



IMOBILIZAÇÃO DA CGTase DE *BACILLUS FIRMUS* CEPA 37 EM CURDULANA PARA PRODUÇÃO DE β -CICLODEXTRINA

Nathália Maria Valério (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Vanderson Carvalho Fenelon (PCF-UEM), Graciette Matioli (Orientador), e-mail: gmatioli@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/ Centro de Ciências da Saúde/
Departamento de Farmácia/ Maringá, PR.

Área: Biotecnologia **Subárea: 90400003 Biotecnologia**

Palavras-chave: ciclodextrinas, imobilização, curdulana

Resumo:

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos produzidos a partir da reação de ciclização do amido e catalisada pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). As mais comuns são α -CD, β -CD e γ -CD, que possuem habilidade em encapsular várias moléculas, podendo aumentar consideravelmente a estabilidade e/ou solubilidade destas. Considerando a importância das CDs e suas inúmeras aplicações industriais, a presente pesquisa teve por objetivo imobilizar a CGTase purificada de *Bacillus firmus* cepa 37 em curdulana para produzir β -CD em reator batelada. O substrato empregado foi o amido de milho comercial na concentração 5% (p/v) na presença de etanol 10% (p/v). A partir de 1,0 mL solução de CGTase utilizada na imobilização, cerca de 45% efetivamente aderiu aos 100 mg de curdulana utilizados como suporte. Na primeira batelada, a produção de β -CD pela CGTase imobilizada alcançou 8,93 mmol/L, decaindo a partir da segunda batelada. A presente pesquisa vem contribuir para a constante busca de melhores tecnologias para a produção de CDs, visando o aumento no rendimento e a redução dos custos para sua obtenção.

Introdução

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos capazes de encapsular uma variedade de moléculas orgânicas, característica de grande interesse industrial. A produção das CDs é feita a partir da reação de ciclização do amido catalisada pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). As





CDs mais importantes, de ocorrência natural, são α -CD, β -CD e γ -CD. As CDs são constituídas por uma cavidade hidrofóbica que permite a formação de complexos de inclusão e por grupos hidroxila livres na sua superfície que interagem com a água por ligações de hidrogênio. Essas características permitem que as CDs sejam adequadas para aplicações na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética, entre outras. O processo biotecnológico de imobilização de enzimas pode aumentar o rendimento na produção de CDs, reduzir custos e permitir o uso repetido e prolongado das enzimas imobilizadas pela maior facilidade de separá-las do meio reacional. Para esse processo, a curdulana, um polímero natural de glicose com grande número de grupos hidroxila livres disponíveis para ativação e ligação com outras moléculas, apresenta características satisfatórias para possível imobilização. Portanto, a presente pesquisa teve por objetivo imobilizar a CGTase de *Bacillus firmus* cepa 37 em curdulana para produzir β -CD em reator batelada.

Materiais e métodos

A CGTase purificada, como descrito por Fenelon e colaboradores (2015), com atividade enzimática de 6,18 $\mu\text{mol } \beta\text{-CD}/\text{minxmL}$, foi imobilizada em curdulana utilizando uma adaptação da metodologia descrita por Saudagar e Singhal (2004) para imobilização de lipase pancreática suína. Em 5 mL de NaOH 0,5 N foram dissolvidos 100 mg de curdulana. Após, foi adicionado 1 mL de epícloridrina e a solução foi agitada durante 8 h à temperatura ambiente com um agitador magnético. A curdulana ativada com epóxi foi recuperada vertendo-se o gel em um banho contendo álcool etílico gelado. O precipitado epóxi-curdulana foi centrifugado a 4000 rpm, 8 °C, por 10 min. Em seguida, foi lavado com água, recuperado por uma nova centrifugação e utilizado como matriz para imobilização. Posteriormente, foi adicionado 1 mL da solução contendo a enzima purificada à matriz de curdulana, juntamente com 5 mL de uma mistura de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, e solução de CaCl_2 5 mM (na proporção de 60:40). A mistura foi agitada a 150 rpm e 30 °C por 8 h. O sobrenadante foi separado por centrifugação e a matriz lavada três vezes com a mesma mistura de soluções mencionada anteriormente. O sobrenadante e as soluções de lavagem foram analisados a fim de detectar atividade enzimática remanescente.

Após a imobilização da CGTase purificada de *B. firmus* cepa 37 em curdulana, deu-se início à sua utilização na produção de β -CD em bateladas repetitivas a partir do substrato amido de milho 5% (p/v), na presença de





etanol 10% (p/v), pH 8,0. O ensaio foi executado em reator de vidro encamisado com capacidade para 50 mL de meio reacional. A concentração de CGTase imobilizada foi ajustada de forma a obter $8,70 \times 10^{-4}$ mg de proteína/mL de meio. O meio reacional permaneceu sob agitação constante e a temperatura foi mantida em 50 °C com auxílio de um banho termostatzado acoplado ao reator encamisado. Cada batelada teve duração de 12 h e, ao seu término, o meio reacional foi centrifugado a 25 °C e 9000 rpm, por 10 min. O precipitado, contendo a CGTase imobilizada em curdulana e, também, o substrato amido de milho remanescente, foi utilizado na batelada seguinte, empregando um novo meio reacional com a concentração de amido corrigida. O sobrenadante foi armazenado e utilizado para determinação da concentração de β -CD por espectrofotometria.

Resultados e Discussão

Tendo em vista os resultados de atividade enzimática alcançados, dispostos na Tabela 1, inferiu-se que a quantidade de enzima imobilizada foi equivalente a 45% da atividade enzimática da CGTase purificada (6,18 μ mol β -CD/minxmL). Ou seja, de 1,0 mL de CGTase purificada utilizado na imobilização, a quantidade de 0,45 mL efetivamente aderiu aos 100 mg de curdulana utilizados como suporte.

Tabela 1: Atividade enzimática no sobrenadante e nas lavagens da imobilização em curdulana.

Amostra	Atividade enzimática (μ mol β -CD/minxmL)
Sobrenadante	3,37
1ª Lavagem	0,05
2ª Lavagem	0,03
3ª Lavagem	0,02

A Figura 1 mostra a produção de β -CD pela CGTase imobilizada em curdulana. Foram realizadas 4 bateladas repetitivas, cada uma com duração de 12 h. No final da primeira batelada de produção, a concentração de β -CD no meio reacional foi satisfatória, alcançando 8,93 mmol/L. Este resultado demonstra que o processo de imobilização foi eficiente e que o método utilizado não afetou o sítio ativo da CGTase e a





sua habilidade de produzir CDs. Nas bateladas seguintes, a CGTase imobilizada em curdulana continuou ativa, ainda que sua atividade tenha sofrido uma queda acentuada.

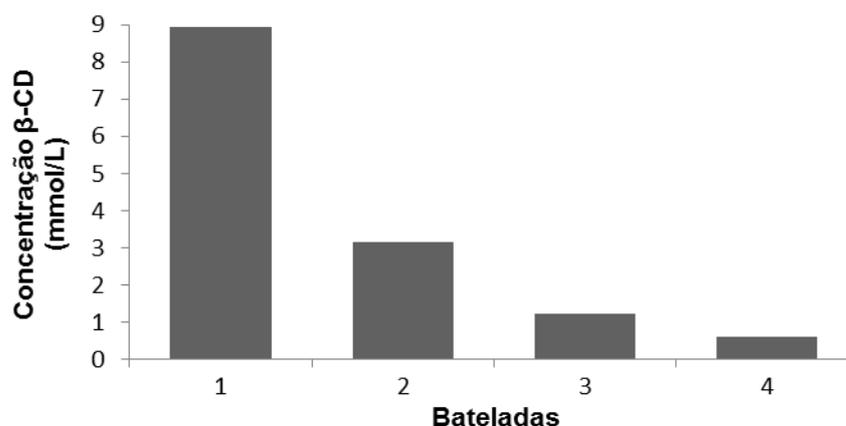


Figura 1: Bateladas de produção de β -CD utilizando a CGTase imobilizada em curdulana.

Conclusões

Os resultados deste estudo demonstram que a imobilização da CGTase de *B. firmus* cepa 37 em curdulana é possível e efetiva, devendo ser melhor estudada e aprimorada, visando sua aplicação na produção de CDs.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Maringá pela oportunidade e ao CNPq-FA- UEM pela concessão de bolsa.

Referências

FENELON, V. C.; AGUIAR, M. F. A.; MIYOSHI, J. H.; MARTINEZ, C. O.; MATIOLI, G. Ultrafiltration system for cyclodextrin production in repetitive batches by CGTase from *Bacillus firmus* strain 37. **Bioprocess and Biosystems Engineering** (Print), v. 38, p. 1291-1301, 2015.

SAUDAGAR, P. S.; SINGHAL, R. S. Curdlan as a support matrix for immobilization of enzyme. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 483-488, 2004.

