

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Seletividade na Produção de β -Ciclodextrina Utilizando Sistema de Ultrafiltração em Bateladas Repetitivas

Vanderson C. Fenelon¹, Suelen P. Ruiz², Juliana H. Miyoshi³ e Graciette Matioli³

¹Universidade Estadual de Maringá – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

²Universidade Estadual de Maringá – Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos

³Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Farmácia
Caixa Postal 87020-900 Maringá – PR - E-mail: gmatioli@uem.br

RESUMO

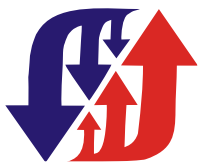
O presente trabalho teve por objetivo melhorar o rendimento da produção de ciclodextrinas (CDs) a partir da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) semipurificada de Bacillus firmus cepa 37, utilizando um sistema de ultrafiltração em bateladas repetitivas para remoção dos produtos inibitórios e para reutilização da CGTase. O substrato utilizado foi o amido de milho 5% (p/v) na presença de etanol 10% (p/v). Realizou-se 16 bateladas consecutivas. Na primeira batelada a produção de β -CD foi de 12,6 mmol/L, decaindo progressivamente até atingir menos de 50% da capacidade inicial. A γ -CD foi produzida em baixa quantidade e α -CD não foi produzida em quantidade detectável. A presente pesquisa foi satisfatória para produção de β -CD, tendo uma seletividade de 92,8% para esta CD.

Palavras-chave: Ciclodextrina, CGTase, Ultrafiltração.

INTRODUÇÃO

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos produzidos a partir da reação de ciclização do amido, catalisada pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). As mais comuns são α -CD, β -CD e γ -CD, constituídas de 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente, unidas por ligações α -1,4. A CGTase é uma enzima monomérica, com peso molecular da ordem de 74,5 kDa. É uma enzima extracelular produzida por diversos micro-organismos, especialmente do gênero *Bacillus* (LEEMHUIS et al., 2010; MATHEW e ADLERCREUTZ, 2013). As moléculas de CD possuem cavidade lipofílica e são capazes de formar complexos de inclusão com compostos de tamanho, forma e hidrofobicidade adequadas, conferindo mudanças nas propriedades físico-químicas da molécula hóspede, como a estabilidade e a solubilidade (LI et al., 2007).

Pesquisadores têm relatado uma forte inibição da CGTase pelas CDs produzidas no meio. Assim, o rendimento das CDs pode ser melhorado por sua eliminação da mistura reacional, o que pode ser obtido pelo emprego de um sistema de ultrafiltração acoplado ao reator (GAWANDE e PATKAR, 2001; GASTÓN et al., 2009). Pela importância das CDs e suas inúmeras aplicações industriais, a presente pesquisa teve por objetivo produzir e semipurificar a CGTase de *B. firmus* cepa 37 e produzir CDs em bateladas repetitivas a partir do substrato amido de milho 5% (p/v), na presença de etanol 10% (p/v). O sistema de ultrafiltração empregado possibilitou a reutilização da CGTase em bateladas repetitivas e a remoção de produtos inibitórios. Este estudo traz novas perspectivas para a produção industrial de CDs no Brasil, onde há grande disponibilidade de substrato a um valor acessível.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo e condições de cultivo

Para o crescimento do *B. firmus* cepa 37 em placa, a 37 °C por 48 h, foi utilizado um meio de cultivo sólido com a seguinte composição (% p/v): amido solúvel 1,0; polipeptona 0,5; extrato de levedura 0,5; K₂HPO₄ 0,1; MgSO₄.7H₂O 0,02; Na₂CO₃ 1,0; ágar 1,5; água purificada q.s.p. 100,0. Para a produção da CGTase, foi utilizado um meio de cultivo líquido com a mesma composição descrita para o meio sólido, exceto o ágar.

Para a produção de CDs pela CGTase de *B. firmus* cepa 37 empregou-se um meio reacional constituído por tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) 20% (v/v), solução de CaCl₂ 5 mM 10% (v/v), etanol 10% (v/v), amido de milho 5% (p/v) e água purificada q.s.p. 100%.

Produção e semipurificação da CGTase

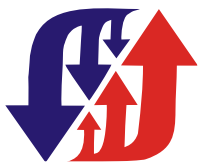
Um pré-inóculo utilizando 70,0 mg de células liofilizadas em 50,0 mL de meio de cultivo foi incubado a 37°C e 80 rpm, por 48 h. Em seguida, o micro-organismo reativado foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 2,0 L contendo 1,0 L de meio líquido e este foi incubado a 37°C e 80 rpm, por 5 dias. No final do quinto dia, o meio foi centrifugado para remoção de células e partículas insolúveis. Uma alíquota do extrato bruto (sobrenadante) foi coletada para determinação do teor de proteínas e da atividade enzimática.

A semipurificação do extrato bruto foi realizada a fim de eliminar compostos contaminantes e concentrar a enzima. Para precipitação de proteínas, adicionou-se 280,5 g de sulfato de amônio a 500 mL do extrato bruto (80% de saturação). A solução foi mantida por 48 h em geladeira (4°C) e, em seguida, o precipitado proteico foi separado por centrifugação a 4°C e 8000 rpm, por 20 min. O sedimento foi suspenso em 50 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 e solução de CaCl₂ 5 mM na proporção 60:40 e, em seguida, submetido à ultrafiltração em membrana de 30 kDa NMWL e 44,5 mm de diâmetro em dispositivo Amicon[®]. Para lavagem, adicionou-se mais 50 mL da mistura de soluções citada e efetuou-se nova ultrafiltração, restando 25 mL do volume total. Então, determinou-se a atividade enzimática, o teor de proteínas e a atividade enzimática específica da amostra.

Produção de CDs em bateladas repetitivas, com ultrafiltração do meio reacional a cada 12 h

Com a CGTase semipurificada do *B. firmus* cepa 37, procedeu-se a produção de CDs a partir do substrato amido de milho 5% (p/v) na presença de etanol 10% (p/v), pH 8,0, em um sistema de bateladas repetitivas com 12 h de duração. Entre as bateladas, o meio reacional foi ultrafiltrado para remoção das CDs e demais produtos inibitórios. A CGTase foi recuperada e reutilizada na próxima batelada. Utilizou-se reator de vidro encamisado com capacidade para 50 mL de meio reacional, sob agitação constante e temperatura de 50°C.

Ao término da primeira batelada, todo o volume de meio foi transferido, por bomba peristáltica, para dispositivo Amicon[®], no qual passou por ultrafiltração em membrana de 10 kDa NMWL e 44,5 mm de diâmetro, por pressão de gás nitrogênio e sob agitação. O filtrado foi recolhido e armazenado para determinação da concentração de CDs por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O volume retido (contendo a enzima) foi suspenso em um novo meio reacional com a concentração de amido de milho corrigida de acordo com a taxa de conversão. Com a bomba peristáltica, os novos 50 mL de meio de produção foram



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

transferidos para o reator. Sob as mesmas condições, bateladas subsequentes de 12 h foram realizadas, aplicando o procedimento de ultrafiltração no final de cada uma.

Métodos analíticos

O teor de proteínas foi determinado pelo método de Bradford, utilizando albumina bovina como padrão (BRADFORD, 1976). A atividade enzimática foi determinada de acordo com a produção de β -CD. Uma unidade de atividade corresponde à quantidade de CGTase que produz 1 μ mol de β -CD/min nas condições de reação empregadas (MORIWAKI et al., 2009). A partir desses dados, calculou-se a atividade enzimática específica (Ae), expressa como a atividade por miligrama de proteína (U/mg).

A concentração de α -CD, β -CD e γ -CD foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando as mesmas condições descritas por Fenelon e colaboradores (2015). Os resultados foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas por meio do teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao final da produção da CGTase, o teor de proteínas encontrado no extrato bruto foi de 0,03 mg/mL, atividade enzimática de 0,13 μ mol de β -CD/min \times mL (U) e atividade específica de 4,21 U/mg. A atividade enzimática determinada para a CGTase semipurificada foi de 2,44 μ mol de β -CD/min \times mL e o teor de proteína foi de 0,19 mg/mL. A atividade enzimática específica correspondeu a 12,64 U/mg. Estes resultados foram considerados satisfatórios para que a enzima fosse utilizada no ensaio de produção de CDs.

De acordo com a Figura 1, no ensaio de produção de CDs em bateladas repetitivas com duração de 12 h, foi possível a realização de 16 bateladas repetitivas. Na primeira batelada, a produção de β -CD alcançou 12,64 mmol/L, sendo que apenas uma pequena queda foi observada na segunda batelada (11,10 mmol/L). Nas demais bateladas, a produção de β -CD caiu progressivamente até atingir menos de 50% de sua capacidade inicial.

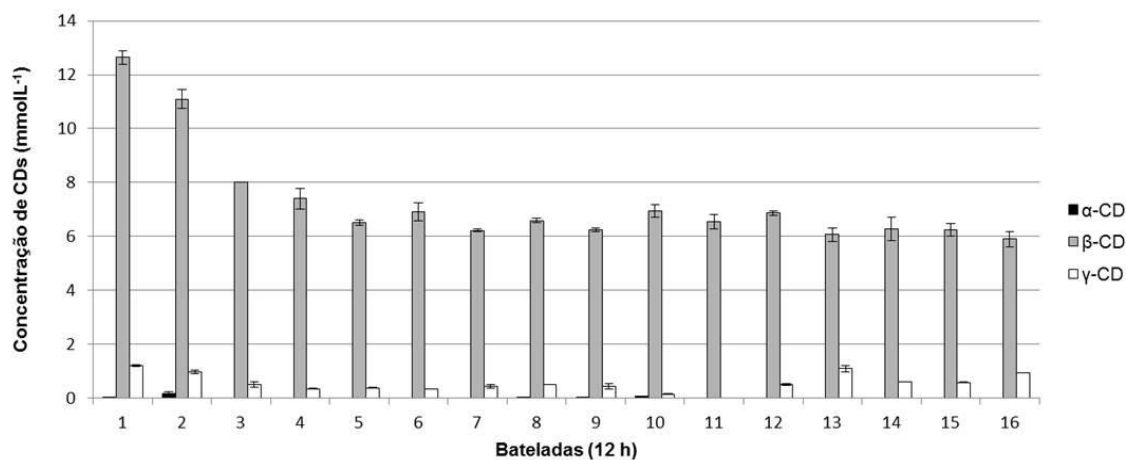
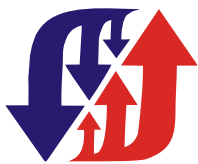


Figura 1: Produção de CDs a partir do substrato amido de milho 5% (p/v) na presença de etanol 10% (p/v), pH 8,0, em um sistema de bateladas repetitivas com 16 ciclos de 12 h de duração.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Quantidade pouco significativa de γ -CD foi produzida no decorrer das bateladas repetitivas, correspondendo a uma concentração média de 0,56 mmol/L. Para a maioria das bateladas, a α -CD não foi produzida em quantidade detectável. Sendo assim, uma excelente seletividade para β -CD foi obtida com a utilização de bateladas de 12 h e correção da concentração do substrato, alcançando 92,8% para a totalidade do ensaio. Para fins de comparação, em estudo realizado anteriormente pela equipe (FENELON et al., 2015), a seletividade para β -CD verificada em bateladas de 24 h com o extrato bruto da CGTase (na ausência de etanol e sem correção da concentração de substrato) foi de 85,7%. Essa menor seletividade para ensaios de 24 h pode ser entendida como reflexo da aproximação do equilíbrio de produção da β -CD, fazendo com que a CGTase direcione sua produção para as demais CDs.

CONCLUSÕES

O sistema de ultrafiltração empregado possibilitou a reutilização da CGTase por 16 ciclos consecutivos. As bateladas repetitivas de 12 h, utilizando a CGTase de *B. firmus* cepa 37 semipurificada e substrato amido de milho 5% (p/v) na presença de etanol 10% (v/v) favoreceram seletivamente a produção de β -CD, fato especialmente vantajoso quando se pensa na purificação dessa molécula a partir da mistura obtida.

Este estudo traz uma perspectiva favorável para produção industrial das CDs no Brasil. O país é grande produtor do substrato utilizado e as condições de processo testadas podem aumentar o rendimento e viabilizar a obtenção de CDs em larga escala.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Fenelon VC, Aguiar, MFA, Miyoshi JH, Martinez CO, Matioli G. 2015. Ultrafiltration system for cyclodextrin production in repetitive batches by CGTase from *Bacillus firmus* strain 37. *Bioprocess Biosyst Eng* 38:1291-1301.
- Gastón JAR, Szerman N, Costa H, Krymkiewicz N, Ferrarotti SA. 2009. Cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R: Activity and kinetic studies. *Enzyme Microb Technol* 45:36-41.
- Leemhuis H, Kelly RM, Dijkhuizen L. 2010. Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:823-835.
- Li Z, Wang M, Wang F, Gu Z, Du G, Wu J, Chen J. 2007. γ -Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:245-255.
- Mathew S, Adlercreutz P. 2013. Regioselective glycosylation of hydroquinone to α -arbutin by cyclodextrin glucanotransferase from *Thermoanaerobacter* sp. *Biochem Eng J* 79:187-193.
- Moriwaki C, Mazzer C, Pazzetto R, Matioli G. 2009. Produção, purificação e aumento da performance de ciclodextrina glicosiltransferases para produção de ciclodextrinas. *Quím Nova* 32:2360-2366.