UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Raisa Déli de Oliveira Sanches

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA CGTase PRODUZIDA POR *Paenibacillus campinasensis* H69-3

São José do Rio Preto – SP
2019

Raisa Déli de Oliveira Sanches

Purificação e caracterização bioquímica da CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – Proc. 140303/2016-2

Orientador: Profª. Drª. Heloiza Ferreira Alves do Prado

São José do Rio Preto
2019

Sanches, Raisa Déli de Oliveira.
Purificação e caracterização bioquímica da CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 / Raisa Déli de Oliveira Sanches. – São José do Rio Preto, 2019
89 f.: il., grafs., tabs.

Orientador: Heloiza Ferreira Alves do Prado
Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

1. Microbiologia. 2. Ciclodextrinas. 3. Cromatografia de afinidade. I. Título.

CDU – 543.54

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Raisa Déli de Oliveira Sanches

Purificação e caracterização bioquímica da CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – Proc. 140303/2016-2

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª. Drª. Heloiza Ferreira Alves do Prado
UNESP – Câmpus de Ilha Solteira
Orientador

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Renato Grillo
UNESP – Câmpus de Ilha Solteira

Drª. Andréia Aparecida Jacomassi Carneiro
Embrapa – Unidade de Brasília

Prof. Dr. Hamilton Cabral
USP – Câmpus de Ribeirão Preto

São José do Rio Preto
18 de dezembro de 2018

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria se realizado se não existissem essas pessoas, nesta ocasião agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram:

À Deus, por sua infinita misericórdia e incontáveis demonstrações de cuidado e amor, por ter me sustentado até aqui.

À Profª Drª Heloiza Ferreira Alves do Prado, pela orientação e confiança no meu trabalho.

À Profª Drª Eleni Gomes e Prof. Dr. Roberto da Silva por permitirem todo o desenvolvimento do projeto no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada/ LBMA.

Aos amigos do LBMA, Gabriela, Lorena, Pâmela, Cíntia, Jaqueline, Josiani, Janaina, Diego, Pedro pela amizade e ajuda durantes esses anos.

À Jéssica por toda ajuda, principalmente pelos cálculos de termodinâmica.

Às minha amigas: Ana Paula, Christiane e Sirlene pela amizade.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro na concessão da bolsa de doutorado.

À minha mãe, por sempre me incentivar e estar ao meu lado em todas minhas escolhas.

Aos meus tios, meu avô, meu irmão e minha cunhada pelo apoio nos meus sonhos, e por compreenderem a minha ausência em muitos momentos.

Ao meu amor, Matheus, pelo amor, cumplicidade e compreensão em todos os momentos.

Aos meus sogros, Arabela e Dorival pelo carinho, torcida e orações.

Meu muito obrigada!

RESUMO

Uma ciclomaltodextrina glucanotransferase (E.C. 2.4.1.19, CGTase) produzida pelo microrganismo *Paenibacillus campinasensis* linhagem H69-3, foi obtida por fermentação submersa a 45 °C, e a CGTase purificada por cromatografia de afinidade bioespecífica em resina Sepharose 6B ativada com β-CD. A enzima foi purificada até 23 vezes, obtendo um rendimento de 11,0%, e a atividade específica de 32,6 U mg^{-1} ao final da etapa de purificação. A massa molecular da enzima purificada foi estimada em 72 kDa por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio. O pH ótimo para a atividade enzimática foi de 6,5 e a enzima foi estável na faixa de pH de 6,5 a 8,0. A temperatura ótima foi de 65 °C em pH 6,5, e foi térmicamente estável até 55 °C na ausência de substrato durante 1 h de incubação e estável até 65 °C na presença de Ca^{2+} 5 mmol L^{-1}. A atividade enzimática aumentou na presença de Ba^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Ni^{2+}, K^{+}, Zn^{2+} e foi inibida na presenca dos íons metálicos Cu^{2+}, Hg^{2+}, Ag^{+}, Li^{2+}, Al^{3+} e NH_4^{2+} e por β-, γ-CD, DMSO, Triton, SDS e NaN_3. Utilizando maltodextrina como substrato a CGTase apresentou 11,0±0,5 µmol min·mg e 0,30 ± 0,07 mg mL^{-1}, $V_{máx}$ e K_m, respectivamente. Avaliaram-se os parâmetros termodinâmicos da CGTase, que demonstrou mais de 11 horas a 65 ºC como tempo de meia vida, e elevada resistência estrutural à desnaturação térmica quando avaliados os resultados de entropia, energia de ativação e entalpia.

Palavras-chave: Ciclomaltodextrina glucanotransferase. CGTase. *Paenibacillus campinasensis*. Ciclodextrinas. Cromatografia de afinidade

ABSTRACT

A cyclomaltodextrin glucanotransferase (E.C. 2.4.1.19, CGTase) produced by 4 microorganism Paenibacillus campinasensis strain H69-3 was obtained by submerged fermentation at 45 °C and CGTase purified by biospecific affinity chromatography on β-CD activated Sepharose 6B resin. The enzyme was purified up to 23 times, yielding 11.0% yield, and the specific activity of 32.6 U mg^{-1} *at the end of the purification step. The molecular weight of the purified enzyme was estimated at 72 kDa by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. The optimum pH for the enzymatic activity was 6.5 and the enzyme was stable in the pH range of 6.5 to 8.0. The optimum temperature was 65 °C at pH 6.5 and was thermally stable at 55 °C in the absence of substrate for 1 h incubation and stable at 65 ° C in the presence of* Ca^{2+} *5 mmol L -1. The enzyme activity increased in the presence of* Ba^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Ni^{2+}, K^{+}, Zn^{2+} *and was inhibited in the presence of* Cu^{2+}, Hg^{2+}, Ag^{+}, Li^{2+}, Al^{3+} *and* NH_4^{2+} *ions and by β, γ -CD, DMSO, Triton, SDS and* NaN_3. *Using maltodextrin as substrate CGTase presented 11.0 ± 0.5 μmol min · mg and 0.30 ± 0.07 mg* mL^{-1}, *Vmax and Km, respectively. The thermodynamic parameters of CGTase, which demonstrated more than 11 hours at 65 ºC as a half-life, and high structural resistance to thermal denaturation were evaluated when the results of entropy, activation energy and enthalpy were evaluated.*

Keywords: Cyclomaltodextrin glucanotransferase. CGTase. Paenibacillus campinasensis. Cyclodextrins. Affinity chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da amilose e da amilopectina. 3

Figura 2. Representação esquemática da ação das enzimas envolvidas na degradação do amido. 5

Figura 3. Representação do mecanismo de ação da CGTase. 8

Figura 4. Estrutura molecular da α-, β-, γ- ciclodextrinas. 12

Figura 5. Representação estrutural das principais CDs. 13

Figura 6. Esquema da preparação do suporte para cromatografia de afinidade bioespecífica (CAB). 28

Figura 7. Perfil de produção da produção enzimática da CGTase em diferentes substratos. 38

Figura 8. Perfil de eluição da cromatografia de afinidade bioespecífica (CAB) em resina Epoxi ativado Sepharose 6B, para purificação da CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3. 40

Figura 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida da junção de frações resultantes da purificação da CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3. MM: marcador de massa molecular; 1: Extrato bruto; 2: Extrato purificado. 42

Figura 10. Gráfico de Fischer (DENNISON, 2003) do logaritmo da massa molecular dos padrões vs. a migração relativa em gel de poliacrilamida. 43

Figura 11. Determinação do período de incubação ideal para cálculo da velocidade inicial de reação de ciclização da CGTase purificada. 45

Figura 12. Efeito da temperatura na atividade e termoestabilidade da CGTase purificada da linhagem *P. campinasensis* H69-3. 46

Figura 13. Efeito do pH na atividade e estabilidade da CGTase pura, poduzida por *P. campinasensis* H69-3. Os tampões utilizados foram: MacIlvaine (pH 3.0–8.0) e Glicina 0,1 M (pH 8.0–11.5). 48

Figura 14. Efeito do $CaCl_2$ na termoestabilidade da CGTase purificada, poduzida por *P. campinasensis* H69-3, após 60 minutos de incubação. a) $CaCl_2$ 1 mmol L^{-1}. b) $CaCl_2$ 5 mmol L^{-1}. 53

Figura 15. Atividade enzimática residual após 24 horas em diferentes temperaturas na presença e ausência de $CaCl_2$ a 1 mmol L^{-1} e.glicerol 50%. São mostrados os valores médios de triplicatas e o desvio padrão. 55

Figura 16. Gráfico de Michaelis-Menten da CGTase purificada variando-se a concentração de substrato entre 0,1 a 10 mg mL^{-1}. Ensaio realizado a 65 °C em pH 6,5. 57

Figura 17. Gráfico de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação (Ea) e temperatura ótima da CGTase purificada. 58

Figura 18. Gráfico de primeira ordem do efeito da temperatura na atividade da CGTase purificada. 59

Figura 19. Gráfico de Arrhenius de primeira ordem para o cálculo da energia de ativação da desnaturação térmica (E_{ad}) da CGTase purificada. 60

Figura 20. Temperatura de fusão da CGTase purificada produzida pela bactéria termofílica P. campinasensis H69-3. A temperatura de fusão é considerada a temperatura na qual a atividade da enzima cai pela metade do seu máximo. 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de técnicas de purificação de CGTases. 11

Tabela 2. Resumo do processo de purificação da CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3. 41

Tabela 3. Efeitos de diferentes íons metálicos na atividade da CGTase da *P. campinasensis* H69-3. 50

Tabela 4. Efeito do íon Ca^{2+} na atividade CGTase de diferentes espécies microbianas. 52

Tabela 5. Efeitos de vários reagentes na atividade da CGTase da *P. campinasensis* H69-3. 54

Tabela 6. Coeficientes de temperatura (Q_{10}) da CGTase estimados com base no Gráfico de Arrhenius. 59

Tabela 7. Parâmetros termodinâmicos da termo inativação irreversível da CGTase purificada. 61

LISTA DE ABREVIATURAS

CGTase ciclomaltodextrina glucanotransferase

CDs ciclodextrinas

FDA Food and Drugs Administration

UV radiação ultravioleta

α-CD alfa ciclodextrina

β-CD beta ciclodextrina

γ-CD gama ciclodextrina

$CaCl_2$ cloreto de cálcio

CLAE cromatografia líquida de alta pressão

K_2HPO_4 fosfato de potássio dibásico anidro

$MgSO_4.7H_20$ sulfato de magnésio heptahidratado

Na_2CO_3 carbonato de sódio

HCl ácido clorídrico

KI iodeto de potássio

I_2 iodo ressublimado

U unidade de atividade enzimática

C controle da atividade enzimática

Abs absorbância da amostra

Fd fator de diluição

mM milimolar

NaCl cloreto de sódio

CAB cromatografia de afinidade bioespecífica

SDS-PAGE eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio

mL mililitro

mg miligrama

DP desvio padrão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Amido	3
2.2 Ciclomaltodextrina glucanotransferase (CGTase)	5
2.2.1 Mecanismo de ação da CGTase	6
2.3 Produção de CGTase	8
2.4 Purificação de CGTases	11
2.5 Ciclodextrinas	12
2.6 Produção de ciclodextrinas	14
2.7 Aplicação das ciclodextrinas	17
2.7.1 Indústria de alimentos	18
2.7.2 Indústria farmacêutica	19
2.7.3 Indústria têxteis	20
3.OBJETIVOS	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Microrganismo	21
4.2 Meios de cultura	22
4.2.1 Meio de seleção	22
4.2.2 Meio de produção	23
4.2.3 Meio de manutenção	23
4.3 Estudo da produção enzimática	23
4.3.1 Pré-inóculo	23
4.3.2 Estudo do efeito da fonte de carbono	24
4.3.3 Fermentação Submersa e obtenção da enzima	24
4.4 Determinação das atividades enzimáticas	25
4.4.1 Atividade CD-fenolftaleína	25
4.4.2 Atividade Dextrinizante	26
4.5 Concentração de Proteína	27
4.6 Purificação da CGTase	27

4.6.1 Cromatografia de Afinidade Bioespecífica (CAB) 27

4.6.1.1 Metodologia para aplicação da CAB e Purificação da CGTase Padrão 27

(i) Preparação do suporte 27
(ii) Processo cromatográfico 29
(iii) Aplicação da amostra 29
(iv) Análise das alíquotas coletadas 29

4.7 Determinação do massa molecular da proteína 30

4.8 Caracterização bioquímica da CGTase 30

4.8.1 Determinação do tempo de incubação 30

4.8.2 Determinação da temperatura ótima 31

4.8.3 Determinação do pH ótimo 31

4.8.4 Estabilidade térmica 31

4.8.5 Estabilidade em relação ao pH 32

4.8.6 Efeito de íons, solventes, detergentes e quelantes sobre a atividade de CGTase 32

4.8.7 Análise das condições de 24 horas de armazenamento 33

4.8.8 Cinética enzimática 33

4.8.9 Termodinâmica da desnaturação térmica irreversível 34

4.8.9.1 Caracterização quanto à temperatura ótima 34

4.8.9.2 Cálculo da energia de ativação 35

4.8.9.3 Cálculo do coeficiente da temperatura 35

4.8.10 Termodinâmica da desnaturação térmica irreversível 35

4.8.10.1 Tempo de meia vida 36

4.8.10.2 Energia de ativação da desnaturação térmica 36

4.8.10.3 Entalpia de ativação da desnaturação térmica (ΔH_D (K J mol^{-1})) 36

4.8.10.4 Energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação térmica (ΔG_D (K J mol^{-1})) 37

4.8.10.5 Entropia de ativação da desnaturação térmica (ΔS_D (J mol^{-1} K^{-1})) 37

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 38

5.1. Estudo do efeito da fonte de carbono 38

5.2. Purificação por Cromatografia de Afinidade Bioespecífica (CAB) 40

5.2.1 Estimativa da Massa Molecular em condições desnaturantes 43
5.3. Caracterização bioquímica da CGTase purificada 44
5.3.1 Determinação do tempo de incubação 44
5.3.2 Determinação da temperatura ótima e termoestabilidade da enzima 45
5.3.3 Efeito do pH na atividade e estabilidade da enzima 47
5.3.4 Efeito de Íons Metálicos e Químicos na Atividade da CGTase 49
5.3.5 Efeito do íon Ca^{2+} na termoestabilidade da CGTase purificada 52
5.3.6 Efeito de reagentes, solventes e produtos da enzima 53
5.3.7 Análise das condições de 24 horas de armazenamento 54
5.4. Cinética enzimática 56
5.5. Termodinâmica da desnaturação térmica irreversível 58
6. CONCLUSÃO 63
7. REFERÊNCIAS 64

1. INTRODUÇÃO

O amido é a principal fonte de carboidratos para os seres humanos, encontrado em diferentes partes das plantas (tubérculos, raízes, sementes e folhas), está presente em diferentes alimentos, como: trigo, arroz, milho, batata, mandioca entre outros (ZEEMAN; KOSSMANN; SMITH, 2010). A degradação do amido se dá por meio das amilases, grupo de enzimas muito importante industrialmente, sendo responsáveis por aproximadamente 1/4 do mercado de enzimas do mundo (SAGU et al., 2015).

A ciclomaltodextrina glucanotransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) é uma enzima da família das amilases, e a única capaz de converter o amido e substâncias relacionadas em ciclodextrinas (CDs) através da reação de ciclização (transglicosilação intramolecular). Ela também é responsável por catalisar as reações de acoplamento, hidrolítica e de desproporcionamento (transglicosilação intermolecular). É uma enzima produzida diversos microrganismos, principlamente espécies de *Bacillus*, como *B. macerans, B. circulans, B. megaterium, B. firmus, B. stearothermophilus* e *B. lentus*. As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, unidas por ligações α-(1,4), as principais contém seis (α-CD), sete (β-CD) ou oito (γ-CD). A molécula de CD tem o formato de “cone truncado”, seu interior é hidrofóbico e a superfície hidrofílica, devido apresentarem esta estrutura, as CDs são capazes de formar complexos de inclusão com diversas moléculas, sendo elas liquidas, sólidas ou gasosas.Os complexos de inclusão são capazes de alterar propriedades físicas e/ou químicas da molécula hóspede. Devido à formação de complexos de inclusão as CDs podem ser aplicadas amplamente em indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêutica e na agricultura, atuando na liberação controlada de drogas,

estabilizantes de substâncias voláteis e/ou instáveis, emulsificantes, na solubilização de compostos insolúveis em água, na imobilização de enzimas e compostos tóxicos. Diferentes fontes de amidos podem ser utilizados como substrato na produção das CDs, como amido de milho, batata, mandioca, arroz e trigo, na presença ou ausência de aditivos para aumentar o rendimento das CDs.

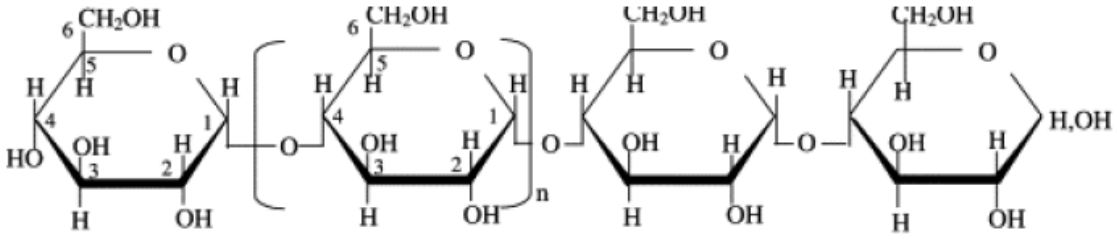
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Amido

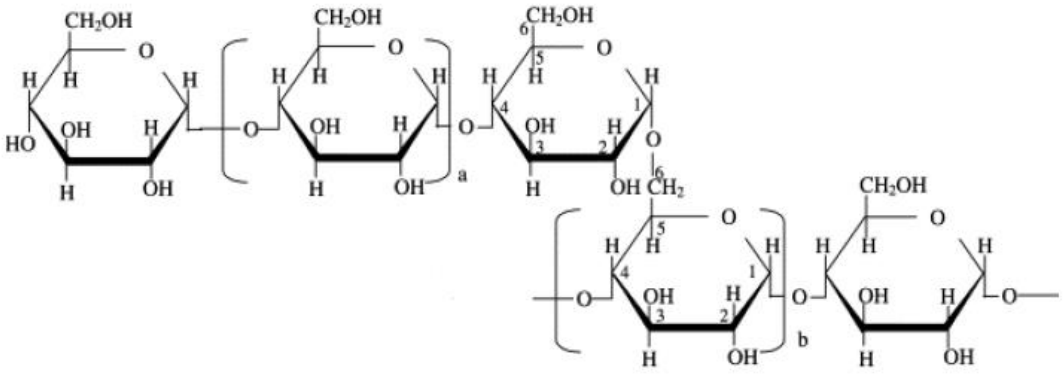
O amido é um dos polissacarídeos mais importantes e a reserva de carboidratos mais abundante nas plantas, sendo encontrado em folhas, flores, frutas, sementes, diferentes tipos de hastes e raízes. Além disso, ele tem ampla aplicação na indústria alimentícia, cosméticos, papel, têxteis, como agentes de adesivo, espessamento, estabilização, endurecimento e gelificação. Ele é também a fonte mais importante de carboidratos na alimentação humana, representando 80% a 90% de todos os polissacarídeos da dieta (WHO/FAO, 1998; ALCÁZAR-ALAY; MEIRELES, 2015; TAKO, 2014). O amido é formado por dois polímeros: amilose e amilopectina (ROBYT, 1998). A amilose é formada por uma cadeia linear de α-1,4 glucanos (Fig. 1a), enquanto a amilopectina consiste em cadeias lineares ligadas unidades de glicose por ligações glicosídicas α-1,4 e é altamente ramificada nas posições α-1,6 por pequenas cadeias de glicose (Fig. 1b; DENARDIN et al. 2009; TESTER et al. 2004).

Figura 1. Estrutura da amilose (a) e da amilopectina (b)

a)



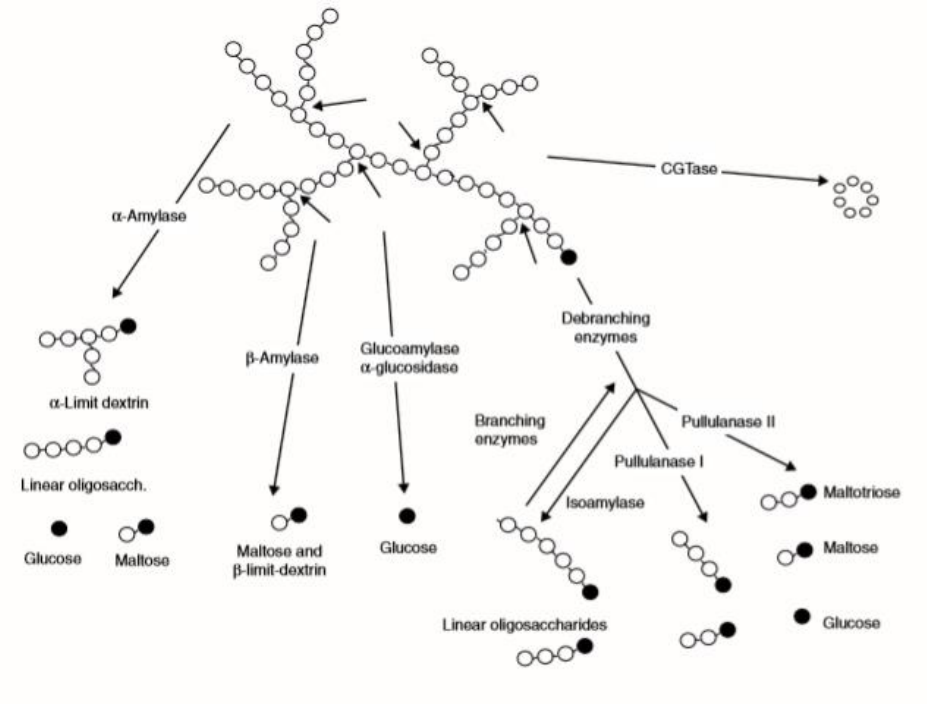
b)



Fonte: TESTER et al. 2004.

A hidrólise do amido pode ser ácida ou enzimática, inicialmente, a degradação do amido ocorria utilizando ácidos minerais, mas a aplicação de biocatalisadores em processos químicos conduziu ao uso das enzimas, em substituição às substâncias químicas. Entre diversas enzimas que atuam no amido (Fig. 2), entre elas, a ciclodextrina glucanotransferase (CGTase) vem ganhando grande importância industrial, por converter o amido e formar ciclodextrinas (CDs) como produto final (BENDER, 1986).

Figura 2. Representação esquemática da ação das enzimas envolvidas na degradação do amido.



Fonte: BERTOLDO; ANTRANIKIAN, 2002, modificado.

Várias bactérias utilizam o amido como única e/ou principal fonte de carbono para o crescimento e produzir CGTase, que degrada o amido em CDs. Estudos mostraram evidências de que as CDs são transportadas para o citoplasma através de um sistema e que eles são hidrolisados dentro da célula por uma CDase para formar malto-oligossacarídeos lineares para serem usados como fonte de energia (KAULPIBOON; PONGSAWASDI, 2005).

2.2 CICLOMALTODEXTRINA GLUCANOTRANSFERASE (CGTase)

A ciclomaltodextrina glucanotransferase (CGTase; EC. 2.4.1.19), é um membro da familia α-amilase ou família 13 das glicosil hidrolases. Este grupo atua sobre as ligações α-glicosídicas e hidrolisam esta ligação produzindo mono

ou oligossacarídeos formando ligações α-1,4 ou ligações α-1,6 por transglicosilação, possuem estrutura $(\beta/\alpha)_8$ e possuem regiões altamente conservadas na sequência primária (VAN DER KAAIJ et al., 2007). A CGTase possui cadeia de polipeptídeos composta por 650 aminoácidos, apresentando uma massa molecular entre 75-79 kDa com ausência de ligações intramoleculares de pontes de dissulfeto (MATIOLI; MORAES; ZANIN; 2000a). A natureza amilolítica da enzima a torna a única capaz de converter o amido em uma mistura de açúcares não redutores, as ciclodextrinas, além de açúcares e dextrinas lineares (GASTÓN et al. 2012). A formação de ciclodextrinas ocorre pela reação de ciclização (RATHER et al. 2015; HAN et al. 2014; SIAN et al. 2005).

2.2.1 Mecanismos de ação da CGTase

A CGTase é responsável por catalisar reações de transglicosilações inter e intramoleculares da α-1,4 glucana, hidrolítica e de desproporcionação. A transglicosilação intermolecular ou reação de acoplamento, consiste na abertura do anel da CD, com transferência de maltooligossacarídeos produzidos para moléculas receptoras, esta reação ocorre somente em presença de CDs e co-substratos promovendo uma competição entre eles (Fig. 3). A reação de desproporcionalização ocorre quando o substrato apresenta uma massa molecular inferior a seis unidades de glicose e superior à maltose, a CGTase é capaz de sintetizar oligômeros de maior massa molecular até superior a seis unidades de glicose. As ciclodextrinas são formadas a partir da reação de transglicosilação intramolecular ou ciclização, que utiliza o amido como único substrato. Nessa reação (Figura 3), a extremidade não redutora da molécula atua

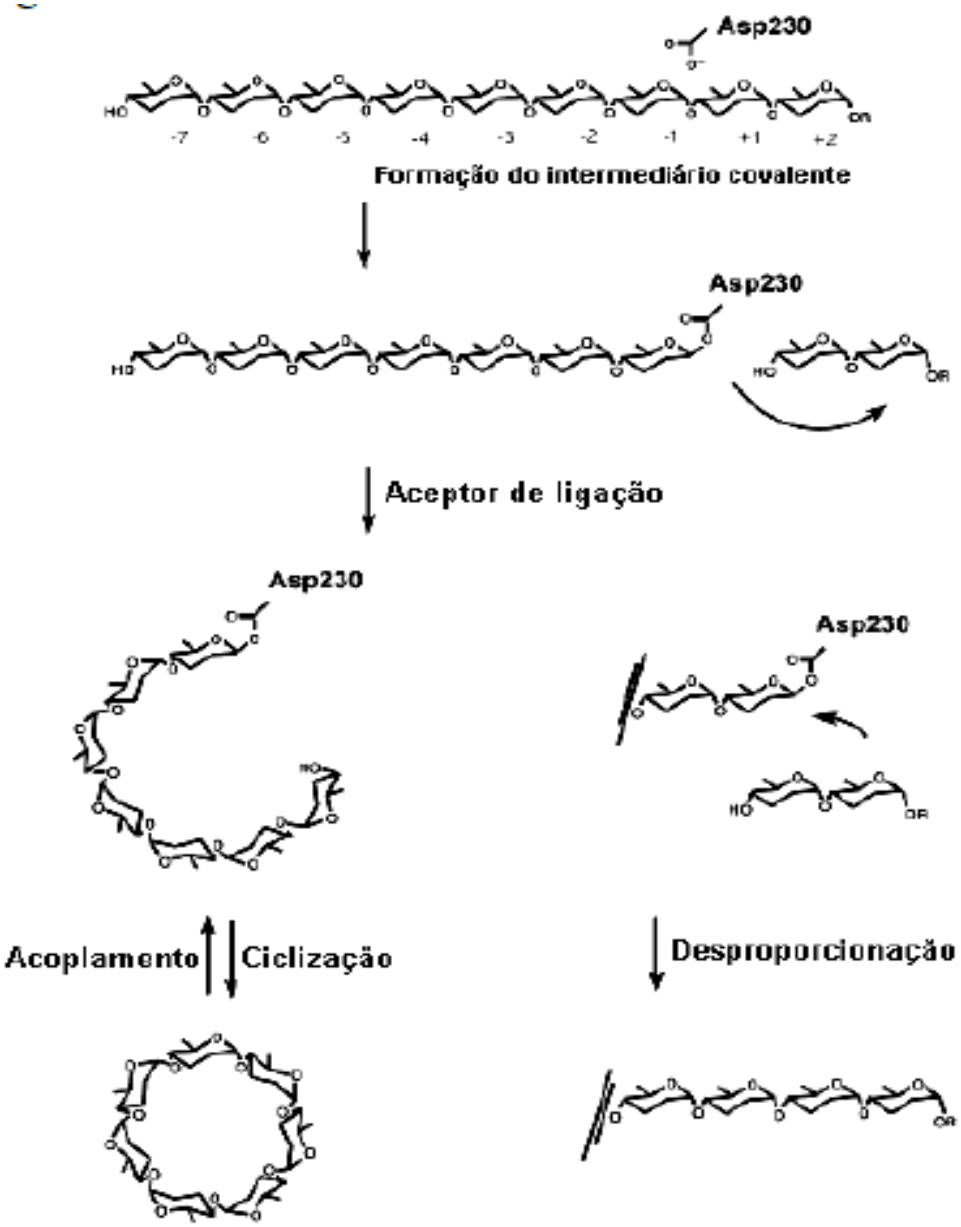
como receptor para a extremidade redutora (BENDER, 1986; ABELYAN et al. 1995; UITDEHAAG, et al. 1999; VAN DE VEEN et al. 2000).

O mecanismo catalítico da CGTase é composto de um número de subsítios de ligação de açúcar, resultante da cadeia de aminoácidos localizada entre os *loops* das fitas β- e α-hélice do domínio catalítico. Cada um desses subsítios interage com uma unidade de glicose proveniente do substrato, por ligações de hidrogênio com grupos OH da glicose ou por interações hidrofóbicas (LEEMHUIS et al. 2003). De acordo com sua localização os subsítios podem ser (i) doador (-1, -2,...) determinando o comprimento da cadeia de açúcar do intermediário covalente ou (ii) receptor (+1, +2,...) determinando qual será a molécula receptora. Assim, a clivagem da cadeia de açúcar ocorre entre os subsítios +1 e -1. O número e constituição dos subsítios são também responsáveis pelas diferenças na especificidade ao produto da enzima e tem sido usado como ferramenta para mudanças na especificidade ao produtor em proteínas engenheiradas (VAN DER VEEN et al. 2000; LEEMHUIS et al. 2003).

O glicosil intermediário é transferido para o 4-hidroxil da sua extremidade não redutora formando uma ligação nova de α-1,4-glucana para produzir um produto cíclico (ciclodextrina).

A CGTase pode produzir um produto linear pela transferência do glicosil intermediário para um segundo α -glucano (desproporção) ou a água (hidrólise), a enzima também pode abrir o anel de CD e transferir a molécula linearizada para uma molécula receptora de açúcar para produzir um oligossacarídeo linear por meio da reação de acoplamento. (LEEMHUIS; KELLY; DIJKHUIZEN, 2010).

Figura 3. Representação do mecanismo de ação da CGTase.



Fonte: LEEMHUIS et al. 2003.

2.3 Produção de CGTase

A CGTase é uma enzima produzida extracelularmente por diversos microrganismos sendo eles alcalofílicos, mesofílicos ou termofílicos, principalmente do gênero *Bacillus,* sua obtenção se dá por fermentação submersa, entre eles *Bacillus cereus* (JAMUNA et al. 1993), *Bacillus circulans*

(SALVA; LIMA; PAGAN, 1997; PONGSAWASDI; YAGISAWA, 1987), *Bacillus* sp (MENOCI et al. 2008; ATANASOVA et al. 2008; ALVES-PRADO et al. 2002*),* *Bacillus macerans* (SHIRAISHI et al. 1989; TILDEN et al. 1942), *Bacillus stearothermophilus* linhagens 2/2, R2 e HR1 (FUJIWARA et al. 1992), *Bacillus* alkalophilic (MORIWAKI et al. 2014; ATANASOVA et al. 2008), *Bacillus licheniformis* (BONILHA et al. 2006), *Bacillus lentus* (SABIONI; PARK, 1992), *Bacillus firmus* (MORIWAKI et al. 2007; GAWANDE et al. 1999), *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 (ALVES-PRADO, 2000) *Bacillus* sp G1 (SIAN et al. 2005) e *Bacillus sphaericus* (MORIWAKI et al. 2009), *Paenibacillus campinasensis* (ALVES-PRADO et al. 2006), embora *Klebsiella pneumoniae* (BENDER, 1977), *Klebiella oxytoca* (LEE et al. 1992); bactérias anaeróbias termofílicas *Thermoanaerobacter* sp (STARNES, 1990) e actinomicetos como *Thermoactinomyces* sp (ABELYAN et al. 1995) sejam também, fontes de CGTase. Até o momento, nenhuma linhagem de fungo ou levedura foram descritas como produtores de CGTase. O gênero *Paenibacillus* é amplamente distribuído no ambiente, algumas das espécies foram isolados do solo (LEE et al. 2013, GARBEVA et al. 2003; ALVES-PRADO, 2000), água (ROSS et al. 2001), e associadas a raízes de plantas (GRADY et al. 2016). Originalmente as espécies de *Paenibacillus* foram incluídas no gênero *Bacillus*, que foi definido com base em características morfológicas em comum com a espécie *Bacillus subtilis,* isolada em 1872 (GRADY et al. 2016). A linhagem bacteriana *Paenibacillus campinasensis* H69-3 foi identificada de acordo com comparações e correlação da sequência 16S rDNA com as características fisiológicas deste isolado. Esta linhagem apresenta células em forma de bastonete e coloração Gram é variável, as células Gram-positivas foram somente observadas na fase

inicial de crescimento, e após 50 horas, eram visíveis apenas bastonetes Gram-negativos. É um microrganismo anaeróbico facultativo, é catalase positivo e capaz de reduzir de nitrito à nitrato, além de ser negativo para a reação da oxidase (ALVES-PRADO et al. 2007b).

Segundo FRENCH (1957), o primeiro microrganismo descrito na literatura como produtor de CGTase, foi o *Bacillus amylobacter* (*Clostridium butyricum*) estudado por Villers em 1891, que produzia compostos cristalinos a partir do amido, os quais foram chamados de “celulosina” devido sua aparência com a celulose. Em 1939, Tilden e Hudson estudaram a CGTase de *Bacillus macerans* (*Aerobacillus macerans*) isolado por Schardinger em 1904, e comprovaram que as CDs não eram produtos sintetizados durante o metabolismo microbiano, e sim, o resultado da ação de uma enzima extracelular produzida pelo microrganismo, a qual hidrolisava o amido e compostos relacionados. Tilden e Hudson, estudaram 11 linhagens de *Bacillus macerans*, e concluíram que todas elas produziam uma amilase capaz de converter amido em dextrinas cristalinas de Schardinger. A enzima mostrou-se relativamente estável ao calor, sendo que a inativação ocorreu após 1 hora a 50 °C. A maior atividade foi apresentada entre pH 5,0-6,0, a 40 °C (TILDEN; HUDSON, 1939). Após estudos de Tilden; Hudson, em 1942, muitos pesquisadores voltaram seus estudos para a produção de microrganismos produtores de CGTase.

A maioria das CGTases produzidas por bactérias formam β-ciclodextrina como produto principal em uma mistura de outros CDs em diferentes proporções. Poucas CGTases foram reportadas para produzir α-e γ-ciclodextrinas como seu principal produto, juntamente com outros CDs (MORI et al. 1994).

2.4 Purificação de CGTases

Enzimas são responsáveis por catalisar reações específicas em sistemas biológicos, elas participam das reações químicas diminuindo significativamente o tempo de reação, apresentam elevada seletividade, são biodegradáveis, funcionam em condições suaves de reação, não liberam produtos indesejáveis, podem ser modificadas geneticamente, e reutilizadas se imobilizadas. Para a separação das proteínas são utilizadas propriedades como carga elétrica, solubilidade e tamanho. Para a purificação de CGTases uma das estratégicas utilizadas é a adsorção de amido, gel filtração, troca iônica e afinidade (HERMES, 2010; SAVERGAVE et al. 2008).

Tabela 1. Técnicas de purificação de CGTases.

Microrganismo	Estratégias de Purificação	Rendimento (%)	Fator de Purificação	Referência
***Bacillus* sp *alcalofílico* G1**	Precipitação Salina $(NH_4)_2SO_4$ (Sulfato de amônio), Afinidade (Sepharose 6B)	39,57 e 4,18	5,0 e 2238,59	(SIAN et al., 2005)
***Thermoanaerobacter* sp. P4**	Precipitação salina $(NH_4)_2SO_4$ (Sulfato de amônio); Afinidade (Sepharose 6B)	25,8 e 17,7	21,37 e 141	(AVCI et al., 2012)
Bacillus lehensis	Precipitação com solvente (Acetona) 50%; Exclusão molecular (Sephadex G-100); Troca iônica (DEAE-Cellulose);	46,6, 24 e 7,7	5,2, 38 e 274	(ELBAZ; SOBHI; ELMEKAWY, 2015)

Fonte: Autoria própria

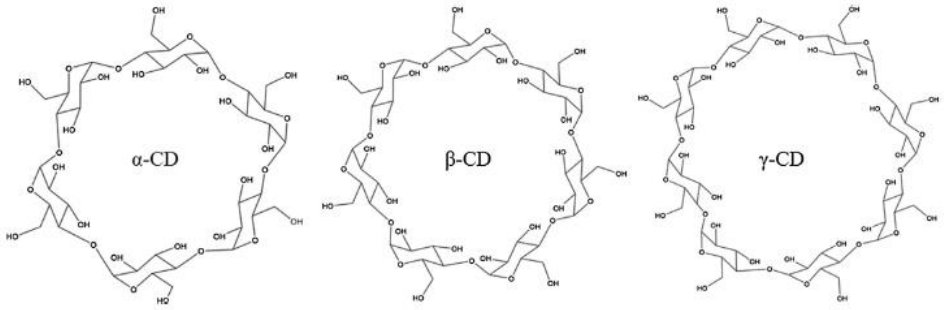
O uso da cromatografia de afinidade bioespecífica na purificação da enzima tem como base a formação de um complexo seletivo e reversível entre

a proteína e o ligante, que pode ser α-, β- ou γ-CD. Essa afinidade entre a molécula de interesse e o ligante, ocorre devido ao reconhecimento molecular entre as duas moléculas. Ligantes bioespecíficos apresentam grau de pureza elevado e consequentemente uma elevada especificidade, proporcionando uma rápida separação, em etapa única, podendo aumentar o rendimento da proteína, devido à proteção contra a desnaturação pela estabilização da estrutura terciária. (BERNA, 1990).

2.5 CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos formados por unidades de glicose ligadas por ligações α-D-1,4. Ciclodextrinas mais comuns são α-CD, β-CD e γ-CD, com seis, sete e oito unidades de glicose, respectivamente (Fig. 4; MORIWAKI et al. 2014; SCHÖFFER et al. 2013; GOH et al. 2009; VENTURINI et al. 2008; ; DEL VALLE et al. 2004; SZEJTLI, 1998; BENDER, 1986), porém é possível encontrar oligossacarídeos cíclicos maiores (δ-, ε-, ζ-, η- e θ-CD) presentes na mistura de reação (FRENCH et al. 1965).

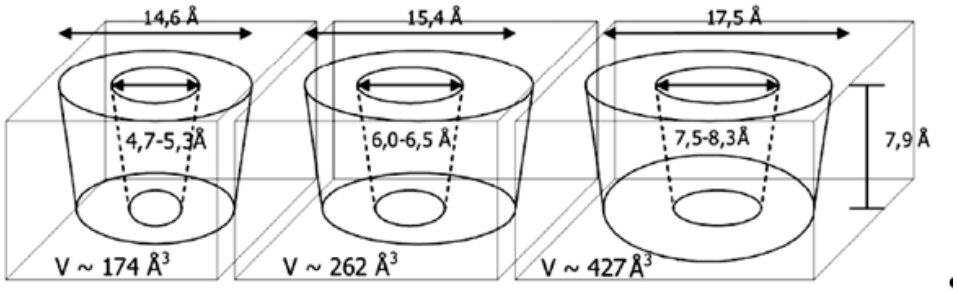
Figura 4. Estrutura molecular das α-, β-, γ-ciclodextrinas



Fonte: LIMA et al. 2016, adaptado de PINHO et al. 2014.

A profundidade da cavidade das CDs apresentam aproximadamente 7,5 Â, porém a largura é determinada por uma unidade de glicose, o tamanho de suas cavidades diferem no diâmetro (α-CD cerca de 5,0 Å; β-CD cerca de 7,0 Å e δ-CD cerca de 9,0 Å; CONNORS et al. 1997). As CDs têm o formato de um “cone truncado” (Fig. 5), que apresenta uma cavidade interior hidrofóbica e uma superfície externa hidrofílica, essa estrutura permite a formação de complexos de inclusão com substâncias altamente hidrofóbicas como hóspede (PINHO et al. 2014), enquanto a superfície externa é hidrofílica, o que torna os CDs solúveis em água. Isso ocorre devido ao arranjo das unidades de glicose (LI et al. 2007; SZEJTLI, 1982).

Figura 5. Representação estrutural das principais CDs.



Fonte: VENTURINI et al. 2008, adaptada.

Devido à sua estrutura, as moléculas de CDs têm a capacidade de formar complexos de inclusão com uma variedade de compostos, (ROJAS et al. 2015; PISHTIYSKI; ZHEKOVA et al. 2006). A natureza hidrofóbica da cavidade dos CDs confere uma capacidade forte para encapsular uma grande quantidade de moléculas inorgânicas, formando complexos de inclusão estáveis com as moléculas encapsuladas. Os complexos de inclusão modificam propriedades fisico-químicas da molécula hóspede, aumentando sua estabilidade e

solubilidade, além de não apresentarem toxicidade e serem biocompativeis e são aprovados pela FDA (Food and Drug Administration; PINHO et al. 2014). Essas qualidades permitem, a utilização das CDs e seus derivados em diversas áreas, indústria alimentícia (ASTRAY et al. 2009; ASTRAY et al. 2010), farmacêutica (IJAZ et al. 2015; LOFTSSON et al. 2007), remediação do solo (CHO et al. 2015).

2.6 PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS

Atualmente, tem-se tido um maior interesse em novas técnicas ou o aperfeiçoamento das já existentes para a produção de CDs, visando o aumento da produção, tendo em vista a importância da comercialização de produtos empregando as CDs no mercado.

Inicialmente, dois processos eram utilizados para a obtenção das CDs comercialmente, um com a presença de solvente complexante e outro com ausência de solvente. Em ambos os métodos, o amido era parcialmente hidrolisado na presença da enzima α-amilase, o que diminui a viscosidade da solução e evitava retrogradação (MALDONADO; LÓPEZ, 1995; BENDER, 1986). No método com presença de solvente, há um complexante específico para cada CD, sendo o 1-decanol, o ciclooctano e o ciclodecanona para α-CD, β-CD e para γ-CD, respectivamente. A separação da CD complexada é feita por centrifugação ou filtração, e a remoção do complexante ocorre por destilação e em seguida a CD é cristalizada. O método sem solvente, somente a CGTase é adicionada (MALDONADO; LÓPEZ, 1995; STARNES, 1990). Com a ausência dos solventes no meio de reação, é necessário cuidados com esterilização e assepsia, pois o crescimento de microrganismos pode levar à contaminação do produto final. Estudos têm sido feitos com a adição de etanol no meio de

hidrólise, que impedirá a contaminação durante o processo de hidrólise, além de atuar eliminando as moléculas de água do centro ativo da enzima, evitando reações hidrolíticas, retardando a degradação das ciclodextrinas produzidas, consequentemente aumentando o seu rendimento (FENELON, et al. 2015; CALSAVARA et al. 2011).

Devido a ser a mais produzida pelos microrganismos, a β-CD é a mais comercializada, dessa forma o custo da β-CD é menor que as demais CDs. Um grama das CDs podem ser encontradas por R$ 23,84, R$275,00 e R$ 2,865.00 para β-CD, α-CD e γ-CD, respectivamente (SIGMA-ALDRICH). Além disso, CDs têm sido modificadas como por exemplo a hidroxipropil-β-CD e a maltosil-β-CD. Devido as características das CDs e sua aplicação industrial em diversas áreas, muitos pesquisadores pelo mundo tem estudado a produção de CDs. A composição das CDs produzidas pela conversão do amido pela CGTase é determinada pela fonte microbiana utilizada, fator importante que pode aumentar o rendimento e a especificidade, porém pode ser manipulada através da adição de complexantes ou solventes orgânicos (WANG et al. 2013; BIWER et al. 2002).

A CGTase produzida por *Bacillus autolyticus* 11149 apresentou melhoras na produção de β-CD quando adicionou 4% (m/v) de triton X-100 à solução de amido de batata 10% (p/v) onde obtiveram 56% de conversão. A produção de α- e γ-CDs foi muito baixa, sendo menor que 1% (TOMITA et al. 1993).

MORI et al (1994) estudaram a produção de CDs a partir da CGTase produzida por *Brevibacterium* sp nº 9605, em diferentes tipos de substrato e obtiveram melhores rendimentos com amido de milho waxy Lintener's solúvel com 36,1% de conversão em % de α:β:γ igual a 1,1:14,7:20,3; e com amilopectina (milho) obtendo 35,4% de conversão em % de α:β:γ igual a

0,9:13,7:20,8. Estudando a mesma CGTase observaram que a produção de CD foi variável com as condições de reação como temperatura, pH, presença ou ausência de $CaCl_2$ e concentração de etanol. Em solução de amido solúvel 1% (p/v) a 50°C, pH 7,0, com 5mmol L^{-1} de $CaCl_2$ houve conversão de 38,7% em CDs com % de α:β:γ igual a 1,8:13,3:23,6 (MORI et al 1995).

MARÉCHAL et al (1996) observaram que em solução de amido solúvel 5% (p/v) a conversão foi de 36% em α:β:γ -CDs na proporção de 1:0,9:04, utilizando a CGTase produzida por *Bacillus circulans* DF 9 tipo R.

RENDLEMAN Jr. (1996) observou melhoras significativas no rendimento de α-, β- e γ-CD utilizando a CGTase de *Bacillus macerans* associada a complexantes específicos e uma enzima desramificante.

YAMAMOTO; ZHANG; KOBAYASHI (2000) observaram que grânulos intactos de amido de batata foram degradados pela ação da CGTase produzida por *Bacillus macerans*. Os autores estudaram ainda, os efeitos de pH, temperatura, concentração de substrato e quantidade de enzima para determinar as melhores condições para a produção de CDs.

Estudos na produção de ciclodextrinas com o *Bacillus megaterium* em diferentes substratos (amidos, dextrinas, amilose e amilopectina), os amidos resultaram nas melhores fontes para a conversão em ciclodextrinas, porém, o amido de milho foi o que apresentou o melhor rendimento, apresentando produção de 50,9% de ciclodextrinas (PISHTIYSKI; ZHEKOVA, 2006). Em estudo posterior, ZHEKOVA et al. (2009) tiveram preferencialmente a produção de β-CD, a partir da hidrólise com CGTase produzida por *Bacillus megaterium,* o produto de ciclodextrinas isolado continha 75-79% de β-CD e 4,0 % de α-CD e 6,0 % γ-CD.

Estudos para melhor rendimento na produção de β-CD, utilizando diferentes fontes de amido, obteve-se melhores resultados com *Bacillus firmus* cepa 7B com o amido de milho como substrato (MORIWAKI et al. 2007). Segundo CALSAVARA et al. (2011), também utilizando o amido de milho comercial Maizena® como substrato na presença de 10,0% de etanol, obtiveram como a produção mais alta de α-CD, 32,92 mmol L^{-1}, β-CD foi de 21,96 mmol L^{-1} e γ-CD foi de 3,98 mmol L^{-1}, após 12 h de hidrólise em lotes sequenciais. Ensaios realizados em um sistema de ultrafiltração, utilizando amido de milho comercial e maltodextrina, na presença e ausência de etanol, conseguiram resultados satisfatórios na produção de β-ciclodextrina. No ensaio utilizando amido de milho comercial com 5,0% de concentração e 10,0% de etanol obtiveram 0,43 mmol L^{-1} h^{-1}, de β-ciclodextrina, sendo 12% maior em relação ao ensaio sem etanol utilizando extrato enzimático bruto e semi-purificado (FENELON et al. 2015).

2.7 APLICAÇÃO DAS CICLODEXTRINAS

Devido a capacidade de formar complexos de inclusão, isso favoreceu a aplicação das ciclodextrinas em diversas áreas da indústria, como a de alimentos, químicas, farmacêuticas e cosméticas. Esse fenômeno permite a encapsulação de compostos sólidos, líquidos e gasosos, e a modificação das propriedades físicas e/ou químicas das substâncias encapsuladas. Essas modificações abrangem melhorar a solubilidade de drogas insolúveis, melhorar a estabilidade, proteger o produto contra a oxidação, reações induzidas pela luz e temperatura, liberação de fármacos de liberação controlada e aumento da biodisponibilidade, mascar odor e sabor de drogas desagradáveis, resolução óptica de misturas racêmicas e mudanças das propriedades reológicas

(corantes, fármacos) (SZENTE; SZEMÁN; SOHAJDA, 2016; ALVES-PRADO, 2002; SZEJTLI, 1997).

2.7.1 Indústria de Alimentos

Na indústria de alimentos as CDs são aplicadas tanto no processamento dos alimentos como aditivos afim de: proteger componentes de alimentos lipofílicos sensíveis ao oxigênio e à luz ou degradação induzida pelo calor; para solubilizar corantes alimentares e vitaminas; para estabilizar fragrâncias, sabores, vitaminas e óleos contra mudanças indesejadas; eliminar odores ou sabores desagradáveis; e alcançar uma liberação controlada de certos constituintes em alimentos (ASTRAY et al. 2010). Devido a isso não devemos esquecer que o sabor desempenha um papel importante na aceitação do produto para o consumidor final (SAINT-EVE et al. 2006). Processos de fabricação, armazenamento e os ingredientes dos alimentos muitas vezes causam modificações no sabor, produzindo componentes não desejáveis (LUBBERS et al. 1998). Para reduzir a degradação ou perda do aroma durante o processamento e/ou armazenamento, tem sido utilizada a encapsulação de ingredientes voláteis com as CDs antes da utilização dos mesmos em alimentos e bebidas. A β-CD ao ser usada como estabilizador ou espessante, pode reter alguns compostos de aroma em matrizes alimentares durante processos térmicos. Na indústria de alimentos as CDs têm sido aplicadas para melhorar a retenção de sabor em alimentos processados termicamente, para melhorar a cor e/ou aroma de diferentes sucos de frutas (ASTRAY et al. 2009), ou em embalagens de alimentos para reter os compostos indesejáveis (LÓPEZ-DE-DICASTILLO et al. 2010; ARIAS et al. 2007). Óleos essenciais podem ser

microencapsulados com β-CD e utilizados na gastronomia, afim de melhorar as propriedades sensoriais de alimentos (GARCÍA-SEGOVIA et al. 2011).

Estudos mostraram a utilização de α-ciclodextrina como suplementação, sem mudança na alimentação e por dois meses, obteve-se como resultado à perda significativa de peso em indivíduos não-obesos, uma vez que o complexo α-ciclodextrina em gordura não é acessível para a microbiota intestinal humana e normalmente são eliminados nas fezes, não ocasionando efeitos colaterais gastrointestinais associados à produtos para perda de peso que promovem a má absorção de gordura (COMERFORD et al. 2011).

2.7.2 Indústria farmacêutica

Na indústria farmacêutica, as CDs são utilizadas como veículos de fármacos para melhorar a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade das moléculas bioativas, elas podem ser encontradas através de comprimidos, soluções parenterais, colírios, pomadas e supositórios (OLIVEIRA et al. 2015). As CDs naturais e modificadas foram estudadas e algumas tiveram aprovação da *Food and Drug Administration* (FDA) ou foram classificadas como sendo "geralmente reconhecidos como seguros" (GRAS) (LAKKAKULA; MACEDO KRAUSE, 2014).

Em adição à melhoria da solubilização, CDs protegem as moléculas bioativas de efeitos secundários em relação às condições ambientais (temperatura, pH, luz) e, consequentemente, aumentam a sua vida de prateleira e reduzem as concentrações do agente necessária para alcançar um efeito biológico. As CDs podem aumentar a biodisponibilidade de drogas insolúveis, aumentando a solubilidade da droga, podem também aumentar a

permeabilidade de fármacos hidrofóbicos insolúveis, tornando o medicamento disponível para a superfície da barreira biológica como por exemplo, a pele e a mucosa, nesses casos, é importante o uso de CDs suficiente para solubilizar o fármaco no veículo aquoso uma vez que seu excesso pode diminuir a disponibilidade da droga (VADHANAM et al. 2013). Em estudos, PEREVA et al. 2016, teve o objetivo de desenvolver um método modificado para a formação de complexo de inclusão de ibuprofeno/β-CD (IBU/β-CD) e comparar sua eficiência com métodos sintéticos, afim de melhorar a solubilidade do produto e controlar o tamanho das partículas, e ao fim dos estudos tiveram a importante descoberta, de que cada molécula do composto encapsulado substituiu todas as 7 moléculas de água, que inicialmente ocupavam a cavidade β-CD. A complexação tem como ação prolongar e/ou aumentar a duração e intensidade dos efeitos de fármacos, além de proporcionar uma maior liberação através das membranas biológicas (YALLAPU; JAGGI; CHAUHAN, 2010).

2.7.3 Indústria Têxtil

A introdução de novos auxiliares na indústria têxtil são viáveis quando usados em baixas concentrações, são biodegradáveis e não prejudicam a qualidade do efluente. Além de serem biodegradáveis, não ocasionando problemas nos efluentes têxteis, as CDs melhoram a biodegradabilidade de muitas substâncias orgânicas tóxicas.

As CDs podem ser utilizadas complexadas com detergentes, para melhorar a eficiência dessas moléculas, removendo agentes ativos retidos na fibra e reduzir a quantidade de água no processo de lavagem, e podem formar complexos com corantes usados no tingimento (CIRELI; YURDAKUL, 2006; KNITTEL et al. 2005). Para o processo de tingimento, um composto derivado,

β-CD-monoclorotriazinil (MCT) muito utilizado, pois apresenta baixa afinidade pelas fibras celulósicas, sendo impossível a sua aplicação em altas temperaturas, como é feito no tingimento utilizando corantes reativos, nesta situação o grupo reativo da ciclodextrina irá reagir com a água e não com a fibra têxtil (ANDREAUS et al. 2010; ALVES-PRADO, 2000).

Estudos foram feitos avaliando fixação e liberação controlada de fragrâncias pelos tecidos que receberam acabamentos com diferentes CDs com APC (Ácidos policarboxílicos). Como resultados, os tecidos que modificados com CDs conseguiram absorver (reter/fixar) mais destas substâncias do que tecidos não modificados, tendo a liberação de aromas retardada, a maior eficiência foi vista na γ-CD (MARTEL et al. 2002).

3. OBJETIVOS

Este estudo teve como proposta a caracterização bioquímica, estudos dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

A linhagem bacteriana *Paenibacillus campinasensis* H69-3, foi isolada do solo com cultura de mandioca na UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto, avaliada em estudos anteriores (ALVES-PRADO, 2000; 2006; 2007) e mantida na coleção de trabalho do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada,

UNESP-IBILCE, Campus de São José do Rio Preto. O estoque foi armazenado em meio alcalino de produção descrito por NAKAMURA; HORIKOSHI (1976) e otimizado por (ALVES-PRADO, 2000): 1,35% de amido solúvel; 0,49% de peptona; 0,59% de extrato de levedura; 0,1% de K_2HPO_4; 1,25% de Na_2CO_3 (*) pH 10,0, (*) Esterilizado separadamente e adicionado ao meio após atingir a temperatura de 60 ºC, contendo 20% de glicerol a -80 ºC.

A linhagem foi reativada em meio alcalino de produção (NAKAMURA; HORIKOSHI, 1976, otimizado por ALVES-PRADO, 2000) e posteriormente repicada em meio seletivo (PONGSAWASDI; YAGISAWA, 1987), quanto a produção de halo característico para CGTase. As colônias positivas para CGTase foram mantidas em meio alcalino inclinado (NAKAMURA; HORIKOSHI, 1976) para os estudos subsequentes.

4.2. Meios de cultura

4.2.1. Meio de seleção

Para a seleção de microrganismo produtor de CGTase foi utilizado o meio de cultura alcalofílico descrito por PARK et al (1989), composto de 10,0 g L^{-1} de amido solúvel; 5,0 g L^{-1} de peptona; 5,0 g L^{-1} de extrato de levedura; 1,0 g L^{-1} de K_2HPO_4; 0,2 g L^{-1} de $MgSO_4.7H_20$; 5,0 g L^{-1} de Na_2CO_3*; 0,03 g L^{-1} de fenolftaleína; 0,1 g L^{-1} de alaranjado de metila; 15,0 g L^{-1} de ágar; pH 10,0. (*) Esterilizado separadamente e adicionado ao meio após atingir a temperatura de 60 ºC. Esse meio apresenta a coloração vermelha, e caso haja a produção de CGTase pelo microrganismo, ocorre a formação de um halo amarelo, contrastante com o meio vermelho, devido à formação de ciclodextrinas que se

complexou com a fenolftaleína. As placas foram incubadas a 45 °C, até a formação do halo. As colônias, CGTase positivas (formação do halo), foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de manutenção e armazenadas para os ensaios de produção.

4.2.2 Meio de produção

Para a produção de CGTase, foi utilizado o meio nutriente alcalino descrito por NAKAMURA; HORIKOSHI (1976) e otimizado por ALVES-PRADO (2000): 1,35% de amido solúvel; 0,49% de peptona; 0,59% de extrato de levedura; 0,1% de K_2HPO_4; 1,25% de Na_2CO_3 (*) pH 10,0. A linhagem foi cultivada em Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de meio de produção.

4.2.3 Meio de manutenção

O meio de manutenção utilizado foi o mesmo que o meio de produção como descrito por NAKAMURA; HORIKOSHI (1976), otimizado por ALVES-PRADO, (2000) acrescido de 20,0 g L-1 de ágar.

4.3 Estudo da produção enzimática

4.3.1 Pré inóculo

O pré inóculo foi preparado com 20 mL de meio de produção, para o qual foi transferida, com o auxílio de uma alça de inoculação, toda a massa celular de um tubo de ensaio. A fermentação foi feita em Erlenmeyer de 125 mL, com agitação de 150 rpm, a 45 ºC por 24 horas.

4.3.2 Estudo do efeito da fonte de carbono

Com o intuito de aperfeiçoar a produção do *P. campinasensis* H69-3 visando o aproveitamento das fontes de carbono alternativas ou que possam diminuir o custo de produção, o microrganismo foi submetido a ensaios de produção de ciclodextrinas, sob fermentação submersa utilizando diferentes substratos como fonte de carbono alternativa ao amido solúvel. As fontes de carbono analisadas foram: amido de milho comercial (Maizena®), amido solúvel (Mallinckrodt), e amido de mandioca obtido por extração manual. O ensaio ocorreu em duplicata em frasco de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de meio de produção contendo 0,5% de extrato de levedura; 0,5% de peptona; 0,1% de K_2HPO_4; 0,02%de Mg_2SO_4; 1,0% de fonte de carbono; 0,5% de Na_2CO_3 (autoclavado separadamente) e suplementado com 1,0% de farinha de soja integral tostada como fonte de proteína. Além disso, o perfil de produção enzimática foi analisado ao longo do tempo, até 96 horas com amostragens a cada 24 horas. A fermentação ocorreu a temperatura de 45°C e agitação de 100 ciclos por minuto durante 72 horas. O material fermentado foi centrifugado a 10.000x*g* por 10 minutos, mantidos posteriormente sob refrigeração de 4 ºC. O sobrenadante foi usado como solução enzimática para os ensaios de atividade enzimática.

4.3.3 Fermentação submersa e obtenção da CGTase

Para a obtenção da CGTase foi utilizado o processo de fermentação submersa. A linhagem *Paenibacillus campinasensis* H69-3 foi cultivada em meio alcalino contendo amido solúvel como fonte de carbono e 0,5% de Na_2CO_3, baseando-se em estudos de ALVES-PRADO et al. (2007). O material inoculado

foi incubado a 45 ºC, por 72 horas e sob agitação a 150 rpm. O material oriundo do crescimento bacteriano foi centrifugado a 10.000x*g*, por 10 minutos, sob refrigeração de 4 ºC e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta.

4.4 Determinação das atividades enzimáticas

4.4.1 *Atividade CD-fenolftaleína*

O ensaio de atividade CD-fenolftaleína adotado foi baseado na metodologia de MÄKELA et al. (1988), e modificado por ALVES-PRADO et al. (2007), no qual 20 µL de solução enzimática foi adicionada 160 µL de solução de maltodextrina a 1,0%, em tampão acetato 0,1 mol L^{-1}, pH 5,5. Após incubação por 5 minutos a 55 °C, a reação foi paralisada com a adição de 800 µL de solução de Na_2CO_3 0,25 M. Em seguida, foi acrescentado 20 µL de solução de fenolftaleína a 1 mM em 50% de etanol. O controle foi preparado conforme o processo descrito, recebendo a solução enzimática apenas no momento da leitura, e todo o ensaio foi realizado em triplicata. A absorbância foi determinada em 550 nm em espectrofotômetro. A unidade de atividade foi definida a partir de uma reta de regressão de concentração de β-CD (µmol), na presença de fenolftaleína, em função da absorbância, da qual resultou na seguinte equação:

Equação 1:

$$x = (y - 0{,}2224) / 0{,}0553$$

Onde: y = absorbância da amostra *

X = µmol de β-CD

*Absorbância da amostra = (Abs. do controle – Abs. da mistura de reação)

Uma unidade de atividade enzimática fenolftaleína, foi definida como a quantidade de enzima, necessária para produzir 1 µmol de β-ciclodextrina, por minuto e por mL de solução enzimática.

4.4.2 *Atividade Dextrinizante*

No ensaio de atividade dextrinizante proposto por FUWA (1954) e PONSAWASDI; YAGISAWA (1987) com algumas modificações, a mistura da reação é composta por 0,1 mL da solução enzimática, convenientemente diluída, adicionada a 0,3 mL de solução de amido solúvel a 0,5%, em tampão acetato 0,1 mol L^{-1}, pH 5,5. Após incubação a 55 °C, por 5 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 4,0 mL de solução de HCl 0,2 mol L^{-1}. Em seguida, a reação recebeu 0,5 mL de reativo de Iodo (0,30% de KI e 0,03% de I_2). A mistura de reação foi diluída com 10 mL de água destilada. O controle foi preparado conforme o processo descrito, substituindo-se a enzima pelo volume equivalente de enzima inativa. A absorbância foi determinada a 700 nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para reduzir em 10% a intensidade da cor azul do complexo Iodo-Amido por minuto e calculada segundo a equação:

Equação 2:

$$U = [(C\text{-}Abs) / C] \times 100 / 10 \times fd$$

Onde: U = unidade de atividade em U mL^{-1};

C = controle;

Abs = absorbância da amostra;

fd = fator de diluição.

4.5 Concentração de proteína

A proteína total foi determinada pelo método de Hartree-Lowry, usando soro albumina bovina como padrão (HARTREE, 1972). A absorbância foi determinada a 650 nm em espectrofotômetro.

4.6 Purificação da CGTase

4.6.1 Cromatografia de Afinidade Bioespecífica (CAB)

Para a purificação da CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 foi utilizada a cromatografia de afinidade bioespecífica (CAB) proposta por Moriwaki et al. (2009) com algumas modificações. A solução enzimática bruta foi submetida à cromatografia de afinidade bioespecífica em resina Epoxi – ativado Sepharose™ 6B (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia), pré-equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 mol L^{-1} (pH 8,0) em uma coluna de cromatografia líquida 1,0 x 20 cm (Pharmacia Biotech, Suécia).

4.6.1.1 Metodologia para aplicação da CAB e Purificação da CGTase Padrão

(i) Preparação do suporte

Para a preparação de 1,0 g de gel Epoxi – ativado Sepharose™ 6B seco foi lavado por 1 hora com 200 mL de água deionizada adicionando alternadamente, passando por membrana de 0,22 µm em sistema acoplado em bomba à vácuo.

Para 1,0 g de gel seco, colocou-se no Erlenmeyer NaOH 0,1 mol L^{-1} contendo 200 µmoles do ligante β-CD, a relação de gel:solução com ligante deve

ser de 1:2 (3,5 mL de gel:7,0 mL de solução de ligante) colocado em agitação a 16h/45ºC.

Após o término da ligação, o gel foi lavado com tampão/água para retirar o excesso de ligante. Para bloquear os grupos ativos remanescentes, o gel foi incubado por 4h/45 ºC sob agitação, em solução de etanolamina 1,0 mol L^{-1}, pH 8,0 na proporção de 1:4 (Fig. 6).

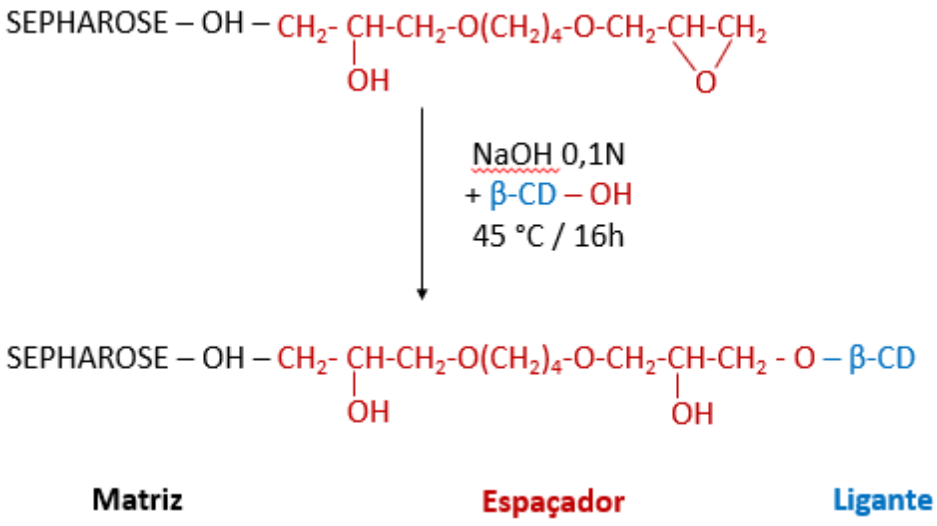
Após o tempo determinado, o gel foi lavado em 3 ciclos de sistemas tamponantes, com as seguintes soluções:

1º sistema – tampão acetato 0,1 mol L^{-1} contendo 0,5 mol L^{-1} NaCl em pH 4,0.

2º sistema – tampão Tris-HCl 0,1 mol L^{-1} contendo 0,5 mol L^{-1} NaCl em pH 8,0.

Após o término da lavagem do gel, o mesmo foi estocado em tampão Tris-HCl 0,1 mol L^{-1} e pH 8,0.

Figura 6. Esquema da preparação do suporte para cromatografia de afinidade bioespecífica (CAB).



Fonte: Moriwaki et al. 2009, com modificações.

(ii) Processo cromatográfico

Para todo o processo cromatográfico foi usado um fluxo de 48 mL h uma coluna de cromatografia líquida 1,0 x 20 cm (Ge Healthcare, Suécia). A coluna foi conectada em sistema de purificação AKTA (Ge Healthcare, Suécia) e um coletor de frações (Ge Healthcare Frac-100, Suécia).

(iii) Aplicação da amostra

Depois de equilibrar a coluna com tampão Tris-HCl 0,05 mol L^{-1} pH 8,0 e regular o fluxo em 0,8 mL min^{-1}, 1,0 mL de CGTase foi aplicada e a coluna foi lavada em tampão Tris-HCl 0,05 mol L^{-1} pH 8,0 com 2 a 3 volumes de coluna, e coletou-se 10 aliquotas de 1,0 mL. Em seguida o tampão foi substituído pela solução de eluição, ou seja, 10 mg mL^{-1} de β-CD em tampão Tris-HCl 0,05 mol L^{-1} pH 8,0 por 1 volume de coluna, sendo susbstituído por tampão Tris-HCl 0,05 mol L^{-1} pH 8,0 até completar 25 alíquotas coletadas.

(iv) Análise das alíquotas coletadas

Foram realizadas análises enzimáticas com todas as alíquotas pelo Método CD-fenolftaleína (item 4.1) e o Método Dextrinizante (item 4.2). As frações contendo CGTase purificada foram centrifugadas usando tubos Centricon® YM10 (Bioseparations Amicon, Millipore, Beldford, MA) membrana com corte de 10 kDa.

4.7 Determinação da massa molecular da proteína

A massa molecular da proteína pura em condições desnaturantes foi estimado por SDS-PAGE de acordo com LAEMMLI (1970). A SDS-PAGE foi realizada em gel homogêneo a 10,0% usando o aparelho de eletroforese Mini-Cell (BioRad Laboratórios, Richmond, CA). A revelação do gel foi realizada por coloração de prata, segundo o método de Blum (1987). A massa molecular da CGTase foi estimada em comparação com padrões de proteínas globulares de massa conhecida, através da confecção de um gráfico de Fischer (DENNISON, 2003) do logaritmo da massa molecular *vs* a migração relativa no gel (distância percorrida pela banda em relação à migração do azul de bromofenol, representando este a máxima migração).

4.8 Caracterização bioquímica da CGTase

A caracterização bioquímica do extrato enzimático purificado foi realizado quanto à temperatura e pH ótimo, temperatura e pH de estabilidade da enzima de interesse. A determinação da atividade enzimática foi realizada na solução enzimática purificada obtida pela cromatografia de afinidade bioespecífica (CAB), a qual foi armazenada sob refrigeração.

4.8.1 Determinação do tempo de incubação

Inicialmente, determinou-se o tempo de incubação da reação enzimática durante o qual seria obtida uma relação linear da liberação de produto em função do tempo. Para este ensaio, 160 µL de tampão acetato de sódio 0,1 mol L^{-1}, pH 5,5, acrescido de substrato (maltodextrina 1,0%, Sigma-Aldrich), foram misturados a um volume de 20 µL de solução enzimática. Em seguida, os tubos

foram colocados em banho a 55 °C, por diferentes períodos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 minutos). Após cada período de incubação analisado, a reação foi paralisada com a adição de 800 µL de solução de Na_2CO_3 0,25 mol L^{-1} seguido de solução de fenolftaleína 1,0 m mol L^{-1} em 50% de etanol. A absorbância foi medida a 550 nm usando leitor de microplaca em espectrofotômetro UV-VIS (Spectra max – PLUS 384®).

4.8.2 Determinação da temperatura ótima

O temperatura ótima da CGTase pura foi determinada incubando 20 µL de enzima com 160 µL de solução de maltodextrina 1,0% pré-aquecido, na faixa de temperatura entre 30 a 80 °C, variando intervalos de 5 °C. A paralisação da reação enzimática e leitura das placas ocorreram conforme descrito no item anterior. A atividade residual foi determinada pelo método CD-Fenolftaleína (item 4.1).

4.8.3 Determinação do pH ótimo

O pH ótimo da CGTase pura foi determinado utilizando tampão “Standard” McIlvaine (pH 2,5 a 8,0) e tampão Glicina-NaOH 0,1 mol L^{-1} (pH 8,0 a 11,0) sob a temperatura de 55 °C, temperatura ótima de atividade enzimática. O pH ideal foi onde a enzima exibiu a atividade máxima, que foi considerada 100% de atividade.

4. 8. 4 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da enzima foi determinada na ausência de substrato, onde 20µl da solução enzimática foi incubada nas temperaturas na faixa entre 30 a 80 °C em intervalos de 5 °C, por 60 minutos. Em seguida, os

tubos com a enzima foram colocados em banho de gelo por 30 minutos e mantidos 4 °C até o momento da análise, com o objetivo de deter o processo de desnaturação e permitir o re-enovelamento.

Seguiu-se a determinação da atividade residual através de ensaio enzimático nas condições ótimas de temperatura e pH. O mesmo ensaio foi realizado com a enzima incubada em temperaturas entre 30 a 80 °C na presença de $CaCl_2$ 1m mol L^{-1} e 5m mol L^{-1}. O controle para o cálculo da atividade residual foi obtido através da determinação da atividade enzimática de uma amostra que não foi exposta à incubação em diferentes temperaturas. Para o cálculo da atividade residual, utilizou-se a atividade inicial como referência.

4.8.5 Estabilidade em relação ao pH

Para o ensaio de estabilidade da enzima 0,2 mL da solução enzimática foram incubados em 0,4 mL de solução tampão em diferentes valores de pH por 24 horas (os tampões foram os mesmos descritos no item 4.8.3). A incubação ocorreu em temperatura ambiente, por um período de 24 horas, seguindo-se o ensaio enzimático. Para o cálculo da atividade residual utilizou-se a atividade inicial como referência, e foi realizada pelo método CD-Fenolftaleína (item 4.1).

4.8.6 Efeito de íons, solventes, detergentes e quelantes sobre a atividade de CGTase

O efeito dos íons K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+} (Dinâmica), Co^{2+}, Ba^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, NH_4^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+} (Merck), Fe^{3+}, Hg^{2+} Ag^+ e Na^+ (Sigma-Aldrich) Li^+, Al^{3+}, apresentados na forma de sais de cloro. Para o ensaio, 10 µL de solução enzimática foram incubados com 10 µL de solução dos sais anteriormente descritos, de modo que

a concentração final dos mesmos fosse de 1, 5 e 10 m mol L^{-1} em tampão acetato 0,10 mol L^{-1}, pH 6,5 a 25 ºC por 10 minutos. Após a incubação, seguiu-se a determinação da atividade residual pelo ensaio enzimático nas condições ótimas de temperatura e pH.

O efeito de tensoativos (Triton X-100 e Dodecil Sulfato de Sódio - SDS), agentes quelantes (ácido etilenodiamino tetra acético - EDTA, ditiotreitol - DTT), azida sódica e β-CD (Sigma-Aldrich), α-CD e γ-CD (Ciclolab) foram avaliados nas concentrações de 1, 5 e 10 m mol L^{-1}.

4.8.7 Análise das condições de 24 horas de armazenamento

A solução enzimática foi armazenada em diferentes temperaturas (25, 4, -20, -80, -196 ºC), por 24 horas na presença e ausência de $CaCl_2$ 1 m mol L^{-1} e glicerol 50%. Para temperaturas negativas, em que as amostras sofreram o efeito de congelamento, o descongelamento foi feito por imersão das amostras em água à temperatura ambiente (aproximadamente 25 ºC).

A atividade enzimática foi mensurada antes (atividade inicial) e depois do armazenamento (atividade final) e a partir da atividade relativa foi identificada a melhor condição de estocagem da solução enzimática, a fim de garantir a estabilidade da proteína.

4.8.8 Cinética enzimática

Para determinação dos parâmetros cinéticos da enzima, a atividade enzimática foi determinada nas condições ótimas de temperatura e pH, variando-se a concentração do substrato entre 0,1 a 10% (m/v). Os valores da Constante de Michaelis K_m e da taxa ou velocidade máxima de reação V_{max} foram obtidos

a partir de ajuste não linear de parâmetros utilizando como modelo a equação de Michaelis-Menten (V_o = (Vmax×[S])/(*K*m+[S]) no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) a partir de resultados da taxa ou velocidade inicial de reação (V_o) em μmol min^{-1} mg^{-1} obtidos em diferentes concentrações de substrato maltodextrina com DE 13,0-17,0 (Aldrich, Milwaukee, WI) ([S]).

4.8.9 Termodinâmica da desnaturação térmica irreversível

Os procedimentos de termodinâmica seguiram as linhas gerais propostas por autores que analisaram a desnaturação térmica de enzimas (SAQIB et al., 2012; SAQIB et al., 2010).

4.8.9.1 Caracterização quanto à temperatura ótima

A caracterização da temperatura ótima da CGTase purificada foi determinada pela dosagem da atividade enzimática pelo método CD-fenolftaleína (item 4.4.1.) variando a temperatura de incubação da amostra enzimática com o substrato maltodextrina 1%, em 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80ºC durante 10 minutos. A partir dos resultados obtidos foi confeccionado o gráfico de Arrhenius: logaritmo natural (*ln*) da atividade em U mL^{-1} *vs*. 1000/T (onde T corresponde à temperatura absoluta em Kelvin: ºC + 273,15), sendo a interseção no eixo x do encontro das linhas ascendentes e descendentes utilizado para calcular o valor de temperatura ótima.

Equação 3:

$$T(^{o}C) = (\frac{1000}{x}) - 273{,}15$$

4.8.9.2 Cálculo da energia de ativação

A energia de ativação da enzima (E_a) foi calculada pelo ajuste linear da porção descendente do gráfico de Arrhenius utilizando o valor de inclinação da reta multiplicado pela constante universal dos gases (R = 8,315 J K^{-1} mol^{-1}).

Equação 4:

$$Ea = -(inclinação.R)$$

4.8.9.3 Cálculo do coeficiente da temperatura

O coeficiente da temperatura foi calculado utilizando os valores de E_a e diversas temperaturas, a partir da equação a seguir, na qual *ln* se refere ao logaritmo natural:

Equação 5:

$$\ln Q_{10} = \frac{(Ea\ .10)}{R.T^2}$$

4.8.10 Termodinâmica da desnaturação térmica irreversível

Para calcular o efeito da temperatura sobre a desnaturação irreversível, a enzima foi incubada em diferentes temperaturas (45, 55, 65 e 75 ºC) variando o tempo de incubação (15, 30, 60, 120 e 150 minutos), sendo posteriormente colocada em banho de gelo, permanecendo overnight a 4 ºC para restabelecimento de qualquer desdobramento reversível nas estruturas secundarias e terciárias (SAQIB et al., 2010). A atividade CGTase foi determinada e comparada com uma amostra não exposta à incubação térmica

(atividade residual). Com os valores obtidos pelos procedimentos acima descritos foi confeccionado um gráfico do logaritmo natural da atividade residual no eixo y e o tempo de incubação térmica no eixo x. Aplicando-se a regressão linear sobre as retas, foi obtido o valor da inclinação, que corresponde a - kd (min^{-1}; taxa de primeira ordem da inativação térmica).

4.8.10.1 Tempo de meia vida

O tempo de meia vida da CGTase purificada foi calculada para todas as temperaturas testadas na desnaturação térmica irreversível, por meio da seguinte equação:

Equação 6:

$$T_{1/2} = ln\ \frac{2}{k_d} = \frac{0{,}693}{k_d}$$

4.8.10.2 Energia de ativação da desnaturação térmica

Para calcular a energia de ativação da desnaturação térmica (K J $moles^{-1}$), foi construído um gráfico do logaritmo natural do k_d obtido anteriormente no eixo y *vs*. 1000/T (T corresponde à temperatura absoluta em Kelvin), e aplicou-se a regressão linear, sendo a inclinação da curva multiplicada pela constante universal dos gases (R= 8.315 J K^{-1} mol^{-1}) na equação:

Equação 7:

$$E_{a(d)} = -(inclinação.R)$$

4.8.10.3 Entalpia de ativação da desnaturação térmica ΔH_D (K J $moles^{-1}$)

Calculou-se a entalpia de ativação da desnaturação térmica seguindo a equação:

Equação 8:

$$\Delta H_D = E_{a(d)} - R.T$$

4.8.10.4 Energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação térmica ΔG_D (K J mol^{-1})

A energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação térmica foi calculada seguindo a equação 9.

Equação 9:

$$\Delta G_D = -R.T \times \ln\left(\frac{k_d \times h}{k_b \times T}\right)$$

Onde: k_b: Constante de Boltzmann = 1.38 x 10^{-23} J K^{-1}

h: Constante de Planck = 6,63 x 10^{-34} J s

4.8.10.5 Entropia de ativação da desnaturação térmica ΔS_D (J mol^{-1} K^{-1})

Para calcular a entropia de ativação da desnaturação são necessários os valores de ΔH_D e ΔG_D calculados anteriormente e aplicados na equação 10:

Equação 10:

$$\Delta S_D = \frac{(\Delta H_D - \Delta G_D)}{T}$$

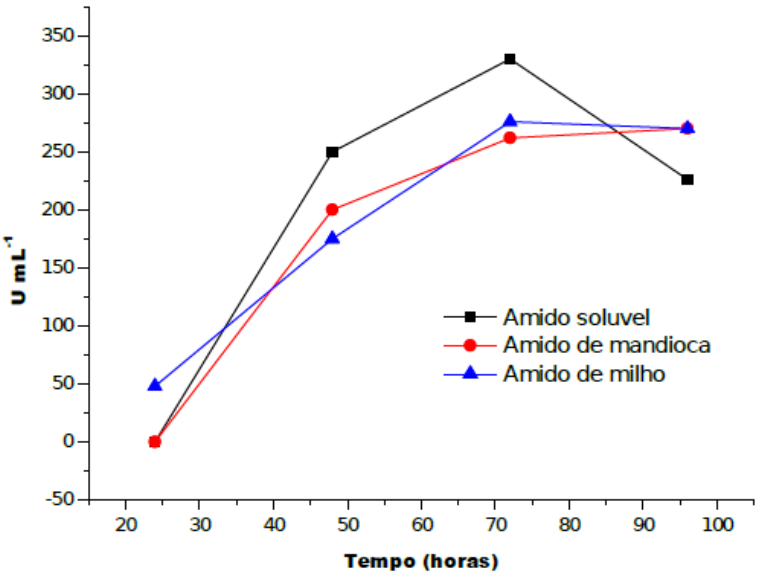
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo do efeito da fonte de carbono

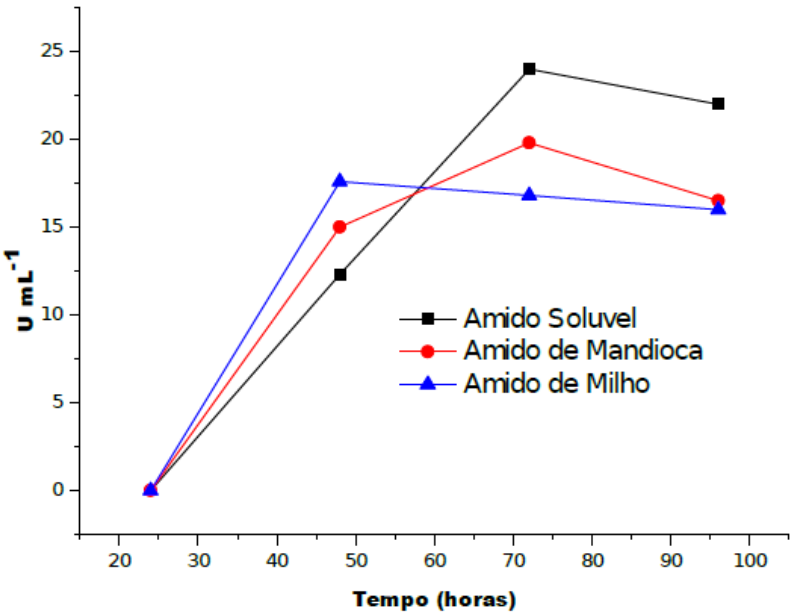
O microrganismo foi estudado quanto à produção enzimática ao longo do tempo, nos substratos selecionados: amido de milho comercial (Maizena®), amido de mandioca e amido solúvel. Os dados desse ensaio estão ilustrados na figura 7.

Figura 7. Perfil de produção enzimática da CGTase em diferentes substratos em função do tempo. a) Atividade Dextrinizante. b) Atividade CD-fenolftaleína.

a)



b)



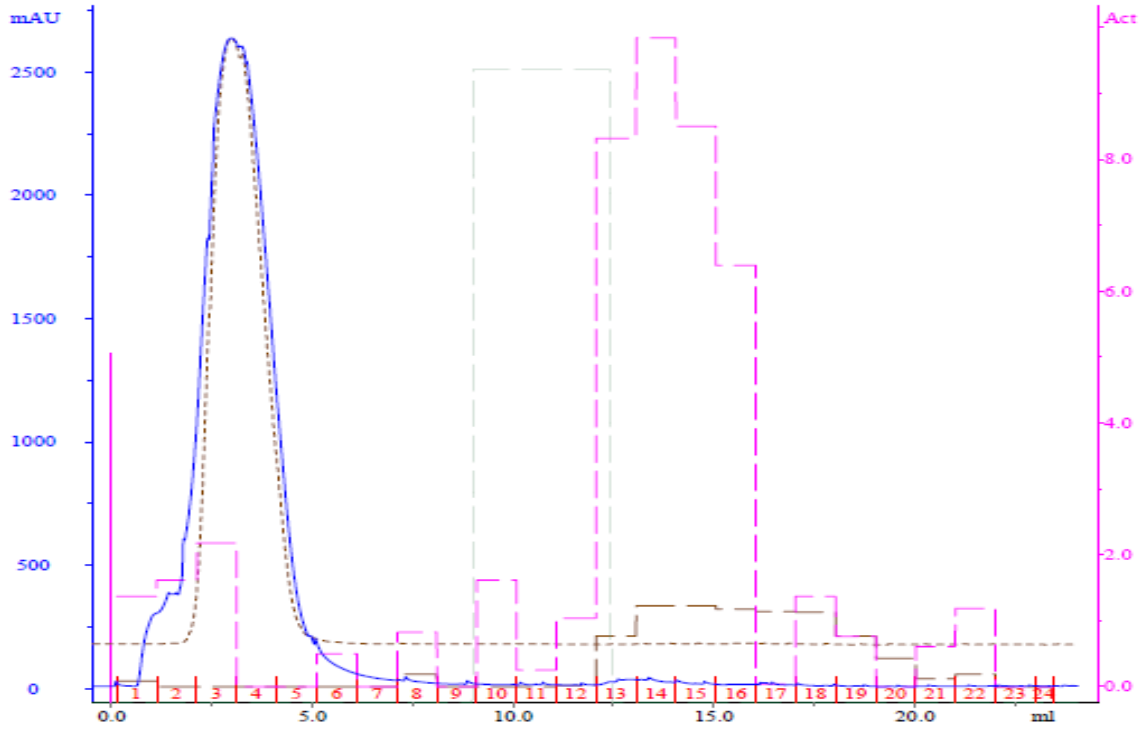
Fonte: Autoria própria

O amido solúvel se mostrou a fonte de carbono que mais contribuiu para a produção enzimática de amilases totais, atingindo 330 Um L^{-1} de atividade amilásica e 24 U mL^{-1} de atividade CGTase. Contudo, as atividades do amido de mandioca e do amido de milho comercial (Maizena®) foram de aproximadamente 300 U mL^{-1} e 250 U mL^{-1}, respectivamente de atividade amilásica e 20 U mL^{-1} de atividade CGTase alcançada. Boas atividades específicas foram alcançadas em todos os substratos fermentados, mas foram maiores em amido solúvel e o amido de milho comercial, aproximadamente 7 e 5 U mg^{-1} de proteína, respectivamente. Assim, pode-se observar que a variação na fonte de carbono pode alterar o nível de produção enzimática e explorar a melhor condição é importante para o aproveitamento potencial da linhagem.

5.2. Purificação por Cromatografia de Afinidade Bioespecífica (CAB)

Para os ensaios de purificação da CGTase produzida pela linhagem bacteriana *P. campinasensis* H69-3 foi utilizada a solução enzimática bruta. A Figura 8 mostra o perfil de eluição de proteínas obtido pelo processo cromatográfico adotado, bem como para as atividades enzimáticas para CGTase.

Figura 8. Perfil de eluição da cromatografia de afinidade bioespecífica (CAB) em resina Epoxi ativado Sepharose 6B, para purificação da CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3.



Fonte: Autoria própria

As frações com atividade CGTase, 13 a 16 (Fig. 8), foram unidas em uma única fração, na qual obteve-se os dados de purificação total. Os dados referentes ao resumo dos ensaios cromatográficos estão disponibilizados abaixo

(Tabela 2.), ao final da cromatografia de afinidade bioespecífica a CGTase foi purificada até 23,21 vezes e o rendimento de 10,73%, e a atividade específica de 32,57 U mg^{-1}.

Tabela 2. Resumo do processo de purificação da CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3

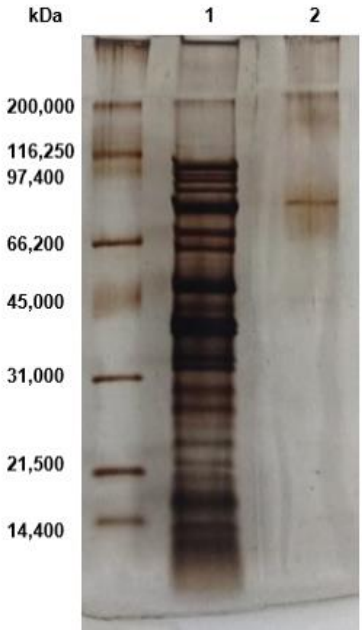
Etapas	Volume	Proteína		Ativ. CD-Fenolftaleína		Ativ. Espec.	Rendi-Mento	Fator Purificação
	mL	mg mL^{-1}	mg total	U mL^{-1}	U Total	U mg^{-1}	%	
Enzima bruta	750	2,62	1965	3,48	2610	1,33	100,0	1,00
Sepharose 6B	10,00	0,02	0,15	0,50	4,98	32,57	10,73	23,21

Fonte: Autoria própria

Em estudos anteriores, usando CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3, a enzima foi purificada e mostrou ao final do processo cromatográfico, a atividade específica de 8,07 U mg^{-1} e 115,3 de fator de purificação, aplicando os processos de gel filtração (Sephadex G-50) e duas de cromatografia de troca iônica (Q-Sepharose e Mono-Q column) respectativamente (ALVES-PRADO et al. 2007). MORIWAKI et al. (2007), utilizando a precipitação por sulfato de amônio e a cromatografia de afinidade bioespecífica para a purificação da CGTase de *Bacillus firmus* 7B, teve como resultado um rendimento de 91,6% e o fator de purificação de 47 vezes. A CGTase produzida por *Stenotrophomonas maltophilia* foi purificada em 4 etapas cromatográficas, ultrafiltração, duas cromatografias de troca iônica e cromatografia de interação hidrofóbica, apresentando ao final um fator de purificação de 2,51 vezes, atividade específica de 202,00 U mg^{-1} (HERMES et al. 2010). Estudos de ATANASOVA et al. (2011) na purificação da CGTase de

Bacillus pseudalcaliphilus 20RF usando o metodo de adsorção de amido ao final da segunda eluição, obteve uma atividade específica de 6638,0 U mg^{-1}, um fator de purificação de 14,4 e rendimento de 22,1%. Após etapa de precipitação por sulfato de amônio e a cromatogafia de afinidade bioespecífica (Sepharose 6B) a CGTase de *Bacillus alcalophilus* foi purificada até 20,21 vezes com um rendimento de 55,14% (GURU et al. 2012). AVCI et al. 2012, purificando a CGTase produzida por *Thermoanaerobacter* sp. P4, por precipitação de sulfato de amônio seguido por cromatografia de afinidade bioespecífica (Sepharose 6B) ativada com α-ciclodextrina, teve a enzima purificada 141 vezes, a atividade específica de 143,8 U mg^{-1} e um rendimento de 17,75%. O grau de purificação foi avaliado pela eletroforese em gel de poliacrilamida, revelado com método de coloração em prata (Fig. 9).

Figura 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida da junção de frações resultantes da purificação da CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3. MM: marcador de massa molecular; 1: CGTase bruta; 2: CGTase purificada.



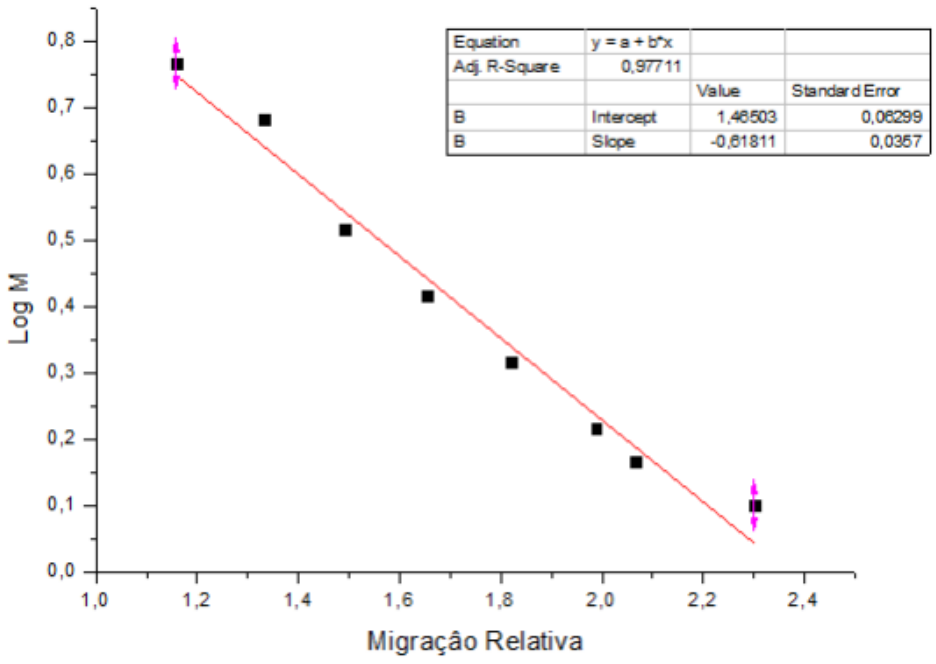
Fonte: Autoria própria

A Figura 9 apresenta o grau de pureza para a junção das frações eluídas a partir de cromatografia de afinidade bioespecífica, observando a banda correspondente a CGTase de interesse.

5.2.1. Estimativa da Massa Molecular em condições desnaturantes

Com base nos resultados obtidos a partir da técnica de eletroforese SDS-PAGE (Fig. 9) foi confeccionado um gráfico da migração relativa no gel de poliacrilamida x Log Massa Molecular (Fig. 10) e por meio da regressão linear obteve-se a seguinte equação da reta y = 1,465 + (- 0,6181 * x), onde x corresponde à migração relativa no gel e y o log da massa molecular.

Figura 10. Gráfico de Fischer (DENNISON, 2003) do logaritmo da massa molecular dos padrões vs. a migração relativa em gel de poliacrilamida.



Fonte: Autoria própria

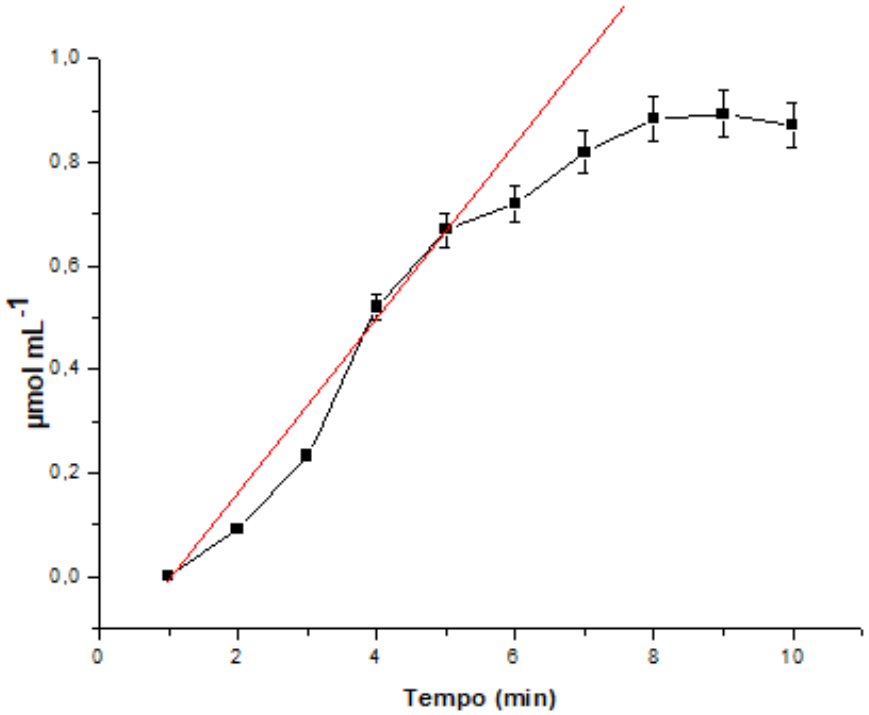
Na Figura 9 apresenta o grau de pureza para a junção das frações eluídas a partir de cromatografia de afinidade bioespecífica. Observa-se a banda com massa molar de 72kDa, correspondente a CGTase de interesse. A maioria das CGTases purificadas produzidas por linhagens de *Bacillus sp*. apresentam uma faixa de massa molecular de 68 - 88 kDa (ALVES-PRADO et al. 2007), semelhante ao obtido nesse estudo. Têm-se *B. firmus*, 56,23 kDa (MORIWAKI et al. 2007), 68,7 kDa (AVCI et al. 2012), 70 kDa (ATANASOVA et al. 2011), 71,7 kDa (XU et al. 2018), 75 kDa (CHE MAN et al. 2016; RATHER et al. 2015; SIAN et al. 2005), 75,5 kDa (PETROVA et al. 2013), 76 kDa (SAVERGAVE et al. 2008), 78 kDa (GAWANDE et al. 1999), 83 kDa (GURU et al. 2012), Porém, já foi relatados casos de CGTases com menor massa molecular, 33 kDa (SABIONI et al. 1992), 42 kDa (ABELYAN et al. 1995) e maior massa molecular, 110 kDa (MARTINS et al. 2002), 144 kDa (YU et al. 1988).

5.3. Caracterização bioquímica da CGTase purificada

5.3.1 Determinação do tempo de incubação

A análise revelou que o tempo de incubação ideal para a reação enzimática é de 5 minutos. Até este período de incubação, observou-se um aumento linear da liberação do produto com o tempo. Aos 6 minutos de reação, porém, a inclinação diminuiu, demonstrando um decréscimo da taxa ou velocidade da reação (Fig. 11).

Figura 11. Determinação do período de incubação ideal para cálculo da velocidade inicial de reação de ciclização da CGTase purificada.



Fonte: Autoria própria.

Com base nestes resultados, determinou-se 5 minutos como o período ideal para a reação enzimática, tendo sido utilizado este tempo de incubação em todos os ensaios subsequentes.

5.3.2. Determinação da temperatura ótima e termoestabilidade da enzima

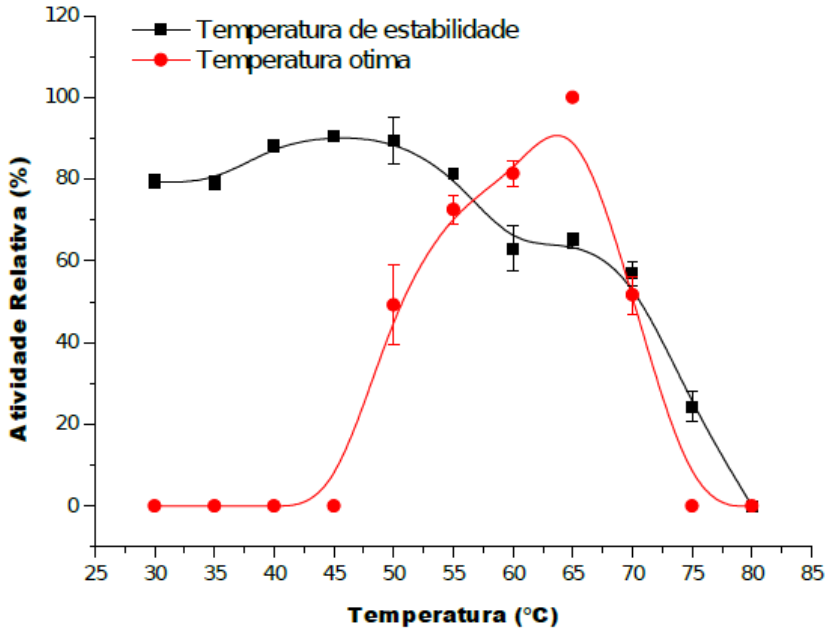
A atividade da CGTase pura foi medida na faixa de temperatura de 30 °C a 80 °C em pH 6,5, variando 5 °C. A enzima apresentou atividade máxima na temperatura em 65 °C (Fig.12) e manteve 40% da sua atividade entre 60 °C e 70 °C e a partir de 75 °C a enzima foi inativada.

Estudos anteriores de Alves-Prado et al. (2007), com a CGTase produzida pelo mesmo microrganismo, apresentou atividade máxima entre 60 – 65 °C, isso

ocorreu com, a CGTase recombinante JCGT8-5 produzida por *E. coli* BL21(DE3) e a enzima manteve até 52-58% de suas atividades após o tratamento térmico a 70 °C por 1 h (PETROVA et al. 2013).

O efeito da temperatura na estabilidade da CGTase pura também foi estudado. A CGTase purificada foi incubada por 1 h, nas mesmas temperaturas utilizadas na temperatura ótima, seguido da realização da atividade residual em condições de ensaio padrão.

Figura 12. Efeito da temperatura na atividade e termoestabilidade da CGTase purificada da linhagem *P. campinasensis* H69-3.



Fonte: Autoria própria

A CGTase apresentou 80% de sua atividade a 30 e 35 °C , e se manteve estável de 40 a 50 °C. A 55 °C apresentava mais de 80% de atividade residual, (Fig. 11), o mesmo ocorreu com o *Bacillus firmus* (YIM et al. 1997), *Bacillus lentus* (SABIONI et al. 1992), *Bacillus alkalophilic* (MORA et al. 2012),

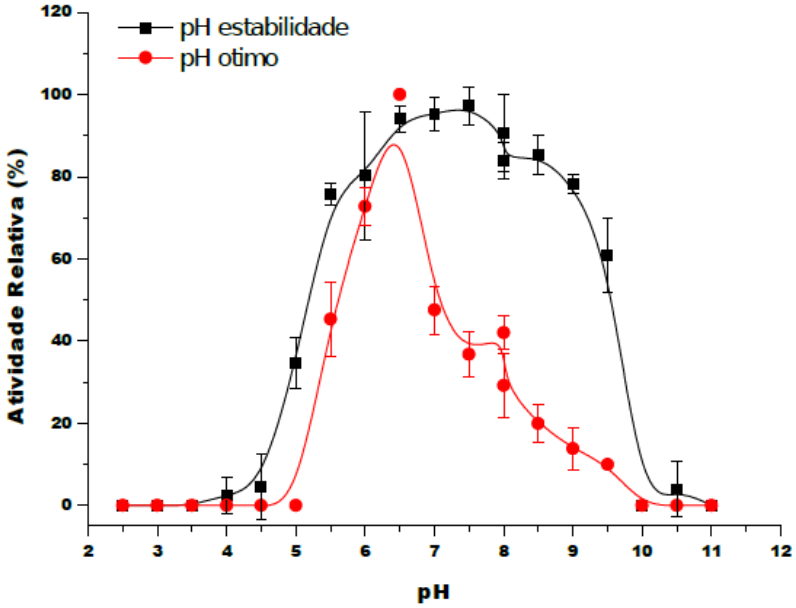
Amphibacillus sp. NPST-10 (IBRAHIM et al. 2012). Após 1 hora de incubação a 65 °C a atividade residual cai 30% e a 70 °C a CGTase de *P. campinasensis* H69-3 apresenta 50% de estabilidade térmica, sendo completamente inativada apartir de 80°C.

A CGTase produzida por *Geobacillus thermoglucosidans* CHB1, apresentou–se estável até 50 °C (JIA et al. 2018). Ao contrário do presente trabalho, AVCI et al. (2012) estudaram a CGTase produzida por *Thermoanaerobacter* sp. P4, essa CGTase apresentou temperatura ótima de ciclização de 80 a 90 °C, aplicando somente a termoestabilidade nas temperaturas de 80, 90 e 100 °C, eles observaram ao final de 4 horas de incubação a enzima totalmente estável a 80 °C.

5.3.4 Efeito do pH na atividade e estabilidade da enzima

A atividade CGTase produzida pela bactéria *Paenibacillus campinasensis* H69-3 foi determinada em diferentes valores de pH que variam de 2,5 a 11,0 a 55 °C, temperatura de reação. A CGTase purificada apresentou atividade máxima no pH 6,5 em tampão “Standard” McIlvaine (Fig. 13). Este pH ótimo, também foi observado para CGTase produzida por *B. lentus* (SABIONI et al. 1992).

Figura 13. Efeito do pH na atividade e estabilidade da CGTase pura, produzida por *P. campinasensis* H69-3. Os tampões utilizados foram: McIlvaine (pH 3.0–8.0) e Glicina 0,1 M(pH 8.0–11.5).



Fonte: Autoria própria

O pH de estabilidade foi determinado incubando a CGTase pura em diferentes valores de pH, variando de 2,5 a 11,0 por 24 h a 25 °C. Então, a atividade residual foi determinada em condições de atividade padrão. A CGTase apresentou estabilidade entre a faixa de pH 6,5 a 8,0 (Fig. 13) que está dentro do intervalo (5–9) da maioria das CGTases de fontes bacterianas (AI-NOI et al. 2008; JUNG et al. 2007) o mesmo foi observado na CGTase produzida por *Bacillus pseudalcaliphilus* 20RF, apresentou pH ótimo em pH 6,0 e 9,0 e se manteve ativo na temperatura 60 °C (ATANASOVA et al. 2011). A CGTase de *Thermoanaerobacter* sp. P4 apresentou 80% de sua atividade nas faixas de pH entre 4,0 e 10,0 (AVCI et al. 2012), enquanto a enzima do *Paenibacillus* sp. A11 (LEE et al. 2013) e *Paenibacillus pabuli* US132 (JEMLI et al. 2008) apresentaram estabilidade na faixa de pH de 6,0 a 10,0.

Petrova et al. (2013), estudando a CGTase recombinante purificada JCGT8-5, observaram a enzima ativa à 60 °C – 65 °C, estável em uma ampla faixa de pH (5,0 – 11,0) e retendo mais de 50% de suas atividades originais após um tratamento térmico a 70 °C por 1 h na ausência de aditivos, semelhante ao obtido nesse tabalho.

A estabilidade é um fator importante para as enzimas, afim de selecioná-las para fins industriais, devido fatores como: altas temperaturas e às variações extremas na pH utilizadas nos processos industriais (COELHO et al. 2016, ATANASONA et al. 2011). O resultado do pH ótimo de 6,5 da CGTase de *P. campinasensis* H69-3, sugere que para ocorrer a reação de ciclização (formação de CDs) necessita de um pH próximo ao pH neutro. Desse modo, a enzima produzida por esse microrganismo tem grande potencial na aplicação nos processos de hidrólise de diferentes amidos, como no processo de sacarificação, que necessitem de pH próximo à neutralidade e temperatura relativamente alta.

5.3.5. Efeito de Íons metálicos e químicos na atividade da CGTase

A CGTase purificada foi incubada com vários sais e reagentes, a 1,0, 5,0 e 10,0 mmol $L^{-1,}$ em 0,1 mol L^{-1} de tampão acetato, pH 6,5 a 25 °C durante 10 minutos. Uma amostra da mistura foi usada para determinar a atividade residual sob condições padrões de ensaio, mantendo as concentrações de sal e reagentes (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeitos de diferentes íons metálicos na atividade da CGTase da *P. campinasensis* H69-3

Íon	Atividade relativa (%)			
	Concentração (1 mmol L^{-1})	± DP	Concentração (5 mmol L^{-1})	± DP
Controle	100	0,12	100	0,12
$BaCl_2$	172,63	0,18	43,58	0,01
$MgCl_2$	150,82	0,06	77,39	0,02
$CaCl_2$	143,62	0,39	179,23	0,02
$NiCl_2$	130,01	0,25	0	0,02
KCl	126,41	0,01	83,19	0,01
$ZnCl_2$	110,00	0,26	14,37	0,01
$CoCl_2$	92,00	0,33	7,96	0,01
NaCl	77,39	0,08	5,4	0,01
Fe_2SO_4	66,79	0,14	0	0,01
$MnCl_2$	58,79	0,02	0	0,01
$FeCl_3$	54,38	0,29	0	0,12

Fonte: Autoria própria

Na presença de Fe^{2+}, Mn^{2+} e Fe^{3+} a 1 mmol L^{-1}, a CGTase foi moderadamente inibida apresentando de 50-70% da atividade. E a atividade CGTase foi melhorada em 72% na presença de Ba^{2+}, a atividade também foi melhorada presença de Mg^{2+},Ca^{2+},Ni^{2+}, Zn^{2+} e K^{+} na concentração de 1 mM. A CGTase foi inibida por Cu^{2+}, Hg^{3+}, Ag^{+}, Li^{2+}, Al^{3+} e NH_4^{2+} em ambas concentrações, enquanto em estudos, ELBAZ; SOBHI; ELMEKAWY (2015) relatou melhora na atividade de CGTase de *Bacillus lehensis* na presença de Fe^{2+} e Cu^{2+}. É relatado na literatura, que Cu^{2+}, teve um efeito inibitório significativo em CGTases de *Bacillus* sp. *alcalophilus* G1 (SIAN et al. 2005), *Bacillus agaradhaerens* (MARTINS; HATTI-KAUL, 2002), *Brevibacterium* sp. nº. 9605 (MORI et al. 1994).

Na concentração de 5 mmol L^{-1}, a CGTase foi fortemente inibida por Ni^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Na^{+}, Co^{2+} e Mn^{2+}. Apresentou atividade relativa de 83% por K^{+} e 77% pelo íon Mg^{2+}. Já para o íon Ca^{2+} a 5 mmol L^{-1}, atividade residual da enzima foi de 179%. Assim, em presença do íon Ca^{2+} houve uma melhora na atividade

enzimática de 44% e de 79% nas concentrações de 1 e 5 mmol L^{-1}, respectivamente.

O efeito de íons e reagentes de metal sobre a atividade da CGTase depende do microrganismo. Os íons metálicos Hg^{2+}, Ag^{+} e Cu^{2+} foram relatados na literatura como inibidores de α-amilases termoestáveis. A termoestabilização da proteína ocorre pela formação de pontes de dissulfeto, a presença de resíduos de cisteína é maior em moléculas termoestáveis (ALVES-PRADO et a. 2007; VIEILLE; ZEIKUS, 2001). Esses íons apresentam afinidade aos grupos tiol, inibindo a atividade enzimática de algumas proteínas pela reação de oxidação dos grupos funcionais de resíduos de cisteína, dos aminoácidos essenciais à atividade da enzima (ATANASOVA et al. 2011). Os principais aminoácidos responsáveis seriam o triptofano e resíduos específicos de tirosina e histidina que são atribuídos um papel importante na eficiência de ciclização e na estabilização do estado de transição (BIWER et al. 2001). A total inibição da atividade enzimática da CGTase de *P. campinasensis* H69-3 pelos íons Hg^{2+}, Ag^{+}, e Cu^{2+} confirma a hipótese de que o grupo tiol seja essencial para a atividade enzimática da CGTase (ALVES-PRADO et a. 2007b.

Atividade enzimática da CGTase estudada foi fortemente estimulada na presença de Ca^{2+} a 5 mmol L^{-1}, como pode ser observar na Tabela 3. Em estudos da CGTase de *Bacillus pseudalcaliphilus* 8SB utilizando a mesma concentração do íon Ca^{2+} 5 mmol L^{-1} (KITAYSKA et al. 2011). Em estudos semelhantes com *Paenibacillus illinoisensis* ZY-08 (LEE et al. 2013) na presença de Ca^{2+}, relataram que a atividade da enzima foi levemente estimulada, o mesmo foi observado na CGTase de *Amphibacillus alcalifílico* sp. NPST-10 (IBRAHIM et al. 2012) e com a CGTase de *Paenibacillus* sp. SSG-1 (XU et al. 2018). Em comum

com a CGTase estudada, como a maioria das CGTases apresentaram a atividade estimulada na presença de Ca^{2+} que também tem sido relatado como sendo um estabilizador de desnaturação (Tabela 4). Essa melhoria na atividade CGTase pode estar relacionada as interações do íon Ca^{2+} com os aminoácidos próximos do sítio ativo da enzima que são conservados entre as enzimas da família α-amilase (MARTINS; HATTI-KAUL, 2002).

Tabela 4 - Efeito do íon Ca^{2+} na atividade CGTase por espécies microbianas.

Microrganismo	**Concentração do íon (mmol L^{-1})**	**Tempo de Exposição (min)**	**Atividade Relativa (%)**	**Referências**
P. campinasensis H69-3	1 5	10 10	144,0 179,2	Presente estudo
Microbacterium terrae KNR 9	5	10	130,0	RAJAPUT et al. 2016
Amphibacillus sp. NPST-10	1 5	60	101.0 108,0	IBRAHIM et al. 2012
Bacillus pseudalcaliphilus 20RF	1 10	30	100,0 96,8	ATANASOV A et al. 2011
Bacillus pseudalcaliphilus 8SB	5	60	120,0	KITAYSKA et al. 2011

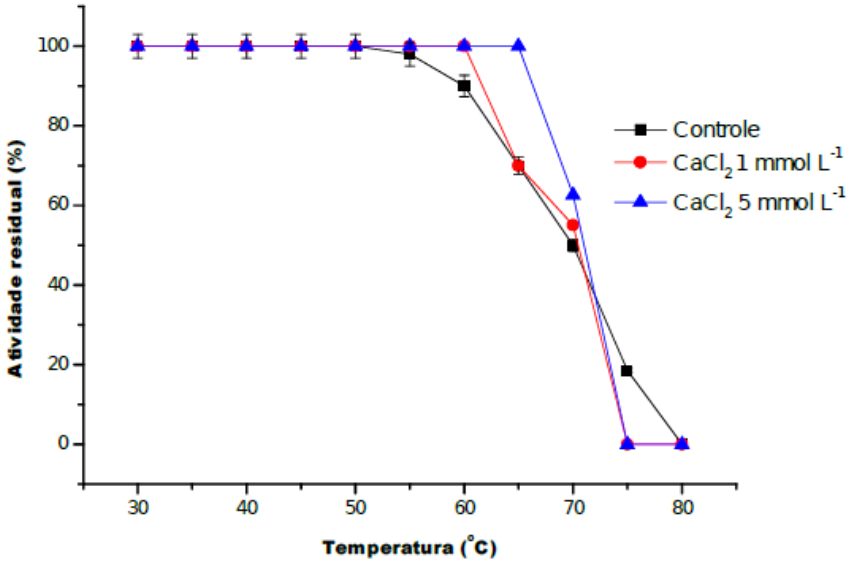
Fonte: Autoria própria

5.3.6. Efeito do íon Ca^{2+} na termoestabilidade da CGTase purificada

Foram realizados testes na presença de íons metálicos na concentração de 10 mmol L^{-1}, e a CGTase *P. campinasensis* H69-3 apresentou 50% da sua atividade relativa na presença do íon Ca^{2+}, e na presença dos demais íons ela foi inibida. O ensaio de termoestabilidade também foi realizado na presença de $CaCl_2$ a 1 mmol L^{-1} e 5 mmol L^{-1}, uma vez que a enzima apresentou atividade melhorada na presença do íon. Na presença de de $CaCl_2$ a 1 m mol L^{-1} a CGTase foi estável até 60 °C (Fig. 14), enquanto que na concentração de 5 mmol L^{-1} a

enzima manteve 100% da atividade até 65 °C e 70 °C ainda mantinha 60% da atividade (Fig. 14). A 75 °C,em ambas concentrações de íon Ca^{2+}, a enzima já se encontrava inativada.

Figura 14. Efeito do $CaCl_2$ na termoestabilidade da CGTase purificada, poduzida por *P. campinasensis* H69-3, após 60 minutos de incubação.



Fonte: Autoria própria

A presença de Ca^{2+} na termoestabilidade da CGTase também foi observada em estudos com *Bacillus pseudalcaliphilus* 8SB na presença de Ca^{2+} 5 mmol L^{-1}, a CGTase se manteve estável de 40-60 °C por 2 horas (KITAYSKA et al. 2011), e na CGTase de *Amphibacillus* sp. NPST-10 também foi estudada, e apresentou melhora significativa na presença de Ca^{2+} 1 mmol L^{-1} por 1 h (IBRAHIM et al. 2012).

5.3.7. Efeito de reagentes, solventes e produtos da enzima

Assim como observado para íons, alguns reagentes e solventes podem também afetar a ação enzimática. O efeito de ativação por componentes não

metálicos é um diferencial para aplicação de enzimas em bioprocessos que, muitas vezes, são realizados na presença de vários aditivos ou compostos liberados após pré-tratamentos. O efeito dos produtos da CGTase, as CDs podem estimular ou inibir a atividade da CGTase, no presente estudo a presença de β-CD e γ-CD exibiu efeito inibitório para a CGTase de *P. campinasensis* H69-3 (Tabela 5), o mesmo foi observado para CGTase de *B. autolyticus* (BOVETTO et al. 1992).

Tabela 5 - Efeitos de vários reagentes na atividade da CGTase da *P. campinasensis* H69-3

Reagentes	**Atividade Relativa (%)**			
	Reagentes 1 mmol L^{-1}	**± DP**	**Reagentes 5 mmol L^{-1}**	**± DP**
Controle	100	0,02	100	0,02
EDTA	111,0	0,01	36,72	0,02
DTT	101,5	0,03	86,75	0,01
DMSO	0	0,02	0	0,02
TRITON	0	0,01	0	0,01
SDS	0	0,01	0	0,00
NaN_3	0	0,01	0	0,02
α-CD	38,93	0,02	0	0,01
β-CD	0	0,01	0	0,01
γ-CD	0	0	0	0,02

Fonte: Autoria própria

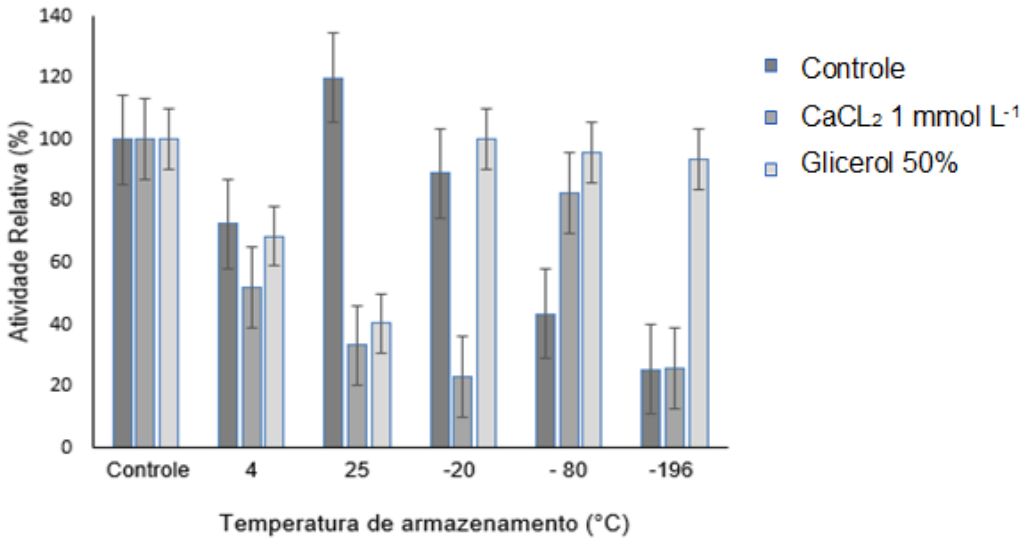
A CGTase na presença de EDTA e DTT a 1 m mol L^{-1} foi levemente estimulada, apresentando uma forte inibição ao EDTA a 5 mmol L^{-1} e sendo moderamente inibida na presença de DTT na mesma concentração. O contrário foi observado pela CGTase de *Bacillus* sp. alcalofílico G1, onde a enzima foi fortemente inibida a 1 mmol L^{-1} de DTT (SIAN et al. 2005).

5.3.8. Análise das condições de 24 horas de armazenamento

Ao determinar as melhores condições de armazenamento do extrato enzimático foi possível observar que nas temperaturas -20 ºC, -80 °C e -196ºC

avaliadas na presença de 50% de glicerol mantiveram a atividade da enzima após 24 horas em relação ao controle (Fig.15), o glicerol promoveu um efeito protetor sobre a enzima nas amostras congeladas apenas. Na presença de $CaCl_2$ 1 mmol L^{-1} a enzima apresentou aproximadamente 80% da atividade na temperatura de -80ºC. A enzima sem a presença de reagente apresentou 120% de atividade na temperatura de 25 ºC, enquanto que nas temperaturas de 4 °C e -20 °C a atividade foi de 70 e 90%, respectivamente. É possível observar que quanto mais rápido for o congelamento da amostra, maior a chance de manter a atividade enzimática preservada (BHATNAGAR; BOGNER; PIKAL, 2007).

Figura 15. Atividade enzimática residual após 24 horas em diferentes temperaturas na presença e ausência de $CaCl_2$ a 1 mmol L^{-1} e glicerol 50%. São mostrados os valores médios de triplicatas e o desvio padrão.



Fonte: Autoria própria

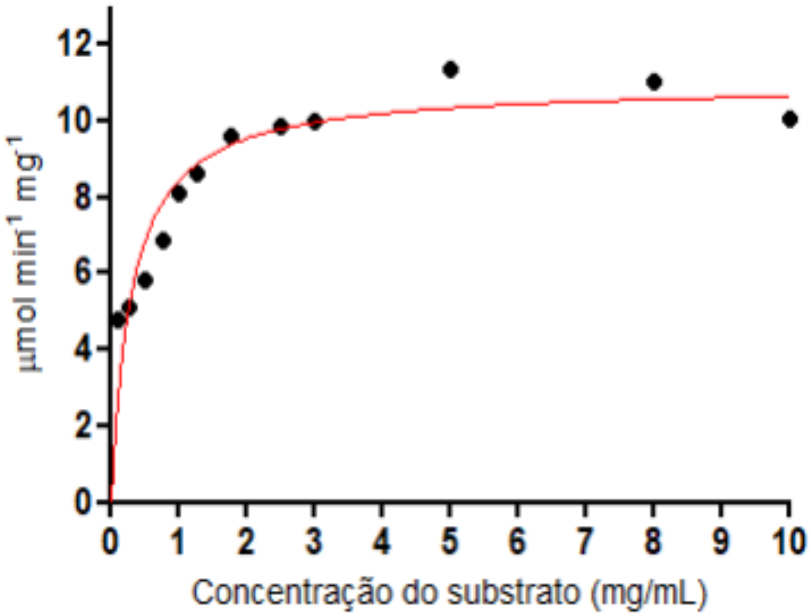
A perda da capacidade catalítica das enzimas pode-se dar por alterações estruturais, podendo ser reversíveis ou irreversíveis, o estado nativo é aquele, que a molécula se apresenta biologicamente ativa, enquanto o estado

desenovelado, é aquele que a molécula sofreu alteração do seu estado nativo afetando sua capacidade catalítica (VOET; VOET, 2006). O efeito de osmólitos sobre a estabilidade na conformação proteínas em situações adversas de estresse celular já é bem conhecido (VIANA; FILHO; PENHA-SILVA, 2006), o glicerol é um osmólito classificado como poli álcool, atuando no equilíbrio entre os estados de uma proteína, aumentando o conteúdo energético em ambos os sentidos. O glicerol favorece tornando a cadeia polipeptídica mais compacta e menos flexível, uma vez que, ele atua deslocando o equilíbrio da reação para o estado menos energético (BHATNAGAR; BOGNER; PIKAL, 2007). A interação da enzima/osmólito não é favorável, devido a isso são excluídos da superfície da proteína, o que resulta na formação de uma camada de hidratação, formada por diversas moléculas de água altamente organizadas e porém menos flexíveis que as demais. Quanto maior a camada de hidratação necessitará de mais energia para mantê-la estável, por essa razão o glicerol irá atuar deslocando o equilíbrio da reação no sentido do estado nativo, elevando assim os níveis de atividade enzimática (QU; BOLEN; BOLEN, 1998).

5.4. Cinética enzimática

No intervalo de concentração do substrato analisado (0,1 a 10 mg mL^{-1}), a CGTase apresentou comportamento compatível com o perfil de cinética de Michaelis-Menten, como é possível observar na figura 16.

Figura 16. Gráfico de Michaelis-Menten da CGTase purificada variando-se a concentração de substrato entre 0,1 a 10 mg/mL. Ensaio realizado a 65 °C em pH 6,5.



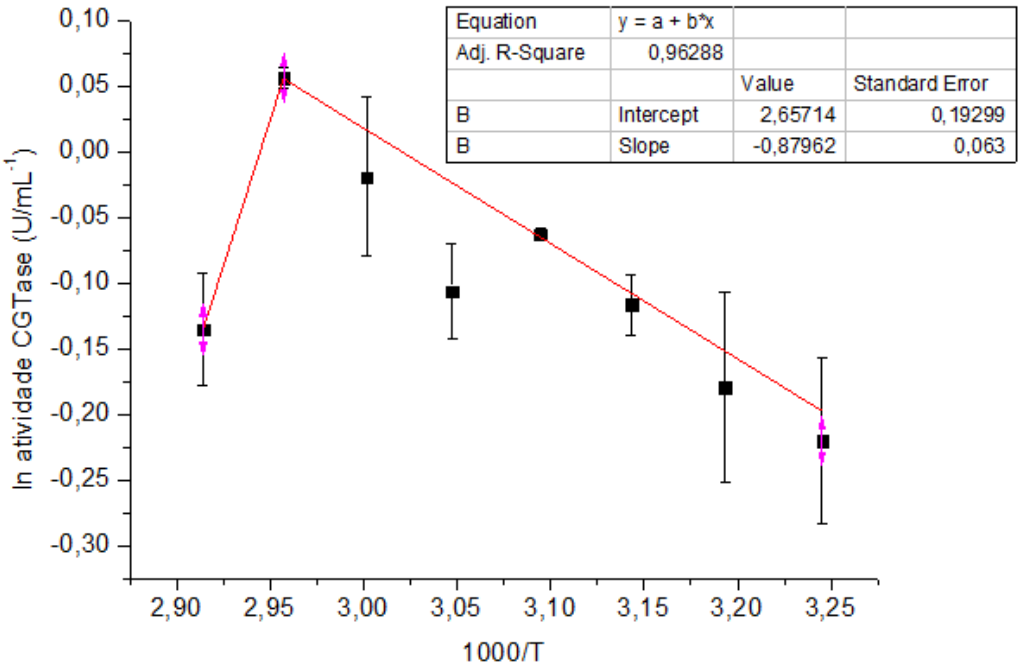
Fonte: Autoria própria

Utilizando maltodextrina como substrato a CGTase estudada apresentou 10,97±0,49 µmol min^{-1} mg^{-1} e 0,303±0,069 mg mL^{-1}, V_{max} e K_m, respectivamente. Estudos cinéticos com a CGTase de *Bacillus* sp. G1, foram observados os valores de K_m e V_{max}, 0,15 mg mL^{-1} e 60,39 mg de β-ciclodextrina mL^{-1} min^{-1}, respectivamente (SIAN, 2005). Jia et al (2018) obtiveram valores K_m e V_{max} com amido solúvel como substrato foram 12,5 mg mL^{-1} e 23,7 mmol $min.^{-1}$. O K_m reflete a afinidade de uma enzima para um substrato, é uma característica importante das enzimas. Os aminoácidos essenciais para a afinidade do substrato permanecem determinado, e seu valor de K_m relativamente baixo torna enzima um bom material para identificar aminoácidos cruciais associado à afinidade do substrato (JIA et al. 2018).

5.5. Termodinâmica da desnaturação térmica irreversível

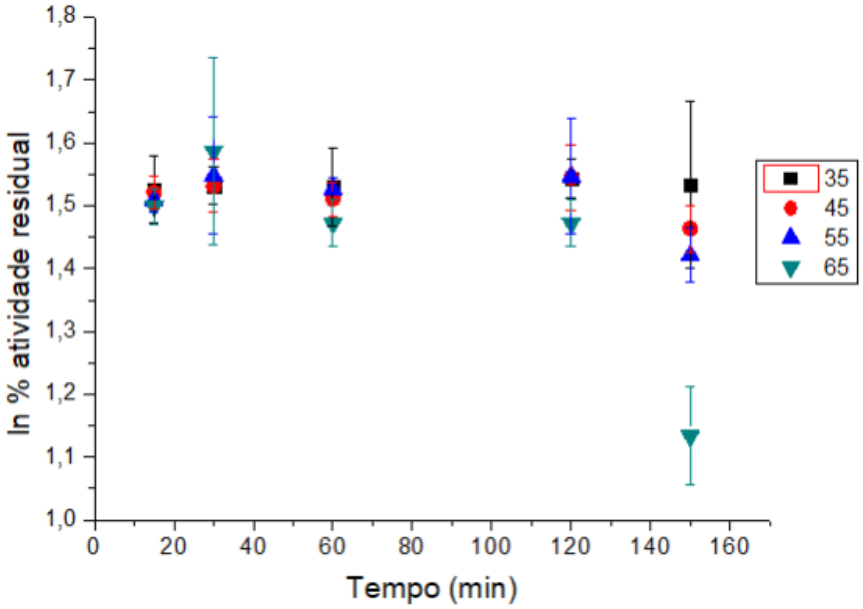
A partir da interseção no eixo x do ponto de encontro entre as porções ascendente e descendente do gráfico de Arrhenius foi possível calcular a temperatura ótima de catálise enzimática (equação 2), que no caso da CGTase purificada no presente trabalho, foi de 65 ºC (Fig. 17). A energia de ativação da enzima (equação 3) foi calculada em 7,31 kJ mol^{-1} (Fig. 17), diferentemente do que foi encontrada nos estudos com a CGTase de *Bacillus amyloliquefaciens* que apresentou 16,40 kJ mol^{-1} (ABDEL-NABY, FOUAD, REYAD, 2015).

Figura 17. Gráfico de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação (E_a) e temperatura ótima da CGTase purificada.



Fonte: Autoria própria

-**Figura 18.** Gráfico de primeira ordem do efeito da temperatura na atividade da CGTase purificada.



Fonte: Autoria própria

Os coeficientes de cada temperatura Q_{10} (equação 4) estão apresentados na tabela 6. No caso da CGTase o Q_{10} estimado para as temperaturas avaliadas decresce com o aumento da temperatura, tornando evidente o progressivo efeito desnaturante.

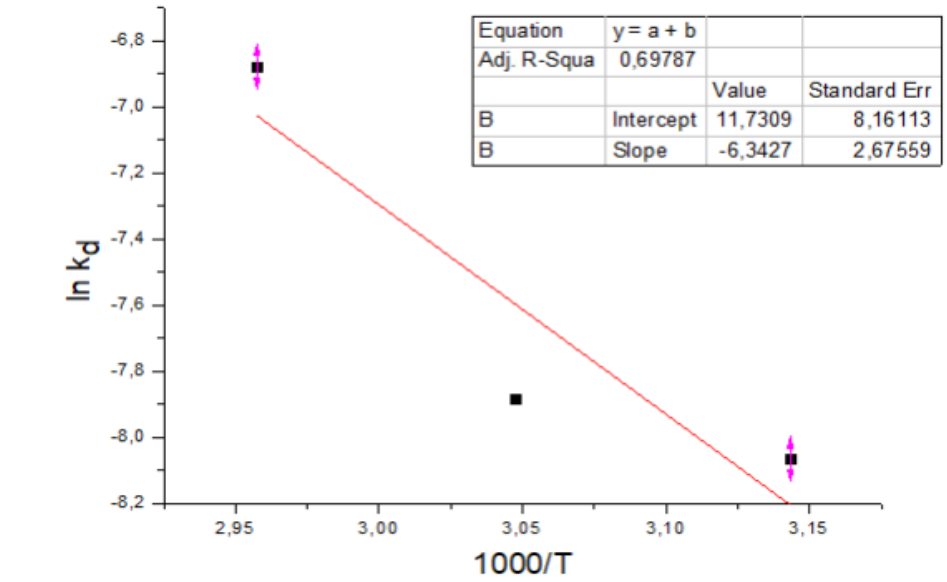
Tabela 6. Coeficientes de temperatura (Q_{10}) da CGTase estimados com base no Gráfico de Arrhenius.

Temperatura (°C)	Temperatura (°K)	Q_{10}
35	308,15	1,0 000 925 983
45	318,15	1,0 000 868 685
55	328,15	1,0 000 816 545
65	338,15	1,0 000 768 963
75	348,15	1,0 000 725 421

Fonte: Autoria própria

A figura 19 representa o efeito da temperatura na desnaturação irreversível, sendo usada para cálculo da constante k_d para cada temperatura.

Figura 19. Gráfico de Arrhenius de primeira ordem para o cálculo da energia de ativação da desnaturação térmica (E_{ad}) da CGTase purificada.



Fonte: Autoria própria

A entalpia de ativação da desnaturação térmica (ΔH_d) (equação 7) representa a quantidade de calor envolvida na quebra de 1 mol de ligações não covalentes durante o processo de desnaturação da enzima. No caso da CGTase esse parâmetro não apresentou variação significativa em relação ao aumento da temperatura, indicando resistência estrutural da enzima frente a variações da mesma.

Tabela 7. Parâmetros termodinâmicos da termo inativação irreversível da CGTase purificada

Temp. (ºC)	Temp. (K)	k_d (min^{-1})	t½ (min)	ΔH_d (kJ $mole^{-1}$)	ΔG_d (kJ mol^{-1})	ΔS_d (J $mol^{-1}K^{-1}$)
45	318,15	0,000314	2206,94	50,09	102,141	-155,067
55	328,15	0,000376	1841,28	50,01	102,503	-158,878
65	338,15	0,00103	672,81	49,92	99,423	-155,496

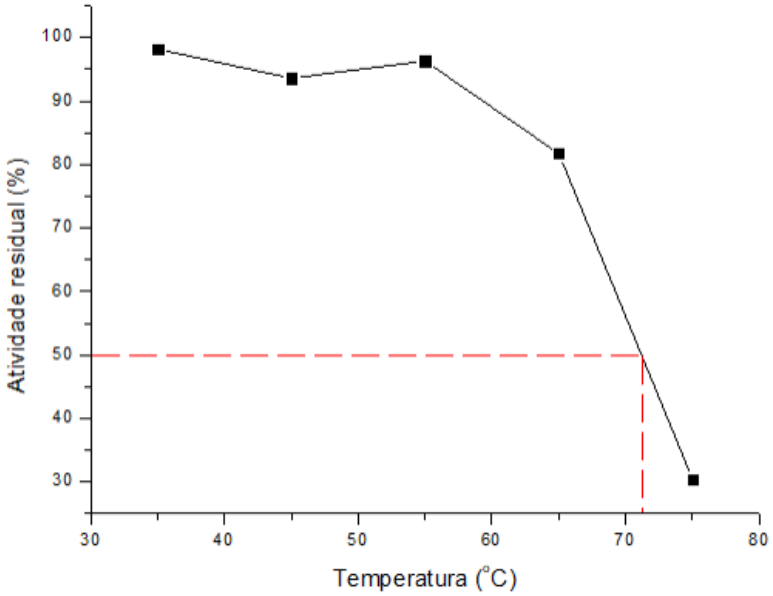
Fonte: Autoria própria

Os altos valores de energia livre (ΔG_d) (equação 8) confirmam a resistência da CGTase em relação à desnaturação térmica, uma vez que esse parâmetro indica se a reação, no caso a desnaturação da enzima, ocorre espontaneamente (valores negativos de ΔG_d) ou necessita de energia para ser realizada. Observa-se que em 55 °C tem-se o maior valor de ΔG_d, a enzima apresenta mais resistência a ser desnaturada nessa temperatura do que a 65 °C, o mesmo ocorre com a ΔG_d do *B. amyloliquefaciens* com o aumento da temperatura (ABDEL–NABY, FOUAD, REYAD, 2015).

Um valor negativo da entropia (ΔS_d) indica uma afinidade significativa entre a enzima e o substrato, mesmo a altas temperaturas. A possível razão pode ser a compactação da enzima durante a reação e alta afinidade com o substrato selecionado, a maltodextrina (SHUKLA, SINGH, 2015).

Avaliou-se também a temperatura de fusão apresentada pela CGTase, como mostrado na figura 20. A temperatura de fusão é considerada a temperatura na qual a atividade da enzima cai pela metade do seu máximo (SAQBI et al. 2012), no caso da CGTase purificada, o máximo de atividade ocorreu em 55 °C, e caiu para 50% desse valor em pouco menos de 71,3 °C, sendo essa a temperatura de fusão da enzima.

Figura 20. Temperatura de fusão da CGTase purificada produzida pela bactéria termofílica *P. campinasensis* H69-3. A temperatura de fusão é considerada a temperatura na qual a atividade da enzima cai pela metade do seu máximo.



Fonte:Autoria própria

6. CONCLUSÕES

A CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 foi purificada em uma etapa, utilizando a cromatografia de afinidade bioespecífica. A CGTase purificada apesentou massa molecular de 72 kDa em gel de poliacrilamida. A caracterização bioquímica da enzima demonstrou que o pH ótimo dessa CGTase foi pH 6,5, e estabilidade em relação ao pH se manteve estável de 6,0-9,0. A temperatura ótima de ação da CGTase foi 65 °C e estabilidade témica em até 55 °C.

Em relação aos efeitos da temperatura sobre a enzima, a CGTase se mostrou resistente à temperatura, com elevados tempos de meia vida em diversas temperaturas e temperatura ótima de 65 °C. Diversos reagentes testados provocaram a diminuição em menor ou maior grau da atividade enzimática do extrato purificado. Por outro lado, o agente quelante EDTA aumentou a atividade enzimática em 4%, os produtos de CGTase mostraram uma inibição da atividade da enzima. Íons como Ca^{2+} causou aumento da atividade, enquanto outros seu decréscimo. Os parâmetros termodinâmicos (ΔH_d, ΔG_d, ΔS_d) avaliados para a CGTase purificada, mostraram elevada resistência estrutural da enzima frente a desnaturação térmica irreversível. A CGTase apresentou elevado valor de temperatura de fusão, aproximadamente 71,3 °C, sendo essa a temperatura necessária para que a enzima perca 50% do seu máximo de atividade catalítica.

REFERÊNCIAS

ABELYAN, V. A.; AFYAN, K. B.; AVAKYAN, Z. G.; MELKUMYAN, A. G.; AFRIKYAN, E. G. Cyclomaltodextrin glucotransferases from thermophilic actinomycetes. *Biochemistry (Moscow)*. v. 60, n.10, p. 1223-1229, 1995.

ABDEL–NABY, M. A., FOUAD, A. A., REYAD, R. M. Catalytic and thermodynamic properties of immobilized *Bacillus amyloliquefaciens* cyclodextrin glucosyltransferase on different carriers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 116, p. 140–147, 2015.

AI-NOI, S., ABD-AZIZ, S., ALITHEEN, N., HASSAN, O., KARIM, M. I. A. Optimization ofcyclodextrin glycosyltransferase production by response surface methodology approach. *Biotechnology,* v. 7, p.10–18, 2008.

ALCÁZAR-ALAY, S. C.; MEIRELES, M. A. A. Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. *Food Science and Technology*, v. 35, n. 2, p. 215-236, 2015.

ALVES PRADO, H. F. Estudo da produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) por *Bacillus* sp alcalofílico. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, 2000.

ALVES-PRADO, H. F.; GOMES, E.; DASILVA, R. Produção de ciclodextrina glicosiltransferse (CGTase) microbiana e aplicação das ciclodextrinas em alimento: Revisão. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologias de Alimentos*, v. 36, n. 1, p. 43-54, 2002.

ALVES-PRADO, H. F.; GOMES, E.; DASILVA, R. Evaluation of Solid and Submerged Fermentations for the Production of cyclodextrin glycosyltransferase by *Paenibacillus campinasensis* H69-3: characterization of crude enzyme. *Applied Biochemistry and Biotechnology,* v. 129, n. 1-3, p. 234-246, 2006.

ALVES-PRADO, H. F.; GOMES, E.; DASILVA, R. Purification and characterization of a cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) from *Paenibacillus campinasensis* strain H69-3. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 136-140, p. 41-55, 2007.

ANDREAUS, J., DALMOLIN, M. C., OLIVEIRA JUNIOR, I. B., BARCELLOS, I. O. Aplicação de ciclodextrinas em processos têxteis. *Química Nova*, v. 33, n. 4, p. 929-937, 2010.

ARIAS, M., GARCÍA-FALCÓN, M. S., GARCÍA-RÍO, L., MEJUTO, J. C., RIAL-OTERO, R., & SIMAL-GÁNDARA, J. Binding constants of oxytetracycline to animal feed divalent cations. *Journal of Food Engineering*, v. 78, p. 69–73, 2007.

ASTRAY, G., GONZALEZ-BARREIRO, C., MEJUTO, J. C., RIAL-OTERO, R., & SIMALGÁNDARA, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, v. 23, p 1631–1640, 2009.

ASTRAY, G. MEJUTO, J.C., MORALES, J., RIAL-OTERO, R., SIMAL-GÁNDARA, J. Factors controlling flavors binding constants to cyclodextrins and their applications in foods. *Food Research International*, v. 43, p. 1212–1218, 2010.

ATANASOVA, N., PETROVA, P., IVANOVA, V., YANKOV, D., VASSILEVA, A., TONKOVA, A. Isolation of Novel Alkaliphilic Bacillus Strains for Cyclodextrin Glucanotransferase Production. *Appl. Biochem. Biotechnol*. v. 149, p 155-167, 2008.

ATANASOVA N, KITAYSKA T, BOJADJIEVA I, YANKOV D, TONKOVA A. A novel cyclodextrin glucanotransferase from alkaliphilic Bacillus *pseudalcaliphilus* 20RF: purification and properties. *Process Biochem*., v. 46, p. 116-122, 2011.

AVCI, A., DÖNMEZ, S., Purification and characterization of a thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacter* sp. P4. Afr. J. Biotechnol., v. 11(45), p.10407-10415, 2012.

BHATNAGAR, B. S.; BOGNER, R. H.; PIKAL, M. J. Protein Stability During Freezing: Separation of Stresses and Mechanisms of Protein Stabilization. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 12, n. 5, p. 505-523, 2007.

BENDER, H. Cyclodextrin glucanotransferase from *Klebsiella pneumoniae*. 1. Formation, purification and properties of the enzyme from *Klebsiella pneumonia. Arch. Microbiol*., v.111, 271-282, 1977.

BENDER, H. Production, Characterization, and application of cyclodextrins. *Advances in Biotechnological Processes*. v.6, p. 31-71, 1986.

BERNA, P. Estude de purification et de l'interaction de la cyclodextrine glycosyl transferase avec um ligand bioespecifique et um ligand pseudobioespecifique. Tese de Doutorado, Université de Tecnolologie de Compiègne, Compiègne, França, 1990.

BERTOLDO, C., ANTRANIKIAN, G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Biocatalysis and biotransformation,* 2002, 6:151–160, 2002.

BIWER, A., ANTRANIKIAN, G., & HEINZLE, E. Enzymatic production of cyclodextrins. *Applied Microbiology and Biotechnology,* v. 59, p. 609–617, 2002.

BLUM, H., BIER, H., AND GROSS, H. J. *Eletrophoresis, v.* 8, p. 93 – 99, 1987.

BONILHA, P. R. M., V., MENOCCI, A. J., GOULART, POLIZELI, M. L. T. M., MONTI, R. Cyclodextrin glycosiltransferase from *Bacillus licheniformis*: optimization of production and its properties, *Brazilian Journal of Microbiology*, v 37, p. 317-323, 2006.

BOVETTO, L. J.; BACKER, D. P.; VILLETTE, J. R.; SICARD, P. J.; BOUQUELET, S. J. Cyclomaltodextrin glucanotransferase from Bacillus circulans E 192. I. Purification and characterization of the enzyme. *Biotechnology and applied biochemistry*, v. 15, p. 48-58, 1992.

CALSAVARA, L. P. V.; CUNHA, A. R. D.; BALBINO, T. A.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Production of Cyclodextrins from Cornstarch Granules in a Sequential Batch Mode and in the Presence of Ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology,* v. 165, p. 1485–1493, 2011.

CHE MAN, R., ISMAIL, A. F., FUZI, S.F. Z. M., GHAZALI, N. F., ILLIAS, R. M. Effects of culture conditions of immobilized recombinant Escherichia coli on cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) excretion and cell stability. *Process Biochemistry*, v. 51, p. 474–483, 2016.

CIRELI, A.; YURDAKUL, B.; Application of cyclodextrin to the textile dyeing and washing processes. *J. Appl. Polym. Sci. v. 100*, p. 208, 2006.

CHO, E., TAHIR, M. N., CHOI J. M., KIM, H., YU, J., JUNG, S. Novel magnetic nanoparticles coated by benzene- and β-cyclodextrin-bearing dextran, and the sorption of polycyclic aromatic hydrocarbon. *Carbohydrate Polymers*, v. 133, p. 221-228, 2015.

COELHO, S. L. A., MAGALHÃES, V. C., P. MARBACH, ARTHUR S., CAZETTA M. L. A new alkalophilic isolate of *Bacillus* as a producer of cyclodextrin glycosyltransferase using cassava flour. Brazilian Journal of Microbiology, v. 4 7, p. 120–128, 2016.

COMERFORD, K.B., ARTISS, J.D., JEN, K.L., KARAKAS, S.E. The beneficial effects of alpha-cyclodextrin on blood lipids and weight loss in healthy humans. *Obesity*, v.19, p. 1200–1204, 2011.

CONNORS, K. A. The stability of cyclodextrin complexes in solution. *Chemical Reviews*, v. 5, p. 1325–1357, 1997.

DEL VALLE, E.M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1033–1046, 2004.

DENARDIN, C. C., SILVA, L.P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 39, p. 945-954, 2009.

DENNISON, C. A Guide to Protein Isolation*. Springer Netherlands*, 249 ISBN 978-90-481-6266-6, 2003.

ELBAZ, A. F.; SOBHI, A.; ELMEKAWY, A. Purification and characterization of cyclodextrin β-glucanotransferase from novel alkalophilic bacilli. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, v. 38, p. 767–776, 2015.

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 Biosyst Eng*. v. 38, p. 1291–1301, 2015.

FRENCH, D. The Schardinger Dextrins. *Adv. Carbohydr. Chem*., v. 12, p.189-260, 1957.

FRENCH D., PULLEY A.O., EFFENBERGER J.A., ROUGVIE M.A., Abdullah M. Studies on the Schardinger dextrins. XII. The molecular size and structure of the delta-, epsilon-, zeta-, and eta-dextrins. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 111, p. 153–160, 1965.

FUJIWARA, S.; KAKIHARA, H.; SAKAGUCHI, K.; IMANAKA, T. Analysis of mutations in cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* which affect cyclization characteristics and thermostability. *Journal of Bacteriology.* v. 174, n.22, p 7474-7481, 1992.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amilose as the substrate. *J. Biochem*. v. 41, p. 583-603, 1954.

GARBEVA, P. VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Predominant Ispp. in Agricultural Soil under Different Management Regimes Detected via PCR-DGGE. New York: Microbial Ecology, v.45, p. 302-316, 2003.

GARCÍA-SEGOVIA, P., BARRETO-PALACIOS, V., BRETÓN, J., MARTÍNEZ-MONZÓ, J. Microencapsulationof Essentials oils using β-cyclodextrin: Applications in gastronomy. *Journal of Culinary Science and Technology*, v. 9, n 4, p 150-157, 2011.

GASTÓN J.A.R., COSTA H, ROSSI A.L., KRYMKIEWICZ N, FERRAROTTI A.S. Maltooligosaccharides production catalysed by cyclodextringlycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R in batch andcontinuous operation. *Process Biochem*. v. 47, p. 2562–2565, 2012.

GAWANDE, B. N.; GOEL, A.; PATKAR, A.; NENE, S. N. Purification and properties of a novel raw starch degrading cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus*. Applied Microbiology Biotechnology. v. 51, p. 504-509, 1998.

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.

GOH, K. M., MAHADI, N. M., HASSAN, O., RAHMAN, R., ILLIAS, R. M. A predominant beta-CGTase G1 engineered to elucidate the relationship between protein struc-ture and product specificity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 57, p. 270–277, 2009.

GRADY, E. N., MACDONALD, J., LIU, L., RICHMAN, A., YUAN, Z. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb. Cell Fact.*, v. 15, n. 203, p. 1-18, 2016.

GUICHARD, E. Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception. *Food Reviews International*, v. 18, 2007.

GURU, M. M. S., RAJAKUMARI, D. M., JAYASHREE, S., FAUZIA, M., KUMAR, D. J. M., KALAICHELVAN, P. T., Production and purification of CGTase of alkalophilic *Bacillus* isolated from Marneri pond in Tirunelveli District, Tamil Nadu. J. Acad. Ind. Res., 2, 101-105, 2012.

HAN, R., LI, J. SHIN, H., CHEN, R. R., DU, G., LIU, L., CHEN, J. Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications. *Biotechnology Advances*, v. 32, p. 415–428, 2014.

HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry,* v. 48, p. 422-427,1972.

HERMES, V. S. Purificação e caracterização de ciclodextrina glicosiltransferase produzida por *Stenotrophomonas maltophilia*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

IBRAHIM, A.S.S.; AL-SALAMAH, A.A.; EL-TAYEB, M.A.; EL-BADAWI, Y.B.; ANTRANIKIAN, G. A Novel Cyclodextrin Glycosyltransferase from Alkaliphilic *Amphibacillus* sp. NPST-10: Purification and Properties*. International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, p. 10505-10522, 2012.

IJAZ, M., MATUSZCZAK, B., RAHMAT, D., MAHMOOD, A., BONENGEL, S., HUSSAIN, S. Synthesis and characterization of thiolated β-CD as a novel mucoadhesive excipient for intra-oral drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, v.132, p. 187–195, 2015.

JAMUNA, R.; SASWATHI, N.; SHEELA, R.; RAMAKRISHNA, S. V. Syntesis of cyclodextrin-Glucosiltransferase by *Bacillus cereus* for the production of cyclodextrins. *Appl. Biochem. Biotechnol. v.* 43, p. 163-176, 1993.

JEMLI, S.; MESSAOUD, E. B.; MABROUK, S. B.; BEJAR, S. The cyclodextrin glycosyltransferase of *Paenibacillus pabuli* US132 strain: molecular characterization and overproduction of the recombinant enzyme. *J Biomed Biotech.,* p. 1–9, 2008.

JUNG, S. W., KIM, T. K., LEE, K. W., LEE, Y. H. Catalytic properties of b-cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. BL-12 and intermolecular transglycosylation of stevioside. *Biotechnol Bioprocess Eng.,* v. 12, p. 207–212, 2007.

JIA, X., YE, X., CHEN, J., LIN, X., VASSEUR, L., YOU, M. Purification and biochemical characterization of a cyclodextrin glycosyltransferase from *Geobacillus thermoglucosidans* CHB1, *Starch/Stärke*, v. 70, 2018.

KAULPIBOON, J., PONGSAWASDI, P. Purification and characterization of cyclodextrinase from *Paenibacillus* sp. A11. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36, 168–175, 2005.

KNITTEL, D., THOMS, G., BUSCHMANN, H.-J., SCHOLLMEYER, E. Bestimmung der Cyclodextrinauflage auf Textilien. *Melliand Textilber*, v. 86, p. 463-464, 2005.

KITAYSKA, T., PETROVA, P., IVANOVA, V., TONKOVA, A. I. Purification and Properties of a New Thermostable Cyclodextrin Glucanotransferase from *Bacillus pseudalcaliphilus* 8SB. *Appl Biochem Biotechnol,* v. 165, p. 1285–1295, 2011.

LAKKAKULA, J. R., MACEDO KRAUSE, R. W. A vision for cyclodextrin nanoparticles in drug delivery systems and pharmaceutical applications. *Nanomedicine* London, v. 9, p. 877–894, 2014.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, v. 27, p. 680–685, 1970.

LEE, J. H.; CHOI, K. H.; LEE, Y. S.; KWON, I.B.; YU, J. H. Enzymatic production of γ- cyclodextrin with the cyclomaltodextrin glucanotransferase of *Klebsiella oxytoca* 191. *Enzyme and Microbial Technology*. v.14, n.12, p. 1017-1020, 1992.

LEE, Y.; ZHOU, Y.; • PARK, D.; CHANG, J.; CHOI, Y. L. β-cyclodextrin production by the cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus illinoisensis* ZY-08: cloning, purification, and properties. *World J. Microbiol. Biotechnol.,* v. 29, p.865–873, 2013.

LEEMHUIS, H.; KRAGH, K. M.; DIJKSTRA, B. W.; DIJKHUIZEN, L. Engineering cyclodextrin glycosyltransferase into a starch hydrolase with a high exo-specificity. *J Biotechnologyl*, v. 103, p. 203– 212, 2003.

LEEMHUIS, H.; KELLY, R. M.; DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications. Applied *Microbiology and Biotechnology*, v. 85, p. 823–835, 2010.

LI, M.; WANG, F. WANG, Z. GU, G. DU, J. WU, J. CHEN. Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. *Appl. Microbiology Biotechnology,* v. 77, p. 245–255, 2007.

LIMA, P. S.S., LUCCHESE, A. M., ARAÚJO-FILHO, H. G., MENEZES, P. P., ARAÚJO, A. A. S., QUINTANS-JÚNIOR, L. J., QUINTANS, J. S.S. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches. *Carbohydrate Polymers*, v. 151, p. 965–987, 2016.

LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C., GALLUR, M., CATALÁ, R., GAVARA, R., & HERNANDEZ MUÑOZ, P. Immobilization of β-cyclodextrin in ethylene-vinyl alcohol copolymer for active food packaging applications. *Journal of Membrane Science*, V. 353, P. 184–191, 2010.

LOFTSSON, T., VOGENSEN, S.B., BREWSTER, M.E., KONRAÐSDOTTIR, F. Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. *J. Pharm. Science*, v. 96, p. 2532–2546, 2007.

LUBBERS, S., LANDY, P., VOILLEY, A. Retention and release of aroma compounds in food containing proteins. *Journal of Food Technology*, v.52, p. 68–74, 1998.

MÄKELÄ, M. J., KORPELA, T. K., PUISTO, J.; LAAKSO, S. V. Nonchromatographic cyclodextrin assays: evaluation of sensitivity, and conversion mixture applications. *Journal Agric. Food Chem.* v. 36, p. 83-88, 1988.

MALDONADO, H. G.; LOPEZ, O. P. Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 35, n. 5, p. 373-403, 1995.

MARECHAL, L. R., ROSSO, A. M., MARECHAL, M. A., KRYMKIEWICZ, N., FERRAROTTI, S. A. Some properties of a cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* DF9R type*. Cell Mol. Biol.* v. 42, p. 659-664, 1996.

MARTEL, B., WELTROWSKI, M., RUFFIN, D. MORCELLET, M. Polycarboxylic acids as crosslinking agents for grafting cyclodextrins onto cotton and wool fabrics: Study of the process parameters. *J. Appl. Polym Sci*, v. 83, p. 1449-1456, 2002.

MARTINS, R., F. HATTI-KAUL, R. A new cyclodextrin glycosyltransferase from na alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterisation. *Enzyme and Microbiol Technology,* v. 30, n. 1, p. 116-124, 2002.

MATIOLI, G.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais, 1ª ed.; Editora da UEM: Maringá, p. 07-26, 2000.

MORA, M. M. M.; SÁNCHEZ, K. H.; SANTANA, R. V.; ROJAS, A. P.; RAMÍREZ, H. L.; TORRES-LABANDEIRA, J. J. Partial purification and properties of cyclodextrin glycosiltransferase (CGTase) from alkalophilic *Bacillus* species. *Springer Plus,* p. 1-6, 2012.

MORI, S.; GOTO, M.; MASE, T.; MATSUURA, A.; OYA, T.; KITAHATA, S. Reaction conditions for the production of □-cyclodextrin by cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp n° 9605. *Bioscience Biotechnology Biochemistry.* v.59, n.6, p. 1012-1015, 1995.

MORI, S.; HIROSE, S.; OYA, T.; KITAHATA, S. Purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp n° 9605. *Biocience Biotechnology Biochemistry*. v.58, n. 11, p. 1968-1972, 1994.

MORIWAKI, C., COSTA, G. L., PAZZETTO, ZANIN, G. M., R., MORAES, F. F., PORTILHO, M., MATIOLI, G. Production and characterization of a new cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* isolated from Brazilian soil. *Process Biochemistry*., v. 42, p. 1384-1390, 2007.

MORIWAKI, C.; MAZZER, C.; PAZZETTO, R., MATIOLI, G.; Produção, purificação e aumento da performance de ciclodextrina glicosiltransferases para a produção de ciclodextrinas. *Química nova.* v. 32, n. 9, p. 2360-2366, 2009.

MORIWAKI, C., MANGOLIM, C. S., RUIZ, G. B., MORAIS, G. R., BAESSO, M. L., MATIOLI, G. Biosynthesis of CGTase by immobilized alkalophilic bacilli and crystallization of beta-cyclodextrin: Effective techniques to investigate cell immobilization and the production of cyclodextrins. *Biochemical Engineering Journal.* v. 83, p. 22-32, 2014.

MENOCCI, V.; GOULART, A. J.; ADALBERTO, P. R.; TAVANO, O. L.; MARQUES, D. P.; CONTIERO, J.; MONTI, R. Cyclodextrin glycosyltransferase production by new *Bacillus sp*. strains isolated from brazilian soil. *Braz. J. Microbiol.,* v. 39, p. 682-688, 2008.

NAKAMURA, N.; HORIKOSHI, K. Purification and properties of neutral cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic Bacillus sp. *Agric. Biol. Chem*., v. 40, 1785-1791, 1976.

OLIVEIRA, M. G., GUIMARAES, A. G., ARAUJO, A. A., QUINTANS, J. S., SANTOS, M. R., & QUINTANS-JUNIOR, L. J. Cyclodextrins: improving the therapeutic response of analgesic drugs: a patent review*. Expert Opinion on Therapeutic Patents,* v. 25, v. 8, p. 897–907, 2015.

PARK, C.S.; PARK, K.H.; KIM, S.H. A rapid screening method for alkaline b-cyclodextrin glucanotransferase using phenolphthalein-methylorange containing solid medium. *Agric. Biol. Chem.,* v. 53, n. 4, p. 1167-1169,1989.

PEREVA, S. SARAFSKA, T. BOGDANOVA, S. SPASSOV, T. Efficiency of “cyclodextrin-ibuprofen” inclusion complex formation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology, v.* 35, p. 34-39, 2016.

PETROVA, P., TOMOVA, I., PETROV, K., NIKOV, I., TONKOVA, A. Purification and properties of a new recombinant cyclodextrin glucanotransferase from *E. coli* BL21 (DE3) pJCGT8-5. *Compt. rend. Acad. bulg. Sci*., v. 66, n. 10, p. 1437- 1444, 2013.

PINHO, E., GROOTVELD, M., SOARES, G., HENRIQUES, M. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers*, v. 101 p.121–135, 2014.

PISHTIYSKI, I.; ZHEKOVA, B. Effect of different substrates and their preliminary treatment on cyclodextrin production. World *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 22, p. 109-114, 2006.

PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Screening and indentification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing bacteria. *Journal Fermentation Technology.* v.65, n.4, p. 463- 467, 1987.

PSZCZOLA, D. E. Prodution and potencial food applications of cyclodextrins. *Food Technology,* p. 96-100, 1988.

QU, Y.; BOLEN, C. L.; BOLEN, D. W. Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 16, p. 9268-9273, 1998.

RAJPUT, K. N., PATEL, K. C., TRIVEDI, U. B. A novel cyclodextrin glucanotransferase from an alkaliphile *Microbacterium terrae* KNR 9: purification and properties. *Springer*, v. 6, p. 168-179, 2016.

RATHER, M. Y., ARA, K. Z. G., KARLSSON, E. N., ADLERCREUTZ, P. Characterization of cyclodextrin glycosyltransferases (CGTases) andtheir application for synthesis of alkyl glycosides with oligomerichead group. *Process Biochemistry* , v. 50 p. 722–728, 2015.

RENDLEMAN Jr., J. A. Enzymic conversion of malto-oligosaccharides and maltodextrin into cyclodextrin at low*.* Biotechnol. and Applied biochem. v.24, p. 129, 1996.

ROBYT, J. F. Essentials of carbohydrate chemistry. New York. Springer, *C*ap. 6, p. 160-168, 1998.

ROJAS, M. J., CASTRAL, T. C., GIORDANO, R. L.C., TARDIOLI, P. W. Development and validation of a simple high performance liquid chromatography – evaporative light scattering detector method for direct quantification of native cyclodextrins in a cyclization medium. *Journal of Chromatography A*, v. 1410, p. 140–146, 2015.

ROSS, N.; VILLEMUR, R.; MARCANDELLA, E.; DESCHEˆNES, L.; Assessment of changes in biodiversity when a community of ultramicrobacteria isolated from groundwater is stimulated to form a biofilm. *Microbial Ecol*. v. 42, p. 56–68, 2001.

SABIONI, J. G.; PARK, Y. K. Production and characterzation of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus lentus. Starch/Stärke.* v.44, n.6, p. 225-229, 1992.

SAGU, S.T.; NSO, E.J.; HOMANN, T.; KAPSEU, C.; RAWEL, H.M. Extraction and purification of beta-amylase from stems of *Abrus precatorius* by three phase partitioning. Food Chemistry. v. 183, p. 144–153, 2015.

SAINT-EVE, A.; MARTIN, N.; GUILLEMIN, H.; SÉMON, E.; GUICHARD, E.; SOUCHON, I. Flavored yogurt complex viscosity influences real-time aroma release in mouth and sensory properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 54, p. 7794-7803, 2006.

SALVA, T. J. G.; LIMA, V. B.; PAGAN, A. P. Screening of alkalophilic bacteria for cyclodextrin glycosyltransferase production. *Revista de Microbiologia*. v. 28, p. 157-164,1997.

SAQIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). *Process Biochemistry,* v. 45, n. 5, p. 641-646, 2010.

SAQIB, A. A. N.; FAROOQ, A.; IQBAL, M.; HASSAN, J. U.; HAYAT, U.; BAIG, S. A thermostable crude endoglucanase produced by *Aspergillus fumigatus* in a novel solid state fermentation process using isolated free water*. Enzyme Res.*, v. 2012, p. 196853, 2012.

SAVERGAVE, L. S.; DHULE, S. S.; JOGDAND, V. V.; NENE, S. N.; GADRE, R. V. Production and single step purification of cyclodextrin glycosyltransferase from alkalophilic *Bacillus firmus* by ion exchange chromatography. *Biochemical Engineering Journal*, v. 39, p. 510–515, 2008.

SCHÖFFER, J. D. N., KLEIN, M. P., RODRIGUES, R. C., & HERTZ, P. F. Continuous production of β-cyclodextrin from starch by highly stable cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on chitosan. Carbohydrate Polymers, v. 98, p. 1311–1316, 2013.

SHUKLA, R. J., SINGH, S.P. Characteristics and thermodynamics of α-amylase from thermophilic actinobacterium, *Laceyella sacchari* TSI-2. *Process Biochemistry*, v. 50, 12, p. 2128-2136, 2015.

SIAN, H. K.; SAID, M.; HASSAN, O.; KAMARUDDIN, K., ISMAIL, A. F., RAHMAN, R. A., MAHMOOD, N. A. N., ILLIAS, R. Md. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. G1. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1101- 1111, 2005.

SIGMA-ALDRICH. https://www.sigmaaldrich.com/brazil, 25 de novembro de 2018.

SHIRAISHI, F. KAWAKAMI, K., MARUSHIMA, H.; KUSUNOKI, K. Effect of ethanol on formation of cyclodextrin from soluble starch by *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase. *Starch/Stärke.* v. 41, n. 4, p. 151-155, 1989.

STARNES, R. L. Industrial potencial of cyclodextrin glycosyltransferases. *Cereal Foods World*.v.35, n.11, p. 1094-1099, 1990.

SZEJTLI, J. Cyclodextrin in food, cosmetic and toiletries. *Starch/Stärke.* v. 34, n.11, p. 379-385, 1982.

SZEJTLI, J. Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. *Journal Mater. Chem.* v.7, n.4, p.575-587, 1997.

SZEJTLI, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry, *Chem. Rev.*, v. *98*, 5, p. 1743–1754, 1998.

SZENTE, L.; SZEMÁN, J.; SOHAJDA, T. Analytical characterization of cyclodextrins: History, official methods and recommended new techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 130, p. 347–365, 2016.

TAKO, M., TAMAKI, Y., TERYUA, T., TAKEDA, Y. The principles of starch gelatinization and retrogradation. Food and Nutrition Sciences, v. 5, p. 280-291, 2014.

TESTER, R. F.; Karkalas J.; Qi, X. Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science,* v. 39, p. 151–165, 2004.

TILDEN, E. B. AND HUDSON, C. S. Conversion of starch to crystalline dextrins by the action of a new type of amylase separated from cultures of *Aerobacilluw macerano*. J. *Am. Chem. Soc*., 61, 2900-2902, 1939.

TILDEN, E. B.; HUDSON, C. S. Preparation and properties of de amylases produced by *Bacillus macerans* and *Bacillus polymyxa*. *Journal of Bacteriology*. v.43, p.527-544, 1942.

TOMITA, K.; KANEDA, M.; KAWAMURA, K.; NAKANISHI, K. Purification and properties of a cylcodextrin glucanotransferase from *Bacillus autolyticus* 11149 and selective formation of ß-cyclodextrin. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 75, n.2, p. 89- 92, 1993.

UITDEHAAG, J. C. M.; KALK, K. H.; VAN DER VEEN, B. A.; DIJKHUIZEN, L.; DIJKSTRA, B. W. ‘‘The cyclization mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) as revealed by a gamma-cyclodextrin/CGTase complex at 1.8-A ˚ resolution’’, *J. Biol. Chem*., v. 274, p. 34868-34876, 1999.

VADHANAM, M. V., AQIL, F., MUNAGALA, R., JEYABALAN, J. Bioavailability of phytochemicals and its enhancement by drug delivery systems. *Cancer Letters,* v. 334, p. 133–141, 2013.

VAN DER KAAIJ, R.M., YUAN, X. L., FRANKEN, A., RAM, A. F. J., PUNT, P. J., VAN DER MAAREL, M. J. E. C., DIJKHUIZEN, L. Two novel, putatively cell wall-associated and glycosylphosphatidylinositol-anchored α-glucanotransferase enzymes of *Aspergillus niger.* Eukaryotic Cell, v. 6, p. 1178-1188, 2007.

VAN DER VEEN, B. A.; UITDEHAAG, J. C. M.; DIJKSTRA, B. W.; DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin glycosyl transferase reaction and product specificity. *Biochem .Biophys. Acta*. v. 1543: p. 336–360, 2000.

VENTURINI, C. G., NICOLINI, J., MACHADO, C., MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas, *Química nova,* v. 31, n. 2, 360-368, 2008.

VIANA, Y. A.; FILHO, M. D. S. G.; PENHA-SILVA, N. Estabilização de proteínas por osmólitos. *Bioscience Journal*, v. 21, n. 2, 2006.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability, *Microbiol. Mol. Biol. Rev. v.* 65, v. 1–43, 2001.

VOET, D.; VOET, J. G. Bioquímica. Ed. Médica Panamericana, 2006. ISBN 9500623013.

WANG, L., WU, D., CHEN, J., WU, J. Enhanced production of c-cyclodextrin by optimization of reaction of c-cyclodextrin glycosyltransferase as well as synchronous use of isoamylase. *Food Chemistry*, v. 141, p. 3072–3076, 2013.

WHO/FAO. Carbohydrates in human nutrition. Rome: FAO, (FAO food and nutrition paper n. 66) 1998.

XU, Q., CAO, Y., LI, X., LIU, L., QIN, S., WANG, Y., CAO, Y., XU, H., QIAO, D. Purification and characterization of a novel intracellular α-amylase with a wide variety of substrates hydrolysis and transglycosylation activity from *Paenibacillus* sp. SSG-1. *Protein Expression and Purification,* v. 144, p. 62-70, 2018.

YALLAPU, M. M., JAGGI, M., CHAUHAN, S. C. Poly(beta-cyclodextrin)/curcuminself-assembly: a novel approach to improve curcumin delivery and itstherapeutic efficacy in prostate cancer cells. *Macromol Biosci*, v. 10(10), p. 1141–1151, 2010.

YAMAMOTO, K.; ZHANG, Z. Z.; KOBAYASHI, S. Cycloamylose (Cyclodextrin) Glucanotransferase Degrades Intact Granules of Potato Raw Starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 962–966, 2000.

YIM, D.G.; SATO, H.H.; PARK, Y.H. Production of cyclodextrin from starch by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* and characterization of purified enzyme. *Journal of Indutrial Microbiology & Biotechnology*, v.18, p.402-405, 1997.

YU, E. K. C.; AOKI, H.; MISAWA, M. Specific alpha-cyclodextrin production by a novel thermostable cyclodextrin glycosyltransferase. *Applied Microbiol Biotechnol.* v. 28, p. 377- 379, 1988.

ZEEMAN, S.C.; KOSSMANN, J.; SMITH, A.M. Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. Zurich: Annu. Rev. Plant Biol., v. 61, p. 209-234, 2010.

ZHEKOVA B., DOBREV, G., STANCHEV, V., PISHTIYSKI I. Approaches for yield increase of β-cyclodextrin formed by cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium. World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v25, n 46, p. 1043-1049, 2009.