



## IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CICLODEXTRINAS A PARTIR DA CICLOMALTODEXTRINA-GLUCANO-TRANSFERASE PRODUZIDA POR *Bacillus Firmus* CEPA 37

Luana Thais Varize<sup>1</sup>; Maicon Ramon Bueno<sup>2</sup>; Fernando Pereira Calderaro<sup>3</sup>;  
Camila Braga Martins<sup>4</sup>; José Eduardo Olivo<sup>5</sup>

**RESUMO:** Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, compostos de seis, sete ou oito unidades de glucopiranoses respectivamente, unidas por ligações glicosídicas do tipo alfa-1,4, denominadas respectivamente de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD e são provenientes de amidos modificados. Possuem capacidade de formar complexos de inclusão com grande variedade de moléculas hóspedes em solução. Este trabalho teve como objetivo estudar a produção da CGTase para formação de  $\beta$  e  $\gamma$ -CD, realizou-se cultivo de *Bacillus firmus* CEPA 37, em reator batelada com pulsos a 48h e 96h. O microrganismo foi semeado em placas de Petri e mantido a 37°C em estufa incubadora por 72 horas, após, a massa celular presente foi transferida asépticamente para o pré-inóculo, mantido a 150 rpm e 37°C por 48 horas, então uma alíquota deste foi adicionada ao meio de cultivo, permanecendo no biorreator a 300 rpm e 37°C por 340 horas. Após 48 e 96 horas de cultivo, aplicou-se pulso de solução de amido com concentração de 1% no meio. As Amostras foram analisadas através de espectrofotometria para avaliação do processo fermentativo.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Bacillus firmus*; CEPA 37; Beta-Ciclomaltodextrina; Gama-Ciclomaltodextrina; Pulso.

### 1. INTRODUÇÃO

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, compostos de seis, sete ou oito unidades de glucopiranoses respectivamente, unidas por ligações glicosídicas do tipo alfa-1, 4, denominadas respectivamente de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD e são provenientes de amidos modificados. A degradação do amido em ciclodextrinas se dá por meio de reações reversíveis de transglicosilação intramolecular (ciclização) que tem como catalisador a CGTase. Na ciclização, a enzima converte amido e  $\alpha$ -1,4glicanos em ciclodextrinas, as quais são amplamente utilizadas em alimentos, fármacos e outros produtos químicos (TONKOVA, 1998). A reação de transglicosilação da CGTase é operada pelo mecanismo “PingPong”, fato verificado por NAKAMURA et al.(1994a). GAWANDE et al. (1998) obtiveram atividade máxima de CGTase igual a 7,05 UI.mL<sup>-1</sup>, usando *Bacillus firmus* em meio com amido de milho, extrato de levedura e pH inicial de 9,8. Com o objetivo de aumentar a produção da CGTase para formação de  $\gamma$ CD, realizou-se no presente trabalho, cultivo de *Bacillus firmus* CEPA 37, em biorreator em processo de batelada com pulsos a 48h e 96h. O microrganismo foi semeado em placas de Petri e mantido a 37°C

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. Aluna de Iniciação Científica. lu.varize90@hotmail.com

<sup>2</sup> Mestrando do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). mramonbueno@hotmail.com

<sup>3</sup> Doutorando do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

<sup>4</sup> Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

<sup>5</sup> Professor Doutor do Curso de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. olivo@deq.uem.br

em estufa incubadora por 72 horas, após, a massa celular presente foi transferida assepticamente para o pré-inóculo, foi mantido a 150 rpm e 37°C por 48 horas, uma alíquota deste foi adicionada ao meio de cultivo, permanecendo no fermentador a 300 rpm e 37°C por 340 horas. Após 48 e 96 horas de cultivo, aplicou-se pulso de solução de amido com concentração de 1% no meio. As Amostras foram analisadas através de espectrofotometria para avaliação do processo fermentativo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Primeiramente o microrganismo, *Bacillus firmus* CEPA 37, foi semeado em placas de Petri contendo meio semi-sólido, cuja composição está apresentada na Tabela 1. As placas foram mantidas em estufa incubadora a 37°C por 72 horas, para o desenvolvimento das células no estado vegetativo. Após 72 horas, a massa celular presente nas placas foi transferida assepticamente para o pré-inóculo, cuja composição é semelhante ao meio semi-sólido, exceto ágar (Tabela 1). Adicionou-se a enzima alfa-amilase ao pré-inóculo e também ao meio de cultivo, fazendo com que parte do amido de milho reduzisse a açúcar fermentescível, disponível ao microrganismo para seu consumo imediato. O pré-inóculo foi colocado em agitador rotativo, onde permaneceu por 48 horas a 37°C e sob agitação de 150 rpm. Na sequência uma alíquota do pré-inóculo foi transferida para o fermentador já com o meio de cultivo preparado e devidamente esterilizado.

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

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

O meio foi mantido a 37°C e 300 rpm com controle de pH acima de 8,5 em biorreator BioFlo III, por 340 horas. Após 48 e 96 horas de cultivo, um pulso de solução de amido estéril com concentração de 2,0 % foi aplicado ao meio. Amostras de 20 mL foram retiradas a cada 8 horas, sendo centrifugadas. As frações líquidas foram analisadas e o precipitado ressuspensão para análise de concentração celular, com leitura direta em espectrofotômetro a 610nm, conforme descrita 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 & Horikoshi (1984) e modificada por Hamon e Moraes (1990).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliando os resultados, observa-se que o pH do meio de cultivo permaneceu acima de 8,5 ao longo das 340 horas (figura 1), sendo assim o meio de cultura apresentou boa capacidade de tamponamento e o metabolismo do microrganismo não gerou grandes quantidades de ácidos orgânicos. Quanto à concentração celular, observa-se um ligeiro aumento após os pulsos aplicados, fato que já era esperado devido à disponibilidade de açúcares para o consumo, atingindo seu máximo de 8,24 g/L com 59 horas de cultivo, visível na figura 2.

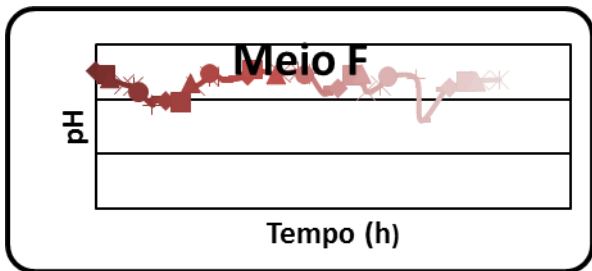


Figura 1: Variação de pH vs. Tempo

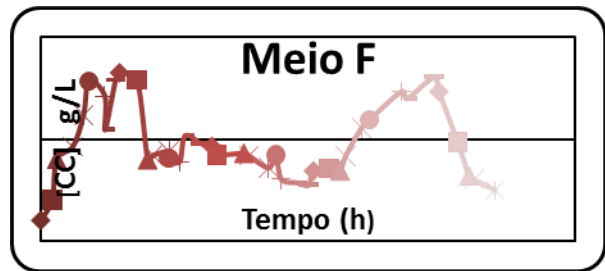


Figura 2: Variação de concentração celular vs. tempo

A curva expressa na Figura 3 mostra o comportamento da concentração de açúcares redutores (AR), que representa o açúcar diretamente disponível para consumo e em resposta aos pulsos aplicados com 48 e 96 horas pode ser notado um ligeiro aumento da concentração de açúcares redutores e açúcares redutores totais (figura 4).

As figuras 5 e 6 mostram as variações da atividade enzimática e da atividade específica ao longo do cultivo, sendo a atividade específica a razão entre a atividade enzimática e a concentração de proteínas solúveis no meio. A máxima atividade específica foi de 1,4 U/mL para leitura de gama-ciclomalto-dextrina e 0,063 U/mL para a leitura de beta-ciclomalto-dextrina.

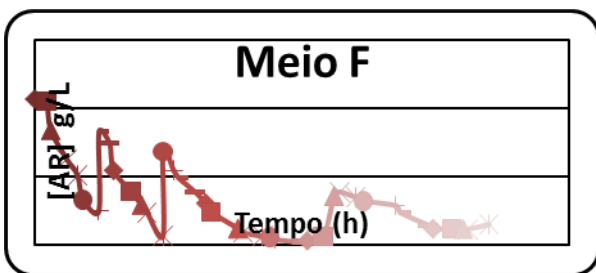


Figura 3: Variação de AR vs. tempo

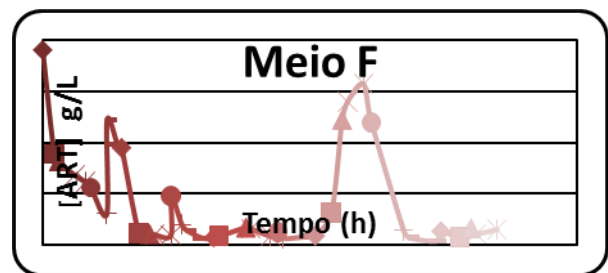


Figura 4: Variação de ART vs. tempo

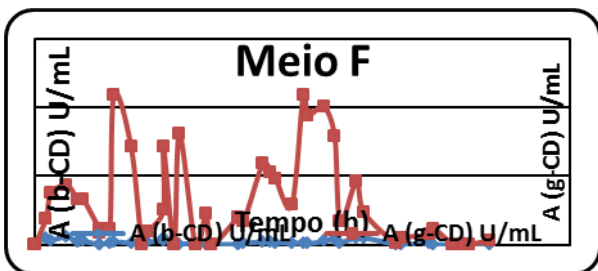


Figura 5: Variação de atividade enzimática vs. tempo

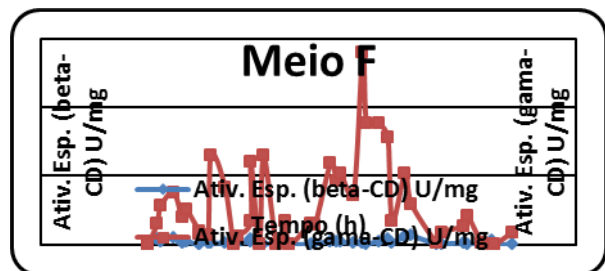


Figura 6: Variação de atividade específica vs. tempo

#### 4. CONCLUSÃO

Os experimentos foram realizados em caráter exploratório, buscando encontrar melhores processos de fermentação para alcançar melhores concentrações de gama-ciclomaltodextrina e beta-ciclomaltodextrina. Contudo, conclui-se que houve maior produção de gama-CD. Além disso, pode-se observar que, o consumo de substrato ao longo do tempo para o meio de cultura estudado, apresentou um consumo compatível com o crescimento celular e um efeito positivo na síntese da enzima GCTase. Assim necessita-se de mais estudos a fim de otimizar o processo de produção da enzima CGTase.

#### 5. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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