

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**IMOBILIZAÇÃO DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE PARA
PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS: CATÁLISE EM BATELADA E CATÁLISE
CONTÍNUA EM REATOR DE LEITO FIXO**

Jéssie da Natividade Schöffler

Porto Alegre

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**IMOBILIZAÇÃO DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE PARA
PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS: CATÁLISE EM BATELADA E CATÁLISE
CONTÍNUA EM REATOR DE LEITO FIXO**

Jéssie da Natividade Schöffler
(Química Industrial de Alimentos – UNIJUÍ)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Porto Alegre

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Schöffner, Jéssie da Natividade
Imobilização de ciclodextrina glicosiltransferase
para produção de ciclodextrinas: catálise em batelada
e catálise contínua em reator de leito fixo / Jéssie
da Natividade Schöffner. -- 2013.
82 f.

Orientador: Plinho Francisco Hertz.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. ciclodextrina glicosiltransferase. 2.
imobilização. 3. quitosana. 4. reator de leito fixo.
I. Hertz, Plinho Francisco, orient. II. Título.

Jéssie da Natividade Schöffner
Química Industrial de Alimentos – UNIJUÍ

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.

Aprovada em:
Pela Banca Examinadora:

Homologada em:
Por:

Plinho Francisco Hertz
Orientador – PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub
Coordenador do Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos (PPGCTA) - UFRGS

Prof.^a Dr.^a Helen Treichel
Banca – UFFS - Erechim

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Diretor do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos ICTA/UFRGS

Prof. Dr. Julio Xandro Heck
Banca – IFRS – Porto Alegre

Porto Alegre, 11 de março de 2013

Prof. Dr. Adriano Brandelli
Banca – PPGCTA/UFRGS

Agradecimentos

Ao meu orientador, Plinho Francisco Hertz, meu sincero agradecimento pela confiança e dedicação. Pelos ensinamentos, disposição diária e amizade sincera. Pelos momentos de descontração e experiências transmitidas. Muito obrigada!

Ao professor Rafael Costa Rodrigues pelas contribuições ao trabalho, e à minha formação.

Ao professor Marco Antonio Záchia Ayub, pela disponibilização de equipamentos e pelas sugestões em relação ao trabalho.

Agradeço aos membros da banca, por terem aceitado o convite para discutir este trabalho, pelo tempo dispensado às correções e sugestões.

À CAPES, pelo auxílio financeiro e ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização do mestrado.

À família 210, Carla (pela herança da CGTase), Manu, Sheila, Mari, André, agradeço imensamente pelos ensinamentos, auxílios, amizade e carinho. Vocês tornam a rotina no laboratório leve e agradável.

Ao meu bolsista Jackson, pela disponibilidade, motivação e ajuda. E também pelas risadas e descontração. E como esquecer a Jô e a Luiza?! Desejo todo sucesso a vocês!

Aos colegas do laboratório 216, pela disponibilidade e amizade que contribuíram para realização deste trabalho.

Àquelas pessoas que mesmo não estando presente diariamente, estavam sempre mandando energias positivas. Pela amizade e sinceras palavras de carinho e apoio quando nos encontrávamos pelos corredores: Tenisa Kinalski, Karla Moresco, Andiará Wrzesinski, Indjara Mallmann, Kleidson Lobato, Marcela L. Brites. Obrigada por tudo!

Ao Vinícius, meu amor, para qual me faltam palavras de agradecimento. Pela paciência, amor e companheirismo, sem o qual, tudo isso seria muito mais difícil. Obrigada

por estar sempre ao meu lado, torcendo por mim e me dando força para continuar. E à família Kolankiewicz pelo acolhimento, carinho e preocupação comigo.

À minha “Vó Didi”, pelo acolhimento quando vim a Porto Alegre, por tudo que fez e continua fazendo por mim.

À minha família, em especial meus pais, pelo incentivo, confiança, dedicação, amor e carinho. Todo meu amor e gratidão não são suficientes para agradecer tudo que fazem por mim. Esse é o resultado de toda tua dedicação, mãe! Pelos exemplos de vida, de dedicação e amor ao que faz. Espero um dia poder retribuir.

A todos os amigos e familiares que contribuíram para a concretização desse sonho.

MUITO OBRIGADA, a todos!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Ciclodextrinas.....	13
1.2 Ciclodextrina glicosiltransferase	16
1.3 Imobilização de enzimas	21
1.3.1 Métodos para imobilização de enzimas.....	23
1.3.1.1 Adsorção e deposição não covalente.....	24
1.3.1.2 Imobilização por interações iônicas	24
1.3.1.3 Imobilização por ligação covalente.....	25
1.3.1.4 Aprisionamento/encapsulamento	26
1.3.1.5 Ligação cruzada.....	26
1.3.2 Suportes para imobilização	27
1.3.2.1 Quitosana.....	28
1.3.3 Vantagens e limitações da imobilização	31
1.4 Reatores enzimáticos	35
2 RESULTADOS.....	37
2.1 Continuous production of β -cyclodextrin from starch by highly stable cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on chitosan.....	38
3 DISCUSSÃO GERAL.....	60
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICE A – Resumo do trabalho apresentado como pôster no ENZITEC 2012.....	72
APÊNDICE B – Fluxograma para purificação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase de Bacillus circulans ATCC 21783.....	74
APÊNDICE C – Gel de eletroforese SDS-PAGE 10% para acompanhamento da eficiência no processo de purificação.....	75

APÊNDICE D – Tabela de purificação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase de <i>Bacillus circulans</i> ATCC 21783.....	76
APÊNDICE E - Esquema do reator enzimático utilizado para produção contínua de β-CD.....	77
APÊNDICE F – Foto do reator enzimático utilizado para produção contínua de β-CD.....	78
ANEXO 1 - Artigo científico “Characterization of cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on sílica microspheres via aminopropyltrimethoxysilane as a “spacer arm”” publicado na revista <i>Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic</i>.	79
ANEXO 2 - Artigo científico “High stability of immobilized β-D-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis” aceito para publicação na revista <i>Carbohydrate Polymers</i>.	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da α -, β - e γ -CDs.....	13
Figura 2. Formato cilíndrico de uma ciclodextrina	14
Figura 3. Representação esquemática das reações catalisadas pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase	18
Figura 4. Esquema do mecanismo de α retenção presente em toda família α -amilase para clivagem da ligação glicosídica.....	19
Figura 5. Reação de ciclização catalisada pela CGTase.....	20
Figura 6. Representação dos principais métodos de imobilização	24
Figura 7. Imobilização covalente em suporte pré-ativado com glutaraldeído.....	26
Figura 8. Estrutura química da celulose, da quitina e da quitosana	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades das ciclodextrinas	14
---	----

IMOBILIZAÇÃO DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE PARA PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINAS: CATÁLISE EM BATELADA E CATÁLISE CONTÍNUA EM REATOR DE LEITO FIXO¹

Autor: Jéssie da Natividade Schöffler

Orientador: Plinho Francisco Hertz

RESUMO

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) faz parte da família das α -amilases e se destaca por ser a única enzima capaz de produzir ciclodextrinas (CDs). Esses oligossacarídeos cíclicos possuem a capacidade de formar complexos de inclusão com uma variedade de moléculas, alterando suas características como, por exemplo, solubilidade, volatilidade e estabilidade. Desta forma, CDs tem encontrado aplicação nas mais diversas áreas. Na indústria de alimentos, se destacam por serem potenciais estabilizantes naturais. Buscando alternativas viáveis para produção destas ciclodextrinas, neste trabalho, a enzima CGTase foi imobilizada covalentemente em esferas de quitosana e posteriormente utilizada em um reator enzimático para uso contínuo. O rendimento da imobilização foi de aproximadamente 100 %, com uma carga de 20 mg de enzima por grama de suporte seco. O processo de imobilização foi capaz de manter o comportamento da enzima frente à variação de pH e temperatura de reação, apresentando pH ótimo em 5,0 e a faixa de temperatura ótima de 70 a 95 °C, para ambos. A estabilidade conferida ao catalisador imobilizado possibilitou sua reutilização, 61 % da sua atividade inicial foi mantida após 100 ciclos de reação. Durante utilização contínua, realizada em um reator de leito fixo, analisou-se a influência da taxa de fluxo e da concentração do substrato na geração de β -CD. A máxima produção (1,32 g / L) foi alcançada utilizando-se 4 % de amido solúvel em uma taxa de fluxo de 3 mL / min. Além disso, o biocatalisador apresentou uma ótima estabilidade operacional a 60 °C, mantendo 100 % da atividade inicial após 100 h de uso contínuo. Estes resultados demonstram que o desempenho do reator é diretamente afetado pelos parâmetros analisados e que a produção pode ser otimizada por regulação simples na velocidade de fluxo, ou pela concentração do substrato; e sugerem a possibilidade de utilizar este biocatalisador imobilizado na produção contínua de CDs.

Palavras-chave: ciclodextrina glicosiltransferase, imobilização, quitosana, reator de leito fixo.

¹ Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos (área de concentração Bioquímica), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, março de 2013.

IMMOBILIZATION OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE FOR THE PRODUCTION OF CYCLODEXTRINS: CATALYSIS IN BATCH AND CONTINUOUS CATALYSIS IN FIXED BED REACTOR²

Author: Jéssie da Natividade Schöffner

Advisor: Prof. Plinho Francisco Hertz

ABSTRACT

Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) is member of the family α -amylase and is known for being the only enzyme able to produce cyclodextrins (CDs). These cyclic oligosaccharides have the ability to form inclusion complexes with a variety of molecules, changing its characteristics, for example, solubility, volatility and stability. Therefore, CDs have found application in several fields. In the food industry stand out for being potential natural stabilizers. Seeking to alternatives for producing these cyclodextrins, in this work, the CGTase enzyme was immobilized covalently on chitosan beads and subsequently used in enzymatic reactor for continuous use. The immobilization yield was high, reaching about 100 %, representing a load of 20 mg enzyme per gram of dry support. The immobilization process was capable of maintaining the behavior of the enzyme to the variation of pH and temperature of reaction, with pH optimum at 5.0 and the optimal temperature range of 70 - 95 ° C, for both. The stability afforded to the immobilized catalyst made possible its reuse, maintaining 61 % of its initial activity after 100 cycles of reaction. During its continuous use, in a packed bed reactor, we analyzed the influence of flow rate and concentration of the substrate in the generation of β -CD. The maximum yield (1.32 g / L) was achieved using 4 % soluble starch at a flow rate of 3 mL / min. In addition, the biocatalyst showed a great operational stability at 60 ° C, maintaining 100 % of initial activity after 100 h of continuous use. These results demonstrate that the performance is directly affected by the parameters analyzed and that the production can be optimized by simple adjustment in flow rate through the reactor, or the substrate concentration used and suggests the possibility of using this biocatalyst immobilized to the continuous production of CDs.

Keywords: cyclodextrin glycosyltransferase, immobilization, chitosan, packed bed reactor.

² Master of Science dissertation on Food Science and Technology, (Area of Biochemistry), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, March, 2013.

1 INTRODUÇÃO

A enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) tem atraído grande interesse industrial devido à sua capacidade única de formar oligossacarídeos cíclicos (ciclodextrinas – CDs) a partir de matéria prima amilácea. Tais produtos são capazes de formar complexos de inclusão com uma variedade de substâncias, conferindo-lhes melhores propriedades físico-químicas tais como maior resistência química a fatores ambientais, maior solubilidade aparente e volatilidade reduzida (TARDIOLI *et al.*, 2006). Essa propriedade das CDs tem levado a um aumento em sua aplicação nas indústrias de alimentos, farmacêuticas, cosméticos, produtos agroquímicos, química, plásticos e outras (SZEJTLI, 1997). O avanço tecnológico na produção de CDs tem alcançado reduções significativas nos seus custos, todavia, várias das aplicações potenciais só poderão se concretizar em larga escala caso se consiga reduzir ainda mais o custo de obtenção (MATIOLI, 2000).

A imobilização é considerada uma ferramenta útil para redução de custos na utilização de enzimas em processos biotecnológicos, apresentando uma série de vantagens como, por exemplo, permitir seu uso repetidamente. Além disso, a facilidade de separação da enzima imobilizada do meio de reação reduz etapas onerosas e trabalhosas de separação posterior. Benefícios adicionais incluem a estabilização contra condições adversas, que normalmente seriam deletérias para as preparações de enzimas solúveis (TISCHER *et al.*, 1999).

Além disso, a imobilização de enzimas torna possível sua utilização em processos contínuos como, por exemplo, em reatores de leito fixo, onde a enzima imobilizada é mantida no interior do reator enquanto o fluxo de substrato é constante alcançando-se, desta forma, maior produtividade (ILLANES *et al.*, 2008).

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo principal desenvolver um método de imobilização eficaz, que proporcione estabilidade à enzima ciclodextrina glicosiltransferase e que possibilite sua utilização na produção contínua de ciclodextrinas. Dentre os objetivos específicos, ressaltam-se:

- Imobilizar covalentemente a enzima em suporte adequado para utilização em batelada e em reator contínuo;

- Analisar os efeitos da imobilização sob parâmetros importantes para a enzima como pH e temperatura de reação;
- Avaliar a estabilidade operacional do biocatalisador imobilizado em reações de bateladas;
- Testar as melhores condições de fluxo e de concentração de substrato na produção contínua de β -ciclodextrina;
- Determinar a estabilidade operacional da enzima imobilizada durante o uso em processo contínuo.

1.1 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs), também conhecidas como cicloamiloses, ciclomaltoses e dextrinas de Schardinger (DEL VALLE, 2004), são macroanéis não redutores, formados a partir de unidades de glicose unidas por ligações $\alpha(1-4)$ através da ação de ciclodextrina glicosiltransferases sob o amido liquefeito. As mais comuns são constituídas por 6 (α -CD), 7 (β -CD) ou 8 (γ -CD) resíduos de glicose (Figura 1) (VAN DER VEEN, UITDEHAAG, PENNINGA, *et al.*, 2000; YAMAMOTO *et al.*, 2000), suas características mais importantes estão apresentadas na Tabela 1.

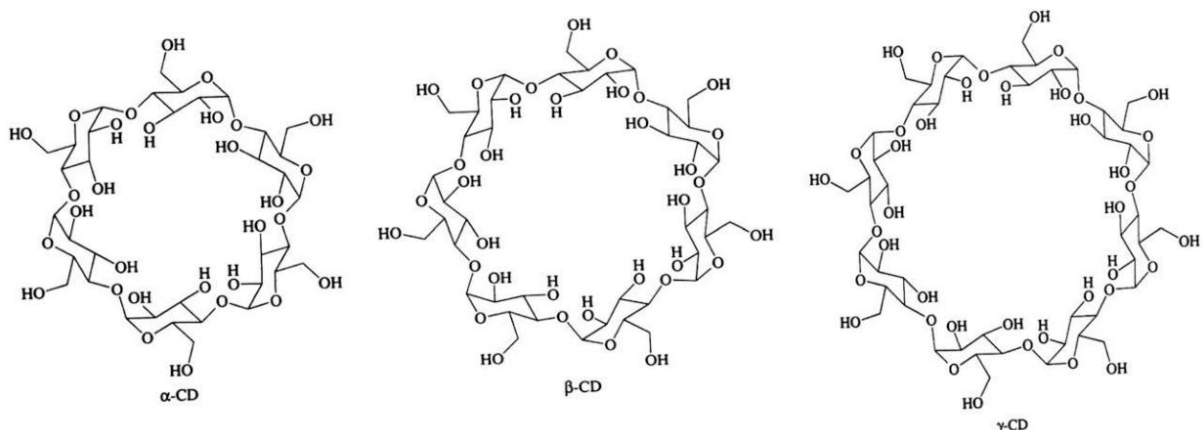


Figura 1. Estrutura química da α -, β - e γ -CDs. Fonte: ASTRAY *et al.*, (2009).

Tabela 1. Propriedades das ciclodextrinas

Características	α -CD	β -CD	γ -CD
Número de unidades de glicose	6	7	8
Massa molecular (g/mol)	972	1.135	1.297
Solubilidade (g/100mL a 25 °C)	14,5	1,85	23,25
Diâmetro externo (Å)	14,6	15,4	17,5
Diâmetro da cavidade (Å)	4,7-5,3	6,0-6	7,5-8,3
Altura do cone (Å)	7,9	7,9	7,9
Volume da cavidade (Å ³)	174	262	427

Fonte: Adaptado de Szejtli, (1998).

Os resíduos de glicose presentes no anel de CDs são arranjados de maneira que as hidroxilas secundárias (C₂ e C₃) estejam situadas em uma extremidade do anel, enquanto as hidroxilas primárias (C₆) na outra (Figura 2) (CARNEIRO *et al.*, 2006). Como consequência dessa conformação, as moléculas tem formato cilíndrico, ou melhor, um cilindro cônico, frequentemente caracterizado como um cone truncado. Os grupos hidroxilas presentes em seu exterior resultam em uma molécula com exterior hidrofílico, com capacidade de se dissolver em água. Sua cavidade revestida por átomos de hidrogênio apolares e pontes de oxigênio glicosídicas, que conferem característica hidrofóbica em seu interior, permite que moléculas sejam encapsuladas pelas ciclodextrinas, formando complexos de inclusão (SZEJTLI, 1997; VAN DER VEEN, UITDEHAAG, PENNINGA *et al.*, 2000; YAMAMOTO, ZHANG *et al.*, 2000).

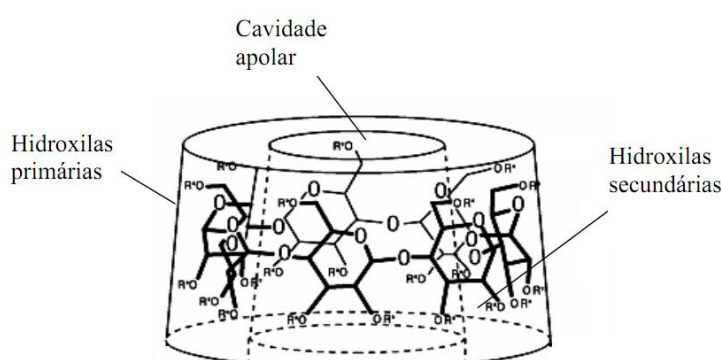


Figura 2. Formato cilíndrico de uma ciclodextrina. Estrutura configura propriedades características: interior hidrofóbico e exterior hidrofílico. Fonte: Adaptado de CARNEIRO *et al.*, (2006).

Os complexos de inclusão são definidos como o resultado da interação entre compostos nos quais uma molécula hóspede menor se encaixa e fica envolvida pela cavidade de outra molécula (HEDGES, 1998). Astray *et al.* (2009) descrevem as CDs como substâncias cristalinas, homogêneas e não higroscópicas, que podem ser consideradas como cápsulas vazias, de um determinado tamanho molecular, com a capacidade de formar complexos de inclusão com uma grande variedade de compostos.

Em solução aquosa, a cavidade levemente apolar da ciclodextrina é ocupada por moléculas de água que são energeticamente desfavorecidas (interação apolar-polar), e, portanto, podem ser facilmente substituídas por "moléculas hóspedes" mais apropriadas, que são menos polares. A ciclodextrina dissolvida é a molécula "hospedeira" e a força propulsora para a formação do complexo de inclusão é o efeito da entropia causado pelo deslocamento de moléculas de água do ambiente hidrofóbico da cavidade que produz um estado de energia mais baixo (SZEJTLI, 1997; VAN DER VEEN, UITDEHAAG, PENNINGA *et al.*, 2000).

Enquanto a altura da cavidade da CD é a mesma para os três principais tipos (α -, β -, e γ -CD), o número de unidades de glicose determina o diâmetro interno da cavidade e seu volume (Tabela 1). Desta forma, a capacidade de uma ciclodextrina para formar um complexo de inclusão é diretamente dependente do tamanho relativo desta e da molécula hóspede, que deve ser compatível com sua cavidade (DEL VALLE, 2004), assim, ciclodextrinas específicas (α -, β - ou γ -) são necessárias para a complexação de moléculas hóspedes específicas (VAN DER VEEN, UITDEHAAG, DIJKSTRA, *et al.*, 2000) que podem formar complexos com compostos sólidos, líquidos ou gasosos (PSZCZOLA, 1988).

A forma e dimensão da cavidade da CD permite inclusão total ou parcial de uma variedade de compostos. Desta forma, uma, duas, ou três moléculas de ciclodextrina podem aprisionar uma ou mais moléculas hóspedes. Mais frequentemente a proporção de hospedeiro:hóspede é de 1:1, esta é a essência do "encapsulamento molecular" e o caso mais simples. No entanto, 2:1, 1:2, 2:2, ou associações ainda mais complexas existem, quase sempre simultaneamente. As principais ligações que mantêm a união entre as CDs e as moléculas por elas encapsuladas são forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (ASTRAY, GONZALEZ-BARREIRO *et al.*, 2009). Essas ligações são fortes o suficiente para impedir a separação do complexo, mesmo em estado sólido, possibilitando serem separados do meio por cristalização, mas fracas o suficiente para permitir a liberação da

molécula encapsulada, quando necessário (SZEJTLI, 1998). Entretanto, elas não são fixas nem permanentes, se trata de um equilíbrio dinâmico entre ambas, e a resistência desta depende de quão bem o complexo se encaixa e das interações entre os átomos das superfícies (DEL VALLE, 2004).

A formação destes complexos de inclusão altera o comportamento das moléculas hóspedes levando a consequências importantes, tais como aumento da solubilidade aparente da molécula encapsulada; diminuição de sua reatividade (estabilização), difusão e volatilidade; isolamento físico de compostos incompatíveis; modificação do gosto por mascarar sabores e odores desagradáveis e liberação controlada de fármacos e sabores. A possibilidade de alterar estas características leva às várias aplicações das ciclodextrinas (ou seus derivados) na química analítica, na agricultura, na biotecnologia, na farmácia, em alimentos e em cosméticos (SZEJTLI, 1998; VAN DER VEEN, UITDEHAAG, DIJKSTRA *et al.*, 2000; YAMAMOTO, ZHANG *et al.*, 2000; QI *et al.*, 2005). No setor alimentício, CDs têm sido recomendadas para aplicação com uma variedade de propósitos: (i) proteger componentes lipofílicos contra a degradação oxidativa, alterações induzidas por luz e calor; (ii) solubilizar corantes e vitaminas; (iii) estabilizar fragrâncias, *flavours*, vitaminas e óleos essenciais contra mudanças indesejáveis; (iv) suprimir odores e sabores desagradáveis; e (v) para conseguir uma liberação controlada de certos componentes (ASTRAY, GONZALEZ-BARREIRO *et al.*, 2009).

Entretanto, o alto custo para a produção de CD limita seu uso extensivo, especialmente na indústria de alimentos (DEL VALLE, 2004). Ainda que α -, β - e γ -ciclodextrinas sejam todas permitidas para uso em alimentos (são consideradas GRAS – Generally Recognized as Safe), apenas a β -ciclodextrina é utilizada em maior quantidade, devido ao seu menor custo e funções já conhecidas (DAMODARAN *et al.*, 2010).

1.2 Ciclodextrina glicosiltransferase

Diversos microrganismos produzem enzimas capazes de converter amido em moléculas menores a fim de serem utilizadas como fonte de carbono e energia. Inúmeras destas enzimas, com diferentes especificidades de reação, têm sido identificadas e caracterizadas, incluindo α -amilases, glucanoamilases e ciclodextrina glicosiltransferases (VAN DER VEEN, UITDEHAAG, PENNINGA *et al.*, 2000; ATANASOVA *et al.*, 2009).

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, α -1,4-D-glicano-4- α -D-(1,4- α -D-glicano)-transferase), também conhecida como ciclomaltodextrina glicosiltransferase, é uma enzima extracelular membro da família das α -amilases e do grupo das transferases (EC 2.4.1.19). Composta por uma cadeia única de polipeptídios, possui massa molecular da ordem de 70 kD, com aproximadamente 700 aminoácidos organizados em cinco domínios. Os domínios A e B representam os grupos catalíticos, ao passo que C e E são especializados na ligação com as moléculas de amido. A função do domínio D ainda não é conhecida (UITDEHAAG *et al.*, 1999; UITDEHAAG *et al.*, 2002).

A enzima é capaz de reconhecer e agir sobre o amido solúvel e substratos glicanos α -(1,4) lineares tais como maltose, maltodextrina e maltotriose. Quatro reações distintas são catalisadas pela CGTase (Figura 3); três delas de transglicosilação (desproporcionalização, ciclização e acoplamento) e uma de hidrólise (SVENSSON *et al.*, 2009). Segundo van der Veen *et al.* (2000), a reação de desproporcionalização é a principal, onde um oligossacarídeo linear é clivado e uma das partes é transferida para outro acceptor também linear. A ciclização, reação de transglicosilação intramolecular, ocorre quando a extremidade não redutora de um oligossacarídeo linear é ligada em sua própria extremidade redutora, formando produtos cíclicos (ciclodextrinas). Já no acoplamento, reação inversa da ciclização, ocorre a abertura de um anel de ciclodextrina seguida pela transferência para outro oligossacarídeo linear. Finalmente, de menor ocorrência, a enzima é capaz de catalisar reações de hidrólise de ligações glicosídicas (VAN DER VEEN, VAN ALEBEEK *et al.*, 2000; UITDEHAAG, VAN DER VEEN *et al.*, 2002; QI *et al.*, 2007).

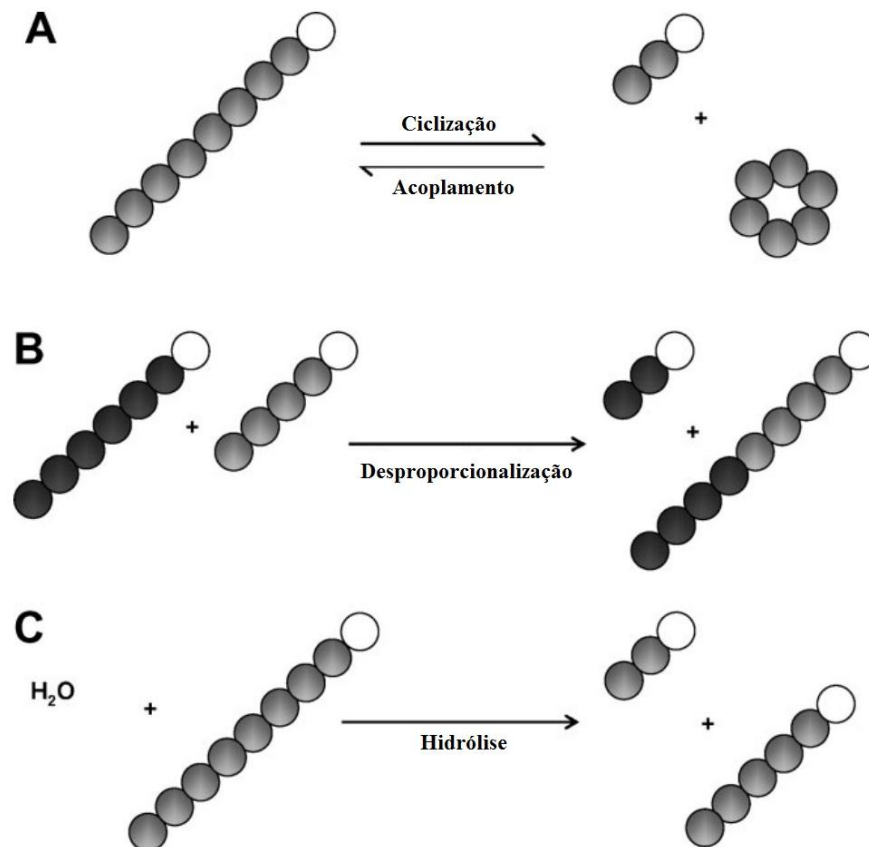


Figura 3. Representação esquemática das reações catalisadas pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase. (A) Ciclização e Acoplamento; (B) Desproporcionalização; (C) Hidrólise. Os círculos sombreados representam resíduos de glicose, e os círculos brancos indicam seus terminais reductores. Fonte: SVENSSON, *et al.* (2009).

Estas quatro reações fazem uso de um mecanismo básico, encontrado em toda família das α -amilases, chamado de α -retenção (Figura 4), e diferem apenas na molécula receptora. Estudos de cristalografia e de metagênese revelaram que os resíduos catalíticos são constituídos por três aminoácidos de alta conservação entre os membros desta família: Asp229, Glu257 e Asp328 (numeração estabelecida para CGTases) (VAN DER VEEN, VAN ALEBEEK *et al.*, 2000; UITDEHAAG, VAN DER VEEN *et al.*, 2002; QI, MOKHTAR *et al.*, 2007).

Além dos resíduos catalíticos, outros importantes aminoácidos fazem parte dos múltiplos sítios de ligação da enzima, permitindo a interação com o substrato e guiando os fragmentos lineares pelo espaço em torno do sítio ativo. A catálise se inicia com a retenção do substrato, que se liga ao resíduo Asp229 (Figura 4). Após essa ligação, a cadeia lateral do

Glu257 forma uma ligação por ponte de hidrogênio com o átomo de O4 da glicose e então o Asp328 interage com os grupos OH-2 e OH-3, estabilizando o estado de transição da reação. Outros resíduos presentes são a His327 e a Arg227 que se ligam com o grupo OH-2 do substrato. Estas ligações de hidrogênio têm duas finalidades, distorcer o anel da glicose para a conformação meia-cadeira e reduzir a eletronegatividade do grupo OH-2 para evitar a formação de um estado de transição desfavorável com carga positiva. A partir deste complexo (enzima-substrato) pode ocorrer qualquer uma das quatro reações acima descritas. Em ambos os casos, a cadeia do oligossacarídeo é clivada entre os subsítios -1 e +1 (mostrado em melhor detalhe na Figura 5), sendo o resíduo de glicose do subsítio -1 ligado covalentemente ao Asp229. Subsequentemente os resíduos ligados aos subsítios +1 e +2 têm de dar espaço a um substrato receptor ou para a extremidade não redutora do próprio oligossacarídeo, em caso de ciclização. Asp135 e Tyr100, mesmo não estando presentes no sítio ativo, também estão envolvidos na ligação do substrato (VAN DER VEEN, VAN ALEBEEK *et al.*, 2000; UITDEHAAG, VAN DER VEEN *et al.*, 2002; VAN DER MAAREL *et al.*, 2002).

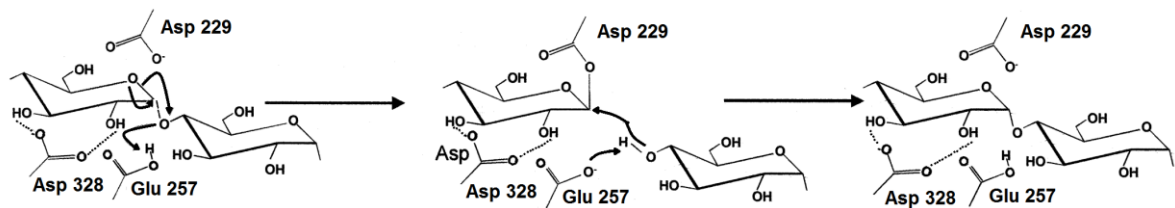


Figura 4. Esquema do mecanismo de α -retenção presente em toda família α -amilase para clivagem da ligação glicosídica. Nas reações de desproporcionalização, ciclização e acoplamento, a parte do substrato que não está ligado covalentemente com a enzima durante a reação é trocada por um receptor diferente. Fonte: Adaptado de VAN DER MAAREL, *et al.*, (2002).

O produto da reação de ciclização (Figura 5), catalisada pela CGTase, tem sido foco de grande interesse uma vez que esta é a única enzima capaz de produzir oligossacarídeos cíclicos (CDs). Pesquisas indicam que todas as CGTases bacterianas convertem amilose ou amilopectina em uma mistura de α -, β - e γ -ciclodextrinas, respectivamente; entretanto, diferem em seus produtos específicos (proporções de cada CD). Deste modo, de acordo com sua especificidade de produto, CGTases são frequentemente classificadas em três subgrupos: α -, β - ou γ -CGTase (VAN DER VEEN, VAN ALEBEEK *et al.*, 2000; QI e ZIMMERMANN, 2005).

Estudos relatam certa capacidade das CGTases de sintetizar CDs com grau de polimerização maior, chegando a 60 resíduos de glicose na etapa inicial da reação (TERADA *et al.*, 1997) que posteriormente, são convertidas à α -, β - e/ou γ -CD devido a sua susceptibilidade às reações de hidrólise e acoplamento. Entretanto, o tamanho da CD obtida é altamente dependente do tipo de CGTase, das condições de reação e da escolha do processo de produção (QI e ZIMMERMANN, 2005; GOH *et al.*, 2009).

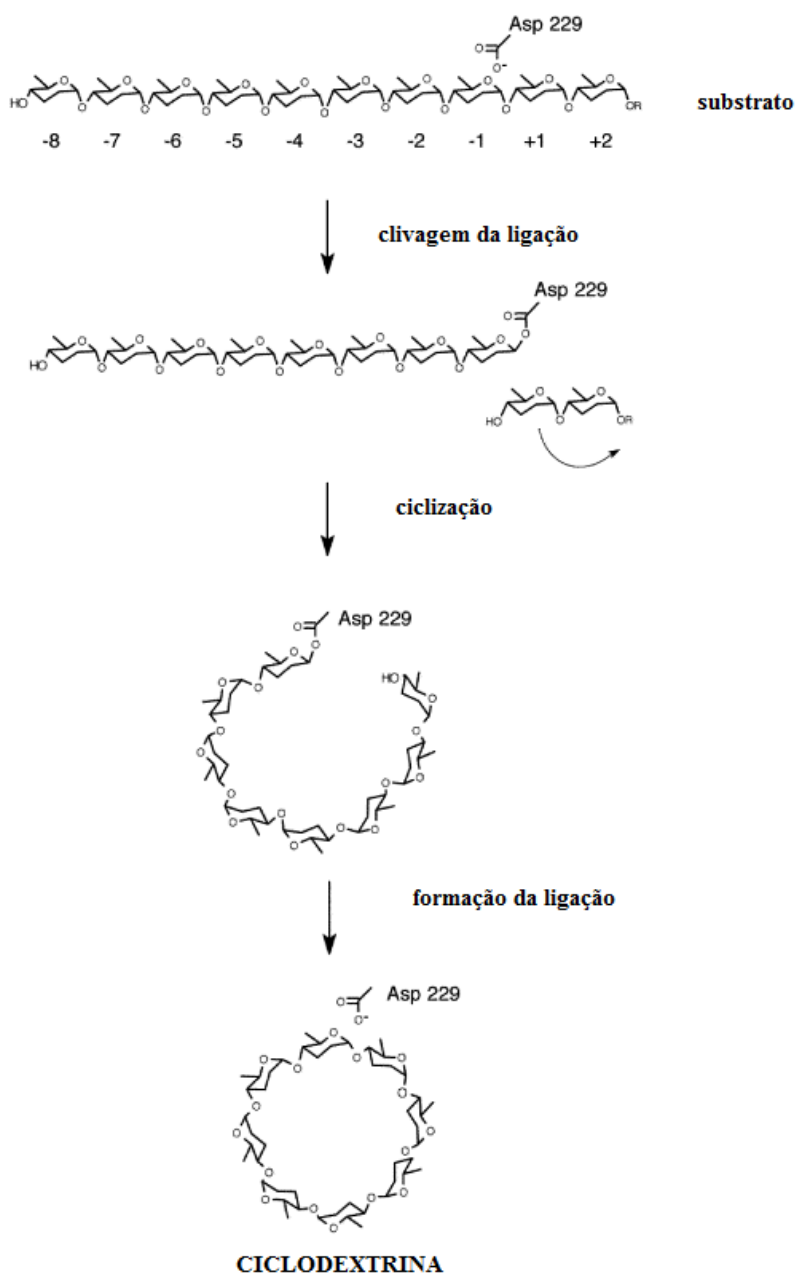


Figura 5. Reação de ciclização catalisada pela CGTase. Fonte: Adaptado de UITDEHAAG, *et al.* (2002).

Desde a descoberta da CGTase, vários microrganismos foram descritos como produtores da mesma, havendo predomínio do gênero *Bacillus* (ALVES-PRADO *et al.*, 2002). Dentre as bactérias já identificadas como produtoras da enzima, incluem-se: aeróbias mesofílicas (como *Bacillus macerans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus obhensis*, *Bacillus agaradhaerens* LS-3C, *Bacillus firmus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Paenibacillus pabuli*), aeróbias termofílicas (*Bacillus stearothermophilus*), algumas anaeróbias termofílicas (*Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1, *Thermoanaerobacter* sp. ATCC 53627) e anaeróbias termoalcalófilas (*Anaerobranca gottschalkii*) (TONKOVA, 1998; ABD RAHMAN *et al.*, 2004; AVCI *et al.*, 2009).

As condições ótimas de reação dependem da fonte da enzima e do produto desejado, entretanto, CGTases exibem tipicamente pH ótimo entre 4 e 10, e temperatura ótima de 50 a 60 °C podendo chegar a 120 °C no caso de termófilos. Bactérias do gênero *Bacillus*, principal fonte comercial da enzima, apresentam CGTases com pH ótimo geralmente entre 7,0 a 10,0 e temperatura ótima de aproximadamente 60 °C (BRENDA).

1.3 Imobilização de enzimas

Uma série de características torna a utilização de enzimas vantajosa em comparação com catalisadores convencionais. As enzimas apresentam elevada eficiência catalítica, frequentemente muito superior aos catalisadores químicos, e alto grau de especificidade, que garante que a reação catalisada não seja perturbada por reações paralelas e proporciona rendimentos substancialmente mais elevados. Além disso, ao contrário dos catalisadores químicos, geralmente operam em condições mais brandas de temperatura, pressão e pH, contribuindo para a economia de energia e redução de custos. Outra vantagem é que estes biocatalisadores não geram problemas de descarte, uma vez que são de origem proteica (KLIBANOV, 1979; KRAJEWSKA, 2004).

Apesar das vantagens inquestionáveis, existem alguns problemas práticos na utilização de enzimas pela indústria, como o elevado custo de sua produção e purificação; a instabilidade de suas estruturas, uma vez que são isoladas de seu ambiente natural; sua sensibilidade, tanto às condições de processo quando não ideais, quanto às substâncias que possam atuar como inibidores, muitas vezes seus próprios substratos e produtos, quando em altas concentrações. Sendo assim, tais problemas resultam em curto período de uso. Além

disso, quando operam dissolvidas em soluções aquosas, impossibilitam sua recuperação para posterior reutilização (KLIBANOV, 1979; KRAJEWSKA, 2004).

A imobilização de enzimas surge, na segunda metade do século XX, como alternativa para contornar tais limitações. Os sistemas de imobilização buscam estabilizar a estrutura das enzimas e manter sua atividade, desta forma, em comparação com enzimas livres, enzimas imobilizadas são mais robustas e mais resistentes às alterações ambientais. Mais importante ainda, a heterogeneidade dos sistemas imobilizados permite a fácil recuperação tanto do biocatalisador quanto do produto, a reutilização da enzima, a operação contínua de processos enzimáticos, rápida interrupção de reações e possibilita aplicação em uma maior variedade de modelos de reatores biológicos (SILMAN e KATCHALSKI, 1966 citado por KATCHALSKI-KATZIR, 1993).

O termo "enzimas imobilizadas" refere-se a enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma determinada região do espaço com a retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetida e continuamente (KATCHALSKI-KATZIR, 1993). Esta tecnologia foi introduzida nos anos 50 quando, pela primeira vez, foram produzidas preparações enzimáticas imobilizadas por inclusão em matrizes poliméricas e por ligação em suportes. Desde então, numerosos métodos de imobilização, em diferentes materiais, foram desenvolvidos. Atualmente são objetos de considerável interesse devido às suas vantagens sobre enzimas solúveis (TISCHER e KASCHE, 1999).

O principal objetivo da imobilização é possibilitar sua reutilização por diversos ciclos de reação, outros benefícios visados são a redução dos custos inerentes à sua utilização e a maior estabilidade de sua forma imobilizada (CAO, 2005b). Além de melhorar o desempenho das enzimas em condições ideais, sua recuperação do meio impede que sejam carregadas para etapas subsequentes (BRADY *et al.*, 2009) e permite sua reciclagem, característica essencial para um bom catalisador. A imobilização também possibilita melhorar a dispersão enzimática e a acessibilidade de substratos, bem como, evita agregação das partículas de proteína. Todavia, é importante enfatizar que sua utilização deve ser avaliada separadamente para cada caso (HANEFELD *et al.*, 2009).

Garcia-Galan *et al.* (2011) consideram pontos relevantes, que devem ser almeçados em um processo de imobilização para um biocatalisador industrial adequado: (i) a resistência mecânica; (ii) a simplicidade do protocolo de imobilização; (iii) a possibilidade de acoplar a imobilização com a purificação da enzima; (iv) o impacto da imobilização na atividade da

enzima; (v) estabilização da enzima através da prevenção de interações intermoleculares, pelo enrijecimento estrutural da enzima, ou ainda pela prevenção da dissociação de subunidades da enzima; (vi) modulação da seletividade ou especificidade da enzima, (vii) a redução dos problemas de inibição.

1.3.1 Métodos para imobilização de enzimas

Idealmente, o método de imobilização deve garantir a estabilidade da enzima durante longos períodos de tempo, evitar sua lixiviação, torná-la reutilizável, e permitir a livre difusão de substratos e produtos da reação (ISPAS *et al.*, 2009).

Enzimas podem ser imobilizadas por uma variedade de métodos (Figura 6), classificados como físicos, onde existem interações fracas entre o suporte e a enzima, e químicos, onde ligações covalentes são formadas entre eles. Aos métodos físicos pertencem: (i) adsorção (física, iônica) em uma matriz insolúvel em água; (ii) aprisionamento em gel; (iii) microencapsulação; e (iv) formação de filmes enzimáticos. Os métodos de imobilização química incluem: (i) ligação covalente ao suporte; (ii) reticulação com uso de um reagente multifuncional de baixa massa molecular; e (iii) ligação cruzada com outras substâncias neutras, por exemplo, proteínas. A literatura apresenta numerosos outros métodos, diferentes ou combinações destes, específicos de um dado suporte ou enzima. No entanto, nenhum método ou suporte é descrito como o melhor para todas as enzimas e suas aplicações (KLIBANOV, 1979; KRAJEWSKA, 2004).

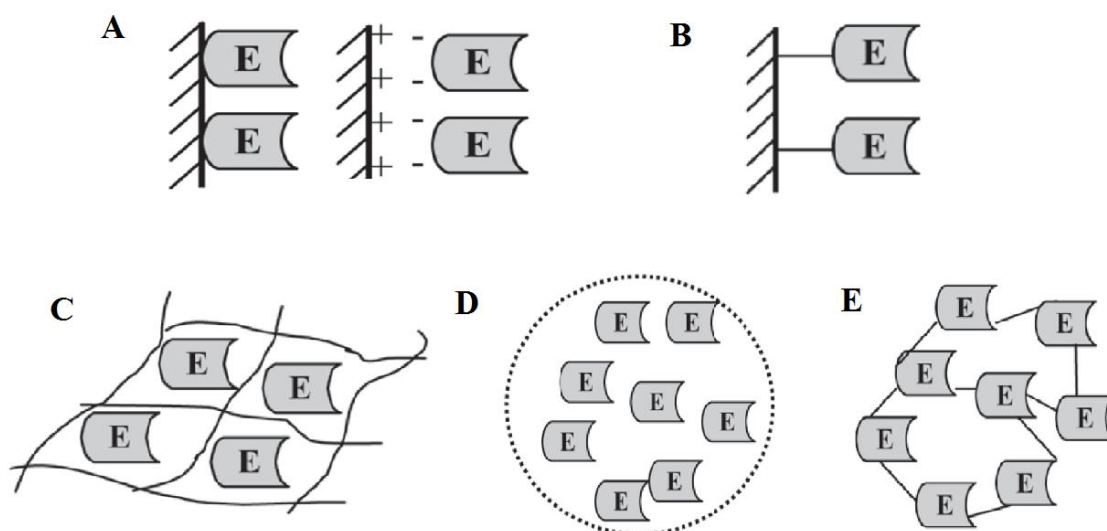


Figura 6. Representação dos principais métodos de imobilização. (A) Adsorção; (B) Ligação covalente; (C) Aprisionamento; (D) Encapsulamento; (E) Ligação cruzada. Fonte: Adaptado de GUIBAN, (2006).

Protocolos eficientes de imobilização devem promover o melhor compromisso entre a estabilidade, a atividade, o fácil manuseio, além de serem economicamente viáveis. Diversos autores (TISCHER e KASCHE, 1999; CAO, 2005; BRADY e JORDAAN, 2009; HANEFELD, GARDOSSI *et al.*, 2009), discutem as técnicas de imobilização mais utilizadas, cada uma com suas próprias vantagens e desvantagens associadas.

1.3.1.1 Adsorção e deposição não covalente

Talvez o protocolo mais simples para imobilizar proteínas é através da adsorção física em suportes sólidos pré-existentes. A adsorção pode ser realizada, dependendo da natureza de ambos (enzima e suporte), através de interações de van der Waals ou forças hidrofóbicas ou ainda, ligações de hidrogênio, que garantem sua ligação ao suporte. O método, simples e barato, tem a vantagem de que a enzima não necessita ser pré-tratada ou quimicamente modificada, e a principal desvantagem é a possível dessorção da enzima quando utilizada em meios aquosos (CARVALHO *et al.*, 2006).

1.3.1.2 Imobilização por interações iônicas

Essencialmente, qualquer trocador de íons pode atuar como suporte para imobilização através de interações iônicas, que ocorrem devido aos diferentes estados de ionização da enzima. Para isso, elas precisam conter resíduos de fácil acesso como imidazol, que pode ser alcançado com caudas de histidinas geneticamente introduzidas, por exemplo. Os anéis de

imidazol da histidina, neste caso, podem atuar como um ligante para os íons de metais. Em particular, Cu^{2+} , Co^{2+} ou Ni^{2+} têm sido utilizados na superfície dos suportes. Este método é fortemente dependente do pH e das concentrações de sal durante a imobilização, e também durante a aplicação. Semelhante à lixiviação em meio aquoso, descrito para enzimas imobilizadas por adsorção, altas concentrações de sal podem levar à troca iônica e, conseqüente, à lavagem das enzimas imobilizadas através de interações iônicas (HANEFELD, GARDOSSI *et al.*, 2009).

1.3.1.3 Imobilização por ligação covalente

A imobilização covalente de enzimas é realizada de uma forma mais complexa. Na maioria dos casos, o suporte exige alguma ativação prévia e algum tipo de bloqueio dos grupos reativos livres é recomendável após imobilização (GARCIA-GALAN, BERENGUER-MURCIA *et al.*, 2011). Os grupos amino da enzima são preferencialmente utilizados para a imobilização covalente com o suporte. Contudo, outros grupos funcionais presentes na superfície da enzima também podem ser utilizados como, por exemplo, resíduos de açúcares. A ligação covalente de uma enzima a um suporte tem a vantagem de que a enzima é firmemente fixada, sua lixiviação para o meio é minimizada e, assim, não ocorre contaminação do produto. A formação de múltiplas ligações covalentes reduz a flexibilidade conformacional e as vibrações térmicas e evita o desdobramento e desnaturação da proteína. A desvantagem do método é que a modificação química da enzima pode acarretar em perdas de atividade (CAO, 2005).

A imobilização covalente de enzimas é frequentemente realizada pela utilização de um agente ativador, como o glutaraldeído, em suportes contendo grupamentos amino primários (Figura 7). O método é simples e eficiente e, em alguns casos, capaz de melhorar a estabilidade da enzima através da imobilização multipontual. A baixa força iônica utilizada no tampão de imobilização promove primeiramente uma adsorção iônica, após, o glutaraldeído reage covalentemente com os grupos amino primários presentes também na enzima ligando-a irreversivelmente ao suporte (GUISAN, 2006).

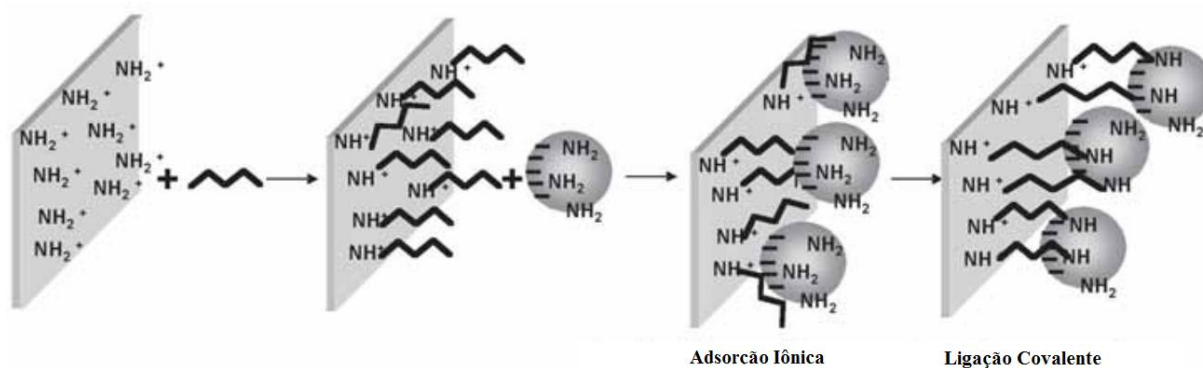


Figura 7. Imobilização covalente em suporte pré-ativado com glutaraldeído. Fonte: Adaptado de GUISSAN, (2006).

Em geral, as enzimas imobilizadas covalentemente podem ser usadas em qualquer meio, enquanto que as enzimas adsorvidas devem ser aplicadas em solventes orgânicos ou em reagentes hidrofóbicos puros para evitar a lixiviação. Tal como acontece com a imobilização não-covalente, os suportes hidrofóbicos ou hidrofílicos podem ser empregados (HANEFELD, GARDOSSI *et al.*, 2009).

1.3.1.4 Aprisionamento/encapsulamento

Alternativamente, o suporte pode encapsular ou aprisionar a enzima. Essa técnica normalmente envolve a utilização de membranas pré-formadas ou então, a síntese da matriz porosa em torno dos biocatalisadores. O método de sol-gel é atualmente o meio mais amplamente utilizado. Neste caso, os poros do suporte tem que ser de tamanho suficiente para garantir a difusão dos substratos sem impedimentos, assegurando simultaneamente que a enzima permaneça retida (HANEFELD, GARDOSSI *et al.*, 2009). Como principais desvantagens citadas estão os problemas difusionais, principalmente quando substratos de elevada massa molecular são usados, e a instabilidade dos suportes normalmente utilizados, o que limita a utilização dos agregados por longos períodos (CARVALHO, CANILHA *et al.*, 2006).

1.3.1.5 Ligação cruzada

Em casos mais extremos de imobilização, os biocatalisadores podem ser ligados entre si, sem a necessidade de uso de um suporte. Esta abordagem elimina as vantagens e desvantagens associadas aos suportes, assim, enzima praticamente pura é obtida, oferecendo

uma atividade altamente concentrada, alta estabilidade e baixo custo de produção devido à exclusão de um suporte adicional (SHELDON, 2007).

De acordo com Garcia-Gálan *et al.* (2011), as duas estratégias mais amplamente utilizadas para imobilizar enzimas sem suporte são: cristais de enzimas reticuladas (CLEC - crosslinking enzyme crystals) ou de agregados (CLEA - crosslinking enzyme aggregates). CLECs baseiam-se na cristalização de enzimas puras, seguido pela sua reticulação química, que ocorre pela adição de agentes químicos, como o glutaraldeído, que forma ligações cruzadas entre elas. Enquanto que a preparação CLEAs envolve a agregação da enzima antes da reticulação química.

Os métodos para imobilização devem atender tanto às necessidades catalíticas (expressas em produtividade, rendimento, estabilidade e seletividade) quanto às necessidades não-catalíticas (separação, controle, processo de down-streaming) exigidas para uma aplicação específica (CAO, 2005). Conforme apresentado, todos eles possuem vantagens e desvantagens: adsorção é simples, barata e eficaz, mas frequentemente reversível; ligação covalente e ligação cruzada (crosslinking) são métodos efetivos e duráveis, porém caros e que diminuem facilmente o desempenho da enzima; problemas difusionais são inerentes aos métodos de aprisionamento e microencapsulação. Conseqüentemente, as condições ideais para a imobilização de uma enzima escolhida e sua aplicação, são encontradas empiricamente por um processo de tentativa e erro buscando garantir a mais alta retenção da atividade enzimática possível, a sua estabilidade operacional e durabilidade (KRAJEWSKA, 2004).

1.3.2 Suportes para imobilização

O processo de imobilização implica na interação entre a enzima e o suporte, que fornecem diferentes propriedades cinéticas, mecânicas, químicas e bioquímicas, assim, as características da superfície de ambos são importantes (TISCHER e KASCHE, 1999; HANEFELD, GARDOSI *et al.*, 2009). Para projetar um biocatalisador imobilizado a principal tarefa é selecionar o suporte adequado às condições de reação (pH, temperatura e natureza do meio) e à enzima em si (natureza, fonte e pureza) (CAO, 2005). Desta forma, um suporte criteriosamente escolhido pode melhorar significativamente o desempenho operacional do sistema imobilizado.

Além das muitas opções naturais existentes (materiais orgânicos e inorgânicos), outros suportes podem ser preparados para combinar com as propriedades de superfície da enzima escolhida. Em geral, as características desejáveis em um suporte para imobilização de enzimas incluem alta afinidade por proteínas, disponibilidade de grupos funcionais para reagir diretamente com enzimas ou para modificações químicas, hidrofobicidade, alta resistência mecânica e rigidez, regenerabilidade, e facilidade de preparo em diferentes configurações geométricas. Outro requisito essencial é ter uma grande área superficial, o que pode ser conseguido com os materiais de pequeno tamanho de partícula, embora possam tornar difícil a separação; ou com materiais altamente porosos, com poros de dimensões suficientemente grandes, que não limitem a difusão de substratos e produtos (HANEFELD, GARDOSSI *et al.*, 2009). Compreensivelmente, para alimentos, produtos farmacêuticos, aplicações médicas e agrícolas, a não toxicidade e a biocompatibilidade dos materiais também são necessárias. Além disso, para corresponder à crescente consciência ambiental, os materiais devem ser biodegradáveis, além de serem econômicos (KRAJEWSKA, 2004; ISPAS, SOKOLOV *et al.*, 2009).

1.3.2.1 Quitosana

A quitina é o principal componente estrutural do exoesqueleto de invertebrados e da parede celular de fungos, e representa o segundo biopolímero natural renovável mais abundante do mundo (depois da celulose). Quimicamente análoga à celulose (Figura 8), a quitina é composta por monômeros de 2-acetamido-2-desoxi- β -D-glicose (ou N-acetil-D-glicosamina) unidos por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ formando uma longa cadeia linear, insolúvel na maioria dos solventes (SHAHIDI *et al.*, 1999; TOKURA *et al.*, 2007).

Seu principal derivado, a quitosana, é obtida por N-desacetilação da quitina. Como esta reação raramente é completa, a cadeia polimérica da quitosana é geralmente descrita como um copolímero de D-glicosamina (D-resíduos), juntamente com resíduos N-acetilados (Figura 8). A fração molar destes grupos residuais na quitosana é expressa como um grau de acetilação (DA) e esse valor depende diretamente das condições do processo de derivatização (GOYCOOLEA *et al.*, 2000).

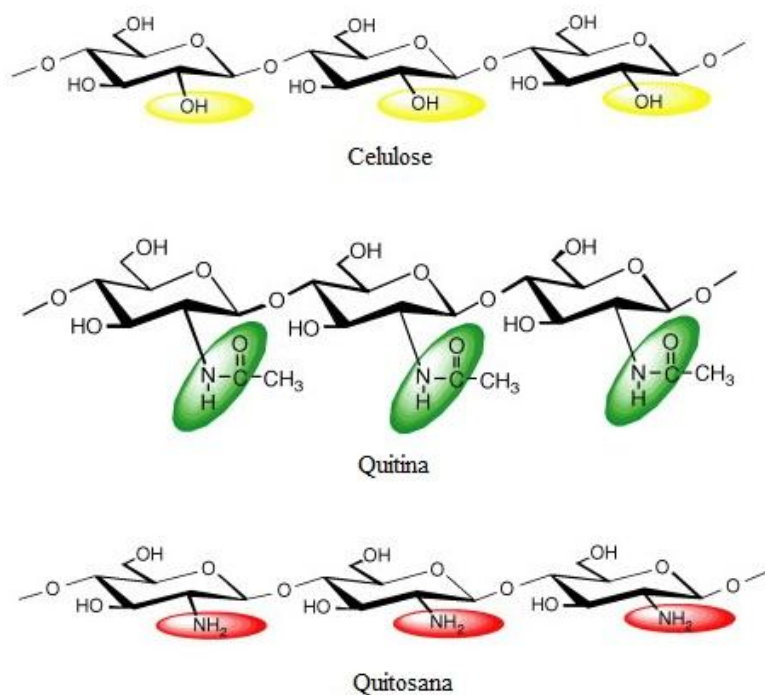


Figura 8. Estrutura química da celulose, da quitina e da quitosana. Fonte: Adaptado de TOKURA *et al.*, (2007).

Comercialmente a quitina é obtida, a um custo relativamente baixo, a partir de resíduos da indústria de processamento de pescado. Nos crustáceos ela está intimamente associada com proteínas, sais inorgânicos, tais como carbonato de cálcio e magnésio, e de lipídios, incluindo pigmentos, assim o seu isolamento compreende três operações básicas de purificação: (i) desproteinização do material com uma solução diluída de NaOH; (ii) descalcificação com uma solução diluída de HCl; e (iii) remoção de pigmentos (carotenóides) (GOYCOOLEA, ARGÜELLES-MONAL *et al.*, 2000). Para resultar em quitosana, a quitina obtida é então submetida à desacetilação por meio de tratamento com uma solução de NaOH 40 - 45 %, seguido de procedimentos de purificação. É importante notar que a composição da quitina e da quitosana varia dependendo da sua origem e do processo de fabricação, sendo o grau de desacetilação necessário para obter um produto solúvel de 80 - 85 % ou superior (KRAJEWSKA, 2004).

A quitosana possui características químicas e biológicas únicas, que oferecem um potencial extraordinário em um amplo espectro de aplicações. Tais características incluem

biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, inércia fisiológica, afinidade notável com proteínas, hemostáticos, propriedades fungistáticas, antitumorais e anticolesterêmicas. Modificações químicas nos grupos funcionais reativos de sua cadeia linear (aminas e hidroxilas) têm fornecido inúmeros materiais úteis inclusive para imobilização de enzimas (SHAHIDI, ARACHCHI *et al.*, 1999).

Os grupos aminos primários da quitosana, em maior quantidade do que na quitina, conferem solubilidade em meio ácido (pH abaixo de 6,5), e, em virtude da carga positiva dos grupos aminos, quando dissolvida é capaz de aderir às superfícies de carga negativa, e agregar com compostos polianiônicos, sendo usada como quelante de íons de metais pesados (BHATNAGAR *et al.*, 2009). Tanto a solubilidade em soluções ácidas quanto a agregação com poliânions conferem à quitosana excelente capacidade de formação de géis.

Para imobilização de enzimas e células, géis em diversos formatos podem ser fabricados através de soluções viscosas de quitosana em ácidos diluídos que precipitam sobre aumento no pH e pela formação de complexos ionotrópicos insolúveis em água com polieletrólitos aniônicos. Segundo Krajewska (2004), os métodos de preparação de suportes de quitosana presentes na literatura podem ser amplamente divididos em quatro grupos, descritos a seguir.

No método de evaporação do solvente, uma solução de quitosana em ácido orgânico é moldada sobre uma placa ou um eletrodo e deixada secar a uma temperatura elevada (65 °C). Após a secagem é neutralizada com uma solução diluída de NaOH e realizadas ligações cruzadas para evitar a desintegração em solução de pH abaixo de 6,5. Um agente de reticulação pode também ser misturado com a solução inicial. A secagem por pulverização é uma variante do método de evaporação de solvente que permite a preparação de grânulos menores.

O método de neutralização explora o fato de que se uma solução ácida de quitosana é misturada com um composto alcalino, o aumento no pH resulta em sua precipitação, podendo formar membranas, fibras, grânulos e esferas de diferentes tamanhos e porosidades. Sendo esse o método utilizado neste trabalho, as esferas foram obtidas adicionando gota a gota uma solução de quitosana em uma solução de NaOH, preparada em uma mistura de água-etanol para facilitar sua solidificação na forma de esferas. Após a preparação, os grânulos são normalmente sujeitos a reticulação. A imobilização de enzimas, semelhante ao método de evaporação do solvente, é obtido através da ligação à superfície do gel, por adsorção,

reticulação, ligação covalente ou por inclusão, se a enzima for dissolvida na solução de quitosana inicial.

No método por reticulação, uma solução ácida de quitosana é misturada com um agente de reticulação e submetida à ligação cruzada simples, o que resulta em gelificação. Os géis obtidos são posteriormente triturados em partículas. Para obter membranas de gel, a solução de quitosana moldada em uma placa é imersa num banho de reticulação, para se obter grânulos, a solução é adicionada gota a gota na mesma.

No método de gelificação ionotrópica se faz uso da natureza polieletrólito catiônica da quitosana, que sofre atração por moléculas com cargas opostas, formando espontaneamente complexos insolúveis em água com polieletrólitos aniônicos, por exemplo, alginato, carragena, goma xantana, vários polifosfatos orgânicos e sulfatos ou propriamente enzimas. O método é utilizado principalmente para a preparação de grânulos através da adição de uma solução de polieletrólito aniônico gota a gota a uma solução ácida de quitosana. A imobilização é realizada através da preparação da solução de polieletrólito aniônico contendo a enzima antes da gelificação, desta forma, a enzima é imobilizada por inclusão no interior do gel.

Uma vez que a biodegradação da quitina nos resíduos de crustáceos é lenta, a acumulação de grandes quantidades de rejeitos tornou-se uma grande preocupação na indústria de processamento de pescado (SHAHIDI, ARACHCHI *et al.*, 1999). Assim, o uso de quitina e quitosana, em particular na produção de derivados enzimáticos imobilizados, é um bom exemplo de reciclagem de resíduos sólidos orgânicos e subprodutos gerados pela indústria alimentar para obtenção de produtos de valor agregado (GOYCOOLEA, ARGÜELLES-MONAL *et al.*, 2000).

1.3.3 Vantagens e limitações da imobilização

Em sua origem, os sistemas biológicos estão submetidos a um controle rigoroso e é natural que se encontrem limitações para o uso de enzimas em ambientes diferentes. Estas limitações surgem a partir de características intrínsecas destes biocatalisadores: geralmente solúveis, são inibidos por diversos componentes possivelmente presentes no meio e até

mesmo por seus próprios substratos e produtos, além da estabilidade moderada fora de suas condições ótimas.

Ao longo dos anos, a imobilização tem sido estudada como solução para a maioria destes problemas que, muitas vezes, impossibilitam a utilização de enzimas em processos industriais. Desta forma, percebe-se que a técnica é eficaz não apenas para melhorar a estabilidade, mas também para reduzir a inibição, melhorar a seletividade ou a especificidade da enzima. Outras vantagens inerentes à técnica é a possibilidade de facilitar o controle das reações, evitar a contaminação do produto por proteína e permitir sua utilização em diferentes configurações de reatores (KLIBANOV, 1979; MATEO *et al.*, 2007; SHELDON, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2013).

Uma vez que a reutilização do biocatalizador só é possível se a atividade for mantida por vários ciclos de reação, a estabilização da enzima é um dos alvos habitualmente buscados pela técnica. Estabilização e imobilização são, neste caso, termos relacionados e existem diversas formas de serem alcançadas (KATCHALSKI-KATZIR, 1993).

Nas técnicas de imobilização em que a enzima fica confinada, é alcançada uma “estabilidade operacional” devido à proteção exercida pelo suporte. Esta proteção evita que as enzimas sejam inativadas por interação com interfaces hidrofóbicas, tais como bolhas de gás ou gotas de solventes imiscíveis. A imobilização de enzimas dentro de suportes porosos também impede processos de autólise e proteólise. Um revestimento com polímeros pode eficientemente evitar esse mecanismo de inativação quando a imobilização ocorre na superfície de suportes não porosos (MATEO, PALOMO *et al.*, 2007).

Ligações covalentes multipontuais levam a uma “estabilização estrutural” devido ao envolvimento de vários resíduos da superfície da enzima, causando enrijecimento da estrutura, o que reduz possíveis alterações conformacionais envolvidas em sua inativação. Este deve ser o alvo real da imobilização para efetivamente aumentar a estabilidade do biocatalisador. O mesmo pode ser alcançado através de técnicas como CLEAs e CLECs, onde a reticulação intramolecular reduz a mobilidade de enzimas em geral. Os melhores resultados em termos de ligação covalente multipontual geralmente são obtidos usando epóxido, grupos amino ativados com glutaraldeído, ou suportes glioxil (GARCIA-GALAN, BERENGUER-MURCIA *et al.*, 2011). Entretanto, as condições de reação devem favorecer certa mobilidade da enzima e garantir que a reação ocorra em condições favoráveis à sua estabilidade. Assim,

um bom sistema de imobilização deve produzir alta estabilização e moderada ou nula perda de atividade.

As interações estabelecidas entre a enzima e o suporte, durante a imobilização, podem alterar sua configuração final e produzir diferentes efeitos sobre sua atividade catalítica. Várias delas tendem a produzir efeitos negativos: distorções no centro ativo, reduzindo a mobilidade global dos grupos; inacessibilidade ao sítio ativo (problema observado principalmente quando o substrato possui alta massa molecular); e problemas de difusão. Entretanto, em outros casos, podem manter formas superativadas da enzima ou ainda promover propriedades catalíticas totalmente alteradas e até melhores que suas formas solúveis (MATEO, PALOMO *et al.*, 2007).

A imobilização tem se mostrado como ferramenta útil também para contornar problemas de inibição da enzima. Tal problema pode ser evitado de duas formas, quando a imobilização ocorre através dos mesmos grupos de ligação do inibidor, bloqueando o local de inibição, ou através de pequena distorção do sítio ativo tornando-o impróprio para ligação do inibidor e permitindo apenas a ligação do substrato. Este efeito é mais fácil de alcançar se uma superfície sólida está em contato com a enzima. Outros casos interessantes são aqueles em que o inibidor precisa induzir uma alteração conformacional da enzima. Nesses casos, aquelas que foram estabilizadas por meio de ligação covalente multipontual, por exemplo, podem ser mais resistentes ao efeito inibidor (GARCIA-GALAN, BERENQUER-MURCIA *et al.*, 2011).

Uma biocatálise eficiente requer que os substratos e produtos possam difundir-se livremente dentro e fora do suporte de imobilização. Limitações de transferência de massa podem não apenas diminuir a taxa de reação, mas também agravar a inibição pelo produto ou induzir gradientes de pH indesejáveis (HANEFELD, GARDOSSI *et al.*, 2009). A acumulação de produtos no interior dos poros do suporte pode, ainda, favorecer reações secundárias ou inversas.

Os problemas de acesso de substratos de massa elevada à enzima ou de difusão de substratos e produtos podem ser minimizados utilizando espaçadores (MATTE *et al.*, 2012) ou suportes macroporosos que assegurem uma grande área de superfície interna. Uma eficiente solvatação da enzima e a difusão dos reagentes e produtos podem ser alcançadas pela imobilização da enzima dentro de uma rede de polissacarídeos altamente hidrofílicos

(quitosana, por exemplo), ou ainda, através da imobilização sobre a superfície de suportes não porosos (HANEFELD, GARDOSSI *et al.*, 2009).

Tão indesejáveis quanto os problemas difusionais são os fenômenos de agregação, causados na proximidade com pontos isoelétricos, em temperaturas elevadas e na presença de sais ou solventes que além de reduzir a acessibilidade do substrato podem causar inativação das proteínas. Na forma imobilizada, as enzimas estarão facilmente dispersas sobre o meio de reação o que impedirá a formação de agregados (RODRIGUES, ORTIZ *et al.*, 2013).

Algumas enzimas multiméricas podem sofrer dissociação de subunidades como primeiro passo de sua inativação, o que leva à consequente contaminação do produto. A melhor solução é a imobilização por CLEAs e CLECs onde a reticulação da enzima após a ligação cruzada impede a dissociação da enzima. Quando suportes sólidos são usados, a dificuldade de estabilização é maior quanto maior for a complexidade da enzima, pois se torna difícil a imobilização completa das subunidades (GARCIA-GALAN, BERENGUER-MURCIA *et al.*, 2011).

Também a geração de ambientes artificiais em torno das moléculas de enzima tem sido proposta como forma de evitar inativações. Isso pode ser alcançado através de modificação física ou química da enzima ou da superfície do suporte. Um ambiente hidrofílico, por exemplo, pode reduzir a concentração de solventes orgânicos hidrofóbicos ou alguns gases próximos à enzima, protegendo-a. A utilização de polímeros com as propriedades físicas desejadas permite gerar o ambiente específico (GARCIA-GALAN, BERENGUER-MURCIA *et al.*, 2011).

Em suma, a imobilização é uma ferramenta muito poderosa para melhorar as propriedades da enzima. Entretanto, o efeito final das interações em todo o conjunto de propriedades é difícil de ser previsto, especialmente quando as alterações podem ser positivas para a atividade com um substrato e negativas para a atividade com outro. É fundamental, para obter bons resultados, testar diferentes métodos de imobilização, capazes de imobilizar a enzima através de diferentes áreas, com intensidades diferentes. Assim, pode ser possível encontrar um suporte e um protocolo que produzam o efeito desejado.

1.4 Reatores enzimáticos

Um reator enzimático pode ser definido como um dispositivo no interior do qual as reações enzimáticas são realizadas, pela catálise de enzimas, para gerar produtos sob determinadas condições. Para sua aplicação consideram-se duas fases: a fase líquida, que corresponde ao substrato e aos produtos dissolvidos, e a fase sólida, composta pelo biocatalisador imobilizado (ILLANES e ALTAMIRANO, 2008).

A estabilidade e a facilidade de recuperação, conferidas pelos processos de imobilização, possibilitam que estes biocatalisadores sejam reutilizados de forma descontínua ou contínua. Processos descontínuos ocorrem quando, ao final de cada reação, a enzima é recuperada para ser utilizada em lotes subsequentes, até que a inativação exija sua reposição. As partículas de enzimas imobilizadas devem estar suspensas na fase líquida por meio de agitação mecânica, que promove também a transferência de massa entre o meio reacional. Após o término da reação, a enzima é recuperada por filtração ou centrifugação e reciclada para um novo processo (VALENCIA *et al.*, 2010).

Várias configurações de reatores têm sido propostas para utilização de enzimas imobilizadas em operações contínuas, nos quais tais biocatalisadores são embalados em colunas e utilizados em um sistema de fluxo, desta forma, são utilizados repetidamente durante o tempo que permanecerem ativos, minimizando custos, tempo de produção, e tornando sua utilização economicamente viável. Possuem vantagens em termos de produtividade e controle de processo, contudo, ciclos de lavagens podem ser necessários para contornar problemas como entupimento (GIRELLI *et al.*, 2005).

As opções para operação contínua são diversas, entretanto, os reatores mais utilizados são os de leito fixo, onde a enzima imobilizada é mantida no interior do reator enquanto o fluxo de substrato é constante. Além da sua facilidade de operação, ampliação, e elevado volume de leito, tem a vantagem de redução da tensão de cisalhamento sobre as enzimas imobilizadas, levando a longa estabilidade (HAMA *et al.*, 2011).

O reator de leito expandido ou fluidizado é uma alternativa, onde as partículas de enzima imobilizada são mantidas em um balanço hidrodinâmico entre a gravidade e as forças promovidas pelo fluxo ascendente de substrato. No estado de fluidização, o leito de partículas se comporta como um líquido onde o fluxo o mantém em contínuo movimento. Este sistema

proporciona a vantagem de facilitar o transporte de massa, o que resulta em aumento da eficiência do processo (FILTVEDT *et al.*, 2010).

Reatores com enzimas imobilizadas em membranas são um modo específico para a execução de processos contínuos. Neste caso, as enzimas são separadas do produto final através de uma membrana seletiva, promovendo o processo de catálise e, simultaneamente, a separação do produto. Dependendo do caso, a enzima pode estar imobilizada sobre a superfície da membrana ou no interior de sua estrutura porosa. Apesar das vantagens na produtividade, qualidade e diversidade de produção, são raras as aplicações industriais deste processo, devido à deterioração da atividade enzimática ao longo do tempo, causada por efeitos de impedimento estérico (distorção do sítio ativo durante imobilização) e fenômenos de limitações interfaciais (baixa difusão de substratos ou produtos na proximidade da superfície da membrana) (FANG *et al.*, 2011).

Contudo, o desempenho de um reator enzimático no cumprimento da tarefa de produção, depende de condições ideais de operação, isto é: regime de fluxo, controle de variáveis operacionais (pH e temperatura), retenção integral da atividade da enzima durante seu funcionamento e a ausência de limitação de transferência de massa (ILLANES e ALTAMIRANO, 2008).

Apesar da crescente utilização de ciclodextrinas nas diversas áreas citadas, seu uso na indústria de alimentos depende ainda de alternativas para redução de seu custo de produção. Visto ainda a ausência de relatos sobre imobilização da CGTase em suporte de quitosana e também sua utilização na produção contínua de CDs, este trabalho buscou investigar a viabilidade de tais processos a fim de possibilitar a utilização destes aditivos naturais na indústria alimentícia.

2 RESULTADOS

Os resultados referentes ao trabalho de imobilização da enzima e sua utilização em reator contínuo estão apresentados na forma de artigo a ser submetido para publicação na revista *Carbohydrate Polymers*, já formatado de acordo com as normas da revista.

2.1 Continuous production of β -cyclodextrin from starch by highly stable cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on chitosan

Continuous production of β -cyclodextrin from starch by highly stable cyclodextrin
glycosyltransferase immobilized on chitosan

*Jéssie da Natividade Schöffer, Manuela Poletto Klein, Rafael C. Rodrigues
and Plinho Francisco Hertz**

Biotechnology, Bioprocess and Biocatalysis Group, Institute of Food Science and
Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves,
9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author:

Tel.: +55 51 3308 7094; fax: +55 51 3308 7048

E-mail address: plinho@ufrgs.br (P. F. Hertz)

ABSTRACT:

Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from *Thermoanaerobacter* sp. was covalently immobilized on glutaraldehyde-activated chitosan spheres and used in a packed bed reactor to investigate the continuous production of β -cyclodextrin (β -CD). The optimum temperatures were 75 °C and 85 °C at pH 6.0, respectively for free and immobilized CGTase, and the optimum pH (5.0) was the same for both at 60 °C. In the reactor, the effects of flow rate and substrate concentration in the β -CD production were evaluated. The optimum substrate concentration was 4 % (w/v), maximizing the β -CD production (1.32 g/L) in a flow rate of 3 mL/min. In addition, the biocatalyst had good operational stability at 60 °C, maintaining 61% of its initial activity after 100 cycles of batch and 100% after 100 h of continuous use. These results suggest the possibility of using this immobilized biocatalyst in continuous production of CDs.

*KEYWORDS: Cyclodextrin glycosyltransferase, Enzyme immobilization, Packed bed reactor, Chitosan

1 Introduction

Cyclodextrin glycosyltransferases (CGTases) (EC 2.4.1.19) is one of the most important groups of amylolytic enzymes. These enzymes catalyze the conversion of starch to cyclodextrins (CDs), which are cyclic oligosaccharides composed of α - $(1\rightarrow4)$ -glycosidic-linked residues. The best-characterized forms are α -, β - and γ -CD consisting of six (cyclomaltohexaose), seven (cyclomaltoheptaose) and eight (cyclomaltooctaose) D-glucose units, respectively (Goh, Mahadi, Hassan, Rahman & Ilias, 2009). The conformation of CDs is formed by a conical cylinder with a relatively hydrophobic internal cavity and a hydrophilic outer surface (Szejtli, 1982). Therefore, CDs are soluble in water and capable of forming inclusion complexes with a variety of molecules, that are placed in their hydrophobic cavity (Nakai, Yamamoto, Terada & Watanabe, 1987). This feature makes CDs attractive for various applications in diverse fields such as food, chemical, pharmaceutical and textile industries as well as in biotechnology, agriculture and environmental protection (Astray, Mejuto, Morales, Rial-Otero & Simal-Gandara, 2010; Biber, Antranikian & Heinzle, 2002; Stella & He, 2008).

Cyclodextrins have been recommended for applications in food processing and as food additives with a variety of aims, mainly as stabilizers of components that are sensitive to oxygen and heat- or light-induced degradation and solubilize food colorings and vitamins (Astray, Mejuto, Morales, Rial-Otero & Simal-Gandara, 2010; Szente & Szejtli, 2004). Immobilization of CGTase has been proposed as a way for reducing CDs production cost, and makes feasible its application in food industries (Sobral, Rodrigues, Oliveira, Olivo, de Moraes & Zanin, 2003).

Immobilization has been seen as a very powerful tool to improve enzyme properties allowing the use of this relatively expensive catalyst in the industry (Garcia-Galan, Berenguer-Murcia, Fernandez-Lafuente & Rodrigues, 2011). There are several benefits of using immobilized enzymes, among them, the increase of stability, activity, specificity and selectivity, the decrease of inhibition by reaction products, the improved operation control, and the easy end of reaction and enzyme recover (Rodrigues, Ortiz, Berenguer-Murcia, Torres & Fernandez-Lafuente, 2013). Moreover, heterogeneous biocatalysts can be used in a variety of reactors, and its choice will depend on the immobilization protocol and support (Garcia-Galan, Berenguer-Murcia, Fernandez-Lafuente & Rodrigues, 2011). In the literature, there are few studies dealing the continuous production of cyclodextrins, with emphasis on the use of packed bed (Lee, Lee & Shin, 1991) and fluidized-bed (Cao, 2005; Tardioli, Zanin & de Moraes, 2000) reactors.

Chitin is a polymer widely abundant in nature and its use is a good example of recycling of byproducts of the food industry for value-added products (Muzzarelli, 1996). Chitosan, the principal derivative of chitin, has desirable characteristics for enzymes immobilization (Muzzarelli, 1980). Chitosan has reactive amino and hydroxyl groups in its linear polyglucosamine chains, available to direct reactions with enzymes or to chemical modifications, with glutaraldehyde for example, when the native amino groups from chitosan surface are bound to its aldehyde groups, that after will bind to amino groups from enzyme (Chiou & Wu, 2004; Juang, Wu & Tseng, 2002). Additionally, it exhibits mechanical stability, rigidity, nontoxicity and biocompatibility, important features for applications in food industry (Krajewska, 2004). Crucially, as biodegradable polymers chitin/chitosan materials are eco-

friendly, safe for humans and the natural environment (Goycoolea, Argüelles-Monal, Peniche & Higuera-Ciapara, 2000; Muzzarelli, 2012).

Packed bed reactors (PBR) are the most commonly system employed for continuous production with heterogeneous catalysis, which can minimize labor and overhead costs for industrial applications. Compared to other immobilized enzyme reactors, such as stirred reactors, PBR is suitable for long-term and industrial scale production without mechanical shear stress; it is more cost effective than the batch operation because possesses advantages of continuity, easy operation, high stability and lower by-product formation (Chang, Shaw, Yang & Shieh, 2007; Delattre, Michaud & Vijayalakshmi, 2008; Halim, Kamaruddin & Fernando, 2009; Tavernier, Michaud, Wadouachi & Petit, 2009).

Therefore, the main objective of this study was the continuous production of β -CD from soluble starch. For this, a CGTase from *Thermoanaerobacter* sp. (Toruzyme®), was covalently immobilized on chitosan spheres and used in a packed bed reactor, at different operational conditions in order to achieve maximum production.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Commercial CGTase from *Thermoanaerobacter* sp. (Toruzyme® 3.0 L) was kindly provided by Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark). Chitosan (from shrimp shells, $\geq 75\%$ deacetylated), phenolphthalein and β -CD were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). The soluble starch and glutaraldehyde were purchased from Nuclear. All chemical products used were of analytical grade.

2.2 Methods

2.2.1 Preparation and immobilization of CGTase

The solid support was prepared by precipitation using the neutralization method (Chiu, Chung, Giridhar & Wu, 2004) and activated with glutaraldehyde (5% v/v) as previously described (Klein et al., 2012). In order to test the support loading, 10 mL of enzyme solution with different protein concentrations, in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.0) was added to 100 chitosan spheres (representing 20, 60, 120 and 200 mg/g of dry support), and incubated, overnight, at room temperature under gentle shaking in an orbital shaker (200 rpm). The immobilized biocatalyst obtained was then sequentially washed with phosphate buffer (0.1 M, pH 6.0), NaCl (1 M) and ethylene glycol (0.2 M) in order to remove the unbound proteins.

Immobilizations yield and efficiency were calculated as described by Sheldon and van Pelt (2013), as follows in Eqs. 1 and 2, respectively:

$$\text{Immobilization yield (\%)} = 100 \times \left(\frac{\text{immobilized activity}}{\text{starting activity}} \right) \quad (1)$$

$$\text{Immobilization efficiency (\%)} = 100 \times \left(\frac{\text{observed activity}}{\text{immobilized activity}} \right) \quad (2)$$

2.2.2 Activity of free and immobilized CGTase and protein quantification

The CGTase activity was assayed following the synthesis of β -CD by the dye-extinction colorimetric method using phenolphthalein, developed by Vikmon (1981) and modified by Kaneko et al. (1987) and Pinto et al. (2007). Reaction mixture, containing 0.65 mL of soluble starch solution (4% w/v) in 0.1 M sodium phosphate

buffer (pH 6.0) and 0.35 mL of properly diluted free enzyme was incubated at 60 °C for 15 min. The reaction was stopped by addition of 4 mL of 0.04 mM phenolphthalein dissolved in 125 mM Na₂CO₃ solution. The absorbance was measured at 550 nm in spectrophotometer (model Ultrospec 3100 pro-UV/Visible, Amersham Pharmacia biotech).

The activity of immobilized preparation was measured by the same method, incubating the spheres with 1.05 mL of phosphate buffer (0.1 M, pH 6.0) and 1.95 mL of starch solution (4% w/v) of soluble starch in the same buffer. Also, the quantification of β -CD in the reactor product was made by adding phenolphthalein solution (2 mL) in 0.5 mL of the samples. A standard curve in the range between 40 and 400 μ g/mL was prepared using commercial β -CD. One unit of cyclodextrin glycosyltransferase activity (U) was defined as the amount of enzyme that produces 1 μ g of β -CD per minute at 60 °C and pH 6.0 with 4% of soluble starch as a substrate solution. Protein content (mg/mL) of the solutions was determined by the Lowry assay (Lowry, Rosebrough, Farr & Randall, 1951).

2.2.3 Activity of CGTase at different temperature and pH

The effect of temperature on the activity of free and immobilized enzyme was measured at different values (50-95 °C) at pH 6.0. The relative activity was calculated as the ratio between the activity at each temperature and the maximum obtained.

The effect of pH was investigated using different buffers at various pH values (glycine-HCl pH 3.0, sodium acetate pH 4.0 and 5.0, sodium phosphate pH 6.0 and 7.0, tris-HCl pH 8.0, carbonate-bicarbonate pH 9.0 and 10.0) and the temperature

fixed at 60 °C, for activity reaction. The relative activity was calculated as the ratio between the activity at each pH and the maximum obtained. A standard curve was prepared with commercial β -CD for each pH value tested.

2.2.4 Operational stability of immobilized CGTase

To investigate the stability of the immobilized enzyme and possibility of reuse, repeated batch reactions were carried out at 60 °C, with 4% of substrate solution, as described above. Between each batch reaction, the support with immobilized enzyme was washed three times with activity buffer to remove possible residues of substrate or product. The reaction cycle time was fixed at 15 min, in order to avoid product inhibition and maintain substrate saturation conditions and, thereafter, repeated with fresh solution of substrate. The activity measured in the first cycle was considered as 100% for calculation of the remaining percent activity after each one.

2.2.5 System setup of the reactor and continuous production of β -CD

The continuous production of β -CD was made in packed bed reactor composed of a water-jacketed glass column (12.0 cm \times 1.2 cm), with temperature control (at 60 °C) and adjustable cylindrical plugs at both ends. In order to retain the enzyme immobilized into the reactor and to ensure the even distribution of reaction mixture across the bed, a glass wool (16 mg, Merck) was placed at the ends. The column was packed with 724 spheres of immobilized enzyme, corresponding to 7.24 mg of protein or 5579.79 U in the reactor. The substrate solution was fed through the column bottom using a peristaltic pump and, to avoid substrate precipitation, it was

maintained in water bath at 60 °C. Samples of 5 mL were collected in triplicate at the end of the reactor, after reaching the steady state, and analyzed for β -CD production.

To observe the effect of substrate concentration on the β -CD production, the soluble starch solution, with concentrations varying from 0.2% to 10% (w/v) in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.0), were pumped into the column in a continuous flow rate of 3 mL/min. Thereafter, to determine the effect of the flow rate, the substrate solution with 4% of soluble starch was pumped into the column in different flow rates (0.4 up to 5 mL/min).

Continuous production of β -CD was evaluated by circulating the substrate solution (0.2% w/v of starch) with a flow rate of 3 mL/min, at 60 °C, during 50 h.

3 Results and discussion

3.1 Effect of protein loading on the immobilization of enzyme

The results of immobilization yield and efficiency are presented in Table 1. The highest immobilization yield and efficiency were obtained at protein concentration of 20 mg/g of dry support. Increasing the protein concentration in the immobilization solution, both yield and efficiency immobilization decreased. The highest immobilization efficiency was 6.1% at that protein concentration, while for higher protein concentrations the immobilization efficiency was below 3%.

Table 1: Effect of the protein load in the enzyme immobilization.

Protein concentration applied (mg/g dry support)	Enzyme concentration applied (U/g dry support)	Immobilization yield (%)	Immobilization efficiency (%)
20	252.68	95.8 ± 2.24	6.1 ± 0.25
60	758.05	89.7 ± 4.51	2.6 ± 0.98
120	1 516.11	94.2 ± 2.72	1.4 ± 0.16
200	2 526.85	47.6 ± 2.15	1.7 ± 0.32

The analysis for immobilization yield and efficiency were performed in triplicate.

The low recovery of the enzyme activity can be due to steric hindrance caused by the process of immobilization that occurs between glutaraldehyde and the terminal amino of the enzyme. Thereby, the immobilization can cause diffusional restrictions of the substrate to the active site of the protein (mainly if a macromolecular substrate, as starch, is used, decreasing the activity of the enzyme after immobilization) (Amud, Presa da Silva, Tardioli, Faria Soares, Moraes & Zanin, 2008; Tardioli, Zanin & de Moraes, 2006). Results of the same magnitude, as the obtained in this work, were also found by other authors for covalent immobilization of CGTase (Martín, Plou, Alcalde & Ballesteros, 2003; Prousoontorn & Pantatan, 2007; Sobral, Rodrigues, De Oliveira, De Moraes & Zanin, 2002).

A way to solve the problem of low efficiency could be changing the immobilization conditions as contact time, pH, buffer and temperature, or even performing the immobilization of the enzyme in the presence of substrate (Cao, 2005). The substrates can protect the enzyme active site against harmful conformational changes or formation of new bonds that denature the enzyme active site during the process. Other possible solution could be the use of larger spacer arm

(Garcia-Galan, Berenguer-Murcia, Fernandez-Lafuente & Rodrigues, 2011; Matte, Nunes, Benvenuti, Schöffner, Ayub & Hertz, 2012; Tardioli, Zanin & de Moraes, 2006).

For the next experiments, the immobilization was performed with a protein load of 20 mg/g of dry support.

3.2 Effects of temperature and pH on CGTase activity

Properties of the enzyme may suffer alterations due to the conformational changes provided by the support after immobilization. Thus, the enzymatic properties of the immobilized CGTase were compared with those of soluble enzyme. The influence of temperature and pH in their relative activities was assayed in the range of 50-95 °C and pH values of 3-10 (Fig. 1). Both biocatalysts showed an optimum pH of 5.0. The free enzyme showed maximum activity between 70 °C and 95 °C, and the immobilized enzyme between 75 °C and 90 °C. These results showed the protein structure after immobilization was similar to the free enzyme. A similar behavior regarding to optimum temperature and pH of immobilized CGTase, without major changes, was found by Martín et al. (2003) in a covalent binding to Eupergit C.

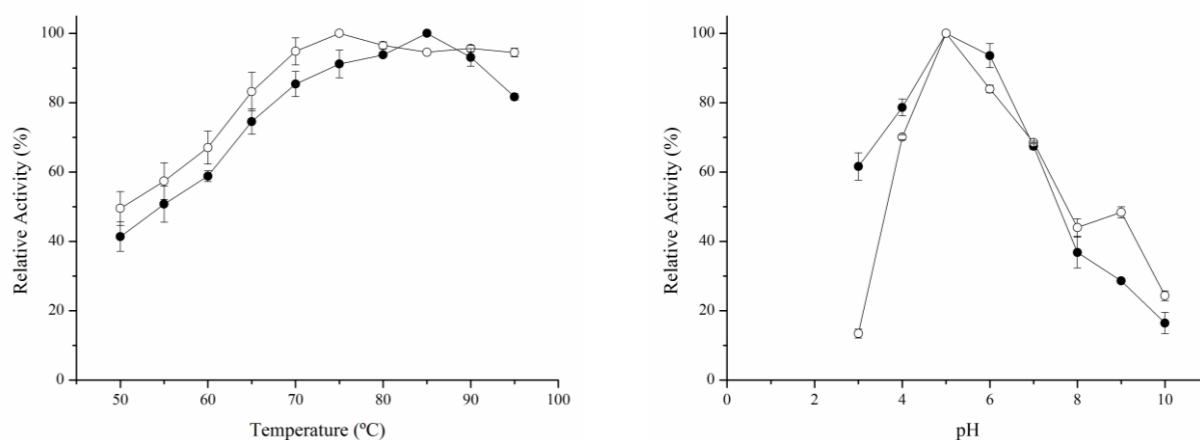


Fig. 1. Effect of the temperature (a) and pH (b) on the activity of free (○) and immobilized (●) CGTase. (a) Activities were assayed at different temperatures using sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.0); 100% is equivalent to 1302 U/mL and 15796 U/g for free and immobilized CGTase, respectively. (b) Activities were assayed at 60 °C and different pH values; 100% is equivalent to 978 U/mL and 9933 U/g for free and immobilized CGTase, respectively.

The synthesis of CDs at high temperatures improves the starch solubility and decreases the viscosity, avoiding the use of other enzymes, such as amylases, for pre-hydrolysis and solubilization of starch (Sakinah, Ismail, Hassan, Zularisam & Illias, 2009). Consequently, in the gelatinization temperature, the enzymatic rate of conversion was improved. This peculiarity of thermostable enzymes is ideal for immobilization processes and subsequent use in batch or continuous process, since they present a good operational stability in high temperatures (Biber, Antranikian & Heinzle, 2002).

3.3 Operational stability of immobilized CGTase

The operational stability of immobilized CGTase was evaluated under consecutive batch reactions, performing washes between each batch in order to

remove remaining substrates and products. The results (Fig. 2) show that 61% of the original activity was retained after one hundred cycles of 15 min. A significant decrease in the enzyme activity was observed only after 60 cycles, with 68% of remaining activity. The great operational stability can be attributed to a protection afforded by this immobilized system and suggested its applicability for continuous production of cyclodextrins.

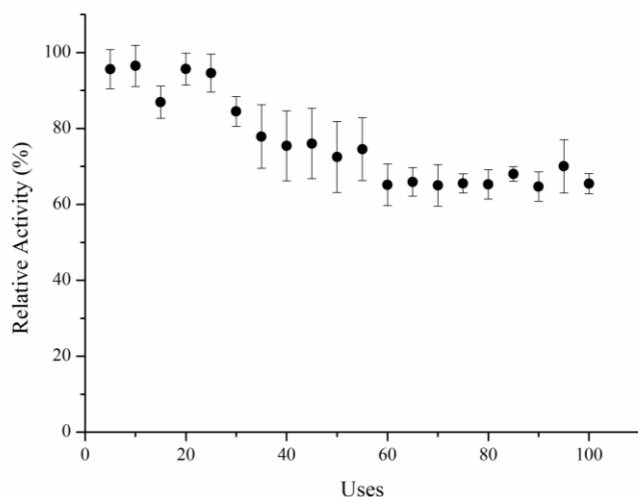


Fig. 2. Operational stability of the CGTase immobilized. Activities were assayed at 60 °C and pH 6.0 (sodium phosphate buffer 0.1 M) with 4% (w/v) of substrate in consecutives batch reactions of 15 min. Analyses were carried out in triplicate. 100% is equivalent to 10001 U/g.

In a previous work (Matte, Nunes, Benvenuti, Schöffer, Ayub & Hertz, 2012), the same CGTase was immobilized on silica microspheres and retained 60% of its initial activity after 15 cycles of 15 min. The *Paenibacillus macerans* CGTase immobilized on PVC showed a good yield of CD (45% substrate conversion using α -CD) with more than 85% of the initial catalytic activity after 14 cycles (Abdel-Naby, 1999).

3.4 *Effect of substrate concentration and flow rate on β -cyclodextrin production*

The continuous production of β -cyclodextrin was evaluated in a PBR containing 5579.79 U or 7.24 mg of CGTase immobilized on chitosan spheres. This experiment was carried out at 60 °C and pH 6.0 with different starch concentrations (Fig. 3) and flow rates (Fig. 4). The amount of produced β -CD in the reactor was examined as a function of substrate concentration from 0.2 up to 10% (w/v) of soluble starch, fixing the flow rate at 3 mL/min for all experiments. At low substrate concentration (Fig. 3), the conversion rate for this particular residence time was maximal (7.9%). The increase of the starch concentration until 4% (w/v) led to a higher production rate, when excess substrate caused a decrease in conversion rate. Although at a slower rate, the production increased until a limit that the high substrate concentration caused its decrease, either by increasing the viscosity, which in turn hinders access of substrate to the enzyme, or by the fact that at high concentrations, the starch acts as an inhibitor of the reaction. The maximum β -CD content was 1.32 g β -CD/L with 4% of substrate.

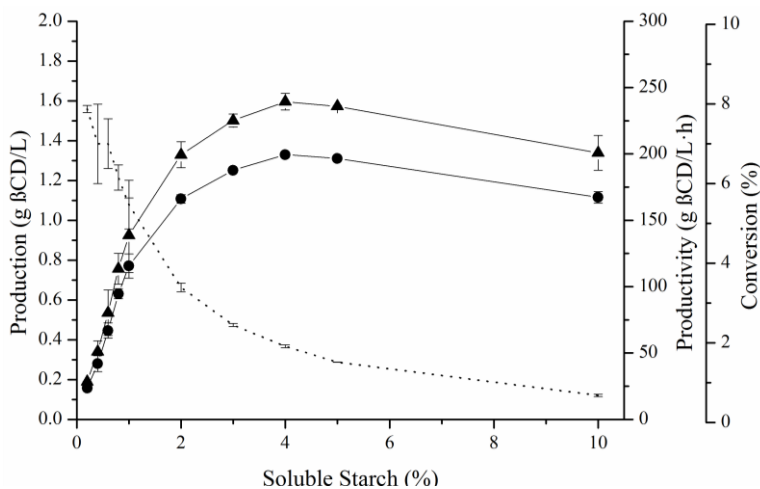


Fig. 3. Effect of the substrate concentration on the production (●), productivity (▲) and conversion (dotted line). Conditions: 7.24 mg of immobilized CGTase (5579.79 U), 60 °C, pH 6.0 (sodium phosphate buffer 0.1 M), flow rate of 3 mL/min corresponding to a residence time of 30 seconds.

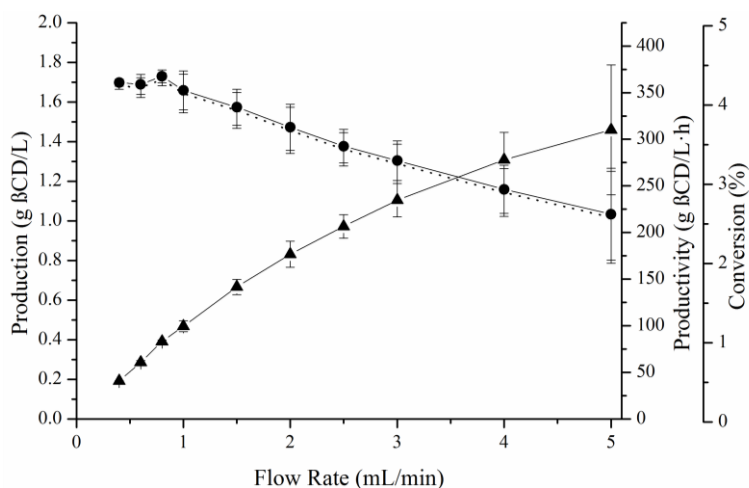


Fig. 4. Effect of the substrate flow rate on the production (●), productivity (▲) and conversion (dotted line). Conditions: 7.24 mg of immobilized CGTase (5579.79 U), 60 °C, pH 6.0 (sodium phosphate buffer 0.1 M) and substrate concentration of 4 % (w/v).

The effects of the flow rate on the β -CD production were also investigated (Fig. 4). For this study, the substrate concentration was fixed at 4% (w/v) of soluble starch. At low flow rates (0.4-1 mL/min), the conversion rate was maximum,

producing 1.697 g β -CD/L with a conversion rate of 4.3%. The increase in flow rate led to a residence time in the reactor too short and the synthesis of β -CD reduced around 30%. However, the productivity rose until it reached the maximum of 310 g β -CD/L h at 5 mL/min.

Comparing Figs. 3 and 4, it can be seen that higher amounts of β -CD were formed at the intermediate concentration of substrate and low flow rates. Tardioli and co-workers (2000), using a fluidized reactor with a load of 417 mg of immobilized CGTase (approximately 58 times higher than in this study) and maltodextrin as a substrate, obtained 13.2% of conversion in β -CD, producing 12.76 g/L of β -CD with 13 min of residence time. In this work, using 4% soluble starch as substrate, it was reached, at a residence time of 1 min, values of 3.8% of conversion to β -CD, and production of 1.51 g β -CD/L.

The importance of substrate concentration and residence time was studied by Tavernier et al. (2009) in continuous production of oligoglucuronans by immobilized glucuronan lyase, when it was possible to control the degree of polymerization of oligoglucuronans by varying these parameters.

3.5 Continuous production of β -cyclodextrin and operational stability of the reactor

To evaluate the operational stability of the PBR, it was continuously used with the same amount of immobilized CGTase. The operational conditions were selected based on the previous results; flow rate was chosen to be an intermediate value between production and productivity (3 mL/min), and the substrate concentration (0.2% w/v) on the higher conversion rate (7.87%). The continuous operation was

carried out during 52 h. The production of β -CD decreased after 49 hours, reaching 78% (± 7.03) of the initial activity. This occurred due to the super packing of spheres, causing a reduction of 45% of bed height, and the consequent decrease in the residence time of the substrate from 1.22 min to 0.14 min. However, after the spheres being washed and re-packed to the column, at the same initial conditions, they recovered 100% of their initial activity for at least more 50 h, i.e., although the super packing of chitosan spheres, it was possible to recover the initial activity performing a buffer wash at room temperature.

4 Conclusions

In this work, cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from *Thermoanaerobacter* sp. was immobilized on glutaraldehyde-activated chitosan spheres, a polymer known for its low propensity for microbial contamination. The immobilized enzyme exhibits no significant changes in their characteristics (optimum temperature and pH) and has a promising operational stability for the continuous production of CDs.

In the packed bed reactor it was possible to achieve a productivity of the 239 g de β -CD/L h at a substrate concentration of 4%. This ratio can be increased to above 310 g de β -CD/L h by increasing the flow rate from 3 to 5 mL/min. Moreover, the biocatalyst presented a very high operational stability. It was possible to use the immobilized CGTase for 100 batches retaining around 60% of its initial activity, or in continuous process, to use for 100 h, performing a buffer wash after 50 h, maintaining the same production rate. These results demonstrated that this system

may be effective for the scale-up of production of CDs in a packed bed reactor, making possible to control it by changing flow rate and substrate concentration.

Acknowledgment

The authors thank, CNPq, Fapergs, Novozymes A/S for the gift of the Toruzyme.

References

- Abdel-Naby, M. A. (1999). Immobilization of *Paenibacillus macerans* NRRL B-3186 cyclodextrin glucosyltransferase and properties of the immobilized enzyme. *Process Biochemistry*, *34*, 399–405.
- Amud, A. E., Presa da Silva, G. R., Tardioli, P. W., Faria Soares, C. M., Moraes, F. F., & Zanin, G. M. (2008). Methods and supports for immobilization and stabilization of cyclomalto-dextrin glucanotransferase from *Thermoanaerobacter*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *146*(1-3), 189-201.
- Astray, G., Mejuto, J. C., Morales, J., Rial-Otero, R., & Simal-Gandara, J. (2010). Factors controlling flavors binding constants to cyclodextrins and their applications in foods. *Food Research International*, *43*(4), 1212-1218.
- Biwer, A., Antranikian, G., & Heinzle, E. (2002). Enzymatic production of cyclodextrins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *59*(6), 609-617.
- Cao, L. (2005). Immobilised enzymes: science or art? *Current Opinion in Chemical Biology*, *9*(2), 217–226.
- Chang, S.-W., Shaw, J.-F., Yang, C.-K., & Shieh, C.-J. (2007). Optimal continuous biosynthesis of hexyl laurate by a packed bed bioreactor. *Process Biochemistry*, *42*(9), 1362–1366.
- Chiou, S.-H., & Wu, W.-T. (2004). Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*, *25*(2), 197-204.
- Chiu, S. H., Chung, T. W., Giridhar, R., & Wu, W. T. (2004). Immobilization of beta-cyclodextrin in chitosan beads for separation of cholesterol from egg yolk. *Food Research International*, *37*(3), 217-223.
- Delattre, C., Michaud, P., & Vijayalakshmi, M. A. (2008). New monolithic enzymatic micro-reactor for the fast production and purification of oligogalacturonides. *Journal of Chromatography B*, *861*(2), 203-208.
- Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, A., Fernandez-Lafuente, R., & Rodrigues, R. C. (2011). Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, *353*(16), 2885-2904.
- Goh, K. M., Mahadi, N. M., Hassan, O., Rahman, R., & Illias, R. M. (2009). A predominant beta-CGTase G1 engineered to elucidate the relationship between protein structure and product specificity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *57*(1-4), 270-277.
- Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Peniche, C., & Higuera-Ciapara, I. (2000). Chitin and Chitosan. *Novel Macromolecules in Food Systems*, 265-308.
- Halim, S. F. A., Kamaruddin, A. H., & Fernando, W. J. N. (2009). Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. *Bioresource Technology*, *100*(2), 710–716.
- Juang, R. S., Wu, F. C., & Tseng, R. L. (2002). Use of chemically modified chitosan beads for sorption and enzyme immobilization. *Advances in Environmental Research*, *6*(2), 171-177.
- Kaneko, T., Kato, T., Nakamura, N., & Horikoshi, K. (1987). Spectrophotometric determination of cyclization activity of β -cyclodextrin-forming cyclomalto-dextrin glucanotransferase. *Journal of the Japanese Society of Starch Science*, *34*(1), 45-48.

- Klein, M. P., Nunes, M. R., Rodrigues, R. C., Benvenuti, E. V., Costa, T. M. H., Hertz, P. F., & Ninow, J. L. (2012). Effect of the support size on the properties of beta-galactosidase immobilized on chitosan: Advantages and disadvantages of macro and nanoparticles. *Biomacromolecules*, 13(8), 2456-2464.
- Krajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2-3), 126-139.
- Lee, Y.-H., Lee, S.-H., & Shin, H.-D. (1991). Performance of column type bioreactor packed with immobilized cyclodextrin glucanotransferase for cyclodextrin production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1(1), 63-69.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Martín, M. T., Plou, F. J., Alcalde, M., & Ballesteros, A. (2003). Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21(4-6), 299-308.
- Matte, C. R., Nunes, M. R., Benvenuti, E. V., Schöffner, J. d. N., Ayub, M. A. Z., & Hertz, P. F. (2012). Characterization of cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on silica microspheres via aminopropyltrimethoxysilane as a "spacer arm". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 78, 51-56.
- Muzzarelli, R. A. A. (1980). Immobilization of enzymes on chitin and chitosan. *Enzyme and Microbial Technology*, 2(3), 177-184.
- Muzzarelli, R. A. A. (1996). Chitin. In J. C. Salamone (Ed.). *The Polymeric Materials Encyclopedia* (pp. 295-300). Boca Raton FL, USA: CRC Press, Inc.
- Muzzarelli, R. A. A. (2012). Nanochitins and nanochitosans, paving the way to eco-friendly and energy-saving exploitation of marine resources. In K. M. Jaszewski & M. Moller (Eds.). *Polymer Science: A comprehensive reference* (Vol. 10) (pp. 153-164). Amsterdam: Elsevier BV.
- Nakai, Y., Yamamoto, K., Terada, K., & Watanabe, D. (1987). New methods for preparing cyclodextrin inclusion-compounds. 1. Heating in a sealed container. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 35(11), 4609-4615.
- Pinto, F. S. T., Flores, S. H., Zachia Ayub, M. A., & Hertz, P. F. (2007). Production of cyclodextrin glycosyltransferase by alkaliphilic *Bacillus circulans* in submerged and solid-state cultivation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 30(5), 377-382.
- Prousoontorn, M. H., & Pantatan, S. (2007). Production of 2-O-alpha-glucopyranosyl β -ascorbic acid from ascorbic acid and beta-cyclodextrin using immobilized cyclodextrin glycosyltransferase. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57(1-4), 39-46.
- Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Torres, R., & Fernandez-Lafuente, R. (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, 42, 6290-6307.
- Sakinah, A. M. M., Ismail, A. F., Hassan, O., Zularisam, A. W., & Illias, R. M. (2009). Influence of starch pretreatment on yield of cyclodextrins and performance of ultrafiltration membranes. *Desalination*, 239(1-3), 317-333.
- Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42, 6223-6235.
- Sobral, K. A., Rodrigues, R. O., De Oliveira, R., De Moraes, F., & Zanin, G. (2002). Immobilization of Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from *Bacillus firmus* in

- commercial chitosan. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 44(1-4), 383-386.
- Sobral, K. A., Rodrigues, R. O., Oliveira, R. D., Olivo, J. E., de Moraes, F. F., & Zanin, G. M. (2003). Evaluation of supports and methods for immobilization of enzyme cyclodextringlycosyltransferase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105, 809-819.
- Stella, V. J., & He, Q. (2008). Cyclodextrins. *Toxicologic Pathology*, 36(1), 30-42.
- Szejtli, J. (1982). Cyclodextrins and their inclusion complexes. *Starch*, 34, 395-401.
- Szente, L., & Szejtli, J. (2004). Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 15 (3-4), 137-142.
- Tardioli, P. W., Zanin, G. M., & de Moraes, F. F. (2000). Production of Cyclodextrins in a Fluidized-Bed Reactor Using Cyclodextrin-Glycosyl-Transferase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86, 1003-1019.
- Tardioli, P. W., Zanin, G. M., & de Moraes, F. F. (2006). Characterization of Thermoanaerobacter cyclomaltodextrin glucanotransferase immobilized on glyoxyl-agarose. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(6), 1270-1278.
- Tavernier, M. L., Michaud, P., Wadouachi, A., & Petit, E. (2009). Continuous production of oligoglucuronans by immobilized glucuronan lyase. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(1), 48-52.
- Vikmon, M. (1981). Rapid and simple spectrophotometric method for determination of microamounts of cyclodextrins. In J. Szejtli (Ed.). *Proceedings of the first international symposium on cyclodextrins* (pp. 69–74). Dordrecht, Netherlands: D. Reidel Publishing Company.

3 DISCUSSÃO GERAL

Além dos resultados apresentados no item 2.1 e nos apêndices G e H, foram realizados, durante o período do mestrado, experimentos de produção e purificação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase a partir do microrganismo *Bacillus circulans* ATCC 21783. Os resultados alcançados foram apresentados em forma de pôster (SCHÖFFER *et al.*, 2012) (Apêndice A).

A produção da enzima se deu através de cultivo submerso em meio contendo amido solúvel como fonte de carbono e indutor para expressão da enzima, mantendo-se as condições já testadas anteriormente pelo grupo (PINTO *et al.*, 2007). Para a purificação, diversas técnicas foram testadas e combinadas para obter um protocolo que alcance bom rendimento e alto fator de purificação (fluxograma apresentado no apêndice B). Após o tempo de cultivo, seguiu-se com os seguintes passos para purificação: clarificação, através de centrifugação para retirada do material celular; precipitação por afinidade da enzima por seu substrato (adsorção em amido insolúvel); precipitação fracionada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fazendo-se uso as diferentes solubilidades das proteínas presentes na amostra; diálise para retirada do sal, e ultrafiltração em membrana de 30 kDa, a fim de separar pequenas proteínas e peptídeos ainda restantes. Também foram realizadas técnicas cromatográficas de interações hidrofóbicas e de troca iônica, porém, o baixo fator de purificação alcançado nestas etapas, inviabiliza sua utilização. O processo de purificação foi acompanhado através do monitoramento da variação na concentração de proteína, da atividade específica e por eletroforese SDS-PAGE (Apêndice C).

De acordo com os resultados obtidos (apresentados em forma de tabela no apêndice D), a enzima presente no extrato bruto foi purificada 9 vezes na etapa de adsorção em amido insolúvel, com recuperação de 92 % da sua atividade inicial. Após dessorção da enzima em tampão adequado, esta foi concentrada por precipitação fracionada com sulfato de amônio (40 % e 70 %), e em seguida o material foi dialisado no mesmo tampão. O passo seguinte foi a concentração por ultrafiltração utilizando uma membrana de 30 kDa (Millipore, MA, EUA). A atividade específica da CGTase purificada aumentou de cerca de 300 U/mg no extrato bruto para 21166 U/mg. A análise por SDS-PAGE comprovou a existência de uma proteína com peso molecular de aproximadamente 70 kDa, sendo este, característico de CGTases deste microrganismo (BRENDA). Os resultados de cada passo de purificação, acompanhados no

gel de eletroforese (apêndice C), mostram que a CGTase foi purificada e concentrada com sucesso.

As pesquisas publicadas tem explorado diversas técnicas para a purificação de CGTases de diferentes fontes, com rendimentos e fatores de purificação que variam de acordo com a quantidade de etapas realizadas. No geral, para adsorção em amido, realizada diretamente no extrato bruto, rendimentos em torno de 60 a 80 % são alcançados, com fatores de purificação de 5 e 17 vezes (KITAYSKA *et al.*, 2011). Já na precipitação com sulfato de amônio, alguns pesquisadores obtiveram purificação em torno de 5 ou 20 vezes, com rendimentos de 40 e 25 %, respectivamente (SIAN *et al.*, 2005; AVCI *et al.*, 2012). A técnica de ultrafiltração foi utilizada diretamente no extrato bruto, alcançando purificação de aproximadamente 9 % e rendimento de 91 % (SAVERGAVE *et al.*, 2008). Torna-se evidente que, entre diversas técnicas disponíveis, a melhor combinação delas é encontrada de acordo com as características próprias de cada solução e que podem variar para a mesma enzima, de acordo com sua fonte. E, muitas vezes, é necessário escolher entre um bom rendimento e um alto fator de purificação. Desta forma, o protocolo final, foi determinado considerando os dois fatores, onde foram alcançados valores de 70 % de purificação e 11 % de rendimento.

Todavia, neste trabalho, o objetivo principal foi a imobilização da enzima, para isso utilizou-se uma ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) de *Thermoanaerobacter* sp, comercializada em solução pela empresa Novozymes S/A com o nome de Toruzyme®, para posterior produção de ciclodextrinas, produtos de alto interesse em diversas áreas industriais. Esta enzima possui alta estabilidade térmica, fato comprovado em um trabalho anterior (MATTE, NUNES *et al.*, 2012), permitindo sua utilização em temperaturas elevadas (Apêndice G), característica desejável para uso com substratos amiláceos. Além disso, o uso de temperaturas elevadas e de suportes com propriedades antimicrobianas como a quitosana (DUTTA *et al.*, 2009) reduz o risco de crescimento microbiano, um dos problemas associados à reutilização de enzimas imobilizadas. Como suporte para fixação da enzima foram utilizadas esferas de quitosana, preparadas por precipitação, conforme o método de neutralização (CHIU *et al.*, 2004) em que a quitosana em pó é dissolvida em solução de ácido acético a 2 % e gotejada em solução de hidróxido de sódio 1 N contendo 26 % (v/v) de etanol. Após a formação das esferas e lavagem para neutralização, procedeu-se a ativação do suporte, incubando-as com uma solução de glutaraldeído 2,5 % por um período de 3 h com leve agitação. Após remoção do excesso de glutaraldeído com sucessivas lavagens com água destilada, adicionou-se a solução enzimática na concentração desejada deixando-a

“overnight” sob agitação. A fim de estimar o rendimento e a eficiência do processo, análises de atividade da enzima foram realizadas nas soluções antes e depois da imobilização, inclusive nas lavagens posteriores com tampão, solução de NaCl e etilenoglicol.

A capacidade de carregamento do suporte em relação à quantidade de proteína foi testada utilizando-se diferentes concentrações da enzima nas soluções de imobilização. Conforme apresentado no item 2.1, os resultados obtidos para o rendimento foram excelentes, chegando a quase 100 % de enzima imobilizada ao suporte. Entretanto as eficiências obtidas, parâmetro que avalia a atividade da enzima após a imobilização, foram baixas. É sabido que, o processo de imobilização pode levar à perda de atividade enzimática e, além disso, pode causar distorções ou impedimento estérico, bloqueando o sítio ativo da enzima. Outra possível causa é a dificuldade encontrada pelo substrato, de alto peso molecular, para acessar o sítio ativo da enzima imobilizada. Entretanto, eficiência baixa após imobilização de CGTases não é incomum, sendo reportada por outros autores (TARDIOLI *et al.*, 2000; AMUD *et al.*, 2008). A carga referente à melhor eficiência obtida (20 mg/g suporte seco) foi escolhida para ensaios posteriores de caracterização da enzima imobilizada e de utilização contínua. O comportamento frente a variação de temperatura e pH foi determinado, tanto para a enzima livre quanto para a imobilizada, a fim de observar o efeito da imobilização sobre estes parâmetros. Os resultados obtidos, apresentados no artigo 1, mostram que, comparando a enzima antes e depois da imobilização, houve pouca alteração em relação a estes parâmetros. O pH ótimo para ambas foi de 5,0 e a temperatura ótima entre 70 e 95 °C. Resultados similares foram encontrados após imobilização covalente da CGTase de *Thermoanaerobacter* sp. em Eupergit C, sem nenhuma variação em temperatura e pH ótimos (80 °C e pH de 5,5) (MARTÍN *et al.*, 2003).

O principal objetivo da técnica de imobilização é conferir estabilidade ao biocatalisador, possibilitando reutilizá-lo. Desta forma, a estabilidade operacional da enzima foi testada em reações consecutivas e os resultados encontrados foram excelentes. Uma diminuição significativa na atividade da enzima foi observada apenas após 60 ciclos de 15 min, com 68 % da atividade inicial, e após 100 usos, a enzima ainda apresentava 61 %. Em trabalho anterior (apêndice G), a CGTase imobilizada em microesferas de sílica manteve 60 % de sua atividade ao final de 15 ciclos também de 15 min (MATTE, NUNES *et al.*, 2012). Outros pesquisadores avaliaram a estabilidade operacional da CGTase de *P. macerans* imobilizada em PVC, a qual manteve mais de 85 % da atividade inicial ao fim de 14 ciclos de reação (ABDEL-NABY, 1999). A alta estabilidade operacional pode ser atribuída a uma

proteção proporcionada por este sistema imobilizado e indica a possibilidade de o biocatalisador ser utilizado em processos contínuos.

Desta forma, com a finalidade de testar o sistema imobilizado para produção contínua de ciclodextrinas, foi desenvolvido um reator enzimático constituído de um cilindro de tamanho ajustável e parede dupla, possibilitando circulação externa de água para manter a temperatura interna de reação. A solução de substrato foi mantida em banho-maria, evitando precipitação, e bombeada com bomba peristáltica para o interior do reator em fluxo ascendente, e o produto coletado ao final. Conforme apresentado no artigo, 724 esferas foram adicionadas neste reator formando um leito fixo (esquema e foto presentes nos apêndices E e F), reunindo assim, aproximadamente 7 mg de CGTase imobilizada, que representa 35000 U. A produção de β -ciclodextrina foi avaliada em relação à concentração de substrato e ao tempo de contato com o biocatalisador. Em relação às diferentes concentrações de substrato, verificou-se que quantidades mais elevadas de β -CD foram formadas em concentrações intermediárias, isso por que, em concentrações baixas, a taxa de conversão para aquele tempo de residência é máxima. Aumentando sua concentração, o aumento da taxa de produção é linear até um limite em que o substrato começa a estar em excesso e então, no mesmo tempo de residência, a taxa de conversão começa a diminuir. Embora em ritmo mais lento, a produção continua a aumentar até que a elevada concentração de amido provoca uma diminuição, seja pelo aumento da viscosidade, o que por sua vez, dificulta o acesso do substrato a enzima, ou pelo fato de que, em concentrações elevadas, o amido atua como inibidor da reação. Assim, os maiores valores de produção de β -CD foram encontrados quando 4 % de amido e fluxo de 3 mL/min foram usados.

Os efeitos do fluxo em que o substrato passa pelo reator na produção de β -CD também foram investigados. Conforme esperado, como consequência do maior tempo de residência, menores fluxos (0,4, 0,6 e 0,8 mL/min) favoreceram a conversão do substrato, e assim, maiores quantidades de β -CD foram formadas, chegando a 1,729 g β -CD/L e 4,3 % de conversão quando um fluxo de 0,8 mL/min foi usado, o que correspondeu a um tempo de residência de 87 segundos. O aumento da taxa de fluxo conduziu a um tempo de residência do substrato dentro do reator muito curto (19 segundos) e, desta forma, a síntese de β -CD diminuiu cerca de 40 % quando o fluxo passou de 0,8 mL/min para 5 mL/min. No entanto, a produtividade, a qual considera a produção ao longo do tempo e o volume, continuou aumentando até atingir o valor máximo de 310 g β -CD / L·h no maior fluxo testado (5 mL/min).

Tardioli e colaboradores (2000), utilizando um reator de leito fluidizado, com uma carga de 417 mg de CGTase e maltodextrina como um substrato, obtiveram 13,2 % de conversão em β -CD, com a produção atingindo 12,76 g β -CD /L durante 13 minutos de tempo de residência. Entretanto, neste trabalho, utilizando 4 % de amido solúvel como substrato, foi alcançado, em apenas um minuto de residência, os valores de 3,8 % de conversão para β -CD, e a produção de 1,51 g β -CD/L, com uma concentração de enzima 58 vezes menor.

Além disso, o reator foi utilizado continuamente a fim de determinar sua estabilidade operacional. Após 49 horas de funcionamento contínuo, a produção de β -CD teve uma queda, ocorrida devido ao super-empacotamento das esferas no reator, o que levou a uma menor área de contato com o substrato e também menor tempo de residência. Entretanto, após ser realizado uma limpeza e reposição destas esferas na coluna, seguindo as mesmas condições iniciais, a produção da ciclodextrina se manteve em 100 % da capacidade inicial por mais, pelo menos, 50 horas. Assim sendo, concluiu-se que mesmo após 100 horas de uso contínuo a capacidade de conversão do amido em β -CD permaneceu inalterada. Trabalho semelhante foi realizado utilizando uma CGTase covalentemente imobilizada sobre Eupergit C em reator de leito fixo, para testar sua estabilidade operacional. Entretanto, o tempo de meia-vida da preparação enzimática foi de 132 min a 60 ° C e 18 min a 70 ° C (SVENSSON *et al.*, 2011).

Observando os resultados obtidos ao longo do trabalho, pode-se concluir que o protocolo utilizado, que promoveu ligação covalente unipontual entre a enzima e o suporte, conferiu ótima estabilidade ao biocatalisador. Além disso, o método foi capaz de alcançar o principal objetivo da imobilização de enzimas que é possibilitar sua reutilização por vários ciclos de reação e manteve uma característica importante da ciclodextrina glicosiltransferase de *Thermoanaerobacter* sp., que age em altas temperaturas. Na utilização do biocatalisador imobilizado em um reator enzimático, as vantagens deste tipo de aplicação ficaram evidentes: facilidade de operação e controle dos rendimentos de reação, longa estabilidade enzimática, influenciada também pela redução da tensão de cisalhamento proporcionada por esse tipo de reator.

Entretanto, no sentido de complementar e aperfeiçoar este trabalho, são apresentadas a seguir algumas perspectivas para a continuidade deste estudo:

- Quantificar a produção das demais ciclodextrinas (α - e γ -CD);
- Determinar a influência da temperatura e de outros parâmetros na produção dos três principais tipos de ciclodextrinas, em processo contínuo;

- Avaliar o efeito da presença de Ca^{2+} na atividade da enzima;
- Purificar a enzima comercial antes da imobilização;
- Aumentar a quantidade de enzima utilizada para imobilização;
- Melhorar a recuperação da atividade após imobilização, utilizando-se outros suportes, se necessário;
- Utilizar espaçadores maiores a fim de evitar possível impedimento estérico da enzima e facilitar o acesso do substrato;
- Testar outros tipos de reatores enzimáticos, como reator de leito fluidizado, por exemplo;
- Usar α -amilase para pré-hidrólise do amido, em uma coluna anterior à CGTase, a fim de melhorar as taxas de conversão do amido em ciclodextrinas.

REFERÊNCIAS

ABD RAHMAN, R. et al. Optimisation of growth medium for the production of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* HR1 using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2053-2060, Oct 29 2004.

ABDEL-NABY, M. A. Immobilization of *Paenibacillus macerans* NRRL B-3186 cyclodextrin glucosyltransferase and properties of the immobilized enzyme. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 399–405, 1999.

ALVES-PRADO, H. F.; HILÁRIO, E. Seleção de microrganismos produtores de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produção e caracterização da enzima. **Braz. J. Food Technol.**, v. 5, p. 189-196, 2002.

AMUD, A. E. et al. Methods and supports for immobilization and stabilization of cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Thermoanaerobacter*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, n. 1-3, p. 189-201, Mar 2008.

ASTRAY, G. et al. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1631-1640, Oct 2009.

ATANASOVA, N. et al. Cyclodextrin glucanotransferase production by cell biocatalysts of alkaliphilic bacilli. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, n. 3, p. 278-285, Nov 2009.

AVCI, A.; DÖNMEZ, S. A novel thermophilic anaerobic bacteria producing cyclodextrin glycosyltransferase. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 36-42, Jan 2009.

AVCI, A.; DÖNMEZ, S. Purification and characterization of a thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacter* sp. P4. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 5 June, p. 10407-10415, 2012.

BHATNAGAR, A.; SILLANPÄÄ, M. Applications of chitin- and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater — A short review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. - 152, n. - 1–2, p. 26–38, 2009.

BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 11, p. 1639-1650, Nov 2009.

BRENDA. The Comprehensive Enzyme Information System. Disponível em: < <http://www.brenda-enzymes.info/> >. Acesso em: 25/01/2013.

CAO, L. Immobilised enzymes: science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, n. - 2, p. 217–226, 2005.

CAO, L. **Immobilised enzymes: science or art?** Current Opinion in Chemical Biology. 9: 217–226 p. 2005b.

CARNEIRO, A. A. J. et al. Escurecimento enzimático em alimentos: ciclodextrinas como agente antiescurecimento. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 3, p. 345-352, 2006.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; DA SILVA, S. S. Uso de biocatalisadores imobilizador: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**, v. 23, p. 60-70, 2006.

CHIU, S. H. et al. Immobilization of beta-cyclodextrin in chitosan beads for separation of cholesterol from egg yolk. **Food Research International**, v. 37, n. 3, p. 217-223, 2004.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1033-1046, May 31 2004.

DUTTA, P. K. et al. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**, v. - 114, n. - 4, p. 1173–1182, 2009.

FANG, Y. et al. Polymer materials for enzyme immobilization and their application in bioreactors. **Bmb Reports**, v. 44, n. 2, p. 87-95, Feb 28 2011.

FILTVEDT, W. O. et al. Development of fluidized bed reactors for silicon production. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, v. 94, n. 12, p. 1980-1995, 2010.

GARCIA-GALAN, C. et al. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885-2904, Nov 2011.

GIRELLI, A. M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 819, n. 1, p. 3-16, May 5 2005.

GOH, K. M. et al. A predominant beta-CGTase G1 engineered to elucidate the relationship between protein structure and product specificity. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 57, n. 1-4, p. 270-277, May 2009.

GOYCOOLEA, F. M. et al. Chitin and Chitosan. **Novel Macromolecules in Food Systems**, p. 265-308, 2000.

GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells 2**. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2006.

HAMA, S. et al. Enzymatic packed-bed reactor integrated with glycerol-separating system for solvent-free production of biodiesel fuel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, n. 1, p. 66-71, 2011.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453-468, 2009.

HEDGES, A. R. Industrial applications of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 2035-2044, Jul-Aug 1998.

ILLANES, A.; ALTAMIRANO, C. Enzyme reactors. In: (Ed.). **Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications**. Chile: Springer Netherlands, 2008. p.205–251.

ISPAS, C.; SOKOLOV, I.; ANDREESCU, S. Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 2, p. 543-554, Jan 2009.

KATCHALSKI-KATZIR, E. Immobilized enzymes — learning from past successes and failures. **Trends in Biotechnology**, v. 11, n. 11, p. 471-478, 1993.

KITAYSKA, T. et al. Purification and Properties of a New Thermostable Cyclodextrin Glucanotransferase from *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 5-6, p. 1285-1295, Nov 2011.

KLIBANOV, A. M. Enzyme stabilization by immobilization. **Analytical Biochemistry**, v. 93, n. 0, p. 1-25, 1979.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 126-139, Aug 2004.

MARTÍN, M. T. et al. Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 21, n. 4-6, p. 299-308, Feb 17 2003.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, May 2 2007.

MATIOLI, G. **Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais**. Maringá: Eduem, 2000. 124

MATTE, C. R. et al. Characterization of cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on silica microspheres via aminopropyltrimethoxysilane as a “spacer arm”. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, n. - 0, p. 51–56, 2012.

PINTO, F. S. T. et al. Production of cyclodextrin glycosyltransferase by alkaliphilic *Bacillus circulans* in submerged and solid-state cultivation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 30, n. 5, p. 377-382, Sep 2007.

PSZCZOLA, D. E. Production and potential food applications of cyclodextrins. **Food Technology**, v. 42, n. 1, p. 96-100, Jan 1988.

QI, Q. S.; MOKHTAR, M. N.; ZIMMERMANN, W. Effect of ethanol on the synthesis of large-ring cyclodextrins by cyclodextrin glucanotransferases. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 57, n. 1-4, p. 95-99, Apr 2007.

QI, Q. S.; ZIMMERMANN, W. Cyclodextrin glucanotransferase: from gene to applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 5, p. 475-485, Feb 2005.

RODRIGUES, R. C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chem. Soc. Rev.**, 2013.

SAVERGAVE, L. S. et al. Production and single step purification of cyclodextrin glycosyltransferase from alkaliphilic *Bacillus firmus* by ion exchange chromatography. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 3, p. 510-515, May 1 2008.

SCHÖFFER, J. D. N. et al. **Production and Purification of Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus circulans* ATCC 21783** X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC. Blumenau, RS - Brasil 2012.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y.-J. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 2, p. 37-51, 1999.

SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8-9, p. 1289-1307, Jun 2007.

SIAN, H. K. et al. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp G1. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 1101-1111, Mar 2005.

SVENSSON, D.; ADLERCREUTZ, P. Immobilisation of CGTase for continuous production of long-carbohydrate-chain alkyl glycosides Control of product distribution by flow rate adjustment. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 69, n. 3-4, p. 147-153, May 2011.

SVENSSON, D.; ULVENLUND, S.; ADLERCREUTZ, P. Efficient Synthesis of a Long Carbohydrate Chain Alkyl Glycoside Catalyzed by Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 5, p. 854-861, Dec 1 2009.

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

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 1743-1753, Jul-Aug 1998.

TARDIOLI, P. W.; ZANIN, G. M.; DE MORAES, F. F. Production of Cyclodextrins in a Fluidized-Bed Reactor Using Cyclodextrin-Glycosyl-Transferase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 1003-1019, 2000.

TARDIOLI, P. W.; ZANIN, G. M.; DE MORAES, F. F. Characterization of *Thermoanaerobacter* cyclomaltodextrin glucanotransferase immobilized on glyoxyl-agarose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 6, p. 1270-1278, Oct 3 2006.

TERADA, Y. et al. Cyclodextrins are not the major cyclic alpha-1,4-glucans produced by the initial action of cyclodextrin glucanotransferase on amylose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 25, p. 15729-15733, Jun 20 1997.

TISCHER, W.; KASCHE, V. Immobilized enzymes: crystals or carriers? **Trends in Biotechnology**, v. 17, n. 8, p. 326-335, Aug 1999.

TOKURA, S.; TAMURA, H. 2.14 - Chitin and Chitosan. In: EDITOR-IN-CHIEF: JOHANNIS, P. K. (Ed.). **Comprehensive Glycoscience**. Oxford: Elsevier, 2007. p.449-475.

TONKOVA, A. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 8, p. 678-686, Jun 1998.

UITDEHAAG, J. C. M. et al. The cyclization mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) as revealed by a gamma-cyclodextrin-CGTase complex at 1.8-angstrom resolution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 49, p. 34868-34876, Dec 1999.

UITDEHAAG, J. C. M. et al. Catalytic mechanism and product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase, a prototypical transglycosylase from the α -amylase family. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 3, p. 295-304, 2002.

VALENCIA, P. et al. Effect of particle size distribution on the simulation of immobilized enzyme reactor performance. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 2, p. 256-263, Apr 15 2010.

VAN DER MAAREL, M. et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 137-155, Mar 28 2002.

VAN DER VEEN, B. A. et al. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. **Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, n. 2, p. 336-360, Dec 29 2000.

VAN DER VEEN, B. A. et al. Rational design of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 to increase alpha-cyclodextrin production. **Journal of Molecular Biology**, v. 296, n. 4, p. 1027-1038, Mar 3 2000.

VAN DER VEEN, B. A. et al. The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* (strain 251) proceed via different kinetic mechanisms. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 3, p. 658-665, Feb 2000.

YAMAMOTO, K.; ZHANG, Z. Z.; KOBAYASHI, S. Cycloamylose (cyclodextrin) glucanotransferase degrades intact granules of potato raw starch. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 962-966, Mar 2000.

APÊNDICE A – Resumo do trabalho apresentado como pôster no ENZITEC 2012.

Production and Purification of Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus circulans* ATCC 21783

Jéssie da N. Schöffner^{1*}, Jackson Feltraco¹, Carla R. Matte¹, Rafael C. Rodrigues¹, Plinho F. Hertz¹

¹*Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), Departamento de Ciência dos Alimentos*

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil

**je_schoffer@yahoo.com.br*

Keywords: CGTase, Bacillus circulans ATCC 21783, purification

INTRODUCTION

Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) is the only one enzyme capable to form cyclodextrins (CDs) from starch by the cyclization reaction¹. The enzymatic product is usually a mixture of CDs, including mainly α -, β -, and γ -CD consisting of six, seven, and eight glucose units, respectively². Their properties, has resulted in the growing importance of the applications of CDs: in food, pharmaceutical, agriculture, and chromatographic techniques. The objective of this study was to purify a CGTase from *Bacillus circulans* ATCC 21783 that produces mainly β -cyclodextrin.

RESULTS AND DISCUSSION

The strain was cultivated at 37 °C and 150 rpm for 18 h, in alkaline medium (pH 9.7 – 10.0) containing soluble starch, 2 g·L⁻¹; peptone, 5 g·L⁻¹; yeast extract, 5 g·L⁻¹; MgSO₄, 0.2 g·L⁻¹; and K₂HPO₄, 1 g·L⁻¹. The bacterial cells were removed by centrifugation at 5,000 ×g, 4 °C for 15 min, and the clear supernatant was used as a crude enzyme.

As showed at table 1, the crude enzyme obtained was purified up to 9-fold by adsorption to the insoluble corn starch (11 %, w/v), under a continuous agitation, with a recovery of 93.15 % activity. The mixture was centrifuged at 5,000 ×g for 15 min. In order to separate the enzyme from starch, it was incubated with phosphate buffer 0.1 M, pH 6.0 (activity buffer) for 30 min at 40 °C with shaking followed by centrifugation (5×). Both

eluates were mixed and concentrated by ammonium sulphate precipitation (40 % and 70 %), followed by dialysis in activity buffer. The next step was the concentration by ultrafiltration using membrane Millipore 30 kDa (Millipore, MA, USA). The purified enzyme was with a very high specific activity ($21166.26 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$) and the yield was 11.84 %.

The protein concentration was determined based on the Lowry method using bovine serum albumin as a standard, and the enzyme activity based in the phenolphthalein method³, with some modifications⁴. Its purity was assessed by SDS-PAGE, performed according to Laemmli, on a vertical slab polyacrylamide gel 10 % (w/v).

Table 1. Purification of CGTase from *Bacillus circulans*

Purification Step	Volume (mL)	Activity ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Protein ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Specific Activity ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Fold Purification	Yield (%)
Crude Enzyme	971	1121	3.71	302.15	1	100
Starch Adsorption	695	1443	0.51	2829.41	9.42	93.15
Ammonium Sulphate Precipitation	15.65	14660	0.69	21246.38	70.65	21.62
Ultrafiltration	1.77	69637	3.29	21166.26	70.04	11.84

CONCLUSION

The results for each purification step showed that the crude CGTase was successfully purified. The specific activity of the purified CGTase has been increased from approximately $302 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ in the crude enzyme to $21166 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$. The PAGE indicated a molecular weight of approximately 70 kDa. However, a lower yield of the CGTase in this case is a trade off for the higher purification fold obtained.

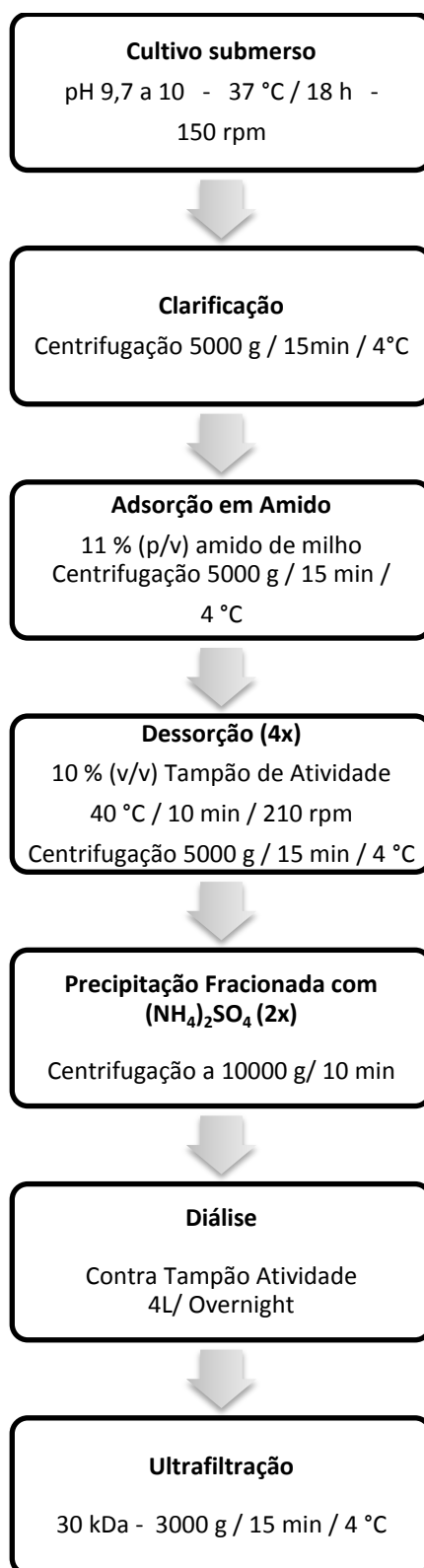
ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank CAPES, CNPq, FAPERGS.

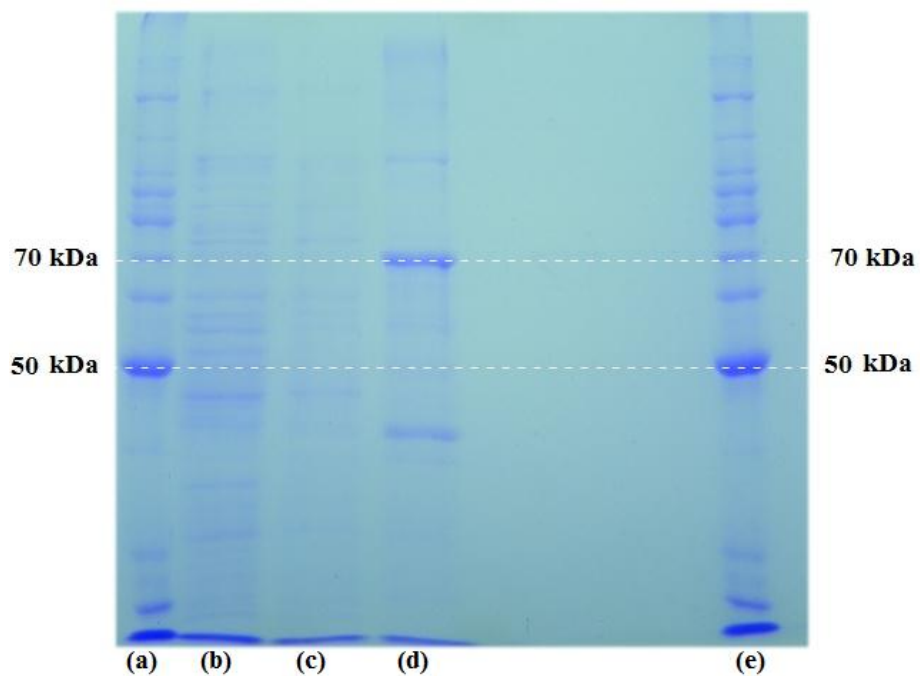
REFERENCES

- ¹ Kitayska, T.; Petrova, P.; Ivanova, V.; Tonkova, A. I., *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2011**, 165 (5-6), 1285-1295.
- ² Li, Z.; Wang, M.; Wang, F.; Gu, Z.; Du, G.; Wu, J.; Chen, J., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 77 (2), 245-255.
- ³ Kaneko T., Kato T., Nakamura N., Horikoshi K. J. *Jpn Soc Starch Sci.*, **1987**, 34, 45-48.
- ⁴ Pinto, F. S. T., S. H. Flores, et al., *Food and Bioprocess Technology.* **2011**, 4(4): 559-565

APÊNDICE B – Fluxograma para purificação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase de *Bacillus circulans* ATCC 21783.



APÊNDICE C – Gel de eletroforese SDS-PAGE 10% para acompanhamento da eficiência no processo de purificação.

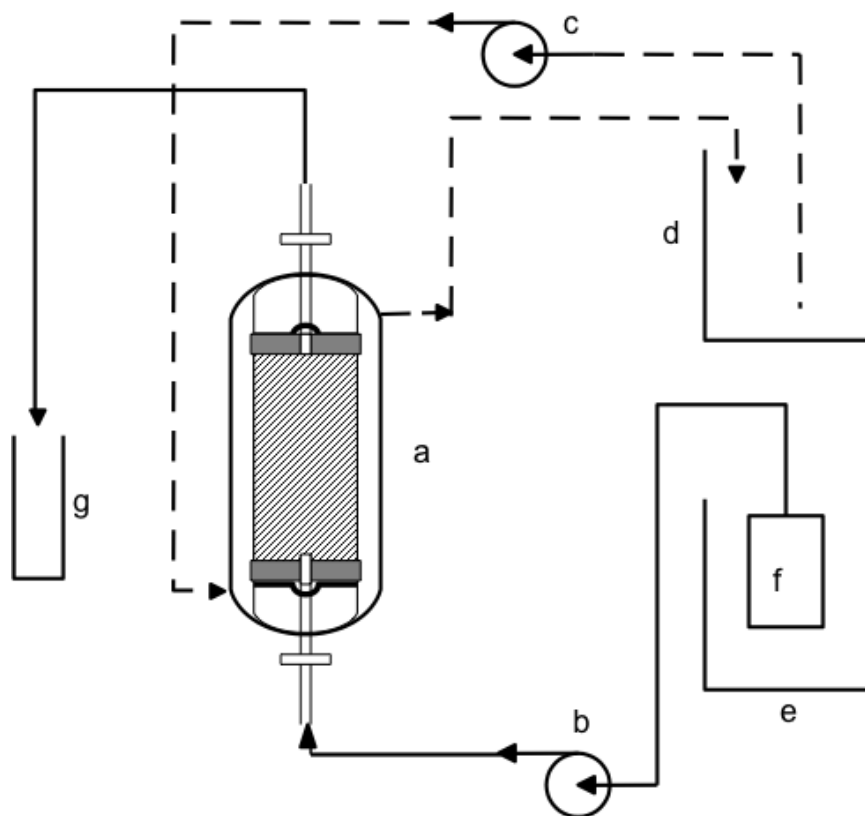


Gel de eletroforese SDS-PAGE para acompanhamento do processo de purificação nas seguintes etapas: (a) padrão de peso molecular; (b) extrato bruto; (c) após adsorção com amido; (d) após precipitação fracionada, (e) padrão de peso molecular. Gel corado com Coomassie Brilliant Blue r-250.

APÊNDICE D – Tabela de purificação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase de *Bacillus circulans* ATCC 21783.

Tabela 2. Purificação de CGTase de *Bacillus circulans* ATCC 21783.

Etapas	Volume (mL)	Proteína (mg)	Atividade (U)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto	971	3602	1088767	302	1	100
Adsorção em amido	695	352	1002681	2848	9,43	92
Precipitação fracionada	15,65	11	229429	20857	69,06	21
Ultrafiltração	1,77	5,8	123258	21251	70,37	11

APÊNDICE E - Esquema do reator enzimático utilizado para produção contínua de β -CD.

Reator de leito fixo com volume interno variável (a), bomba (b) e (c), banho-maria (d) e (e), substrato (f) e produto (g).

APÊNDICE F – Foto do reator enzimático utilizado para produção contínua de β -CD.



ANEXO 1 - Artigo científico **“Characterization of cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on sílica microspheres via aminopropyltrimethoxysilane as a “spacer arm””** publicado na revista *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. DOI: 10.1016/j.molcatb.2012.01.003.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molcatb

Characterization of cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on silica microspheres via aminopropyltrimethoxysilane as a “spacer arm”

Carla Roberta Matte^a, Michael Ramos Nunes^b, Edilson Valmir Benvenuti^b,
Jéssie da Natividade Schöffer^a, Marco Antônio Záchia Ayub^a, Plinho Francisco Hertz^{a,*}

^a Food Science & Technology Institute (ICTA), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Chemistry Institute (IQ), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2011

Received in revised form

21 December 2011

Accepted 6 January 2012

Available online 16 February 2012

Keywords:

Cyclodextrin glycosyltransferase

Enzyme immobilization

Toruzyme[®]*Thermoanaerobacter* sp.

Silica

ABSTRACT

In this work, the enzymatic properties of immobilized cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) of *Thermoanaerobacter* sp. were investigated and compared with 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 prior to immobilization. This innovative approach for support preparation produced high yields of immobilization (83%) and activity recoveries (73%), which are the highest so far reported for CGTase. The soluble enzyme (CGTase) and its immobilized form (ImCGTase) showed similar values for the optimal pH activity, while optimal reaction temperatures were found to be 100 °C and 80 °C, respectively. The immobilized enzyme showed similar values for K_m and thermal stabilities with the soluble form, while its V_{max} was lower. The immobilized enzyme was tested in repeated batches in order to simulate recovery and reuse, keeping about 60% of the initial catalytic activity after 15 cycles, showing its good chemical and mechanical resistance.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

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

The industrial production of CDs has been chiefly carried out in batch systems, with soluble CGTase used directly into the reaction mixture. The use of immobilized CGTase has been proposed as a technical alternative to allow for its continuous and repeated use, avoiding enzyme solubilization and improving the stability of the biocatalyst [11]. However, it has been reported that activity recoveries of immobilized CGTases are usually very low due to diffusional resistances imposed by the structure of the macromolecular substrates, such as starches and dextrans [11–13]. To

overcome these problems, the addition of spacers, or linkers, has been investigated to produce more flexible spatial arrangements of the biomolecules, providing higher mobility of the resulting immobilized enzyme, while enhancing the interaction between the enzyme and the macromolecular substrate [14,15].

A wide variety of materials have been used as immobilization supports for CGTase such as Eupergit C [7], commercial chitosan [16,17], glyoxyl-agarose [18], controlled pore size silica [16,19], among others. In particular, silica supports have been shown to be excellent materials for enzyme immobilization due to their excellent biocompatibility, rigidity, mechanical and operational stability, high thermal resistance, and nontoxicity [20–22]. It also shows remarkable resistance to microbial degradation and to solvent distortion [23]. Surface modification via functional groups provides the opportunity to change the interfacial properties, while retaining their basic geometry and mechanical strength of the solid matrix in cyclic reuse [21].

Several enzymes have been immobilized in a variety of silica matrices using different methods. In this study, it is demonstrated the use of an emulsion for preparing ordered silica microspheres with the PEG polymer as the swelling agent [24]. Chemical attachment of *Thermoanaerobacter* sp. CGTase by covalent coupling onto silica microspheres silanized with 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) was the chosen mechanism because it can generate a highly stable system [25–27]. In this system, a solution of APTMS

* Corresponding author at: Food Science & Technology Institute (ICTA), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, PO Box 15095, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33087094; fax: +55 51 33087048.
E-mail address: plinho@ufrgs.br (P.F. Hertz).

ANEXO 2 - Artigo científico “**High stability of immobilized β -D-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis**” aceito para publicação na revista *Carbohydrate Polymers*. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.02.044



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol

High stability of immobilized β -D-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis



Manuela P. Klein^{a,b}, Lucas P. Fallavena^b, Jéssie da N. Schöffner^b, Marco A.Z. Ayub^b, Rafael C. Rodrigues^b, Jorge L. Ninow^a, Plinho F. Hertz^{b,*}

^a Chemical and Food Engineering Department, Federal University of Santa Catarina, ZC 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^b Enzymology Laboratory, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 November 2012

Received in revised form 30 January 2013

Accepted 21 February 2013

Available online xxx

Keywords:

Continuous enzymatic packed-bed reactor

 β -D-Galactosidase

Chitosan macroparticles

Galactooligosaccharides

Lactose hydrolysis

ABSTRACT

β -D-Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* was immobilized on glutaraldehyde-activated chitosan and used in a packed-bed reactor for the continuous hydrolysis of lactose and the synthesis of galactooligosaccharides (GOS). The biocatalyst was tested for its optima pH and temperature, thermal stability in the presence of substrate and products, and operational stability. Immobilization increased the range of operational pH and temperature, and the enzyme thermal stability was sharply increased in the presence of lactose. Almost complete lactose hydrolysis was achieved for both milk whey and lactose solution at 37 °C at flow rates up to 2.6 mL min⁻¹. Maximal GOS concentration of 26 g L⁻¹ was obtained at a flow rate of 3.1 mL min⁻¹, with a productivity of 186 g L⁻¹ h⁻¹. Steady-state operation for 15 days showed the reactor stability concerning lactose hydrolysis.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lactose (β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose), the main sugar of milk, can be hydrolyzed by β -D-galactosidase liberating D-glucose and D-galactose, making possible the consumption of milk and other dairy products by lactose-intolerant people (Haider & Husain, 2009). In the presence of highly concentrated lactose, this enzyme can also produce galactooligosaccharides (GOS), by transferring galactosyl residues to lactose molecules. The GOS produced (for example, Gal (β 1 \rightarrow 4) Gal (β 1 \rightarrow 4) Glc), usually has the structure Gal_n-Glc, where *n* indicates the degree of polymerization, which is typically 1–5 (Gosling, Stevens, Barber, Kentish, & Gras, 2010; Mussatto & Mancilha, 2007). GOS are non-digestible oligosaccharides, which are used as prebiotics food ingredients. The regular consumption of GOS can promote the growth and metabolism of intestinal bifidobacteria, microorganisms that are associated with positive health effects (as the reduction of the level of cholesterol, anticarcinogenic properties, and production of vitamins), when applied in human and other animals diets (Grossova, Rosenberg, & Rebros, 2008). Therefore, the enzyme β -D-galactosidase, in its free or immobilized forms, has an important

application in the food industry for lactose hydrolysis and for GOS synthesis.

For the industrial-scale applications of immobilized enzymes, where large amounts of biocatalyst are required, the immobilization protocol must be simple and preferably make use of inexpensive materials as supports (Garcia-Galan, Berenguer-Murcia, Fernandez-Lafuente, & Rodrigues, 2011). Moreover, concerning food applications, nontoxicity and biocompatibility are also required. In this context, chitosan [(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoxy- β -D-glucan], which is a natural polyaminosaccharide derived from chitin [(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucan], a by-product of the seafood processing industry, is both safe and cheap (Krajewska, 2004; Muzzarelli, 1980). Another unique property of chitosan is its low propensity for microbial contamination, a problem associated with the immobilization of β -D-galactosidase for lactose hydrolysis (Benhabiles et al., 2012). Chitosan is soluble in acid solutions, and can be precipitated in alkaline pH, thus chitosan particles can be readily obtained dripping an acid chitosan solution into an alkaline coagulation solution (Krajewska, 2004). Prior to enzyme immobilization, chitosan particles can also be easily activated using various agents such as glutaraldehyde (Muzzarelli, 1980), genipin (Chiou, Hung, Giridhar, & Wu, 2007; Muzzarelli, 2009), glycidol or epichlorohydrin (Rodrigues, Mendes, Adriano, Gonçalves, & Giordano, 2008) in order to generate specific groups for enzyme attachment.

* Corresponding author. Tel.: +55 51 3308 7094; fax: +55 51 3308 7048.
E-mail address: plinho@ufrgs.br (P.F. Hertz).

