

PRODUÇÃO DE β -CD EM SISTEMA CONTÍNUO DE ULTRAFILTRAÇÃO PELA CGTase SEMIPURIFICADA DE *BACILLUS FIRMUS* CEPA 37

Nathalia Maria Valerio (PIBIC/CNPq/FA/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, CGTase, ultrafiltração

Resumo:

As ciclodextrinas (CDs) são formadas durante a ação de uma enzima denominada ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) sobre o amido. As mais comuns são α -CD, β -CD e γ -CD, compostas por 6, 7 e 8 unidades de glucose, respectivamente. Apresentam habilidade em encapsular uma larga faixa de moléculas, podendo aumentar consideravelmente sua estabilidade e/ou solubilidade. Em razão do grande aumento da utilização das CDs, vários pesquisadores têm buscado melhores vantagens tecnológicas na produção destas moléculas. No presente trabalho, a produção de β -CD foi realizada a partir do substrato amido de milho 5% (p/v) na presença de etanol 10% (v/v), em um reator encamisado com capacidade para 500 mL de meio reacional. O reator foi acoplado a um módulo de ultrafiltração *hollow fiber* (fibra oca), munido de uma coluna com limite de exclusão de 50.000 Da MWCO, capaz de separar as CDs e demais produtos inibitórios e, ao mesmo tempo, recuperar a CGTase para que continue atuando sobre o amido. A produção contínua foi mantida ao longo de 264 h (11 dias), sendo que, a cada 12 h alíquotas de ultrafiltrado foram coletas para determinação da β -CD produzida. Nas primeiras 12 h de produção, sem ultrafiltração, o rendimento foi de 16,73 mmol/L e, em sequência, o sistema contínuo de ultrafiltração foi colocado em operação e resultou em rendimentos satisfatórios, sendo que a queda na concentração de β -CD ocorreu lentamente. A presente pesquisa traz novas perspectivas para a produção de CDs e poderá contribuir para que sejam produzidas em escala industrial no Brasil.

Introdução

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos capazes de encapsular diversas moléculas orgânicas. As mais comuns são aquelas com seis, sete ou oito unidades de glucose, denominadas de α -CD, β -CD e γ -CD, respectivamente.

A CGTase é uma enzima monomérica, com peso molecular da ordem de 74,5 kDa e produz CDs por meio de reações reversíveis de transglicosilação intramolecular. As CDs são constituídas por uma cavidade hidrofóbica que permite a formação de complexos de inclusão com diversas moléculas de tamanho e hidrofobicidade adequados. Ao mesmo tempo, as CDs possuem grupos hidroxila livres na sua superfície, que interagem com a água por ligações de hidrogênio. Dessa forma, os complexos de inclusão alteram as propriedades físico-químicas da molécula hóspede, melhorando consideravelmente sua estabilidade e solubilidade. Essas características permitem que as CDs sejam adequadas para aplicações na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética, entre outras (MATHEW e ADLERCREUTZ, 2013).

Diversos estudos têm relatado que o emprego do etanol, em concentrações moderadas, no meio reacional leva a um aumento na produção de CDs. Acredita-se que esta propriedade esteja relacionada com a diminuição da perda destas moléculas por reações de transglicosilação e acoplamento e com a diminuição da atividade de água na mistura reacional, reduzindo a reação de hidrólise da CGTase (GAWANDE e PATKAR, 2001).

O sistema de ultrafiltração acoplado ao reator melhora consideravelmente o rendimento de CDs, pela remoção dos produtos inibitórios da CGTase que tendem a se acumular na mistura reacional. Baixo rendimento de CDs tem sido relatado em altas concentrações de amido, bem como uma forte inibição da CGTase pelas CDs produzidas no meio (GAWANDE e PATKAR, 2001). Portanto, o objetivo do presente trabalho foi produzir β -CD em sistema contínuo de ultrafiltração pela CGTase semipurificada de *Bacillus firmus* cepa 37, a partir do substrato amido de milho 5% (p/V) e na presença de etanol.

Materiais e métodos

A produção de β -CD pela CGTase semipurificada do *B. firmus* cepa 37 foi realizada a partir do substrato amido de milho 5% (p/v) na presença de etanol 10% (p/v) de forma contínua, em um reator encamisado de vidro com capacidade para 500 mL de meio reacional acoplado a um módulo de ultrafiltração *Hollow Fiber* (Tecnal mod. TE-0198) equipado com coluna com limite de exclusão de 50.000 Da MWCO e a um sistema de alimentação. Considerando o peso molecular de aproximadamente 78.000 Da da CGTase do *B. firmus* cepa 37, a mesma ficou retida pela membrana enquanto as CDs, que possuíam menores pesos moleculares, foram filtradas.

A CGTase semipurificada utilizada no ensaio possuía atividade enzimática de 3,3 U/mL. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de CGTase que produz 1 μ mol de β -CD por minuto, sob às condições de teste.

O volume de meio reacional no reator foi de 500 mL e, seguindo os parâmetros otimizados por Mاتيoli e colaboradores (2001), o pH foi mantido em 8,0 e a temperatura em 50 °C. Contudo, durante a produção contínua, o volume total de meio reacional foi mantido em 800 mL, dos quais 300 mL

ficaram em circulação entre os condutos do sistema, a coluna e o reator. Para o volume total de 800 mL de meio reacional, foram utilizados 24 mL de CGTase semipurificada, resultando na concentração enzimática de 0,1 U/mL de meio reacional, de acordo com ensaios prévios realizados pelo grupo (FENELON et al., 2015).

A produção foi iniciada com um processo descontínuo (batelada) de 12 h e, após esse período, o sistema de ultrafiltração Hollow Fiber (Tecnal mod. TE-0198) foi colocado em funcionamento para início do processo de produção contínua. A potência da bomba foi fixada em 15%, resultando em um fluxo médio de permeado de 4,5 mL/min. Dessa forma, o fluxo de alimentação do reator com novo meio reacional também foi mantido em 4,5 mL/min para manutenção do volume e concentração de substrato. Alíquotas do ultrafiltrado foram coletadas periodicamente para determinação espectrofotométrica da produção de β -CD.

Resultados e Discussão

A produção contínua foi mantida ao longo de 264 h (11 dias). A cada 12 h, foram coletadas alíquotas do ultrafiltrado para determinação da β -CD produzida. A produção de β -CD nas primeiras 12 h, sem ultrafiltração, foi de 16,73 mmol/L. Após a obtenção dessa batelada com rendimento satisfatório, o sistema contínuo de ultrafiltração foi colocado em operação. Ao término das 264 h, a concentração de β -CD era de 5,79 mmol/L. A Figura 1 mostra a produção de β -CD ao longo das 264 h de produção.

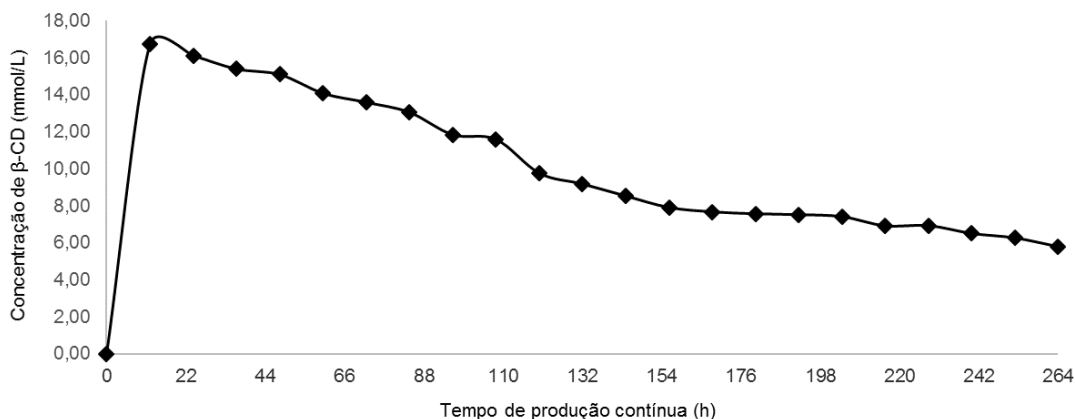


Fig. 1 – Rendimento de β -CD ao longo de 264 h (11 dias) de produção contínua em sistema de ultrafiltração.

Como observado, rendimentos satisfatórios de β -CD foram alcançados com o emprego do sistema contínuo de ultrafiltração, visto que inicialmente a produção manteve valores adequados e a queda no rendimento ocorreu lentamente. Esses resultados demonstram a efetividade do sistema contínuo

de ultrafiltração para um melhor aproveitamento da CGTase na produção de CDs, visto que a mesma foi capaz de manter a sua atividade ao longo de todo o ensaio, apresentando queda gradativa e lenta e sem necessidade de reposição da enzima ao longo do processo.

Conclusões

Esse estudo demonstrou que a produção de β -CD em sistema contínuo de ultrafiltração pela CGTase semipurificada de *B. firmus* cepa 37 apresenta potencial para tornar-se um meio efetivo e apropriado para a obtenção de CDs pela indústria brasileira, reduzindo seus custos e, assim, possibilitando maior aplicação dessas moléculas em produtos nacionais.

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.

GAWANDE, B.; PATKAR, A. Alpha-Cyclodextrin Production using Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Klebsiella pneumonia* AS-22. **Starch**, v. 53, p. 75-83, 2001.

MATHEW, S.; ADLERCREUTZ, P. Regioselective glycosylation of hydroquinone to α -arbutin by cyclodextrin glucanotransferase from *Thermoanaerobacter* sp. **Biochemical Engineering Journal**, v. 79, p. 187-193, 2013.

MATIOLI, G.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* strain nº 37. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, p. 643-654, 2001.