclomaltodextrin glucanotransferase by maltotriose-methylorange assay. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 15:307-318, 1988.
- Mäkelä, M.; Paavilainen, S.K.; Korpela, T.K. Cultural characteristics of an cyclodextrin glucanotransferase-producing alkalophilic *Bacillus* sp. In: Huber, O.; Szejtli, J. (eds). *Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 27-31.
- Matioli, G. *Seleção de microrganismo e caracterização de sua enzima ciclodextrina glicosiltransferase*. Curitiba, 1997. (Doctoral Thesis in Biochemistry) - Universidade Federal do Paraná.
- Matioli, G.; Zanin, G.M.; Guimaraes, M.F.; Moraes, F.F. de Production and purification of CGTase of Alkalophilic *Bacillus* isolated from brazilian soil. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 70-72:267-275, 1998.
- Matioli, G. *Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais*. Maringá: Eduem, 2000. 124p.
- Nakamura, A.; Haga, K.; Yamane, K. The transglycosylation reaction of cyclodextrin glucanotransferase is operated by a ping-pong mechanism. *FEBS Letters*, 337:66-70, 1994.
- Pszczola, D.E. Production and potential food applications of cyclodextrins. *Food Technol.*, 42:96-100, 1988.
- Sabione, J.G.; Park, Y. K. Production and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus lentus*. *Starch/Stärke*, 44:225-229, 1992.
- Szejtli, J. *Cyclodextrins technology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. 450 p.
- Yim, D.K. *Caracterização de ciclodextrina glicosiltransferase de Bacillus firmus n° 324 alcalofílico - produção de ciclodextrinas ramificadas*. Campinas, 1996. (Doctoral Thesis in Food Science) - Universidade Estadual de Campinas.
- Yim, D.G.; Sato, H.H.; Park, Y.H.; Park, Y.K. Production of cyclodextrin from starch by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* and characterization of purified enzyme. *J. Industr. Microbiol. & Biotechnol.*, 18:402-405, 1997.

Received on May 09, 2000.

Accepted on May 30, 2000.