

ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS ALCALOFÍLICOS PRODUTORES DA ENZIMA CICLODEXTRINA GLICOSIL-TRANSFERASE (CGTASE)

HELISSA DE OLIVEIRA MENDONÇA *

JOSÉ GERALDO SABIONI *

Uma cultura de bactéria alcalofílica, bastonete Gram+, com alta capacidade de produção da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) foi isolada de amostras de solo da cidade Ouro Preto, Minas Gerais (Brasil). A produção máxima da enzima ocorreu a 37°C após 72 horas de incubação, sob agitação de 120 ciclos por minuto, em meio alcalofílico (pH 10,3) contendo 2% de amido solúvel, 0,5% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,1% de K_2HPO_4 , 0,02% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 1% de Na_2CO_3 . A temperatura ótima de atividade hidrolítica da enzima situou-se entre 55 e 60°C. Na ausência de substrato, a CGTase mostrou-se 100% estável até 60°C por 30 min. A adição de 10 mmol/L de cloreto de cálcio aumentou sua termo-resistência, resultando em maior produção de ciclodextrinas. O pH ótimo em tampão borato 50 mmol/L foi 8,0. A atividade e a estabilidade em altas temperaturas indicam potencialidade industrial para essa CGTase. Assim, estudos complementares devem ser realizados para identificar a espécie microbiana, purificar a enzima, avaliar o efeito de inibidores enzimáticos, determinar o tipo de ciclodextrina produzida em maior proporção e a taxa de conversão do amido em ciclodextrinas.

PALAVRAS-CHAVE: CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE; CGTASE; MICRORGANISMO ALCALOFÍLICO.

1 INTRODUÇÃO

Enzima multifuncional, a ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), EC 2.4.1.19 catalisa reações como a a (1-4) transglicosilação inter e

* Acadêmica do Curso de Nutrição, Bolsista do Programa de Iniciação à Pesquisa, Departamento de Alimentos, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), MG (e-mail: lili@enut.ufop.br).

** Professor Adjunto de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Alimentos, Escola de Nutrição UFOP, MG (e-mail: sabioni@enut.ufop.br).

intramolecular e a reação hidrolítica a partir do amido e de compostos relacionados ao amido (AKIMARU, YAGI, e YAMAMOTO, 1991). Os produtos de maior importância das CGTases são os α (1-4) oligossacarídeos cíclicos não-redutores, também conhecidos como ciclodextrinas (STARNES, 1990). As ciclodextrinas (CD) produzidas em maior proporção pelas CGTases são a alfa (α), a beta (β) e a gama (γ) ciclodextrinas, que contam com respectivamente seis, sete e oito unidades de glicose (FRENCH, 1957).

As ciclodextrinas são capazes de produzir a inclusão molecular de compostos orgânicos, e devido à esta característica têm encontrado numerosas aplicações na agricultura e nas indústrias químicas, alimentícias e farmacêuticas (AGUIAR, 2001). Nos últimos anos, a demanda pelas CD vem aumentando gradativamente (TOMITA et al. 1993). Têm sido utilizadas como aditivos alimentares e farmacêuticos pela habilidade de mascarar sabor amargo, reduzir a volatilidade, aumentar a estabilidade e a biodisponibilidade de substâncias mediante a formação de complexos de inclusão (TOMITA et al. 1993).

A produção industrial das CGTases tornou-se atrativa somente quando as espécies de *Bacillus* alcalofílicos foram introduzidas como culturas industriais (STARNES, 1990). Já são conhecidas CGTases com diferentes propriedades produzidas por vários microrganismos (AKIMARU, YAGI e YAMAMOTO, 1991, GOEL e NENE, 1995, MARECHAL et al., 1996, MARTINS e HATTI-KAUL, 2002, LARSEN et al., 1998, HIGUTI et al., 2003, SABIONI e PARK, 1992, TOMITA et al., 1993, ISMAIL, 1996, MALTIOLI et al., 1998).

Realizou-se este experimento com o objetivo de isolar novas culturas microbianas alcalofílicas produtoras da CGTase, oriundas de amostras de solo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ISOLAMENTO MICROBIANO

Para o isolamento dos microrganismos produtores de CGTase foram colhidas amostras de solo de diversas regiões da cidade de Ouro Preto (MG). Diluiu-se 1 g de solo em 50 mL de água destilada e

0,1 mL da diluição foi inoculada, superficialmente, em placas contendo o meio de cultivo de PARK, PARK e KIM (1989). As amostras foram incubadas em aerobiose a 37°C por até 5 dias. Colônias circundadas por halo amarelo foram isoladas em ágar alcalofílico inclinado (HORIKOSHI, 1971) e conservadas em temperatura ambiente.

2.2 SELEÇÃO MICROBIANA

Para a quantificação da CGTase, cada cultura foi cultivada em 20 mL de meio alcalofílico de HORIKOSHI (1971) por 72h a 37°C, sob agitação de 120 ciclos por minuto. Após a remoção das células por centrifugação, a CGTase foi quantificada no sobrenadante pelo método ciclodextrina tricloroetileno (CD-TCE) de NOMOTO et al. (1984). Diluiu-se 1 mL do sobrenadante sucessivamente, de duas em duas vezes, em tampão borato 50 mmol/L, pH 8,5 até 2⁸ vezes. Um mililitro da enzima diluída foi incubada com 5 mL do tampão, contendo 2% de amido solúvel, por 48h a 55°C. Culturas com atividade CD-TCE equivalente a 2⁸ foram selecionadas como boas produtoras de CGTase.

2.3 UNIDADE ENZIMÁTICA

Determinou-se a unidade enzimática em função da atividade dextrinizante da amilase CGTase (FUWA, 1954). A mistura em reação continha 0,1 mL da enzima diluída e 0,3 mL de amido solúvel 0,2%, preparados em tampão acetato 50 mmol/L (pH 5,8). Após 10 min de incubação a 55°C, a reação foi paralisada mediante a adição de 4 mL de HCl 0,2M e 0,5 mL de solução de iodo (0,02% de I₂ e 0,2% de KI) e o volume completado para 10 mL com água destilada. Sob tais condições, a unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir em 10% por minuto a intensidade da cor azul do complexo iodo-amido a 700 nm.

2.4 OBTENÇÃO DA ENZIMA BRUTA

A cultura selecionada pela maior capacidade de produção da CGTase foi cultivada a 37°C por 72h, sob contínua agitação de 120 ciclos por minuto, em 800 mL de meio alcalofílico de HORIKOSHI (1971).

Terminada a incubação o cultivo foi centrifugado e o sobrenadante conservado sob congelamento em porções de 20 mL.

2.5 CARACTERÍSTICAS DA ENZIMA

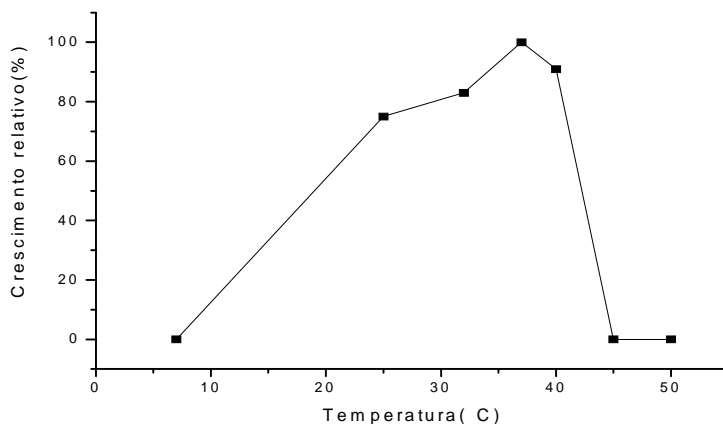
As características que interferem na atividade enzimática foram avaliadas pela capacidade de formação de ciclodextrinas CD-TCE (NOMOTO et al., 1984). No estudo do efeito da temperatura os valores permaneceram entre 20 e 80°C. O efeito do pH na atividade foi determinado em tampão citrato-fosfato, 50 mmol/L (pH 2,6 a 7,0), tampão ácido bórico-borato de sódio, 50 mmol/L (pH 7,6 a 9,2) e em tampão borato de sódio-NaOH, 50 mmol/L (pH 9,3 a 10).

A determinação da temperatura de estabilidade térmica da CGTase foi realizada em presença e ausência de cloreto de cálcio. Aos tubos contendo 2 mL de tampão borato 50 mmol/L (pH 8.0), com e sem cloreto de cálcio 10 mmol/L, foram adicionados 0,1 mL da enzima bruta (8,8 U). Os tubos foram mantidos nas temperaturas de 40°C, 50°C, 55°C, 60°C, 70°C e 80°C por 30 minutos. Em seguida determinou-se a formação de ciclodextrinas da CGTase.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 84 amostras de solo analisadas foram isoladas 85 culturas alcalofílicas produtoras de CGTase em meio de cultivo de PARK, PARK e KIM (1989). Na primeira avaliação da capacidade de produção da enzima dessas culturas (método CD-TCE) (NOMOTO et al., 1984) foram selecionadas 14 culturas com atividade enzimática acima de 2^6 . Na segunda avaliação dos isolados com atividade CD-TCE acima de 2^6 selecionou-se cepa de Bastonete Gram positivo que produziu CGTase ao nível de 2^8 . A cultura, produtora de catalase, foi denominada de alcalofílico HM-8 e apresentou crescimento celular ótimo a 37°C, não exibindo crescimento a 7 ou a 45°C até 24h de incubação (Figura 1). A produção máxima da CGTase da cultura HM-8 ocorreu após 72h de incubação a 37°C, sob agitação de 120 rotações por minuto, em meio de cultivo de HORIKOSHI (1971). Tais condições experimentais de produção de CGTase têm sido relatadas com outros microrganismos (SABIONI e PARK, 1992, GOEL e NENE, 1995, ISMAIL, 1996, HIGUTI et al., 2003, MARTINS e HATTI-KAUL, 2002).

FIGURA 1 – EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DA CULTURA HM-8



A produção máxima de ciclodextrinas da CGTase da cultura HM-8, avaliada pelo método CD-TCE (NOMOTO et al., 1984), ocorreu em temperatura entre 55 e 60°C. Temperaturas de incubação de 50 ou 65°C reduziram a atividade enzimática em mais de 50% (Figura 2). As temperaturas ótimas das CGTases variam de acordo com o microrganismo produtor. A CGTase do *Bacillus circulans* DF9R, estudada por MARECHAL et al. 1996, exibiu atividade máxima a 60°C. Em tabelas comparativas de CGTases produzidas por vários microrganismos, as temperaturas ótimas de atividade hidrolítica situam-se entre 45 a 95°C (LARSEM et al., 1998; MARTINS e HATTI-KAUL, 2002).

O efeito do pH na atividade da CGTase da cultura HM-8 está representado na Figura 3. A atividade ótima foi observada a pH 8 em tampão borato-ácido bórico 50 mmol/L. Incubações em valores de pH 3 ou 10 inibiram significativamente a enzima. Os valores de pH ótimo das CGTases, relatados na literatura, variam de acordo com a espécie microbiana produtora. A CGTase do *Bacillus lentus* exibiu pH ótimo entre 6,5 e 8,5 (SABIONI e PARK, 1992). LARSEN et al. (1998) e MARTIN e HATTI-KAUL (2002) citaram que os microrganismos *Micrococcus varians*, *Bacillus subtilis* e *Brevibacterium* produzem CGTases com atividade hidrolítica máxima em pH 8. Entretanto, HIGUTI

et al. (2003) constataram atividade máxima da CGTase do *Bacillus firmus* em pH 5,5 e 8,5.

FIGURA 2 – EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DA CGTASE DA CULTURA HM-8

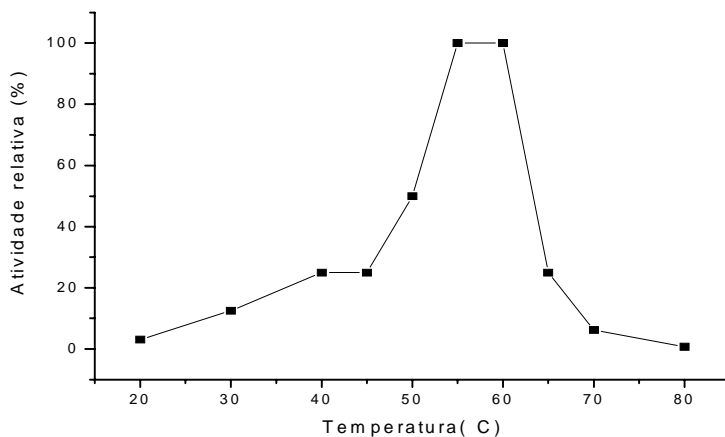
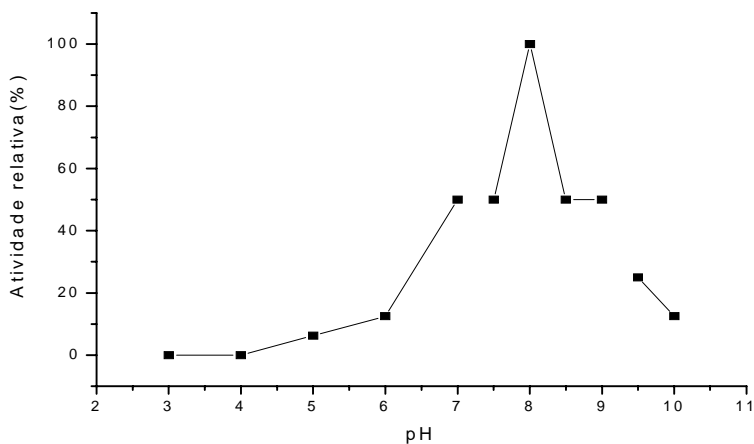
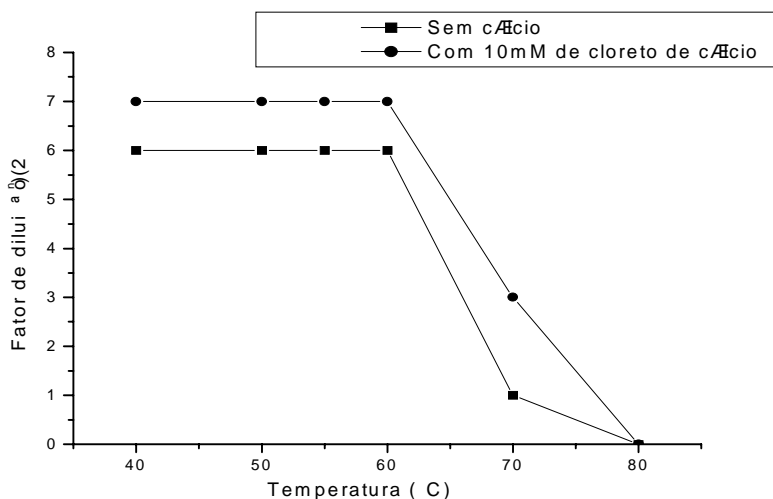


FIGURA 3 – EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA CGTASE DA CULTURA HM-8



O efeito da temperatura na estabilidade térmica da CGTase da cultura HM-8 está apresentado na Figura 4. Na ausência de substrato, a enzima apresentou 100% de estabilidade térmica durante exposição de 30 min a 60°C. Caracteristicamente, as amilases apresentam maior estabilidade térmica na presença de cálcio (MARECHAL et al., 1996, AKIMARU, YAGI e YAMAMOTO, 1991, LARSEN et al., 1998, MARTINS e HATTI-KAUL, 2002). Nota-se pela Figura 4 que a adição de 10 mmol/L de CaCl_2 resultou em atividade CD-TCE de 2^7 , o que equivale a incremento de 100% na atividade enzimática na CGTase deste experimento. A 70°C e na ausência de cálcio a atividade CD-TCE foi 2^1 . Nessa mesma temperatura, a adição de 10 mmol/L de cálcio resultou em atividade CD-TCE de 2^3 .

FIGURA 4 – EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE TÉRMICA DA CGTASE DA CULTURA HM-8, NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE ÍON CÁLCIO



4 CONCLUSÃO

A cultura HM-8 estudada neste experimento apresentou características importantes como temperatura ótima de atividade em torno de 60°C e

boa estabilidade térmica. Entretanto, são necessários estudos complementares para avaliar a potencialidade da cultura. Tais estudos deveriam identificar a espécie microbiana, purificar a enzima por métodos cromatográficos, determinar o tipo de ciclodextrina produzida em maior proporção e a taxa de conversão do amido em ciclodextrinas, bem como pesquisar a interferência de inibidores enzimáticos.

Abstract

ISOLATION OF ALKALOPHILIC MICROORGANISMS PRODUCERS OF THE ENZYME CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE (CGTase)

A culture of an alkalophilic bacterium, rod shaped Gram positive, with high production capacity of the enzyme CGTase was isolated from soil samples of the city of Ouro Preto, Minas Gerais state (Brazil). Maximum enzyme production occurred at 37° C after 72 h of incubation, under agitation of 120 cycles per minute, in alkalophilic medium (pH 10.3) containing 2% soluble starch, 0.5 % peptone, 0.1 % K₂HPO₄, 0.02 % MgSO₄·7H₂O and 1% Na₂CO₃. The optimum temperature of the enzyme hydrolytic activity was between 55 and 60° C. In the absence of substrate, the CGTase showed stability of 100% until 60° C per 30 min. The addition of 10 mmol/L of calcium chloride enhanced its thermal resistance, resulting in a higher production of cyclodextrins. The optimum pH in borate buffer 50 mmol/L was 8.0. The activity and the stability in high temperatures indicate industrial potential for this CGTase. Like this, complementary studies must be realized to identify the microbial species, to purify the enzyme, to evaluate the effect of enzymatic inhibitors, to determine the type of cyclodextrins produced in greater proportion and the conversion rate of starch in cyclodextrins.

KEY-WORDS: CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE; CGTase; ALKALOPHILIC MICROORGANISM

REFERÊNCIAS

- 1 AGUIAR, L.C. Ciclodextrina glicosiltransferase: produção, ação e aplicação. **B. CEPPA**, Curitiba, v.19, n.1, p.119-138, jan./jun. 2001.
- 2 AKIMARU, K.; YAGI, T.; YAMAMOTO, S. Purification and properties of *Bacillus coagulans* cyclomalto-dextrin glucanotransferase. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 71, n. 5, p. 322-328, 1991.
- 3 FRENCH, D. The schardinger dextrins. **Adv. Carbohydr. Chem.**, v.12, p. 189-260, 1957.
- 4 FUWA, H.J. A new method for microdetermination of amylase activity by use of the amylose as the substrate. **Journal Biochemical**, v. 41, p. 583-603, 1954.

- 5 GOEL, A.; NENE, S. A. A novel cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus* that degrades raw starch. **Biotechnol. Lett.**, v. 17, p. 411-416, 1995.
- 6 HIGUTI, I.H.; GRANDE, S.W.; SACO, R.; NASCIMENTO, A.J. Isolation of alkalophilic CGTase-producing bacteria and characterization of cyclodextrin-glycosyltransferase. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 2, p.183-186, 2003.
- 7 HORIKOSHI, K. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus*. **Agric. Biol. Chem.**, v. 35, p.1407-1414, 1971.
- 8 ISMAIL, A. M. Biosynthesis of cyclodextrin glucosyltransferase and β -cyclodextrin by *Bacillus macerans* 314 and properties of the crude enzyme. **Biochem. Eng. J.**, v.61, p. 247-253, 1996.
- 9 LARSEN, K.L.; DUEDAHL-OLESEN, L.; CHRISTENSEN, H.J.S.; MATHIESEN, F.; PEDERSEN, L.H.; ZIMMOL/LERMANN, W. Purification and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus sp.F8*. **Carbohydrate Research**, v. 310, p.211-219, 1998.
- 10 MALTIOLO, G.; ZANI, G.M.; GUIMARÃES, M.F.; MORAES, F.F. Production and purification of CGTase of alkalophilic *Bacillus* isolated from brazilian soil. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 70, n. 2, p.267-275, 1998.
- 11 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.
- 12 MARTINS, R.F.; HATTI-KAUL, R. A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkalophilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, p.116-124, 2002.
- 13 NOMOTO, M.; SHEW, D.C.; CHEN, S.; YEN, C.W.L.; YANG, C.P. Cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic bacteria of Taiwan. **Agric. Biol. Chem.**, v. 48, p. 1337-1338, 1984.
- 14 PARK, C. S.; PARK, K.H.; KIM, S.H. A rapid screening method for alkaline β -cyclodextrin glucanotransferase using phenolphthalein – methyl orange – containing – solid medium. **Agric. Biol. Chem.**, v. 53, p. 1167-1169, 1989.
- 15 SABIONI, J. G.; PARK, Y. K. Production and characterization of Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus lentus*. **Starch/Stark.**, v. 44, p. 225-229, 1992.
- 16 STARNES, R.L. Industrial potential of cyclodextrin glycosyltransferase. **Cereal Food World**, v. 35, p. 1094-1099, 1990.

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