

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – ICTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - PPGCTA

Carla Roberta Matte

**IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE EM
MICROESFERAS DE SILICA-POLIETILENOGLICOL**

Porto Alegre

2011

Carla Roberta Matte

**IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE EM
MICROESFERAS DE SILICA-POLIETILENOGLICOL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Dr. Plinho Francisco Hertz

Porto Alegre, Janeiro de 2011

M435i Matte, Carla Roberta
 Imobilização covalente de ciclodextrina glicosiltransferase em
 microesferas de sílica-poli(etileno)glicol. / Carla Roberta Matte. --
 Porto Alegre, 2011.

 64f. : il.

 Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-graduação em
 Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia
 de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, BR-RS,
 2011.

 Orientador: Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz

 Bibliografia

 1. Enzimas 2. Ciclodextrina 3. Caracterização enzimática 4.
 Imobilização enzimática I. Título. II. Hertz, Plinho Francisco (Orient.).

 CDU 577.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

Carla Roberta Matte

Bacharel em Química Industrial de Alimentos – UNIJUI/UERGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Pela Banca Examinadora:

Aprovada em:

Homologado em:

Por:

Plinho Francisco Hertz
Orientador – PPGCTA/UFRGS

Adriano Brandelli
Banca – PPGCTA/UFRGS

Rafael Costa Rodrigues
Banca – UFRGS

Júlio Xandro Heck
Banca – IFRS

José Maria Wiest
Coordenador do Programa de Pós Graduação
em Ciência e Tecnologia de Alimentos
(PPGCTA)

Vitor Manfroi
Diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de
Alimentos
ICTA– PPGCTA/UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Ao Luciano, meu amor, a pessoa que sempre esteve ao meu lado, pelo amor, carinho, paciência e companheirismo. Por ter compartilhado meus anseios e angústias durante este percurso.

Aos meus pais e avós por todo apoio e empenho para que tudo isso fosse possível.

Agradeço a vocês pela confiança, amor e incentivo.

A minha irmã Claudia pelo carinho de sempre, mesmo a distância.

Ao meu orientador (mais conhecido como chefe) por ter acreditado em mim e no meu potencial para desenvolver esse trabalho. Pela sua amizade, compreensão e ensinamentos transmitidos.

Ao PPGCTA, em especial aos professores, pelos ensinamentos e pela palavra amiga.

As colegas Manu, Shê e Mari pela amizade, companheirismo, troca de conhecimentos e experiências, dividindo momentos de dúvidas, questionamentos, mas também de conquistas e realizações.

À minha “grande” Van, pela amizade e carinho sempre. Foste muito importante nesta minha caminhada.

À minha colega de graduação, colega de mestrado e amiga Stela, pela amizade e presença em todos os momentos, sejam eles bons ou ruins.

Aos colegas do BiotecLab que fizeram parte dessa trajetória. Foi muito bom ter convivido com vocês.

Ao meu bolsista Alexandre, por sua disposição, motivação e amizade. Também agradeço a Cris e a Jé que foram parte importante dessa trajetória.

As minhas amigas e familiares de Cândido Godói e Santa Rosa, por entenderem minha ausência em muitos momentos e estarem sempre torcendo pelas minhas vitórias.

Também, a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho.

Finalmente, agradeço a Deus pelo dom da vida e por ter colocado todas essas pessoas especiais no meu caminho, sem as quais não teria conseguido chegar até aqui.

IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE EM MICROESFERAS DE SILICA-POLIETILENOGLICOL

Autor: Carla Roberta Matte

Orientador: Plinho Francisco Hertz

RESUMO

Ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) é a enzima capaz de converter o amido e seus açúcares relacionados em ciclodextrinas (CDs) através da reação de ciclização. As CDs têm inúmeras aplicações na indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos, devido à sua capacidade de encapsular moléculas hidrofóbicas dentro de sua cavidade. A CGTase de *Thermoanaerobacter sp.* é capaz de converter o amido em CDs sob condições de processo industrial, em temperaturas elevadas. A produção de CDs em escala industrial é feita, geralmente, em processos de batelada, nos quais é utilizada a enzima livre diretamente. No entanto, a imobilização da CGTase tem sido testada, com o propósito de permitir seu uso contínua e repetidamente, de modo a prevenir sua solubilização e promover uma forma molecular mais estável. Neste trabalho, buscou-se imobilizá-la em microesferas de sílica-poli(etileno)glicol (sílica-PEG). O suporte foi silanizado com 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS) e ativado com glutaraldeído para gerar condições de imobilização de enzimas, que foi realizada a 6°C e pH 6, durante 15h. O rendimento de imobilização e a atividade recuperada foram 83% e 73%, respectivamente. Os resultados foram comparados com estudos anteriores sobre a imobilização covalente de CGTase. As propriedades enzimáticas da CGTase imobilizada foram investigadas e comparadas com as da enzima solúvel. CGTases solúveis e imobilizadas apresentaram valores similares de pH ótimo. Por outro lado, a temperatura ótima foi de 100°C e 80°C para as formas solúvel e imobilizada da enzima, respectivamente. Em comparação com a CGTase solúvel, a forma imobilizada apresentou maior K_m (constante de Michaelis), menor V_{max} (velocidade máxima de reação), a estabilidade de armazenamento diminuiu cerca de 15% e apenas um ligeiro decréscimo foi observado quando a estabilidade térmica estava sob avaliação. A estabilidade operacional foi medida em repetidos processos de batelada e a enzima imobilizada reteve cerca de 60% da atividade catalítica inicial, após 15 ciclos.

Palavras-chave: Ciclodextrina glicosiltransferase, imobilização CGTase, Toruzyme®, *Thermoanaerobacter sp.*, Sílica

COVALENT IMMOBILIZATION OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE ONTO SILICA-POLYETHYLENEGLICOL MICROSPHERES

Author: Carla Roberta Matte

Supervisor: Plinho Francisco Hertz

ABSTRACT

Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) is the enzyme able to convert starch and related sugars into cyclodextrins (CDs) via cyclization reaction. Cyclodextrins have numerous applications in the pharmaceutical, cosmetics, and food industry, because of their capacity to encapsulate hydrophobic molecules within their cavity. The CGTase from the *Thermoanaerobacter sp.* is able to degrade starch into CDs under industrial conditions (high temperature). For the industrial scale production of CDs, conventional batch production methods, which utilize soluble CGTase directly, have been mainly adopted. However the immobilization of CGTase has been pursued with the purpose of allow its reuse continuously and repeatedly by avoiding enzyme solubilization and promoting a more stable molecule form. In this research, *Thermoanaerobacter* CGTase was immobilized on silica-polyethyleneglycol (silica-PEG) microspheres. The support was silanized with 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) and activated with glutaraldehyde to generate conditions for enzyme immobilization, which was carried out at 6°C and pH 6, during 15h. The immobilization yield and recovery activity was around 83% and 73%, respectively. Results were compared with previous studies on covalent immobilization of CGTase. The enzymatic properties of immobilized CGTase were investigated and compared with those of the soluble enzyme. Soluble and immobilized CGTases showed similar values for optimum pH. On the other hand, the optimum temperature was 100°C and 80°C for the soluble and immobilized forms, respectively. In comparison with the soluble CGTase, the immobilized form exhibited higher K_m (Michaelis constant), lower V_{max} (maximal reaction rate), the storage stability was decreased about 15% and just a slight decrease was observed when thermal stability was under evaluation. The operational stability was evaluated in repeated batch process and the immobilized enzyme retained about 60% of the initial catalytic activity after 15 cycles.

Keywords: Cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase immobilization, Toruzyme®, *Thermoanaerobacter sp.*, Silica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das reações de transglicosilação catalisadas pela CGTase, sendo cada círculo representante de uma unidade de glicose. A) ciclização, B) acoplamento, C) desproporcionação e D) hidrólise (VAN DER VEEN et al., 2000a).	13
Figura 2 -Estruturas das α -, β -, γ -ciclodextrinas (VAN DER VEEN et al., 2000a).	14
Figura 3 - Solubilidade em água (mg de CD/g) de (\square) α -CDs, (\bullet) β -CDs e (\circ) γ -CDs em relação a temperatura (expressa em kelvin) (ASTRAY et al., 2009).	16
Figura 4 - Representação esquemática da formação do complexo de inclusão da ciclodextrina. A molécula hospede é o p -Xileno e os círculos menores representam as moléculas de água (CEREDA, 2003).	18
Figura 5 - Imobilização covalente de enzimas em suporte sólido (CARDOSO et al., 2009).	24
Figura 6 - Processo de imobilização covalente com (a) silanização com APTS (3-aminopropiltriétoxissilano), ativação (b) com glutaraldeído (CARDOSO et al., 2009).	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades das ciclodextrinas (VAN DER VEEN et al., 2000a).....	15
Tabela 2 - Vantagens e desvantagens do método de imobilização por ligação covalente (CARDOSO et al., 2009; BON et al., 2008).....	25
Tabela 3 - Imobilização da CGTase <i>Thermoanaerobacter</i> na literatura.....	25
Tabela 4 - Parâmetros obtidos em um dos processos de imobilização de CGTase em filme de celulose/líquido iônico modificado com grupos amina.....	64
Tabela 5 - Parâmetros obtidos em um dos processos de imobilização de CGTase em filme de celulose/líquido iônico modificado com grupos amina em presença de substrato (solução a 1%).....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

APTES	3-aminopropyltriethoxysilano
APTMS	3-aminopropyltrimethoxysilano
BET	Método Brunauer–Emmett–Teller
BJH	Método Barrett–Joyner–Halenda
CD	Ciclodextrina
CGTase	Ciclodextrina glicosiltransferase
HEMDA	Hexametiletilenodiamina
ICGTase	Ciclodextrina glicosiltransferase imobilizada
K_m	Constante de Michaelis-Menten
PEG	Polietilenoglicol
V_{max}	Velocidade máxima da reação
α -CD	Alfa-ciclodextrina
β -CD	Beta-ciclodextrina
γ -CD	Gama-ciclodextrina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
1 CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE	12
1.1 CICLODEXTRINAS.....	14
1.2 APLICAÇÃO DAS CICLODEXTRINAS EM ALIMENTOS	19
2 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	21
2.1 SUPORTES	22
2.2 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO.....	23
2.3 PROCESSO DE SILANIZAÇÃO.....	26
2.4 LIMITAÇÕES DA IMOBILIZAÇÃO	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 ANÁLISES ENZIMÁTICAS DA CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE LIVRE (CGT _{ASE}) E IMOBILIZADA (ICGT _{ASE})	29
3.2 SÍNTESE DO SUPORTE (SÍLICA-PEG)	30
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA SÍLICA-PEG	31
3.4 IMOBILIZAÇÃO POR LIGAÇÃO COVALENTE	31
3.5 ESTABILIDADE DE ESTOCAGEM E TÉRMICA.....	32
3.6 ESTABILIDADE OPERACIONAL	32
3.7 ESTABILIDADE MECÂNICA	33
4 RESULTADOS.....	34
COVALENT IMMOBILIZATION OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE ONTO SILICA-POLYETHYLENEGLICOL MICROSPHERES VIA AMINOPROPYLTRIMETHOXSILANE AS SPACER ARM.....	35
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55

INTRODUÇÃO

A ciclodextrina glicosiltransferase é uma enzima extracelular microbiana capaz de converter o amido em ciclodextrinas, produto de vasta aplicação na indústria de alimentos. A ciclodextrina glicosiltransferase de *Thermoanaerobacter* sp. (*Toruzyme®*) é uma enzima com caráter termofílico, o que possibilita sua utilização sob altas temperaturas, diferentemente da maioria das enzimas.

O custo relativamente alto das enzimas é um fator limitante a sua utilização, o que faz com que sua aplicação direta seja muitas vezes economicamente inviável. Tal problema pode ser resolvido se a enzima for utilizada em sua forma imobilizada.

A imobilização da CGTase é pouco realizada pois enfrenta fatores como a resistência de difusão do substrato macromolecular, que no geral poderia explicar a baixa recuperação de atividade. A adição de espaçadores permite uma mobilidade da enzima imobilizada, permitindo uma máxima interação entre a enzima e o substrato macromolecular.

Neste contexto, o presente trabalho teve como principal objetivo avaliar as condições ótimas de utilização da enzima comercial solúvel *Toruzyme®* e sua forma imobilizada em suporte adequado, com o objetivo de obter-se um complexo estável e que pudesse ser utilizado consecutivamente (processo tipo batelada) para a produção de ciclodextrina. Dentre os objetivos específicos, destacam-se as principais etapas de imobilização e de caracterização enzimática:

- Imobilização da CGTase por ligação covalente em suporte adequado;
- Caracterização do suporte escolhido e sua estabilidade mecânica;
- Caracterização de pH e temperatura ótima, estabilidade de estocagem e térmica da enzima livre e imobilizada.
- Estabilidade operacional da enzima imobilizada.

A descrição do presente estudo foi realizada sob forma de capítulos, sendo o Capítulo 1 e 2 apresentam a revisão bibliográfica sobre a CGTase e sobre a imobilização de enzimas, respectivamente. Esta revisão foi efetuada para dar fundamentação teórica a todas as etapas deste estudo. No Capítulo 3 descrevem-se as técnicas utilizadas nas diferentes etapas do trabalho. No Capítulo 4 apresentam-se os resultados obtidos sob forma de artigo. O Capítulo 5 apresenta as considerações finais do trabalho realizado e suas perspectivas.

1 CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE

A Ciclodextrina Glicosiltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19, 1,4- α -D-glicana, 1,4- α -D-glicopiranosil transferase) é uma enzima que catalisa a reação de formação de ciclodextrinas (CDs) a partir do amido (VAN DER VEEN et al., 2000a). A CGTase é composta por uma cadeia única de polipeptídios com aproximadamente 650 aminoácidos, possui uma ou nenhuma ligações intramoleculares por pontes de dissulfeto e são dependentes de íons metálicos, principalmente o cálcio, para manter sua atividade catalítica (MATIOLI et al., 2000b; KELLY et al., 2009).

A CGTase apresenta uma seqüência de aminoácidos que revela uma similaridade estrutural com as α -amilases, sendo por este motivo considerada uma enzima da família das amilases (UITDEHAAG et al., 2002). Uma característica marcante das enzimas desta família é que todas utilizam o mecanismo de α -conservação, porém seu substrato ou especificidade de produto é largamente variável (VAN DER MAAREL et al., 2002) e as principais diferenças entre a CGTase e demais α -amilases é a presença de dois domínios adicionais (D e E) e uma massa molecular de 70-75 kDa, enquanto as amilases, geralmente, apresentam uma massa molecular de aproximadamente 45 a 55 kDa (WIND et al., 1995).

Estudos sobre a estrutura da CGTase mostram semelhanças de seqüência entre CGTases e α -amilases (abaixo de 25%). Há quatro resíduos de aminoácidos aromáticos que são encontrados no centro ativo da CGTase, mas não nas amilases. Esses resíduos (que correspondem a Phe-183, Tyr-195, Phe-259 e Phe-283 em CGTase de *Bacillus sp.* 1011) são conservadas entre todas as CGTases conhecidas, incluindo CGTase de *Klebsiella pneumoniae* que tem apenas 25% de identidade de aminoácidos com CGTases de *Bacillus*. Os dados obtidos por Tonkova (1998) sugerem que: Phe-183 é uma parte do sitio acceptor de ligação; Tyr-195 afeta a formação de um complexo de inclusão a partir do substrato; Phe-259 está envolvida na ligação de ambos os doadores e receptores; Phe-283 está envolvido na estabilização do estado de transição. De acordo com o modelo atualizado para o mecanismo de ação CGTase, propõe-se que a principal reação catalisada pela CGTase é a desproporcionalização (TONKOVA, 1998).

Como mostra a figura 1, a enzima CGTase catalisa a conversão do amido em CDs por meio de reações reversíveis de transglicosilação intramolecular (ciclização). Exibe, ainda, atividade em

reações de transglicosilação intermolecular (acoplamento e desproporcionalização) e além disso pode realizar reações de hidrólise do amido (VAN DER VEEN et al., 2000a; COSTA et al., 2009).

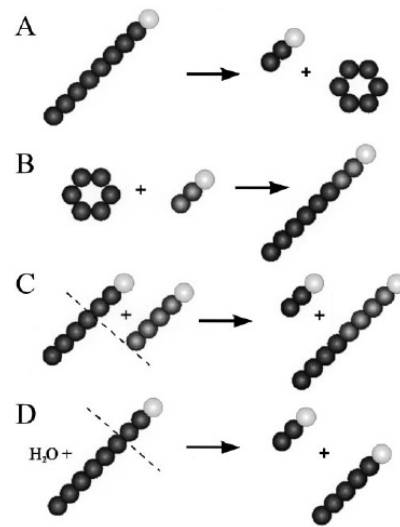


Figura 1 - Representação esquemática das reações de transglicosilação catalisadas pela CGTase, sendo cada círculo representante de uma unidade de glicose. A) ciclização, B) acoplamento, C) desproporcionalização e D) hidrólise (VAN DER VEEN et al., 2000a).

A reação de transglicosilação intramolecular, também chamada de ciclização, ocorre quando a cadeia de oligossacarídeo linear (amido) é clivada e um novo açúcar com final redutor é transferido para o açúcar não redutor da mesma cadeia (UITDEHAAG et al., 2002) levando à formação de oligossacarídeos cíclicos não redutores, chamados ciclodextrinas (ALVES-PRADO et al., 2008). A reação de acoplamento é reversa a ciclização e ocorre quando o anel de ciclodextrina é clivado e transferido para um substrato, o maltooligossacarídeo aceptor. A desproporcionalização ocorre quando o maltooligossacarídeo linear é clivado e um novo açúcar com final redutor é transferido para um substrato de maltooligossacarídeo aceptor (VAN DER VEEN et al., 2000b).

A maioria das CGTases, geralmente, produzem uma mistura de α -, β - e γ -CD, e os produtos podem variar dependendo das condições (composição do tampão, pH e temperatura) e do tempo de reação. Assim, estudos estão sendo feitos não só para aumentar o rendimento das CDs, mas também para melhorar as condições de reação enzimática das CGTases na direção de uma determinada CD. Muitos trabalhos têm demonstrado que os diferentes substratos podem determinar o tipo de CDs formadas a partir da reação enzimática (ALVES-PRADO et al., 2008; LEEMHUIS et al., 2010).

Desde a descoberta da CGTase vários microrganismos foram descritos como produtores da mesma, havendo predomínio do gênero *Bacillus*. Dentre as bactérias já identificadas como

produtoras de CGTase inclui-se aeróbias mesofílicas (como *Bacillus macerans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus obhensis*, *Bacillus agaradhaerens* LS-3C, *Bacillus firmus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Paenibacillus pabuli*), aeróbia termófila (*Bacillus stearothermophilus*), algumas anaeróbias termófilicas (*Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1, *Thermoanaerobacter* sp. ATCC 53627) e anaeróbia termoalcalofílica (*Anaerobranca gottschalkii*) (AVCI & DÖNMEZ, 2009).

1.1 CICLODEXTRINAS

Segundo o histórico apresentado por Pszczola (1988) foi Villiers, em 1891, o primeiro pesquisador a relatar a existência das ciclodextrinas (CDs) após hidrolisar o amido com a bactéria *Bacillus amylobacter*, sendo denominado na época de celulosina. Em 1904, Schardinger caracterizou as CDs como dextrinas de Schardinger, identificando o *Bacillus macerans* como seu produtor. Freudenberg, em 1938, verificou as estruturas das CDs e detectou sua habilidade de formar complexos de inclusão. Em 1938, Tilden e Hudson descobriram que a amilase era a responsável pela sua produção, comprovando que as CDs não eram produtos sintetizados durante o metabolismo microbiano, sendo compostos da ação extracelular de uma enzima microbiana. Somente na década de 50 é que as pesquisas sobre CDs começaram a se intensificar.

As CDs são formadas por oligossacarídeos cíclicos, unidos por ligações glicosídicas α -1,4, sendo as mais comuns as do tipo α -, β - e γ - CD (figura 2), consistindo de 6, 7 e 8 resíduos de glicose, respectivamente (TONKOVA, 1998).

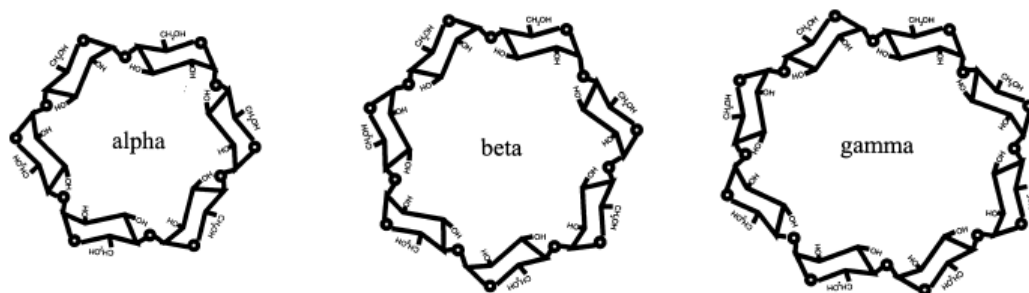


Figura 2 -Estruturas das α -, β -, γ -ciclodextrinas (VAN DER VEEN et al., 2000a).

As CDs apresentam sabor doce, portanto quando esta for utilizada no processamento de alimentos, o seu poder adoçante não pode ser ignorado, pois uma solução de 2,5% de β -CD é tão doce quanto uma solução de 1,7% de sacarose (MATIOLI et al., 2000b). Elas são consideradas um edulcorante novo e promissor (SINGH et al., 2002).

Dentre as CDs mais usualmente utilizadas, a β -CD é a de mais fácil recuperação industrial através do processo de cristalização. Ela apresenta a menor solubilidade e tamanho intermediário como pode-se observar na tabela 1. Além disso, a produção de β -CD é a mais economicamente viável, sendo seu custo industrial, por quilograma, cerca de 20 vezes menor do que o praticado para a α -CD e a γ -CD (SZENTE & SZEJTLI, 2004).

A β -CD é produzida industrialmente por dois processos (MATIOLI et al., 2000b):

- conversão não controlada (sem agentes complexantes) com subsequente sacarificação das dextrinas lineares do amido não convertido pela enzima. Este método proporciona um rendimento de 18 a 24% e é muito utilizado no Japão;

- conversão controlada empregando tolueno (5% v/v) como agente complexante, proporcionando um rendimento de 33%. Este processo é utilizado na Hungria.

A forma tridimensional e tamanho das moléculas de ciclodextrinas (tabela 1) nos fornece uma importante informação a respeito da formação de complexos com moléculas hidrofóbicas.

Tabela 1 - Propriedades das ciclodextrinas (VAN DER VEEN et al., 2000a).

Característica	α-ciclodextrina	β-ciclodextrina	γ-ciclodextrina
Número de monômeros de glicose	6	7	8
Massa Molecular (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade em água (g/L - 25°C)	145	18,5	232
Diâmetro externo (Å)	14,6	15,4	17,5
Diâmetro interno (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Volume da cavidade interna (Å ³)	174	262	427

A solubilidade de CDs depende fortemente da temperatura como é mostrado graficamente na figura 3.

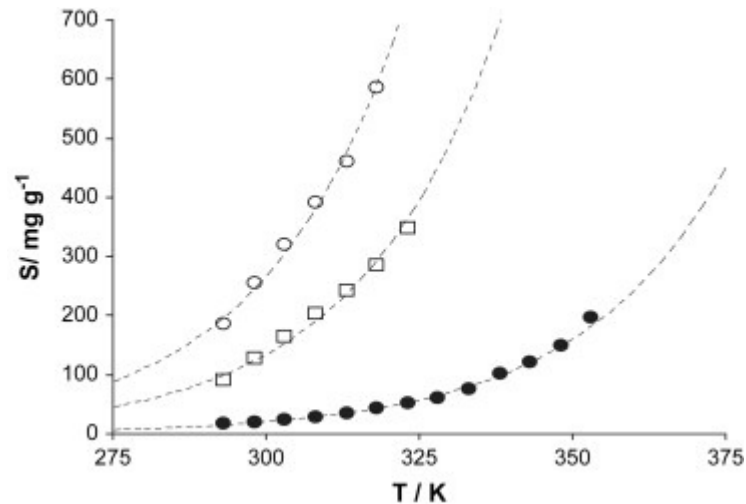


Figura 3 - Solubilidade em água (mg de CD/g) de (□) α -CDs, (●) β -CDs e (○) γ -CDs em relação a temperatura (expressa em kelvin) (ASTRAY et al., 2009).

Conforme Astray et al. (2009), com a elevação da temperatura, a solubilidade das CDs aumenta rapidamente, o que permite uma recristalização fácil quando ocorre o resfriamento. A hidrossolubilidade das CDs é incomum, pois a β -CD é pelo menos nove vezes menos solúvel (1,85 g/100 mL, à 25°C) do que os outras CDs (14,5 g/100 mL e 23,2 g/100 mL para α - e γ -CD, respectivamente).

Quando a molécula é encapsulada pela CD não ocorre absorção de energia, no entanto, observa-se um aumento na temperatura de fusão, de aproximadamente 10°C. As CDs não têm ponto de fusão definido, mas começam a se decompor a partir de 200°C, sendo suas propriedades térmicas exatas dependentes do teor de água, da estrutura cristalina, do grau de aquecimento e também da composição da atmosfera (MATIOLI et al., 2000b)

Segundo os seus respectivos tamanhos, as moléculas complexadas são encapsuladas de maneira total ou parcial, cabendo a ciclodextrina o papel de molécula “hospedeira” ou receptora. Em muitos casos, adições são formadas mesmo quando o tamanho molecular do componente a incluir não permite a completa inserção dentro da cavidade central. Estes fenômenos são explicados pela formação de “tampa” para a cavidade da ciclodextrina ou a inserção de alguns grupos funcionais no interior da cavidade. Em solução aquosa, a cavidade fracamente apolar da ciclodextrina é ocupada por moléculas de água que podem ser facilmente substituídas por moléculas “hóspedes”, menos polares que a água. O número de unidades de glicose determina a dimensão e o tamanho da cavidade (LINDNER et al., 1998 apud DRUNKLER et al., 1999).

A característica mais marcante das CDs é a capacidade que possuem de formar complexos de inclusão com grande variedade de substâncias devido à sua estrutura geométrica, com a cavidade interna hidrofóbica e a região externa hidrofílica. Por possuir exterior hidrofílico a CD pode ser dissolvida em água e uma cavidade interna apolar, possibilita-se formar complexos de inclusão com uma ampla variedade de moléculas hidrofóbicas. Como consequência do complexo de inclusão das CD com as moléculas hóspedes tem-se a estabilização de compostos sensíveis a luz ou oxigênio, estabilização de compostos voláteis, alteração de reatividade química e aumento de solubilidade (VAN DER VEEN et al., 2000a).

Esse fenômeno, denominado como “encapsulação molecular”, pode melhorar as propriedades físico-químicas da molécula encapsulada (hóspede), resultando em melhor estabilidade, solubilidade, biodisponibilidade e menor volatilidade, o que possibilita um grande número de aplicações nas indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêuticas, agroquímicas, químicas e outras (YU et al., 1988; GAWANDE et al., 2003).

O tamanho da molécula a ser encapsulada deve ser compatível com o tamanho da cavidade interna da CD, podendo formar complexos com compostos sólidos, líquidos ou gasosos. Os complexos de inclusão são relativamente estáveis e facilmente separados das soluções devido a sua cristalinidade (PSZCZOLA, 1988). Quando as moléculas hóspedes forem pequenas para serem envolvidas corretamente pela CD, não se formará complexos estáveis, pois as moléculas escaparão do interior da cavidade (MATIOLI et al., 2000b).

Em solução aquosa, a cavidade central apolar da CD é ocupada por moléculas de água (figura 4) que podem ser facilmente substituídas por “moléculas hóspedes” como, por exemplo, o *p*-xileno e a fenolftaleína que são menos polares que a água (CASTILLO & BOYD, 2005). A inclusão de moléculas pelas CDs alteram a absorção espectrofotométrica dessas moléculas, podendo ser usado para a determinação das CDs produzidas na reação. De acordo com metodologia descrita por Kaneco et al. (1987) e adaptado por Pinto et al. (2007) a fenolftaleína, que é um indicador ácido-base, atinge sua máxima coloração rosa em pH 10,5, formando complexo de inclusão com as β -CDs em solução aquosa, na razão molar de 1:1. Dessa forma, o decréscimo na intensidade da cor da solução da fenolftaleína é proporcional a concentração de β -CD .

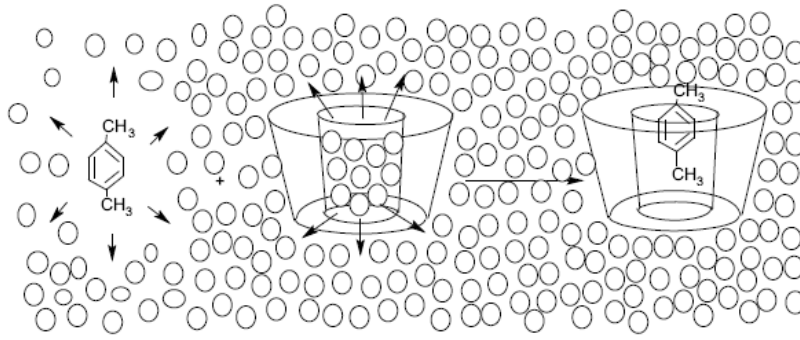


Figura 4 - Representação esquemática da formação do complexo de inclusão da ciclodextrina. A molécula hospede é o *p*-Xileno e os círculos menores representam as moléculas de água (CEREDA, 2003).

As interações envolvidas na formação dos complexos são forças de van der Waals, interações dipolo-dipolo e pontes de hidrogênio. Essas ligações são fortes o suficiente para impedir a separação do complexo mesmo em estado sólido, mas fracas o suficiente para permitir a liberação da molécula encapsulada, quando necessário (HEDGES & MCBRIUDE, 1999; VENTURINI et al., 2008). As ciclodextrinas α , β e γ podem ser facilmente separadas do conteúdo desta reação por precipitação seletiva, mediante adição de determinados solventes orgânicos (DRUNKLER et al., 1999).

Para substâncias relativamente insolúveis em água, a inclusão pode melhorar sua solubilidade ou a sua cinética de dissolução. Estas propriedades tornam as CDs muito atrativas para um variado número de aplicações industriais (MATIOLI et al., 2000a).

Embora seja um derivado enzimático do amido, ainda subsistem controvérsias e diferenças na regulamentação do uso de CDs nos alimentos entre os países. Nos EUA α -, β - e γ -CDs são consideradas GRAS (FDA), sendo portanto listados como aditivos alimentares que são "geralmente reconhecidos como seguros". No Japão α -, β - e γ -CDs são reconhecidos como produtos naturais e sua comercialização no setor alimentar está restrito apenas por considerações de pureza. Já na Austrália e na Nova Zelândia α - e γ -CDs são classificadas como novos alimentos a partir de 2004 e 2003, respectivamente (ASTRAY et al., 2009).

Segundo Astray et al. (2009) a recomendação do Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), para um nível máximo de β -CDs nos alimentos é 5 mg/kg por dia. Para α - e γ -CDs não há Dose Diária Aceitável (DDA) devido ao seu perfil toxicológico favorável.

Estudos envolvendo as CDs têm apresentado um crescimento nos últimos anos e elas têm se tornado populares em diferentes campos do conhecimento e de aplicação tecnológica, como na indústria de produtos farmacêuticos, alimentícios, cosméticos, na área têxtil e em biotecnologia. De

acordo com Venturini et al. (2008) é razoável considerar que, com a evolução de campos recentes do conhecimento, tais como a química supramolecular, a nanotecnologia e a química verde, as CDs possam, pelo seu baixo custo, grande disponibilidade e baixa toxicidade, serem empregadas para atuar como encapsuladores eficientes e, desta forma, auxiliar na solução dos diferentes tipos de problemas que se descortinam. Assim, as CDs vêm representando um papel de destaque em inúmeras áreas, tais como na montagem de sistemas de liberação controlada de fármacos, em terapia imunomodulatória.

1.2 APLICAÇÃO DAS CICLODEXTRINAS EM ALIMENTOS

Mudanças no estilo de vida do consumidor tem levado a uma demanda maior pelos alimentos naturais e seguros, e a uma menor adição química nos alimentos processados. Devido a esta tendência tem sido renovado o interesse pela pesquisa por agentes naturais. Segundo Cai et al. (1990) proporcionam a redução do escurecimento enzimático de alimentos como vegetais, frutas e bebidas. A sua cavidade hidrofóbica é capaz de formar complexos de inclusão com uma ampla classe de moléculas orgânicas, incluindo os precursores do escurecimento, uma vez encapsulados, estes compostos se tornam indisponíveis e conseqüentemente há inibição da reação de escurecimento enzimático.

Na indústria alimentícia, as CDs podem ser utilizadas para:

- extração da cafeína do café ou chá (CEREDA, 2003);
- *flavours* naturais ou sintéticos de café foram estabilizados por complexação com β -CDs.

Em contacto com a água, o complexo de substâncias aromáticas vinculados são liberados imediatamente (SZENTE & SZEJTLI, 2004).

- uso da β -CD como estabilizador de óleos essenciais voláteis de chá permite menores taxas de deterioração e menores perdas de aroma quando armazenados por longo tempo e/ou quando submetidos a altas temperaturas (como o cozimento ou processo de pasteurização) (CEREDA, 2003; ASTRAY et al., 2009). As substâncias responsáveis pelo sabor normalmente são constituídos por vários componentes, então é importante que todos estes componentes devam ser encapsulados, sem alterar sua composição (ASTRAY et al., 2009);

- para evitar o efeito da polifenol-oxidase em sucos de vegetais e frutas (reações de escurecimento), pode-se remover os compostos fenólicos por complexação com CDs (DEL VALLE, 2004). Além disso, Irvin et al. (1994) mostrou que as CDs protegem os compostos fenólicos da oxidação enzimática, formando complexos de inclusão;

- alguns alimentos têm um odor peculiar, mas, quando as CDs são adicionadas na produção, estes componentes formam complexos de inclusão com CD, resultando na desodorização do produto final, por exemplo, a desodorização de leite de soja e da proteína de soja (ASTRAY et al., 2009);

- a β -CD pode ser utilizada para extração de compostos de aroma oleosos diretamente de fontes naturais (como alho, cebola) sem necessidade de utilização de solventes ou destilação, apenas utilizando a centrifugação. Podendo-se após o processo utilizar o complexo insolúvel ou ainda pode-se remover o óleo das CD através do aquecimento em água, ocorrendo assim a decomplexação e a separação em uma fase aquosa, que contém as CD, e uma fase oleosa imiscível (CEREDA, 2003);

- remoção de colesterol da gordura do leite ou da gema de ovos pela precipitação de complexos de inclusão cristalinos e complexação com β -CD (CEREDA, 2003);

- remoção de ácidos graxos livres de gorduras para melhorar as propriedades de frituras (CEREDA, 2003);

- encapsulação de componentes lipofílicos dos alimentos e vitaminas do complexo B para proteção contra oxidação, degradação térmica e reações com outros componentes, como a encapsulação de óleo da casca de limão para utilização em tortas para realçar o sabor (CEREDA, 2003; ASTRAY et al., 2009);

- a encapsulação de agentes adoçantes como o aspartame estabiliza-os e melhora o gosto, eliminando o sabor amargo (SINGH et al., 2002).

O sabor amargo de fármacos, alimentos ou de qualquer outra substância dissolvida em solução aquosa ou na saliva, pode ser reduzido ou totalmente eliminado se o componente amargo formar um complexo de inclusão com uma CD apropriada (VENTURINI et al., 2008).

2 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Enzimas na forma nativa têm sido usadas por séculos nas indústrias de alimentos, e mais recentemente, nas indústrias farmacêuticas e químicas. Inicialmente apenas se dispunha de enzimas na forma livre e solúvel, sendo apenas possível a utilização de reatores em batelada (BON et al., 2008; VITOLO, 2001). Com o uso destas condições, após a finalização do processo catalítico, tem-se grande dificuldade técnico-econômica de recuperação da enzima na sua forma ativa para sua reutilização, além da instabilidade das estruturas, uma vez que são isoladas de seus ambientes naturais, e da sua sensibilidade ao processo catalítico. Vários métodos têm sido propostos para superar essas limitações, um dos mais bem sucedidos é a imobilização de enzimas (KRAJEWSKA, 2004).

Em 1971, a importância de processos industriais com enzimas imobilizadas motivou a organização da primeira Conferência em Engenharia Enzimática. Nela estabeleceu-se o uso do termo enzima imobilizada, empregado para os biocatalisadores ligados a suportes insolúveis ou confinados a espaços físicos definidos (BON et al., 2008)

As principais vantagens de se utilizar enzimas imobilizadas são: (i) múltiplas reutilizações das enzimas; (ii) heterogeneidade dos sistemas, permitindo fácil recuperação das enzimas (ligadas ao suporte) e dos produtos, e rápida interrupção das reações; (iii) alterar as propriedades catalíticas da enzima em relação a sua forma solúvel, como maior estabilidade ao pH e à temperatura; e (iv) operação contínua com uma maior variedade de modelos de biorreator (KRAJEWSKA, 2004).

De acordo com Sobral et al. (2003) os fatores de maior influência na resposta da atividade da enzima imobilizada são o suporte, o método de imobilização e a temperatura da reação. Porém, segundo Krajewska (2004), cabe ressaltar, que não existe nenhum único método ou suporte que seja o melhor para todas as enzimas, devido às características químicas e de composição muito diferentes das enzimas, como também as diferentes propriedades dos substratos e dos produtos. Como regra, as condições ótimas para a imobilização de uma enzima e sua aplicação encontra-se por um processo de tentativa e erro, de modo a garantir a taxa mais alta possível de retenção de atividade da enzima, a sua estabilidade operacional e usabilidade.

2.1 SUPORTES

As propriedades das enzimas imobilizadas são diretamente afetadas pelas características do suporte, devendo ser avaliada as propriedades físicas e químicas do mesmo (BON et al., 2008):

- características morfológicas: área superficial, tamanho e volume de poros;
- características químicas: devem possuir grupos químicos que possam ser ativados ou modificados de modo a permitir a ligação com a enzima, sem que esta desnature;
- estabilização química: o suporte deve ser quimicamente estável, resistindo ao processo de ativação e as condições de reação;
- estabilização mecânica: deve permitir o uso de diversos processos de operações unitárias, como centrifugação, filtração, agitação, entre outros.
- estabilização térmica: não deve apresentar grande coeficiente de expansão pois pode provocar distorção ou destruição do sítio ativo das enzimas imobilizadas.
- natureza hidrofílica: influencia na difusividade do substrato e estabilização da enzima;
- insolubilidade: evita a contaminação do produto pela enzima e dissolução do suporte;
- estabilidade de escoamento: importante para suportes que serão utilizados em reatores contínuos;
- resistência ao ataque microbiano: sendo resistente à degradação microbiana evita a liberação da enzima para o meio;
- regenerabilidade: do ponto de vista econômico e ambiental é interessante que haja a possibilidade de reutilização da matriz.

Os suportes podem ser classificados como sendo orgânicos (naturais e sintéticos), onde destaca-se a quitosana, quitina e argila, e os suportes inorgânicos (minerais e fabricados), onde pode-se destacar a cerâmica, alumina, sílica, vidro e metais (BON et al., 2008).

Em geral, o tamanho das enzimas imobilizadas deve coincidir com o suporte e as configurações do reator. O tamanho dos poros do suporte é um fator limitante que deve ser observado para reduzir as limitações de transferência de massa e obter alta retenção de atividade (CAO, 2005a).

De acordo com Cabral & Kennedy (1991) apud Klein (2010) os suportes podem ser classificados como:

- Suportes não-porosos: Sua área superficial é baixa e, portanto, está limitada a área de imobilização. Para aumentar esta superfície, pode-se trabalhar com partículas muito finas, porém, tem-se a desvantagem de ser difícil sua separação da reação enzimática e de não poder trabalhar com sistemas contínuos do tipo coluna, pois não suportam altas pressões sem se compactar, nem em leitos fluidizados, pois está limitada a velocidade de fluxo. Possuem, ao contrário, a vantagem de não apresentarem problemas difusionais, uma vez que a enzima é imobilizada na superfície externa do suporte.

- Suportes porosos: Apresentam uma grande área superficial por unidade de massa, o que aumenta sua capacidade de imobilização. A principal desvantagem é que a maior área disponível é a interna, e, por isso, aumentam os problemas de difusão. Para superar tais problemas, existem suportes de poro controlado, de forma que é possível selecionar o suporte mais adequado de acordo com o tamanho da enzima, substrato e produto. De acordo com Artyomova et al. (1986), quando os poros do suporte excedem 5 a 10 vezes o tamanho do glóbulo protéico uma máxima capacidade de imobilização é obtida.

A IUPAC (1982) recomenda uma classificação de porosidade em função dos diâmetros de poros, que é: microporos, mesoporos e macroporos. Microporos são aqueles que compreendem um diâmetro inferior a 2 nm, os mesoporos compreendem uma faixa de 2 a 50 nm, enquanto os macroporos compreendem um diâmetro superior a 50 nm.

Cada forma geométrica de suporte envolve métodos de imobilização diferentes, exigindo assim a utilização de diferentes tipos de materiais e de preparação (CAO, 2005a). O principal desafio é a síntese de materiais biocompatíveis e de estruturas que permitam a ligação interfacial estável de enzimas, mantendo a sua atividade o mais próximo possível ao seu estado nativo. A fim de aumentar a eficiência de imobilização de enzimas e dos processos biocatalíticos, é desejável desenvolver materiais que apresentem uma grande superfície, caráter hidrofílico, alta porosidade, o aumento da estabilidade com mudanças no microambiente, e alta resistência mecânica (ISPAS, 2009).

2.2 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

Idealmente, o método de imobilização deve garantir a estabilidade da enzima durante longos períodos de tempo, evitar a lixiviação, a ser reutilizável, e permitir a livre difusão de substratos e produtos da reação (ISPAS, 2009).

Segundo Cao (2005b) embora os métodos básicos de imobilização de enzimas possam ser categorizados em apenas poucos métodos diferentes, por exemplo, adsorção, ligação covalente, aprisionamento, encapsulamento e cross-linking, centenas de variações, com base na combinação desses métodos originais, foram desenvolvidos.

Enzimas podem ser imobilizadas por uma variedade de métodos, que podem ser classificados como físicos: (i) a contenção de uma enzima dentro de um reator com membrana, (ii) adsorção (física, iônica) em uma matriz insolúvel em água, (iii) inclusão (ou aprisionamento em gel), (iv) microencapsulação com um membrana sólida e (v) microencapsulação com uma membrana líquida; e químicos, que incluem: (i) ligação covalente a uma matriz insolúvel em água, (ii) reticulação com utilização de um reagente multifuncional, e (iii) co-ligação cruzada com outras substâncias neutras, por exemplo, proteínas (KRAJEWSKA, 2004).

2.2.1 Imobilização por Ligação Covalente

O método baseia-se na formação de uma ligação forte entre a enzima e o suporte (figura 5). Este procedimento envolve normalmente dois passos, a ativação do suporte e a ligação da enzima ao suporte. Primeiramente os grupos funcionais do suporte (hidroxila, aminoalquila, aminoarila, 3-glicidoxipropil-carboxila, etc) são ativados por reagentes específicos como, por exemplo, o glutaraldeído, que introduz um grupo carbonila, susceptível a reações com os grupos nucleofílicos da enzima (CARDOSO et al., 2009).



Figura 5 - Imobilização covalente de enzimas em suporte sólido (CARDOSO et al., 2009).

Como todos os métodos de imobilização, o método por ligação covalente também apresenta suas vantagens e desvantagens. Estas estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Vantagens e desvantagens do método de imobilização por ligação covalente (CARDOSO et al., 2009; BON et al., 2008).

Vantagens	Desvantagens
- evita o fenômeno de dessorção;	- facilita a alteração da estrutura terciária nativa
- diminui a velocidade de desativação espontânea da enzima;	da enzima, podendo-se contornar esta desvantagem protegendo o sítio ativo;
- aumenta o tempo de vida útil da enzima imobilizada;	- altos custos, quando comparado a metodologias mais simples;
- aumenta a estabilidade térmica, pois promove rigidez na estrutura da enzima mesmo quando submetida a altas temperaturas.	- em alguns casos baixo rendimento, devido à exposição da enzima a reagentes tóxicos ou condições severas de reação.

A imobilização da enzima CGTase *Thermoanaerobacter* é estudada como um meio de obter-se economia nos processos industriais utilizando altas temperaturas (tabela 3).

Tabela 3 - Imobilização da CGTase *Thermoanaerobacter* na literatura.

Suporte utilizado	Condições de imobilização	Rendimento (%)	Eficiência (%)	Temperatura ótima após imobilização (°C)	Referências
Glioxil-silica	Covalente, 25°C, 5 h, pH 10,05	100	1,54	-	AMUD, 2008
Glioxil-agarose	Covalente, 25°C, 5 h, pH 10,05	100	32,39	90	TARDIOLI, 2006
Eupergit C	Covalente, 25°C, 72h, pH 7	81	10,2	80	MARTÍN, 2003

Avaliando-se os resultados de Amud (2008) e Tradioli (2006) pode-se observar que mesmo utilizando métodos semelhantes, porém, suportes diferentes, têm-se variações na eficiência da imobilização.

Nestes estudos o rendimento é elevado, no entanto, a recuperação da atividade é geralmente baixa, isto tem sido atribuído, segundo Martín et al. (2003), à complexidade da estrutura 3D da CGTase (a enzima apresenta cinco domínios) e ao mecanismo (quatro possíveis reações). Outros fatores limitantes aos rendimentos da CGTase, é a inibição da enzima por produto e a reação de acoplamento (reversa a ciclização). Os efeitos da inibição tanto do produto e da degradação do CD são minimizados, mantendo as concentrações de CDs baixas (GASTON et al. 2009).

Para conseguir enzimas imobilizadas com alta atividade, algumas vezes, são utilizadas técnicas que procuram evitar a inativação dos resíduos de aminoácidos do centro ativo. Dentre as técnicas desenvolvidas para a imobilização por ligação covalente pode-se citar: (i) a ligação covalente da enzima na presença de um inibidor competitivo ou do substrato; (ii) ligação multipontual da enzima ao suporte; e (iii) na presença de aditivos macromoleculares, como o polietilenoglicol (PEG) e polivinilálcool (PVA), ou de baixo peso molecular, como o sorbitol e glicerol (BON et al., 2008).

A seleção do aditivo adequado é em do tipo de enzima e do método de imobilização. Outro parâmetro que interfere na eficiência de um determinado aditivo é sua forma de adição no momento de imobilização, isto é, em que etapa esta adição é mais indicada e qual a quantidade de aditivo necessária para promover um grau satisfatório de estabilização. Nestes casos, é importante que as substâncias protetoras possam ser facilmente removidas ao final do processo de imobilização (BON et al., 2008).

2.3 PROCESSO DE SILANIZAÇÃO

Muitos métodos de ligação covalente de enzimas em suportes inorgânicos envolvem a utilização de derivados de silano contendo um grupo orgânico funcional (método de silanização). De acordo com Cardoso et al. (2009), o processo de silanização é realizado para introduzir um espaçador entre a enzima e o suporte. A solução de reagente silanizante reage com os grupos hidroxilas ou silanóis do suporte. Os grupos aminopropila servem, então, para a imobilização da

enzima (Figura 6). O hexametiletenodiamina (HEMA) e o 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS), são reagentes que podem ser empregados como espaçadores.

Em alguns casos, os suportes silanizados podem reagir diretamente com a enzima, mas na maior parte dos casos, estes grupos funcionais devem ser modificados para produzir intermediários reativos. O reagente mais utilizado é o glutaraldeído, devido à simplicidade do método e preparações enzimáticas mais ativas e estáveis (BON et al., 2008).

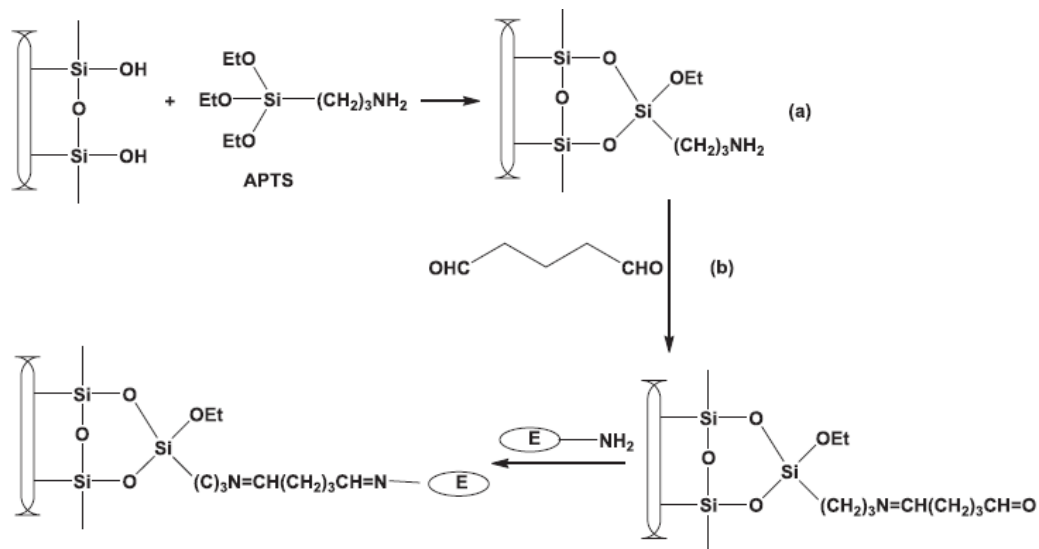


Figura 6 - Processo de imobilização covalente com (a) silanização com APTS (3-aminopropiltrietoxissilano), ativação (b) com glutaraldeído (CARDOSO et al., 2009).

Os suportes orgânicos não necessitam da etapa de silanização, uma vez que dispõem de grupos funcionais capazes de promoverem a ligação enzima-suporte. Porém, as enzimas imobilizadas com presença de silanizantes são mais ativas, estáveis e apresentam maior mobilidade (BON et al., 2008).

2.4 LIMITAÇÕES DA IMOBILIZAÇÃO

A tecnologia de imobilização mostra que, de modo geral, as vantagens superam as limitações. Porém, alguns fatores devem ser apontados, não como desvantagens do processo, mas sim como pontos a serem evitados ou contornados (BON et al., 2008).

Como os métodos de imobilização, de modo geral, envolvem interações fracas ou fortes (ligação covalente), entre a frágil estrutura da enzima e o suporte, ocorre invariavelmente alteração

da estrutura tridimensional da proteína, resultando em menor atividade. Além disso, também ocorrem alterações de orientação e acesso o substrato ao sítio ativo (BON et al., 2008).

2.4.1 Efeitos difusionais (transferência de massa)

A enzima, com sua mobilidade restringida pelo fato de estar ligada a um suporte, perde parte da acessibilidade ao substrato, o que leva à aparente redução da atividade, neste caso causada por restrições difusionais, ou seja, limitações do acesso do substrato ao sítio ativo devido à presença da matriz sólida (BON et al., 2008).

2.4.2 Efeitos da estabilidade do biocatalizador

A enzima imobilizada perderá atividade com o tempo, devido a desnaturação e/ou inibição. A desnaturação poderá ser consequência do calor, espumação, ataque por reagentes químicos e/ou cisalhamento (resistência mecânica). A inibição poderá ser por inibidores naturalmente existentes no substrato ou formados durante o pré-tratamento do mesmo. As contribuições relativas dessas causas de perdas de atividade dependerão das condições operacionais (VITOLLO, 2001).

Além destes efeitos, pode-se também, perder rendimento através da contaminação microbiana. Essa contaminação pode ser minimizada ou eliminada trabalhando-se a temperaturas superiores a 40°C e pH adequado. É importante ressaltar que muitas enzimas são mais termoestáveis em presença de seus substratos (VITOLLO, 2001).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A CGTase (*Toruzyme 0,2 L*) de *Thermoanaerobacter* sp. foi doada por Novozymes S/A (Bagsvaerd, Dinamarca). A β -CD utilizada para plotagem das curvas de calibração foi adquirida da Sigma Chemical (St. Louis, MO). Fenolftaleína P.A. ACS, polietilenoglicol 400 (PEG) e amido solúvel PA A.C.S. foram adquiridos da Synth (Diadema, Brasil). Tetraethylortosilicato 98% (TEOS) foi adquirido da Fluka (Chemicals, EUA). Diciclohexilamina foi adquirida da Merck (Jacarepaguá, Brasil). Aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) foi adquirido da Across Orgânica (New Jersey, EUA) e o glutaraldeído 25% foi adquirido da Nuclear (Diadema, Brasil).

3.1 ANÁLISES ENZIMÁTICAS DA CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE LIVRE (CGTase) E IMOBILIZADA (ICGTase)

3.1.1 Atividade enzimática, Temperatura e pH ótimo

O método com fenolftaleína (KANEKO et al., 1987), modificado por Pinto et al. (2007) é específico para a ciclodextrina (β -CD) formada na reação. O método baseia-se na capacidade da fenolftaleína de ser encapsulada pela ciclodextrina, perdendo proporcionalmente a cor.

Em tubos de ensaio contendo 350 μ L de meio de cultivo (extrato enzimático), são adicionados 650 μ L de uma solução de amido solúvel a 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 6,0). No branco utiliza-se tampão ao invés da solução enzimática. Os tubos então são incubados a 60°C por 15 minutos em banho-maria. A reação é interrompida com a adição de 4mL de fenolftaleína diluída em Na₂CO₃ (13,5g/L). Faz-se a leitura em espectrofotômetro na faixa de 550 nm. Uma unidade de atividade enzimática fenolftaleína, é definida como a quantidade de enzima, necessária para produzir 1 μ mol de β -ciclodextrina, por minuto.

Para a medida da atividade da ICGTase, aumentou-se dez vezes o volume de reação e, para manter o suporte suspenso, os 15 min no banho-maria foram sob agitação de

100 rpm, então centrifugou-se por 15 min com uma temperatura de 4°C a uma velocidade de 3.000g para obter-se apenas o produto de interesse (CD formada).

Partindo-se deste protocolo inicial testou-se o pH e temperatura ótima para a enzima, fixando-se um dos parâmetros e variando o outro. Iniciou-se com o parâmetro temperatura fixo a 60°C (como indicado no protocolo de Pinto et al. (2007) e testou-se o pH 4 (tampão acetato 0,1M), pH 6 (tampão fosfato 0,1M), pH 8 (tampão fosfato 0,1M) e pH 10 (tampão glicina-NaOH 0,1M). Confirmou-se assim o pH ótimo do protocolo anterior. A temperatura ótima foi avaliada fixando-se o pH em 6 e testando a cada 10 °C na faixa de 50 a 120 °C.

3.1.2 Parâmetros Cinéticos

Os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, K_m e V_{max} , tiveram seus valores determinados pelo método gráfico de Lineweaver-Burk (LINEWEAVER & BURK (1934)). Assim, um gráfico de $1/V_0$ versus $1/[S]_0$ permite a determinação de $1/V_{max}$ como a intercessão da reta com o eixo das ordenadas (coeficiente linear) e K_m/V_{max} pela inclinação da reta (coeficiente angular), a partir dos quais K_m e V_{max} são obtidos.

3.2 SÍNTESE DO SUPORTE (SÍLICA-PEG)

A síntese das microesferas de sílica-PEG foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido por Yang (2002) com algumas modificações descritas abaixo. Inicialmente misturou-se com o auxílio do agitador magnético 5 mL do tetraetilortiosilicato 98% (TEOS) e água acidificada a pH 1 com HCl, na proporção de 0,015 mol:1mol, respectivamente. Para se obter o primeiro estágio de pré-hidrólise adicionou-se a solução anterior 0,5 mL de polietilenoglicol 400, para agir como polarizador da reação. Quando percebeu-se a formação de hidro-gel (cerca de 30 min de reação) adicionou-se 0,5 mL de diciclohexilamina (catalizador químico), iniciando-se então a reação de policondensação. Após a formação de

microesferas sólidas, estas foram lavadas com água e etanol para remover traços do catalizador.

Para a funcionalização da sílica-PEG utilizou-se 3-aminopropiltrimetoxilano (APTMS) na proporção de 1mL por grama de suporte e permanece 24h em tolueno sob refluxo. O suporte resultante é lavado exaustivamente com tolueno, etanol, éter e água. Posteriormente é mantida sob vácuo a 60 °C por 4h.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA SÍLICA-PEG

A área específica pode ser calculada usando múltiplos pontos de adsorção a partir de um segmento linear da isoterma do gás N₂ (gás nitrogênio) através de técnica Brunauer-Emmett-Teller (BET). A técnica de BET consiste em medir a quantidade de gás adsorvido em um meio poroso em função da pressão relativa deste gás a temperatura de 77K, ou seja, (pressão relativa = pressão aplicada / pressão de saturação do gás na temperatura do experimento).

A distribuição das dimensões dos poros pode ser calculada a partir de várias isotermas pelo método de Barrett-JoynerHalenda (BJH). Medidas de área superficial e volume do poro antes e depois da adsorção/dessorção evidencia adsorção e retenção de compostos sobre a superfície interna dos mesoporos.

3.4 IMOBILIZAÇÃO POR LIGAÇÃO COVALENTE

Incubou-se sob agitação, a temperatura ambiente por 1h, 0,5g de sílica-PEG com glutaraldeído 2,5% diluído com Tampão Fosfato 20mM pH7, na proporção de 10mL por grama de suporte. Após este período, centrifugou-se por 15 min com uma temperatura de 4°C a uma velocidade de 3.000g.

Para limpar o suporte do contato com o glutaraldeído, adicionou-se 10mL com tampão fosfato 20mM pH7, homogeneizou-se e novamente centrifugou-se nas mesmas

condições anteriores. Realizou-se cerca de 5 lavagens, até eliminar a presença de glutaraldeído.

Incubou-se 10mL de solução enzimática com o tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6 na diluição adequada (aproximadamente 200U/mL). Deixou-se imobilizando em shaker orbital a 200 rpm por 15h a 8°C. Após este período centrifugou-se.

Realizou-se 2 lavagens com 10mL de tampão fosfato 0,1M pH6 para retirar qualquer enzima não imobilizada do frasco. Posteriormente, fez-se uma lavagem com NaCl 1M e outra com etilenoglicol, afim de retirar as enzimas não covalentemente ligadas ao suporte. Novamente lavou-se com tampão fosfato 0,1M pH6.

3.5 ESTABILIDADE DE ESTOCAGEM E TÉRMICA

Na avaliação da estabilidade à estocagem, deixou-se em repouso refrigerado a 8 °C uma solução enzimática (forma solúvel) e 11 frascos contendo 10 mL de tampão fosfato com ICGTase . Durante um mês, a cada três dias, realizou-se a medida da atividade.

A inativação térmica foi verificada sob duas temperaturas, 60 e 80°C. Seis frascos contendo 10 mL de solução enzimática (forma solúvel) e seis frascos contendo o complexo ICGTase com tampão fosfato 0,1M (pH 6) foram deixados em banho-maria, sob agitação de 100 rpm. Durante cinco horas, a cada 60 minutos, realizou-se a medida da atividade em 1 frasco de cada amostra (livre e imobilizada).

3.6 ESTABILIDADE OPERACIONAL

Para a reutilização da enzima imobilizada incubou-se o complexo ICGTase com solução de substrato nas condições atividade ótima (80 °C, pH 6). No final do ciclo separou-se o produto por centrifugação a 3.500g por 15 min a 4 °C e mediu-se a atividade no sobrenadante. O complexo ICGTase foi lavado com tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6) e,

logo após, ressuspendeu-se em solução de substrato preparada para iniciar um ciclo novo de batelada.

3.7 ESTABILIDADE MECÂNICA

Para verificar a estabilidade mecânica do suporte, utilizou-se microfotografias de microscópio eletrônico de varedura (MEV) marca JEOL (modelo JSM 6060, Japão) para comparar a estrutura física do suporte antes da sua utilização e posteriormente ao mesmo ter sido utilizado por 15 vezes.

4 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de um artigo, já formatado de acordo com as normas, a ser submetido para publicação na revista *Process Biochemistry*.

Covalent immobilization of cyclodextrin glycosyltransferase onto silica-polyethyleneglicol microspheres via aminopropyltrimethoxysilane as spacer arm

Carla Roberta Matte¹ (carlamatte2004@gmail.com), Michael Ramos Nunes² (mrnunes3@gmail.com), Edilson V. Benvenuti² (benvenuti@iq.ufrgs.br), Marco Antônio Záchia Ayub¹ (mazayub@ufrgs.br), Plinho Francisco Hertz^{1*} (plinho@ufrgs.br).

¹ Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

² Instituto de Química (IQ), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

* Corresponding Author: PF Hertz (plinho@ufrgs.br) Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa-Postal: 15095, CEP91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. Phone +55 51 33087094; Fax +55 51 33087048.

Abstract

In this work the enzymatic properties of immobilized cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) of *Thermoanaerobacter sp.* were investigated and compared with those of the soluble form of the enzyme. CGTase was immobilized on mesoporous silica microspheres, synthesized using polyethylene glycol 400 as swelling agent, silanized with 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) and activated with glutaraldehyde to generate conditions for enzyme immobilization. The yields of immobilization and recovery of activity were approximately 83% and 73%, respectively. Soluble (CGTase) and immobilized enzyme (ICGTase) showed similar values for optimal pH, while the optimal reaction temperatures were 100 °C and 80 °C, respectively. The immobilized enzyme produced higher K_m , lower V_{max} , and low decreased storage and equal thermal stabilities compared to the soluble form. Enzyme activity was tested in repeated batch processes in order to simulate recover and reuse, with the immobilized enzyme retaining about 60% of the initial catalytic activity after 15 cycles, showing good mechanical resistance.

Keywords: Cyclodextrin glycosyltransferase; enzyme immobilization; Toruzyme®; *Thermoanaerobacter sp.*; Silica.

1. Introduction

Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) is a microbial enzyme able to convert starch and related sugars into cyclodextrins (CDs) via cyclization reactions. Cyclodextrins have the ability of encapsulating hydrophobic molecules into their internal cavity, promoting the stabilization, solubilization, and masking odors and tastes of a wide variety of important compounds industrially used in foods, pharmaceuticals, cosmetics, agriculturals and chemicals [1-10].

The industrial production of CDs has been mainly carried out in batch systems with soluble CGTase used directly into reaction mixtures. However, the use of immobilized CGTase has been proposed as a technical alternative in order to allow for its continuous and repeated use avoiding enzyme solubilization and promoting a more stable biocatalyst [11]. However, it has been reported that activities recoveries of immobilized CGTases are usually very low due to diffusional resistance imposed by the structure of macromolecular substrates such as starches and dextrans [11,12,13]. In order to overcome these problems, the addition of spacers or linkers have been tried, allowing for more flexible spatial arrangements of the biomolecules and providing higher mobility to the resulting immobilized enzyme, with maximal interaction between the enzyme and the macromolecular substrate [14,15].

A wide variety of materials have been used as support for CGTase immobilization, including eupergit C [2], commercial chitosan [16,17], glyoxyl-agarose [18], controlled pore silica [17, 19], among others. In particular, silica supports have been demonstrated to be good materials for enzyme immobilization due to their excellent biocompatibility, rigidity, mechanical and operational stability, high thermal resistance, nontoxicity, and to resist microbial degradation or solvent distortion [20, 21,22, 23]. Surface modification via functional groups provides opportunity to change the interfacial properties while retaining their basic geometry and mechanical strength of the solid matrix in cyclic reuse [20].

Several enzymes have been immobilized in a variety of silica matrices using different methods. In this study, we explored an emulsion method for preparing ordered silica microspheres, with the PEG polymer as the swelling agent [24]. Chemical attachment of *Thermoanaerobacter* CGTase by covalent coupling on silica microspheres silanized with 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) is the chosen mechanism due to its high stability [25, 26, 27]. A solution of APTMS reacts with the hydroxyl groups or silanol support (the silanization process) introducing a spacer between

enzyme and support, which makes easier for the substrate to be accessed by the immobilized enzyme [28]. The effects of the immobilization (ICGTase) process on pH, temperature, kinetic parameters and stability of the enzyme were also investigated and compared with the soluble, free enzyme.

2 Materials and Methods

CGTase from *Thermoanaerobacter* sp. (Toruzyme 0.2L) was kindly provided by Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark). β -CD was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). All other chemicals were of analytical grade and purchased either from Fluka or Merck in Brazil.

2.1 Assay of β -CD

CGTase cyclization activity was determined using the phenolphthalein method assay [29] with modifications as described by Pinto et al [30], on the basis of its ability to form inclusion complexes with phenolphthalein. One unit of CGTase activity was defined as the amount of enzyme that produced one μ mol of β -CD per minute.

The measure of immobilized CGTase activity (ICGTase) was performed on supernatant after centrifugation at 3,500 g for 15 min at 4°C.

2.2 Synthesis and functionalization of silica-polyethyleneglicol microspheres

The silica-polyethyleneglicol (silica-PEG) microspheres were produced using the method [22] with modifications as follows. Mixing 5 mL tetraethylorthosilicate (TEOS) and water at a molar ratio of 0.015:1 acidified with HCl. The pre-hydrolysis of TEOS was obtained by mixing 0.5 mL polyethylene glycol 400 (PEG-400) under vigorous stirring. When emulsification was nearly completed, 0.5 mL of dicyclohexylamine catalyst was added to start the polycondensation reactions. The microspheres were produced in the form of hydrogel, which resulted in solid spheres by dehydration. After aging and drying by 15 days at room temperature the hydrogel beads were successive washings with water and ethanol to remove catalyst traces.

The silica-PEG microspheres were functionalized by the addition of 1 mL of aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) per gram of microspheres under reflux in toluene for 24 h. The

resulting product was washed several times with toluene, ethanol, ether and water. Then, it was dried under vacuum at 60 °C for 4 h.

The pore size distribution was estimated using the BJH method [31] and the specific surface area was determined by the BET multipoint technique [32] using adsorption of N₂ at 77 K. Images from the support were taken by scanning electron microscopy (SEM) in a Jeol equipment (JEOL model JSM 6060, Japan).

2.3 Immobilization on Silica-PEG

Silica-PEG (0.5 g) was immersed in a mixture of 0.5 mL of glutaraldehyde solution (25%) and 4.5 mL of 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), and the solution was stirred for 1 h at room temperature. The activated support was extensively washed with the same buffer and immediately incubated under orbital shaking (200 rpm) in a 10 mL CGTase solution in a 10 mL CGTase solution (approximately 200 U/mL in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.0) at 8°C for 15 h. After immobilization, successive washings with buffer removed the excess of enzyme until no activity could be detected in the washing fractions. The immobilized enzyme system was also washed with 1M NaCl and ethylene glycol (30%) in order to eliminate any enzyme molecule non-covalently attached to the support.

2.4 Effect of pH and temperature on CGTase activity

The effects of immobilization on the pH of enzyme activities were measured for the range of pH from 4.0 to 10.0 at 60° C using sodium acetate buffer 0.1 M (pH 4), sodium phosphate buffer 0.1 M (pH 6 and 8), and glycine-NaOH buffer (pH 10). The effects of temperature on CGTase activity was measured in sodium phosphate buffer 0.1 M, pH 6.0 in the range of 50 and 120 °C. The reaction was carried out using the CGTase assay procedure mentioned above.

2.5 Kinetic parameters of the soluble and immobilized CGTase

The kinetic parameters were determined by incubating diluted enzyme (approximately 200 U/mL) with 2.5 to 60 mg/mL solutions of soluble starch in 0.1 M sodium phosphate pH 6 at optimal temperature for 15 minutes. The values of K_m and V_{max} were then determined using the Lineweaver-Burk plot.

2.6 Storage and Thermal Stability of immobilized CGTase

Immobilized and soluble enzymes were stored in the fridge at 8°C for 30 days. The remaining enzyme activity was measured with phenolphthalein at optimal pH and temperature for 15 minutes as described above. Thermal inactivation assays were performed at 60 and 80°C in 0.1 M sodium phosphate pH 6. Aliquots were periodically taken and the activity was measured as described above.

2.7 Operational Stability of the Immobilized CGTase

For the reusability of the ICGTase, the immobilized enzyme system was incubated under the optimal activity conditions (80°C, pH 6) for CD production. At the end of each cycle, the immobilized enzyme was separated from the product formed by centrifugation at 3,500 g for 15 min at 4°C and the remaining activity was measured in the supernatant. The ICGTase was thoroughly washed with 0.1M sodium phosphate (pH 6); after that it was resuspended in freshly prepared substrate to restart a new cycle.

3 Results and Discussion

3.1 Immobilization of CGTase on silica-PEG microspheres and support characterization

Analysis of silica-PEG microspheres showed that specific surface area was 185.04 m²/g and pore volume was 0.0809 cm³/g, with mesoporous structure (pore diameter 4.6 nm) according to the International Union Pure and Applied Chemistry nomenclature. It has been suggested that supports for enzyme immobilization should not have lower specific surface area than 5 m²/g [11], thus it can be seen that the synthesized support has an appropriate surface area.

The activated surface of these mesoporous microspheres was effective for enzyme immobilization. It can be observed that the immobilization yield was 83.13 % and the recovery of activity was 73.08 %. Table 1 shows the measured parameters for immobilization of CGTase on silica-PEG microspheres support. These results show the much higher efficiency of silica-PEG microspheres immobilization system for CGTase when compared to eupergit C and glioxyl-agarose, being the recovery of activities approximately six and two-fold of those systems, respectively [2,18].

3.2 Effect of pH and temperature on CGTase activity

In Figure 1 are presented the results for enzyme activities as a function of pH. As can be seen for 60 °C the optimal pH was 6.0, with no differences found for soluble and immobilized CGTase. As have been previously reported by others authors, soluble enzyme activity is kept elevated while in acid pH [11].

The optimal temperature for CGTase and ICGTase were evaluated in the range from 50 to 120 °C, at the optimal pH for the catalytic activity, pH 6. The best activity for the soluble enzyme was 100 °C, suggesting its thermostability. On the other hand, the ICGTase presented best activities at 70-90 °C, remaining constant in this range, as can be seen in Figure 2. Conformational changes in enzyme molecule could explain this change in temperature for optimal activity when soluble and immobilized CGTase were compared, with small decreases in the optimal temperature been observed for *Thermoanaerobacter* sp. ICGTase by other authors [2]. Nevertheless, at this range of temperatures, ICGTase could be used in industrial processes ensuring that no microbial contamination would take place. Moreover, at 80 °C, the solubility of substrates and products are high, possibly increasing productivity, yields, and reducing industrial application costs.

3.3 Kinetics parameters

The kinetic parameters calculated from the Lineweaver–Burk plots are listed in Table 1. K_m is measures the affinity of the enzyme for the substrate, the higher K_m , lower the affinity. The small increase in K_m and the lower V_{max} values of the immobilized enzyme may be due to the conformational changes caused by enzyme fixation to the support or it could reflect the constraints to substrate access to the active site [33]. A similar change was also observed in the immobilization of others CGTases [12, 33].

3.4 Storage and Thermal Stabilities

The storage and thermal stabilities of immobilized enzymes are important parameters concerning their applicabilities [33]. Figure 3 shows the results for the storage stabilities of soluble and immobilized CGTases. After 18 days, there were almost no changes in ICGTase activity, while after 30 days in the fridge the reminiscent activity was 60%, slightly lower than the soluble enzyme.

Commercial enzymes are stored in the presence of salts or stabilizers, which is the case of the soluble form of CGTase, which may contribute to maintain the enzyme stability [34].

Concerning the thermal stability shown in Figure 4, the ICGTase showed practically the same behavior as for the soluble enzyme. The sol–gel-encapsulated CGTase [11] incubated at 60 °C and pH 6.0 (citrate buffer) demonstrated a lower thermal stability due the almost complete inactivation after 3 h and our immobilized CGTase in silica-PEG showed about 90% of the initial activity after 5h.

3.5 Repeated Batch Operational Stability of the Immobilized CGTase

The repeated batch operational stability of the immobilized CGTase was evaluated in a 15 cycles batch process, with results shown in Figure 5. It was found that the immobilized enzyme produced a satisfactory yield of β -CDs in the successive cycles, with 60% of the initial catalytic activity still remaining after 15 cycles. Up to the 11th cycle, activity losses were not detected. The support stability is an important factor, since it prevents the loss of the enzyme to the reaction medium, which would contaminate the product and making more difficult its purification [35]. In Figure 6 the structure of the silica-PEG microspheres after 15 cycles are shown, suggesting their exceptionally good mechanical resistance, with no structural modifications appearing in the microphotographies.

4 Conclusions

There are many important reasons for using immobilized enzymes among them the convenience of enzyme preparation, handling, and downstream separation of enzyme and its reactional products. Moreover, the possibility of enzyme reuse in successive batches or in a continuous enzyme reactor is of foremost importance. In particular, enzyme reuse provides cost advantages, which are often an essential prerequisite to establish an economically viable enzyme catalysis process [36, 37]. The operational stability of ICGTase on silica-PEG microspheres presented in this work may indicate its possible applicability for the industrial production of cyclodextrins.

Acknowledgements

The authors wish to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Brazilian Coordenação da Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for their financial support and scholarships for this project.

References

- [1] Arya SK, Srivastava SK. Kinetics of immobilized cyclodextrin gluconotransferase produced by *Bacillus macerans* ATCC 8244. *Enzyme Microbial. Technol.* 2006; 39:507-510.
- [2] Martín MT, Plou FJ, Alcalde M, Ballesteros A. Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2003; 21:299–308.
- [3] Tonkova A. Bacterial cyclodextrin gluconotransferase. *Enzyme Microbial Technol.* 1998; 22:678–686.
- [4] Jemli S, Messaoud EB, Ayadi-Zouari D, Naili B, Khemakhem B, Bejar S. A β -cyclodextrin glycosyltransferase from a newly isolated *Paenibacillus pabuli* US132 strain: Purification, properties and potential use in bread-making. *Biochem. Eng. J.* 2007; 34:44–50.
- [5] Ferrarotti AS, Bolivar JM., Mateo C, Wilson L, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Immobilization and Stabilization of a Cyclodextrin Glycosyltransferase by Covalent Attachment on Highly Activated Glyoxyl-Agarose Supports. *Biotechnol. Prog.* 2006; 22:1140-1145.
- [6] Moriwaki C, Ferreira LR, Rodella JRT, Matioli G. A novel cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus sphaericus* strain 41: Production, characterization and catalytic properties. *Biochem. Eng. J.* 2009; 48:124–131.
- [7] Chung H, Yoon S, Lee M, Kim M, Kweon K, Lee I, Kim J, Oh B, Lee H, Spiridonova V, Park K. Characterization of a Thermostable Cyclodextrin Gluconotransferase Isolated from *Bacillus stearothermophilus* ET1. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46:952-959.
- [8] Leemhuis H, Kelly RM, Dijkhuizen L. Engineering of cyclodextrin gluconotransferases and the impact for biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010; 85:823–835.
- [9] Lee M, Yang S, Kim J, Lee H, Kim J, Park K. Characterization of a thermostable cyclodextrin gluconotransferase from *Pyrococcus furiosus* DSM3638. *Extremophile.* 2007; 11:537–541.

- [10] Martins RF, Hatti-Kaul R. *Bacillus agaradhaerens* LS-3C cyclodextrin glycosyltransferase: activity and stability features. *Enzyme Microbial. Technol.* 2003; 33:819–827.
- [11] Amud AE, Silva GRP, Tardioli PW, Soares CMF, Moraes FF, Zanin GM. Methods and Supports for Immobilization and Stabilization of Cyclomalto-dextrin Glucanotransferase from *Thermoanaerobacter*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2008; 146:189–20.
- [12] Abdel-Naby MA. Immobilization of *Paenibacillus macerans* NRRL B-3186 cyclodextrin glycosyltransferase and properties of the immobilized enzyme. *Process Biochem.* 1999; 34:399–405.
- [13] Park D, Haam S, Jang K, Ahn I, Kim W. Immobilization of starch-converting enzymes on surface-modified carriers using single and co-immobilized systems: properties and application to starch hydrolysis. *Process Biochem.* 2005; 40:53–61.
- [14] Sinclair, B. To Bead or Not To Bead: Applications of Magnetic Bead Technology, *The Scientist.* 1998; 12(13):17.
- [15] Guisán JM, Penzol G, Armisen P, Bastida A, Blanco RM, Fernández-Lafuente R, García-Junceda E. Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrates. In: Bickerstaff GF. (Ed.). *Immobilization of enzymes and cells.* Totowa: Humana Press; 1997. p. 261-275.
- [16] Sobral KA, Rodrigues RO, Oliveira RD, Moraes FF, Zanin G. Immobilization of Cyclodextrin-glycosyltransferase (CGTase) from *Bacillus firmus* in Commercial Chitosan. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2002; 44:383–386.
- [17] Sobral KA, Rodrigues RO, Oliveira RD, Olivo JE, Moraes FF, Zanin G. Evaluation of Supports and Methods for Immobilization of Enzyme Cyclodextrin-glycosyltransferase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2003; 105-108:809-819.
- [18] Tardioli PW, Zanin GM, Moraes FF. Characterization of *Thermoanaerobacter* cyclomalto-dextrin glucanotransferase immobilized on glyoxyl-agarose. *Enzyme Microbial. Technol.* 2006; 39:1270–1278.
- [19] Tardioli PW, Zanin GM, Moraes FF. Production of Cyclodextrins in a Fluidized-Bed Reactor Using Cyclodextrin-Glycosyl-Transferase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2000; 84–86:1003-1019
- [20] Jal PK, Patel S, Mishra BK. Chemical modification of silica surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions. *Tal.* 2004; 62:1005–1028
- [21] Bhowmick TK, Yoon D, Patel M, Fisher J, Ehrman S. In vitro effects of cisplatin-functionalized silica nanoparticles on chondrocytes. *J Nanopart Res.* 2010; 12:2757–2770.

- [22] Yang X, Wang J, Liu X, Shang Z. High purity micron-scale macroporous silica spheres for high performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* 2002; 25:179-182.
- [23] Yokoyama T, Ishii R, Itoh T, Kitahata K, Matsuura S, Tsunoda T, Hamakawa S, Hanaoka T, Nanbu H, Mizukami F. Synthesis of l-theanine using enzyme/mesoporous silica conjugates under high pH conditions. *Materials Letters.* 2011; 65:67–69.
- [24] Guo W, Luo GS, Wang YJ. A new emulsion method to synthesize well-defined mesoporous particles. *J of Colloid Interface Sci.* 2004; 271:400–406.
- [25] Bagheri M, Rodríguez H, Swatloski RP, Spear SK, Daly DT, Rogers RD. Ionic Liquid-Based Preparation of Cellulose-Dendrimer Films as Solid Supports for Enzyme Immobilization. *Biomacromol.* 2008; 9:381-387.
- [26] Turner MB, Spear SK, Holbrey JD, Daly DT, Rogers RD. Ionic liquid-Reconstituted Cellulose Composites as Solid Support Matrices for Biocatalyst Immobilization. *Biomacromol.* 2005; 6:2497-2502.
- [27] Murtinho D, Lagoa AR, Garcia AP, Gil MH. Cellulose derivatives membranes as supports for immobilisation os enzymes. *Cellulose.* 1998; 5-299-308.
- [28] Cardoso CL, Moraes MC, Cass QB. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Quim. Nova.*, 2009; 32:175-187.
- [29] Kaneco T, Kato T, Nakamura N, Horikoshi K. Spectrophotometric determination of cyclization activity of β -cyclodextrin-forming cyclodextrin glucanotransferase. *J. Jpn Soc Starch Sci.* 1987; 34:45-48
- [30] Pinto FST, Flôres SH, Ayub MAZ, Hertz PF. Production of cyclodextrin glycosyltransferase by alkaliphilic *Bacillus circulans* in submerged and solid-state cultivation. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2007; 30:377-382.
- [31] Barrett EP, Joyner LG, Halenda PP. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms. *J. Am. Chem. Soc.* 1951, 73:373-380.
- [32] Brunauer S, Emmett PH, Teller E. Adsorption of gases in multi molecular layers, *J. Am. chem. Soc.* 1938, 60:309–319.
- [33] Prousoontorn MH, Pantatan S. Production of 2-O- α -glucopyranosyl L-ascorbic acid from ascorbic acid and β -cyclodextrin using immobilized cyclodextrin glycosyltransferase. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2007; 57:39-46.

- [34] Fields PA. Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comp. Biochem. Phys. A.* 2001; 129:417-431.
- [35] BON EPS, FERRARA MA, CORVO ML. *Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado.* Rio de Janeiro: Interciência:UFRJ:CAPES:FAPERJ:FTC [Portugal], 2008. p. 506.
- [36] Kweon DH, Kim SG, Han NS, Lee JH, Chung KM, Seo JH. Immobilization of *Bacillus macerans* cyclodextrin glycosyltransferase fused with poly-lysine using cation exchanger. *Enzyme Microbial. Technol.* 2005; 36:571–578.
- [37] Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microbial. Technol.* 2007; 40:1451–1463.

Table 1. Parameters obtained for the CGTase immobilized on silica-PEG microspheres compared with the soluble enzyme

	Offered activity (U/mL)	Non linked activity (U/mL)	Immobilization yield (%)	Immobilized enzyme activity (U/mL)	Activity recovery (%)	K_m (mg/mL)	V_{max} (U/mL)
ICGTase	191.86	32.36	83.13	116.56	73.08	27.325	125
CGTase	-	-	-	-	-	26.6	166.66

Figures Legends

Figure 1 - CGTase relative activity as a function of pH (buffers 0.1M sodium acetate for pH 4, 0.1M sodium phosphate for pH 6 and 8 and 0.1M glycine-NaOH for pH 10) using 60°C. (●) CGTase, soluble enzyme. (Δ) ICGTase, immobilized. Results are the mean of triplicates.

Figure 2 - CGTase activity as a function of temperature (50-120°C) using 0.1M sodium phosphate buffer pH 6. (●) CGTase, soluble enzyme. (Δ) ICGTase, immobilized. Results are the mean of triplicates.

Figure 3 - Storage stability in the fridge at 8°C for 30 days. (●) CGTase, soluble enzyme. (Δ) ICGTase, immobilized. Results are the mean of duplicates.

Figure 4 - Thermal stability at different temperatures. (CGTase, soluble enzyme; ICGTase, immobilized enzyme). (●) CGTase, soluble enzyme submitted to 60 °C. (○) CGTase, soluble enzyme submitted to 80 °C. (▲) ICGTase, immobilized enzyme submitted to 60 °C. (Δ) ICGTase, immobilized enzyme submitted to 80 °C. Results are the mean of duplicates.

Figure 5 - Relative activities for the hydrolysis of starch with multiple uses. Hydrolysis was performed in sodium phosphate buffer solution (0.1 M, pH 6) for 15 min at 80 °C with 200 rpm rotation. Results are the mean of triplicates.

Figure 6 - Scanning electron micrograph (SEM). (a) Silica-PEG microspheres before activation with glutaraldehyde 10 kV x 500; (b) silica-PEG microspheres after 15 uses (20 kV; x500).

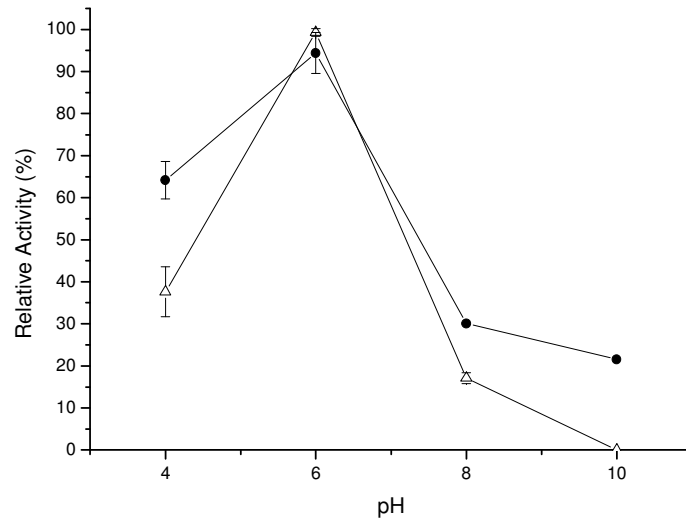


Figure 1 - CGTase relative activity as a function of pH (buffers 0.1M sodium acetate for pH 4, 0.1M sodium phosphate for pH 6 and 8 and 0.1M glycine-NaOH for pH 10) using 60°C.(●) CGTase, soluble enzyme. (Δ) ICGTase, immobilized. Results are the mean of triplicates.

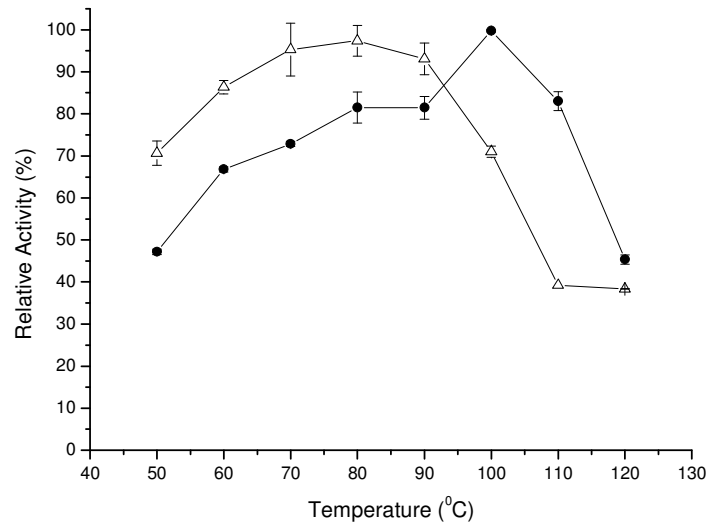


Figure 2 - CGTase activity as a function of temperature (50-120°C) using 0.1M sodium phosphate buffer pH 6. (●) CGTase, soluble enzyme. (Δ) ICGTase, immobilized. Results are the mean of triplicates.

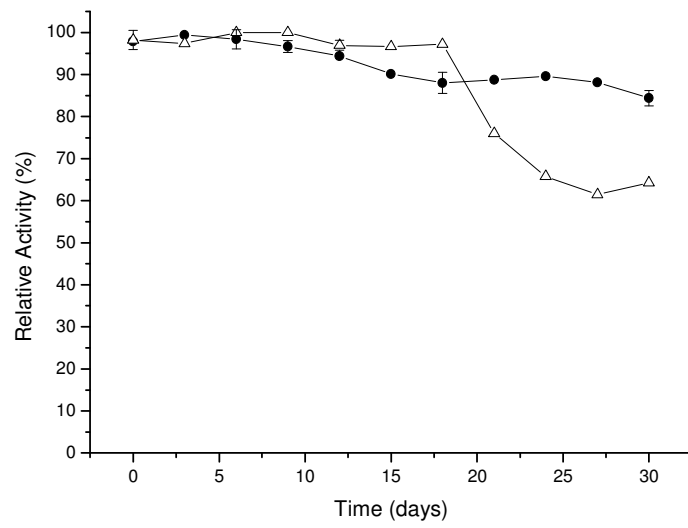


Figure 3 - Storage stability in the fridge at 8°C for 30 days. (●) CGTase, soluble enzyme. (Δ) ICGTase, immobilized. Results are the mean of duplicates.

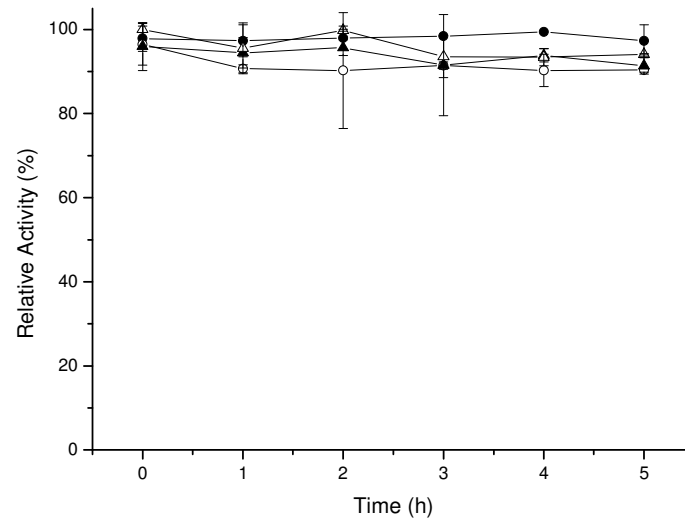


Figure 4 - Thermal stability at different temperatures. (CGTase, soluble enzyme; ICGTase, immobilized enzyme). (●) CGTase, soluble enzyme submitted to 60 °C. (○) CGTase, soluble enzyme submitted to 80 °C. (▲) ICGTase, immobilized enzyme submitted to 60 °C. (Δ) ICGTase, immobilized enzyme submitted to 80 °C. Results are the mean of duplicates.

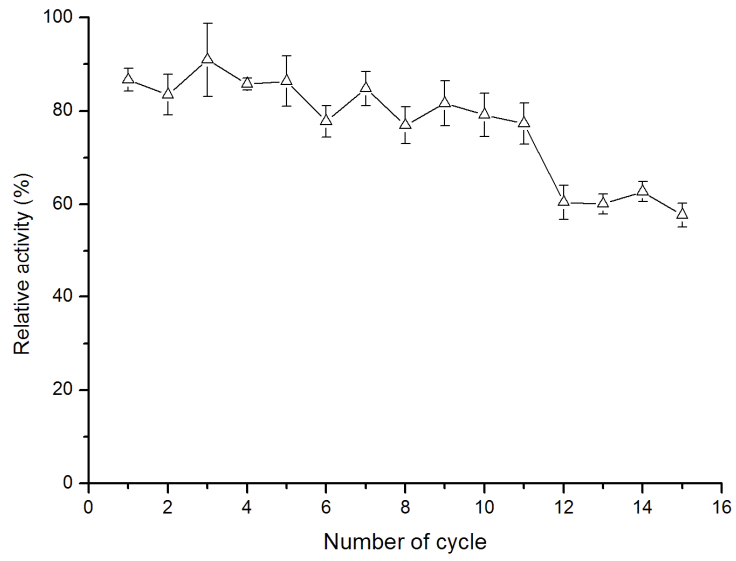


Figure 5 - Relative activities for the hydrolysis of starch with multiple uses. Hydrolysis was performed in sodium phosphate buffer solution (0.1 M, pH 6) for 15 min at 80 °C with 200 rpm rotation. Results are the mean of triplicates.

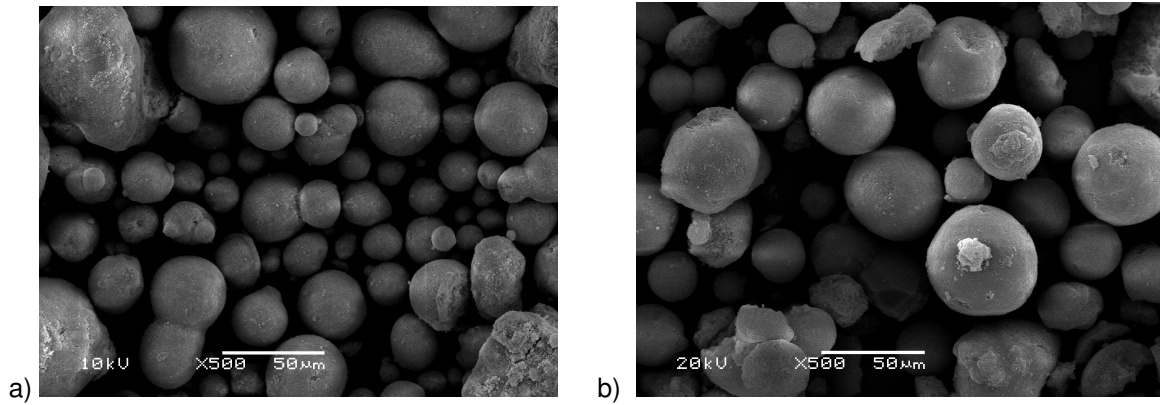


Figure 6 - Scanning electron micrograph (SEM). (a) Silica-PEG microspheres before activation with glutaraldehyde 10 kV x 500; (b) silica-PEG microspheres after 15 uses (20 kV; x500). Covalent immobilization of cyclodextrin glycosyltransferase onto silica-polyethyleneglicol microspheres via aminopropyltrimethoxysilane as spacer arm.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho inicialmente foi testado a imobilização unipontual covalente em filme de celulose/líquido iônico modificado com grupos amina e ativado com glutaraldeído. Os resultados referentes a alguns destes testes do suporte estão descritos apenas como apêndice (apêndice A), pois a eficiência de imobilização foi sempre muito baixa e não apresentou possibilidade de reuso do complexo CGTase/suporte, mesmo realizando modificações no processo de imobilização na tentativa de tornar esse processo viável. Isso demonstra, como já foi sinalizado por Krajewska (2004), que não existe nenhum único método ou suporte que seja o melhor para todas as enzimas.

A sílica-PEG utilizada neste estudo foi sintetizada no laboratório de Sólidos e Superfícies (LSS) do Instituto de Química da UFRGS. O diâmetro dos poros foi estimado pelo método de Barrett–Joyner–Halenda (BJH) (BARRETT et al., 1951) e a área superficial e o volume de poro foram estimados através do método de Brunauer–Emmett–Teller (BET) baseado no método de adsorção e dessorção de nitrogênio a 77 Kelvin (BRUNAUER et al., 1938). A área superficial encontrada foi de 185,04 m²/g, volume de poro de 0,08 cm³/g e diâmetro médio de poro de 4,6 nm, sendo então classificada como mesoporosa de acordo com a International Union Pure Applied Chemistry – IUPAC (1982), pois apresenta poros de 2 a 50 nm. Na maioria dos relatos da literatura sobre sílica mesoporosa utilizadas para imobilizar enzimas têm poros pequenos (geralmente menos de 7 nm), o que restringe sua aplicação à imobilização de pequenas proteínas, como o citocromo c (massa molecular de 13kDa), lisozima (13,93 kDa) e α -quimotripsina (21,6 kDa) (ISPAS, 2009), indicando que a CGTase *Toruzyme*[®] (75 kDa) foi ligada apenas na área externa do suporte.

Após a síntese da sílica-PEG realizou-se o processo de silanização com 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS) para assim introduzir um espaçador entre a enzima e o suporte, facilitando o acesso do substrato (amido), o qual apresenta alta massa molecular.

Para a imobilização optou-se pelo mesmo protocolo que anteriormente, com a celulose como suporte, não havia correspondido as expectativas (ligação covalente, ativado com glutaraldeído). Após a CGTase ser imobilizada na sílica-PEG observou-se um rendimento médio de 83,1% e uma eficiência (atividade recuperada) de 73%. Apesar destes resultados serem adequados quando comparados a outros da literatura, poderão ainda ser melhorados com o uso de aditivos, como o polietilenoglicol, pra proteger o sitio ativo da enzima no momento da imobilização, ou a

utilização do boroidreto de sódio, por exemplo, para promover a redução das bases de Schiff. Os resultados demonstram que o processo de imobilização é adequado, porém os resultados anteriormente obtidos (filme de celulose/líquido iônico) apresentavam características que não eram propícios pra CGTase.

A determinação do pH e temperatura ótimos tanto para CGTase como para ICGTase, foi fixado um dos parâmetros e variando o outro. Iniciou-se com o parâmetro temperatura fixo a 60°C (como indicado no protocolo de Pinto et al. (2007). Para ambas as formas o pH 6 foi o ótimo. A temperatura ótima foi avaliada fixando-se o pH em 6, onde obteve-se uma temperatura ótima para CGTase e ICGTase de 100 e 80°C, respectivamente. Para as demais análises realizadas utilizou-se os parâmetros ótimos de pH e temperatura da CGTase e ICGTase.

Os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, K_m e V_{max} , obtidos pelo método gráfico de Lineweaver-Burk, para a enzima solúvel foi de 26,6 mg/mL e 166,6 U/mL, respectivamente e para a imobilizada foi de 27,3 mg/mL e 125 U/mL, respectivamente. Em comparação com K_m e V_{max} obtidos para a CGTase solúvel, houve um leve aumento de K_m . O valor maior de K_m para a ICGTase indica que, mediante imobilização, a afinidade da enzima pelo substrato foi reduzida. Esse comportamento se deve à menor transferência de massa do meio reacional para o sistema imobilizado, pois o processo de imobilização reduz a difusão do substrato nos interstícios do suporte. O decréscimo no valor da velocidade máxima (V_{max}) de reação é possivelmente devido às mudanças conformacionais sofridas pela enzima após sua imobilização e ou limitação de acessibilidade do substrato ao sítio ativo (PROUSOONTORN; PANTATAN, 2007).

A estabilidade de armazenamento (geladeira a 8°C) da CGTase e ICGTase foi avaliada durante 30 dias, em intervalos de três dias. A atividade enzimática permaneceu praticamente inalterada por aproximadamente 18 dias. Após os 30 dias a atividade remanescente da CGTase e da ICGTase foi de 80 e 60%, respectivamente. Para a estabilidade térmica a 60 e 80°C por 5h houve uma pequena diferença entre a CGTase e a ICGTase, demonstrando novamente uma maior atividade catalítica na forma solúvel.

A estabilidade operacional da enzima imobilizada foi avaliada em processo de batelada. Após 15 ciclos de produção de β -CDs, o complexo ICGTase ainda apresentava 60% da atividade catalítica inicial. Até o 11º ciclo houve apenas pequenas perdas. As microesferas de sílica-PEG

provaram ser um material resistente, pois resistiram a 15 usos sob forte agitação e altas temperaturas (80°C), uma vez que a aparência superficial não foi alterada.

Para concluir, pode-se afirmar que o trabalho atingiu os objetivos propostos. Os parâmetros de produção de β -CD da CGTase e da ICGTase foram estabelecidos e comparados entre si, como também seus parâmetros cinéticos e suas características de estabilidade de estocagem e térmica. Além disso, o complexo da enzima CGTase ligada covalentemente ao suporte de sílica-PEG apresentou bons resultados ao ser reutilizado, indicando ser adequado o uso do complexo ICGTase na indústria, reduzindo custos de produção e purificação de β -CD, produto este de tão vasta e interessante aplicação em diferentes áreas. Contudo, a utilização de substratos e agentes protetores da estrutura molecular da enzima poderão ser testados durante o processo de imobilização, bem como o uso de agentes de conservação poderão ser adicionados após a imobilização de modo a aumentar a estabilidade da enzima imobilizada durante o armazenamento. Também poderão ser testados protocolos de imobilização covalente multipontual, técnica conhecida por aumentar significativamente a estabilidade de diferentes enzimas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES-PRADO H. F., CARNEIRO A. A. J., PAVEZZI F. C., GOMES E., BOSCOLO M., FRANCO C. M. L., SILVA R. Production of Cyclodextrins by CGTase from *Bacillus clausii* Using Different Starches as Substrates. *Appl Biochem Biotechnol.*, v.146, p.3–13, 2008.

AMUD A.E., SILVA G. R. P., TARDIOLI P. W., SOARES C. M. F., MORAES F. F., ZANIN G. M. Methods and Supports for Immobilization and Stabilization of Cyclomaltodextrin Glucanotransferase from *Thermoanaerobacter*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* v.146, p.189–20. 2008.

ARTYOMOVA A. A., VOROSHILOVA O. I., NIKITIN Y. U. S., KHOKHLOVA T. D. Macroporous silica in chromatography and immobilization of biopolymers. *Advances in Colloid and Interface Science*, Amsterdam, v.25, p.235-248, 1986.

ASTRAY G., GONZALEZ-BARREIRO C., MEJUTO J.C., RIAL-OTERO R., SIMAL-GA'NDARA J. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocoll*, v.23, p.1631–1640, 2009.

AVCI A., DÖNMEZ S. A novel thermophilic anaerobic bacteria producing cyclodextrin Glycosyltransferase. *Process Biochem.*, v. 44, p. 36–42, 2009.

BARRETT E. P., JOYNER L. G., HALENDA P. P. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 73, p. 373-380, 1951.

BON E. P. S., FERRARA M. A., CORVO M. L. Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro, Interciência:UFRJ:CAPES: FAPERJ:FTC [Portugal], 506 p. 2008.

BRUNAUER P.H., EMMETT E., TELLER, Adsorption of gases in multi molecular layers, *J. Am. chem. Soc.* v., 60, p. 309–319, 1938.

CAI Y., GAFFNEY S. H., LILLEY T. H., MAGNOLATO D., MARTIN R., SPENCER C. M., HASLAM E. Polyphenol interactions. Part 4. Model studies with caffeine and cyclodextrins. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, v. 2, p. 2197-2209, 1990.

CAO L. *Carrier-bound Immobilized Enzymes - Principles, Applications and Design*. 1.ed. The Netherlands: Wiley-VHC, 531p. 2005a.

CAO L. Immobilised enzymes: science or art? *Curr Opin Chem Biol*, 9, p. 217-226, 2005b.

CARDOSO C.L., MORAES M. C., CASS Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Quim. Nova*. v.32, p. 175-187, 2009.

CASTILLO N., BOYD R. J. The host-guest inclusion complex of *p*-chlorophenol inside α -cyclodextrin: an atoms in molecules study. *Chem. Phys.*, v. 416, p. 70-74, 2005.

CEREDA M. P. *Tecnologias, Usos e Potencialidades de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas*. São Paulo: Fundação Cargill, 2003. 711p.

COSTA H., DEL CANTO S., FERRAROTTI S., BONINO M. B. J. Structure–function relationship in cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R. *Carbohydr Res*, v. 344, p. 74–79, 2009.

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

DRUNKLER D. A., FETT R., LUIZ M. T. B. Polímeros de ciclodextrina: características, formação de complexos de inclusão e aplicações industriais. *B. CEPPA, Curitiba*, v. 17, n. 1, p. 21-32, jan./jun.1999.

GASTON J. A. R., SZERMAN N., COSTA H., KRYMKIEWICZ N., FERRAROTTI S. Cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R: activity and kinetic studies. *Enzyme Microb Technol.*, v. 45, p. 36–41, 2009.

GAWANDE B. N., SONAWANE A. M., JOGDAND V. V., PATKAR A. Y. Optimization of cyclodextrin glycosyltransferase production from *Klebsiella pneumoniae* AS-22 in batch, fed-batch and continuous cultures. *Biotechnol Progr.*, v. 19, p. 1697-1702, 2003.

HEDGES R. A., MCBRIUDE C. Utilization of β -cyclodextrin in food. *CFW*, v. 44, p. 700-704, 1999.

IUPAC - INTERNATIONAL UNION PURE APPLIED CHEMISTRY. Handbook of chemistry and physics. Oxford: Pergamum, 54, 1982. p. 2201.

IRWIN P. L., PFEFFER P E., DONER L. W., SAPERS G. M., BREWSTER J.D., NAGAHASHI G., HICKS K. B. Binding geometry, stoichiometry, and thermodynamics of cyclomalto-oligosaccharide (cyclodextrin) inclusion complex formation with chlorogenic acid, the major substrate of apple polyphenol oxidase. *Carbohydr Res*, 256, p. 13-27, 1994.

ISPAS C., SOKOLOV I., ANDREESCU S. Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. *Anal Bioanal Chem.*, 393, p. 543-554, 2009.

KANECO T., KATO T., NAKAMURA N., HORIKOSHI K. Spectrophotometric determination of cyclization activity of β -cyclodextrin-forming cyclodextrin glucanotransferase. *J. Jpn Soc Starch Sci.*, v.34, p.45-48, 1987.

KELLY R. M., DIJKHUIZEN L., LEEMHUIS H. The evolution of cyclodextrin glucanotransferase product specificity. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 84, p. 119–133, 2009.

KLEIN M. P. Imobilização de β -galactosidase para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose. Porto Alegre: UFRGS, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

KRAJEWSKA B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzym Microb Tech*, v. 35, p. 126–139, 2004.

LEEMHUIS H., KELLY R. M., DIJKHUIZEN L. Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 85, p. 823–835, 2010.

LINEWEAVER H., Burk D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. A. C. S.* v.56, p. 658-666, 1934.

MARTÍN M. T., PLOU F.J., ALCALDE M., BALLESTEROS A. Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v.21, p.299–308, 2003.

MATIOLI G.; MORIWAKI C.; MAZZONI R. B.; ZANIN G. M.; MORAES F. F. Estudos de parâmetros que influenciam na produção da enzima CGTase de *Bacillus firmus*, cepa nº 37. *Acta Scientiarum*, v. 22, n. 2, p.311-316, 2000a.

MATIOLI G. Ciclodextrinas e suas aplicações em alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais. Maringá: Eduem, 2000b.

PINTO F. S. T.; FLÔRES S. H.; AYUB M. A. Z.; HERTZ P. F. Production of cyclodextrin glycosyltransferase by alcaliphilic *Bacillus circulans* in submerged and solid-state cultivation. *Bioprocess Biosyst Eng*, v.30, p.377-382, 2007.

- PROUSOONTORN M. H., PANTATAN S. Production of 2-O- α -glucopyranosyl L-ascorbic acid from ascorbic acid and β -cyclodextrin using immobilized cyclodextrin glycosyltransferase. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, v.57, p.39-46, 2007.
- PSZCZOLA. Production and Potential Food Applications of Cyclodextrins. *Food Technol*, v. 42, p. 96-100, 1988.
- SINGH M., SHARMA R., BANERJEE U. C. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnol Adv*, v. 20, p. 341–359, 2002.
- SOBRAL K. A., RODRIGUES R. O., OLIVEIRA R. D., OLIVO J. E., MORAES F. F., ZANIN G. Evaluation of Supports and Methods for Immobilization of Enzyme Cyclodextringlycosyltransferase. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 105-108, p. 809-819, 2003.
- SZENTE L., SZEJTLI J. Cyclodextrins as food ingredients. *Food Sci Tech*, v.15, p.137-142, 2004.
- TARDIOLI P. W., ZANIN G. M., MORAES F. F. Characterization of *Thermoanaerobacter* cyclomaltodextrin glucanotransferase immobilized on glyoxyl-agarose. *Enzyme Microbial Technol*, v. 39, p.1270–1278, 2006.
- TONKOVA A. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme Microbial Technol*, v.22, p.678-686, 1998.
- UITDEHAAG J. C. M., VAN DER VEEN B. A., DIJKHUIZEN L., DIJKSTRA B. W. Catalytic mechanism and product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase, a prototypical transglycosylase from the α -amylase family. *Enzyme Microbial Technol*, v.30, p.295-304, 2002.
- VAN DER MAAREL M. J. E. C., VAN DER VEEN B. A., UITDEHAAG J. C. M., LEEMHUIS H., DIJKHUIZEN L. Properties and Applications of Starch-Converting Enzymes of the α -Amylase Family. *J Biotech*, v.94, p.137-155, 2002.

VAN DER VEEN B. A., UITDEHAAG J. C. M., DIJKSTRA B. W., DIJKHUIZEN L. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochim Biophys Acta*, v.1543, p.336-360, 2000a.

VAN DER VEEN B. A., ALEBEEK G. W. M., UITDEHAAG J. C. M., DIJKSTRA B. W., DIJKHUIZEN L. The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* (strain 251) proceed via different kinetic mechanisms. *Eur J Biochem*, v. 267, p. 658-665, 2000b.

VENTURINI C. DE G., NICOLINI J., MACHADO C., MACHADO V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Quim. Nova*, 31, p. 360-368, 2008.

VITOLLO M. Reatores com enzimas imobilizadas. In: SCHMIDELL W., LIMA U. A., AQUARONE E., BORZANI W., (eds), *Biotecnologia industrial – engenharia bioquímica*. v. 2. São Paulo: ABDR, p. 373-396, 2001.

WIND R. D., LIEBL W., BUITELAAR R. M., PENNINGA D., SPREINAT A., DIJKHUIZEN L., BAHL H. Cyclodextrin Formation by the Thermostable α -Amylase of *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 and Reclassification of the Enzyme as a Cyclodextrin Glycosyltransferase. *Appl Environ Microbiol*, v. 61, p. 1257–1265, 1995.

YANG X, WANG J, LIU X, SHANG Z. High purity micron-scale macroporous silica spheres for high performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* v. 25, p. 179-182, 2002.

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

Apêndice A

Nas tabelas 4 e 5 estão representados alguns dos resultados obtidos nos processos de imobilização de CGTase em filme de celulose/líquido iônico modificado com grupos amina.

Tabela 4 - Parâmetros obtidos em um dos processos de imobilização de CGTase em filme de celulose/líquido iônico modificado com grupos amina.

Atividade oferecida (U/mL)	Atividade não ligada (U/mL)	Rendimento de imobilização (%)	Atividade da enzima imobilizada (U/mL)	Atividade Recuperada (%)
175	149	10,6	3	16

Tabela 5 - Parâmetros obtidos em um dos processos de imobilização de CGTase em filme de celulose/líquido iônico modificado com grupos amina em presença de substrato (solução a 1%).

Atividade oferecida (U/mL)	Atividade não ligada (U/mL)	Rendimento de imobilização (%)	Atividade da enzima imobilizada (U/mL)	Atividade Recuperada (%)
202	173,4	14,5	2,8	9,6