

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – ICTA
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Vanessa Stahl Hermes

**Purificação e caracterização de Ciclodextrina Glicosiltransferase
Produzida por *Stenotrophomonas maltophilia***

Porto Alegre
2010

Vanessa Stahl Hermes

**Purificação e caracterização de Ciclodextrina Glicosiltransferase
Produzida por *Stenotrophomonas maltophilia***

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

Orientador: Dr. Plinho Francisco Hertz

Porto Alegre

2010

Hermes, Vanessa Stahl
Purificação e caracterização de Ciclodextrina Glicosiltransferase
H551p produzida por *Stenotrophomonas maltophilia* . / Vanessa Stahl
Hermes. -- Porto Alegre, 2010.
46f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2010.

Orientador: Plinho Francisco Hertz

Bibliografia

1.Aditivo alimentar 2.Ciclodextrina glicosiltransferase
3.Purificação de CGTase 4.Stenotrophomonas maltophilia I.Título. II.
Hertz, Plinho Francisco (orient.)

CDU 664.06:577.15

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Aos meus pais e meu irmão por todo apoio e empenho para que tudo isso fosse possível. Os resultados estão sendo colhidos.

Ao meu orientador por ter sido muito mais que isso. Por ter acreditado em mim e no meu potencial para desenvolver esse trabalho. Pela sua compreensão e, principalmente, pela sua amizade. Também, aos demais professores do ICTA pelos ensinamentos e pela credibilidade na minha capacidade.

A Fabi e a Cris pelo empenho e dedicação ao trabalho. Meninas que se tornaram muito mais que estagiárias, são amigas que levarei para sempre.

A Carla, que trabalhou tanto quanto eu para finalização desse trabalho e a quem sou muito grata pela incansável dedicação e amizade.

Aos colegas do BiotecLab que foram imprescindíveis para realização desse trabalho, pela troca de conhecimentos e experiência. Bem como, às colegas de mestrado que dividiram momentos de dúvidas, questionamentos, mas também de conquistas e realizações. .

A Gabi, pela amizade e compreensão das minhas ausências. Também por me permitir fazer parte do grupo da Imunogenética, pessoas amáveis a quem agradeço pela companhia nos almoços no RU.

À minha grande amiga Frê, meu espelho maior na busca pelos meus objetivos. Que me fez voltar a acreditar que podemos chegar onde queremos, e conquistar tudo que queremos, só depende de nós.

Aos meus colegas de graduação, sempre presentes para comemorar cada conquista, tão relevante para nós Biomédicos.

As minhas amigas de Santa Cruz, por entenderem minha ausência e estarem sempre torcendo pelas minhas vitórias.

A minha família, pela compreensão de eu não poder estar presente nas festas e encontros familiares e pela força que sempre me deram na busca da minha realização.

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

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

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CICLODEXTRINA
GLICOSILTRANSFERASE PRODUZIDA POR *STENOTROPHOMONAS
MALTOPHILIA* ISOLADA DE SOLO BRASILEIRO**

Autor: Vanessa Stahl Hermes

Orientador: Plinho Francisco Hertz

RESUMO

A ciclodextrina glicosiltransferase (EC 2.4.1.19) é a única enzima capaz de converter amido e açúcares relacionados em ciclodextrinas através de reação de ciclização. Estes compostos podem formar complexos de inclusão com moléculas hidrofóbicas, tornando-se importante para aplicação nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, agrícolas, químicas e de cosméticos. Um novo microorganismo produtor de CGTase foi encontrado entre bactérias isoladas do solo e foi identificado como *Stenotrophomonas maltophilia*. A enzima produzida por este microorganismo foi purificada em quatro etapas: precipitação por afinidade com amido, ultrafiltração, cromatografia de troca iônica e cromatografia de interação hidrofóbica. A CGTase assim purificada obteve, aproximadamente, atividade específica de 200.000 U/mg e fator de purificação de 2500. Com uma única banda, o peso molecular da enzima purificada foi estimado em 70kDa por SDS-PAGE. A temperatura ótima para atividade da enzima foi de 60 ° C, enquanto que a atividade enzimática permaneceu praticamente estável entre pH 6 e 10, indicando natureza alcalotolerante. K_m e V_{max} para a enzima pura foram de 2,5 g/mL e 12,5 U/mg de proteína, respectivamente, usando amido solúvel como substrato.

Palavras-chave: ciclodextrina glicosiltransferase, purificação de CGTase, *Stenotrophomonas maltophilia*

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CYCLODEXTRIN
GLYCOSYLTRANSFERASE PRODUCED BY *STENOTROPHOMONAS
MALTOPHILIA* ISOLATED FROM BRAZILIAN SOIL**

Author: Vanessa Stahl Hermes

Supervisor: Plinho Francisco Hertz

ABSTRACT

Cyclodextrin glycosyltransferase (EC 2.4.1.19) is the unique enzyme able to convert starch and related sugars into cyclodextrins via cyclization reaction. These compounds can form inclusion complexes with hydrophobic molecules, becoming important for application in the food, pharmaceutical, agricultural, chemical and cosmetics industries. A new microorganism producing the CGTase was found among strains isolated from soil and identified as *Stenotrophomonas maltophilia*. The enzyme produced by this strain was purified by four steps: starch affinity precipitation, ultrafiltration, ion exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography. The CGTase thus obtaining specific activity 200,000 U.mg⁻¹ and 2500-fold purification. With a single band, the molecular weight of the purified enzyme was estimated in 70kDa by SDS-PAGE. The optimum temperature for enzyme activity was 60°C, whereas the enzyme activity remained almost stable between pH 6 to 10, indicating its alkalotolerant nature. *K_m* e *V_{max}* for the pure enzyme were 2.5 g/mL and 12.5 U/mg protein, respectively, using soluble starch as substrate.

Key words: cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase purification, *Stenotrophomonas maltophilia*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1Ciclodextrinas.....	11
1.2 Ciclodextrina glicosiltransferase	14
1.3 Produção e purificação de CGTase	16
1.4 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>.....	18
2 RESULTADOS.....	20
2.1 Purification of cyclodextrin glycosyltransferase produced by <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> isolated from Brazilian soil	21
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
APÊNDICES	43
Apêndice A.....	44
Apêndice B.....	45
Apêndice C.....	46
Apêndice D.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas das α -, β -, γ -ciclodextrinas (VAN DER VEEN et al 2000a).....	11
2.1 Purification of cyclodextrin glycosyltransferase produced by <i>Stenotrophomonas Maltophilia</i> isolated from Brazilian soil	
Figure 1: Chromatographic profile of CGTase purification by ion exchanger on DEAE-Sepharose column.....	33
Figure 2: Chromatographic profile of CGTase purification by hydrophobic interaction on Phenyl- Sepharose column.....	34
Figure 3: Determination of molecular weight on SDS-PAGE.....	35
Anexos	
Anexo B – Fluxograma de purificação.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades da ciclodextrina.....12

2.1 Purification of cyclodextrin glycosyltransferase produced by *Stenotrophomonas Maltophilia* isolated from Brazilian soil

Table 1: Summary of CGTase purification results.....32

ANEXOS

Anexo C - Tabela comparativa de purificação com o protocolo de referência.....46

Anexo D - Tabela comparativa de purificações da CGTase de *Bacillus circulans*.....47

1 INTRODUÇÃO

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos compostos de resíduos de glicose, sintetizados exclusivamente pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) a partir do amido.

O interesse da utilização de ciclodextrinas no processamento de alimentos vem crescendo com o decorrer dos anos. Em 1998, a β -ciclodextrina passou a fazer parte da lista GRAS (generally recognized as safe), o que acarretou o aumento nas pesquisas sobre suas aplicações em alimentos.

A encapsulação molecular de compostos lipofílicos e hidrofóbicos por ciclodextrinas, além das aplicações conhecidas na indústria farmacêutica, melhora a estabilidade de aromas, vitaminas, cor e gorduras insaturadas presentes nos alimentos, aumentando a vida de prateleira destes e, algumas vezes, a sua aceitabilidade.

Os aspectos relacionados acima são possíveis devido à estrutura das ciclodextrinas, que possuem hidroxilas na sua parte externa tornando-as solúveis em água ao passo que seu interior é hidrofóbico. Por isso as ciclodextrinas, em solução, podem formar esses complexos de inclusão, limitadas apenas por restrições estereoquímicas de sua cavidade interna rígida.

Por serem aditivos multifuncionais, as ciclodextrinas podem ser aplicadas na indústria de alimentos como agente estabilizante. Como exemplo desta aplicação cita-se a encapsulação de compostos de cor do “ketchup” impedindo que ocorra oxidação durante o seu processamento que alcança 100°C. Outra aplicação da CD é em hidrolisados de caseína de leite, uma fonte de proteína prontamente digerível. Neste caso, a adição de β -CD à proteína hidrolisada elimina o residual amargo da mesma, não eliminando as propriedades nutricionais além de ampliar a aplicação industrial da proteína a outros alimentos.

O aumento da aplicação das ciclodextrinas no processamento de alimentos e fármacos faz com que a busca por novas fontes de CGTase torne-se de suma importância. Assim como, a investigação de técnicas mais apuradas de purificação e caracterização dessa enzima, que podem fornecer um melhor rendimento na atividade e formação dos produtos, proporcionando uma diminuição nos custos de aplicação da CGTase e de produção das CDs.

1.1 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos compostos principalmente de seis, sete e oito resíduos de glicose unidos por ligações α -1,4, chamados respectivamente de α , β e γ -ciclodextrinas (figura 1). Estes oligossacarídeos são relativamente estáveis além de serem resistentes à ação da maioria das exo-amilases (TONKOVA, 1998).

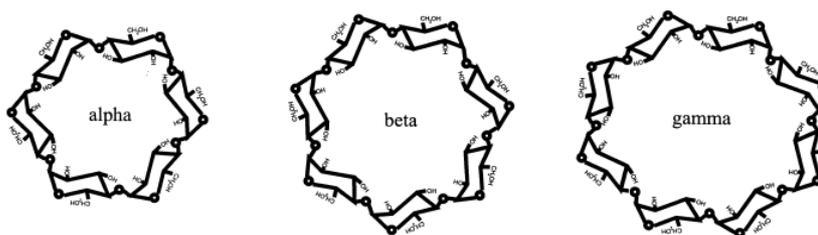


Figura 1 - Estruturas das α -, β -, γ -ciclodextrinas (VAN DER VEEN *et al* 2000a)

As CDs apresentam sabor doce, portanto quando esta for utilizada ao processamento de alimentos, o seu poder adoçante não pode ser ignorado, pois uma solução de 2,5% de β -CD é tão doce quanto uma solução de 1,7% de sacarose (MATIOLI, 2000).

Os resíduos de glicose do anel de ciclodextrina são arranjados de maneira que o segundo grupamento hidroxil (C2-C3) é localizado no limite do anel e o primeiro grupamento hidroxil (C6) no outro limite, resultando em uma molécula com forma cilíndrica. Os hidrogênios apolares C3 e C5, bem como seus oxigênios estão na parte interna e os grupamentos hidroxil na parte externa da molécula de ciclodextrina. Isso resulta em uma molécula com o exterior hidrofílico, podendo ser dissolvida em água e com uma cavidade apolar, possibilitando as ciclodextrinas a capacidade de formar complexos de inclusão com uma ampla variedade de moléculas hidrofóbicas (VAN DER VEEN *et al.*, 2000a). Considerando que uma das áreas de importância em biotecnologia e bioengenharia é o fenômeno de complexação molecular, que é útil na seleção, separação e solubilização de várias biomoléculas, as CDs tornam-se compostos vantajosos pela capacidade de formação destes complexos (MORIWAKI *et al.*, 2007). Essa encapsulação pode mudar as propriedades físicas e químicas das moléculas envolvidas, permitindo uma variedade de usos para indústrias alimentícias, de cosméticos e farmacêuticas (BONILHA *et al.*, 2006).

Como possíveis efeitos da formação de complexos de inclusão sobre as moléculas inclusas, têm-se a estabilização de compostos sensíveis à luz ou oxigênio, estabilização de compostos voláteis, alteração de reatividade química, melhora da solubilidade, melhora de sabor e aroma (VAN DER VEEN *et al.*, 2000a).

A cavidade das CDs é ocupada por moléculas de água, tanto no estado cristalino, como em solução aquosa. Considerando que estas moléculas de água estão em contato direto com a parte apolar da cavidade, esta interação polar-apolar resulta em um estado energeticamente desfavorecido. Estas moléculas de água podem ser facilmente substituídas por moléculas 'adequadas', as quais são menos polares que a água e ajustam-se geometricamente na cavidade (SZEJTLI & SZENTE, 2005).

A forma tridimensional e o tamanho das moléculas de ciclodextrinas (tabela 1) nos fornecem uma importante informação a respeito da formação de complexos com compostos hidrofóbicos ou grupos funcionais. Devido à formação de complexos de inclusão poderemos ter trocas das propriedades físicas e químicas das moléculas inclusas, bem como a alteração do meio onde estas moléculas estavam. Estas características alteradas de compostos encapsulados têm conduzido as ciclodextrinas a diversas aplicações em química analítica, agricultura, biotecnologia, farmácia e cosméticos (VAN DER VEEN *et al.*, 2000a).

Tabela 1: Propriedades da ciclodextrina

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

Fonte: Adaptada de VAN DER VEEN *et al* 2000a

As β -ciclodextrinas, CDs de tamanho intermediário, foram aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso em alimentos. A microencapsulação de compostos hidrofóbicos em β -ciclodextrinas vem sendo reconhecida, nos últimos anos, como um método eficiente para proteção de aromas e sabores contra a oxidação, degradação ao calor e evaporação na indústria de alimentos. Os produtos de inclusão nestas moléculas costumam apresentar maior vida de prateleira em

comparação aos agentes encapsulantes utilizados pelo método de atomização, como por exemplo, amidos modificados (SZENTE & SZEJTLI, 2004).

As CDs, de um modo geral, podem ser utilizadas para capturar “flavors” e odores, estabilizar compostos voláteis, melhorar a solubilidade de substâncias hidrofóbicas e proteger substâncias contra modificações indesejáveis (ALVES-PRADO *et al.*, 2007). Na indústria alimentícia, as CDs também podem ser utilizadas especificamente para: extrair componentes específicos, através da separação líquido-líquido, favorecendo a extração de componentes amargos de frutas cítricas ou proteínas hidrolisadas; extração de cafeína do café ou chá; extração de aromas oleosos diretamente de fontes naturais, como alho e cebola, sem a necessidade da utilização de solventes ou de processos de destilação; remoção de colesterol da gordura do leite ou da gema de ovos; remoção de ácidos graxos livres de gorduras para melhorar as propriedades de fritura; encapsulação de vitaminas lipofílicas e vitaminas do complexo B para proteção contra oxidação, degradação térmica e reações com outros componentes; estabilização de óleos essenciais voláteis de chás (VAN DER VEEN *et al.*, 2000a).

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

O consumo anual de CD no mundo está crescendo em taxa elevada. Contudo, a aplicação industrial extensiva de CD é limitada pelo seu alto custo. Como consequência, muitos esforços têm sido feitos para melhorar a produção, recuperação e purificação desses oligossacarídeos cíclicos (SZERMAN *et al.*, 2007).

Recentemente, uma classe de polímeros com nanoporos usando CD como base de construção tem sido sintetizada. Esses polímeros têm sido nomeados “nanoesponjas” devido aos seus nanoporos exibirem capacidade superior de absorver moléculas orgânicas em água. Assim, contaminantes orgânicos podem ser reduzidos a níveis de partes por trilhão (VASSILEVA *et al.*, 2005).

1.2 Ciclodextrina glicosiltransferase

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) pertence à família das α -amilases, ou família 13 glicosil hidrolases, são enzimas que hidrolisam o amido. Este grupo de enzimas possui uma série de características em comum: agem sobre as ligações α -glicosídicas e hidrolisam esta ligação produzindo mono ou oligossacarídeos formando ligações α -1,4 ou ligações α -1,6 por transglicosilação; possuem estrutura $(\beta/\alpha)_8$ e possuem quatro regiões altamente conservadas na seqüência primária (VAN DER KAAIJ *et al.*, 2007). A principal diferença dentro deste grupo de enzimas é a preferência por reações de hidrólise ou de transferência e a especificidade por ligações glicosídicas α -1,4 ou α -1,6 (LEEMHUIS *et al.*, 2003).

De acordo com Van der Veen *et al.*, (2000b), as enzimas da família da α -amilase geralmente hidrolisam as ligações glicosídicas α -1, 4, enquanto que uma enzima em particular, a ciclodextrina glicosiltransferase [CGTase; 1,4- α -D-glicana: 1,4- α -D-glicopiranosil transferase; EC 2.4.1.19] destaca-se por possuir a habilidade de catalisar reações de transglicosilação intramolecular e intermolecular.

Um aspecto característico das enzimas da família das α -amilases é que todas utilizam o mecanismo de α -conservação, porém seu substrato ou especificidade de produto é largamente variável. Estas diferenças podem ser atribuídas à fixação de diferentes domínios aos centros catalíticos ou às ligações extras de açúcar ao subsítio em torno do sítio catalítico (VAN DER MAAREL *et al.*, 2002). A principal diferença entre as CGTase e demais α -amilases é a presença de um domínio adicional na porção C-terminal da enzima. (VAN DER VEEN *et al.*, 2000a).

A CGTase é composta por uma cadeia única de polipeptídios com aproximadamente 650 aminoácidos, atingindo uma massa molecular na ordem de 70-75 kDa e não possui ligações intramoleculares por pontes de dissulfeto (MATIOLI *et al.*, 2000; UITDEHAAG *et al.*, 2002). A ciclodextrina glicosiltransferase possui cinco domínios marcados de A e E. O domínio A é o domínio $(\beta/\alpha)_8$ catalítico, sendo este comum às enzimas da família da α - amilase. O domínio B contribui com a ligação do substrato (STROKOPYTOV *et al.*, 1996; UITDEHAAG *et al.*, 1999). Os domínios C e E tem conformação β e são especializados na ligação com o grão bruto do amido. A função do domínio D, que também possui conformação β é ainda desconhecida (UITDEHAAG *et al.*, 2002).

CGTases de diferentes fontes mostram similaridade na seqüência de aminoácidos, variando de 47 a 99%, sendo que alguns exemplares apresentam 51 resíduos de aminoácidos completamente conservados, os quais estão envolvidos na catálise, na ligação ao substrato ou na ligação com cálcio (QI & ZIMMERMANN, 2005).

Considerando a ação catalítica da CGTase, a reação de transglicosilação intramolecular, também chamada de ciclização, ocorre quando a cadeia de um oligossacarídeo linear (amido ou maltodextrina) é clivada e um novo açúcar com final redutor é transferido para o açúcar não redutor da mesma cadeia. Mais especificamente, o aminoácido Asp 129 liga-se ao oligossacarídeo linear formando um intermediário covalente e a cadeia linear passa a assumir a conformação cíclica (UITDEHAAG *et al.*, 2002).

A reação de ciclização da CGTase pode produzir α , β e/ou γ -CD, sendo que a maioria vai originar uma mistura destes produtos, cuja proporção vai variar dependendo da bactéria de origem, do tempo e das condições de reação (GOH *et al.*, 2009). Sob condições normais, β -CD é produzida em maiores quantidades (MORIWAKI *et al.*, 2007). Considerando que as CDs estão sujeitas à inibição por estes produtos cíclicos, a disponibilidade de uma CGTase capaz de produzir um tipo específico de CD a uma taxa de crescimento elevada e com reduzida inibição pelo produto, torna-se importante (RAHMAN *et al.*, 2006). As CDs podem ser também produzidas pela CGTase imobilizada, o que permite o reuso da enzima (WANG *et al.*, 2006).

A composição de CDs produzidas pela reação de síntese da CGTase é determinada primariamente pelo tipo de enzima empregada e pode ser manipulada pela adição de agentes de complexação ou solventes orgânicos à mistura de reação (WANG *et al.*, 2006). Uma CGTase que sintetiza predominantemente um tipo de CD tem importância comercial, já que a separação de um tipo particular de CD exige elevado investimento financeiro além de ser demorada (BONILHA *et al.*, 2006). Sendo assim, torna-se de grande interesse a investigação dos produtos gerados por CGTases produzidas por novos microrganismos produtores, como a relatada neste trabalho, proveniente de *Stenotrophomonas maltophilia*.

Estudos estão sendo feitos não só para aumentar o rendimento das CDs, mas também para melhorar as condições de reação enzimática da CGTases na direção uma determinada CD. Muitos trabalhos têm demonstrado que os diferentes

substratos podem determinar o tipo de produto obtido a partir da reação enzimática da CGTase (ALVES-PRADO *et al.*, 2008).

Esta enzima também catalisa duas reações de transglicosilação intermolecular: acoplamento e desproporcionalização. A reação de acoplamento é reversa a ciclização e ocorre quando o anel da ciclodextrina é clivado e transferido para um substrato, o maltooligossacarídeo acceptor. A reação de desproporcionalização ocorre quando o maltooligossacarídeo linear é clivado e um novo açúcar com final redutor é transferido para um substrato de maltooligossacarídeo acceptor. A enzima possui ainda uma fraca atividade hidrolítica. (VAN DER VEEN *et al.*, 2000b). Portanto, a CGTase é a única enzima que catalisa quatro reações: ciclização, acoplamento, desproporcionalização e hidrólise (VASSILEVA *et al.*, 2005).

Muitos fatores envolvidos na especificidade de produção da CGTase têm sido identificados, incluindo a identidade, posição e interação de muitos resíduos de aminoácidos que exercem importante papel. Além disso, complexos cristalinos resultantes desse processo são estáveis, uma característica que pode fornecer muitos benefícios (BONILHA *et al.*, 2006). Métodos para produção industrial de CGTase têm sido estabelecidos e muitas cepas bacterianas selvagem ou geneticamente modificadas têm sido usadas na indústria para produção de diferentes tipos de CGTase (QI & ZIMMERMANN, 2005).

1.3 Produção e purificação de CGTase

A CGTase é produzida extracelularmente por diferentes microrganismos, principalmente pelo gênero *Bacillus*, tanto alcalofílicos, quanto mesofílicos e termofílicos, em cultivo submerso ou em estado sólido; embora *Anaerobranca*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Microccus*, *Clostridium*, *Thermococcus*, *Thermoanaerobacter* e *Thermoanaerobacterium* também sejam fontes de CGTase (PINTO *et al.*, 2007; ALVES-PRADO *et al.*, 2007; BONILHA *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2009). O microrganismo *Bacillus macerans* foi o primeiro a ser identificado capaz de produzir a enzima CGTase, a qual é excretada pelas bactérias (enzima extracelular) com a finalidade de converter o amido em compostos que não poderão ser utilizados por organismos competidores, as ciclodextrinas (UITDEHAAG *et al.*, 2002).

As enzimas obtidas dos diferentes microrganismos apresentam propriedades diferentes, tais como estabilidade térmica, pH ótimo, massa molecular e capacidade de formação de CDs (MORIWAKI *et al.*, 2007).

Usualmente, a CGTase é produzida a partir de cultivos submersos utilizando o amido como fonte de carbono, uma vez que esta enzima proveniente da maioria dos microrganismos é extracelular (MORIWAKI *et al.*, 2007). Alguns relatos nos mostram que o *Bacillus cereus* NCIMB 13123 é capaz de sintetizar a CGTase a partir de outras fontes de carbono, como glicose e xilose, sendo estes melhores indutores que o amido (JAMUNA *et al.*, 1993). É importante ressaltar, no entanto, que a formação da CGTase é dependente da presença de amido, mas é inibida pela glicose (QI & ZIMMERMANN, 2005). A temperatura e o pH são os parâmetros físicos mais influentes para a produção da CGTase. No entanto, existem poucos estudos sobre o efeito do pH e da temperatura na produção de CGTases por *Bacillus circulans* (PINTO *et al.*, 2007).

Os meios de cultivo utilizados para a cultura das diferentes cepas são bastante complexos. Como substratos são utilizados diversos tipos de amido, tais como de milho, batata, mandioca, trigo e arroz. As fontes de proteína geralmente são peptona, extrato de carne e levedura, farinha de soja, e em alguns casos água de maceração de milho. Os sais minerais mais comuns são K_2HPO_4 , $MgSO_2$, $CaCl_2$, Na_2CO_3 e $CaCO_3$ (MATIOLI, 2000).

Poucos estudos relatam a produção de CGTase através de imobilização de células com alginato, encontrando-se somente linhagens de *Bacillus cereus* NCMI 13123 (JAMUNA *et al.*, 1993), *Bacillus circulans* 21783 (SASWATHI *et al.*, 1995), *Bacillus amyloliquefaciens* (ABDEL-NABY *et al.*, 1999). Segundo Vassileva *et al.* (2005) utilizando a imobilização das células de *Bacillus circulans* 21783 em matriz de agar e membrana aumenta-se a atividade e produtividade enzimática em até 4,7 vezes e 2,9 vezes respectivamente.

Pinto *et al.* (2007) relatou que *B. circulans* cresceram tanto em meio com glicose quanto com amido, mas a atividade da CGTase só foi detectada quando se utilizou o amido. Para cultura de *B. firmus* também foram testadas diferentes fontes de carbono e observou-se que estas cepas cresceram bem em quase todas as fontes de carbono, mas a atividade da CGTase foi expressa apenas quando havia amido no meio (GAWANDE *et al.*, 1999).

Nos últimos anos, muitos pesquisadores voltaram-se para a pesquisa de purificação e caracterização da ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). Em geral, são utilizadas as propriedades das proteínas para a separação, como sua carga elétrica, seu tamanho e solubilidade. Entre os diversos métodos de purificação de proteínas, os mais utilizados são cromatografia de troca iônica, gel filtração e afinidade. Muitas vezes é necessário utilizar etapas como a precipitação seletiva das proteínas com sais, ácidos ou temperaturas elevadas (SCOPES, 1994).

Para CGTase, a adsorção com amido é a técnica de purificação mais utilizada. Estudos mostram a utilização de amido de milho, mandioca, batata e trigo para realização de precipitação por afinidade (ROSSO *et al.*, 2005; MARTINS & HATTI-KAUL, 2002). Outra forma de utilização da adsorção com amido, é em cromatografia de afinidade, como utilizado por Gawande *et al.* (1999). Entretanto, os resultados obtidos por este procedimento geralmente não são satisfatórios, atingindo fator de purificação e atividade específica relativamente baixos. Para tanto, outras etapas são acrescentadas visando melhorar o rendimento da purificação, como a ultrafiltração e, principalmente, a cromatografia, que já está bem difundida nas pesquisas envolvendo purificação de CGTase. Entre os diferentes princípios de cromatografia, as mais utilizadas são: cromatografia de afinidade (Sephacryl S-200; Sephadex G-50) (MORIWAKI *et al.*, 2007), gel filtração (Sephacryl S-200; Sephadex G-50) (GAWANDE *et al.*, 1999; ALVES-PRADO *et al.*, 2007), cromatografia de interação hidrofóbica (Phenyl-Sepharose) (JEMLI *et al.*, 2007) e por troca iônica (DEAE-Cellulose; Q-Sepharose) (CAO *et al.*, 2005; CHAROENSAKDI *et al.*, 2007; ALVES-PRADO *et al.*, 2007).

1.4 *Stenotrophomonas maltophilia*

Inicialmente nomeado de *Pseudomonas maltophilia*, no início dos anos 60, por Hugh e Ryschenkow, esse microrganismo passou a fazer parte do gênero *Xanthomonas* nos anos 80. Entretanto, em 1992, Van Zyl e Steyn publicaram um estudo argumentando a inconveniência dessa transferência de gêneros, o que gerou intensas pesquisas e discussões. Então, em 1993 foi proposto um novo gênero para esse microrganismo ser enquadrado, *Stenotrophomonas* (*stenus*, estreito; *trophus*, que se alimenta; *monas*, uma unidade = uma unidade que se alimenta com pouco substrato) (PALLERONI & BRADBURY, 1993).

Definiu-se assim a descrição para o gênero *Stenotrophomonas*: gram-negativo, células não esporulantes, entre 0,5 e 1,5 μm , móveis com muitos flagelos polares, podem produzir fímbrias e as colônias são lisas, brilhantes, com margens regulares e brancas, cinzentas ou amarelo-pálidas. Esses bastonetes aeróbios têm temperatura ótima de crescimento a 35°C (PALLERONI & BRADBURY, 1993).

Stenotrophomonas maltophilia é um patógeno oportunista em pacientes imunodeprimidos, possuindo baixa virulência. Frequentemente colonizam fluidos utilizados em hospitais (soluções de irrigação e fluidos intravenosos, por exemplo) e secreções de pacientes (secreção respiratória, urina e exsudatos entre outros) (GOPALAKRISHNAN *et al.*, 1999). É considerada patógeno emergente, sendo responsável por elevada morbi-letalidade, principalmente em pacientes sob terapia imunossupressora ou antibioticoterapia prolongada e de amplo espectro. Outros fatores de risco significativos incluem: longo tempo de internação, procedimentos invasivos, idade avançada e procedimento cirúrgico prévio (ALMEIDA *et al.*, 2005).

S. maltophilia pode ser encontrada em água, plantas ou solo. É frequentemente associada com plantas e tem sido isolada de solos de trigo, aveia, pepino, sementes oleaginosas e batata. Estudos têm indicado um importante papel da espécie em biotecnologia (BERG *et al.*, 1999), como o caso de microrganismos isolados de solo na Índia serem capazes de sintetizar nanopartículas de ouro (NANGIA *et al.*, 2009). Também, foram identificados como agentes de controle biológico devido à produção de quitinase (YADAV *et al.*, 2007) e como controladores de fungos patógenos de plantas (BERG *et al.*, 1999). *S. maltophilia* ainda tem a capacidade de degradar hidrocarbonetos policíclicos. Um estudo de cepa específica desse microrganismo mostrou que ela pode ser uma ferramenta poderosa e útil para o biotratamento de efluentes e descontaminação do solo devido a um amplo espectro de atividade de dioxigenases produzidas (GUZIK *et al.*, 2009).

Entretanto, apesar dos dados acima descritos, até o momento não há nenhum relato na literatura que mostre a produção de CGTase por *Stenotrophomonas maltophilia*. Sendo assim, este trabalho tem por objetivo purificar e caracterizar a CGTase produzida por esse microrganismo.

2 RESULTADOS

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

2.1 Purification and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase produced by *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Brazilian soil

Purification and Characterization of Cyclodextrin Glycosyltransferase Produced by *Stenotrophomonas maltophilia* Isolated from Brazilian Soil

Vanessa Stalh Hermes¹, Carla Roberta Matte¹, Cristina Correia¹, Fabiane Zwirtes Cavalheiro¹, Carolina de Souza Gusatti², Simone Hickmann Flôres¹, Marco Antônio Zachia Ayub¹, Plinho Francisco Hertz^{1*}

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

2 Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

Abstract Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) is the unique enzyme able to convert starch and related sugars into cyclodextrins via cyclization reactions. Cyclodextrins can form inclusion complexes with hydrophobic molecules, which are interesting for several industrial applications. In this work, we describe the purification and characterization of CGTase from a new bacterium identified as *Stenotrophomonas maltophilia*, isolated from soil. The enzyme was purified following a four steps procedure: starch affinity precipitation, ultrafiltration, ion exchange chromatography, and hydrophobic interaction chromatography. The purified CGTase has a specific activity of 200,000 U.mg⁻¹ protein after a 2,500-fold purification. The molecular weight of the purified enzyme was estimated to be 70kDa by SDS-PAGE and the optimal temperature for enzyme activity was 60°C. The enzyme kept its activity in a pH range from 6 to 10, indicating its alkalotolerant nature. K_m and V_{max} for the pure enzyme were 2.5 mg/mL and 12.5 U/mg protein, respectively, using soluble starch as substrate.

Keywords: cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase purification, *Stenotrophomonas maltophilia*

* Corresponding Author: PF Hertz (plinho@ufrgs.br) Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa-Postal: 15095, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. Phone +55 51 33087094; Fax +55 51 33087048.

Introduction

Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) is the enzyme that converts starch molecules and related sugars into cyclodextrins (CDs) via cyclization reactions (1, 2). CDs are cyclic oligosaccharides bonded by α -1,4 links composed of six, seven, or eight glucose residues, respectively called α , β , and γ -cyclodextrins (3, 4). CDs have a spatial structure of a doughnut, in which the interior presents hydrophobic properties, while its surface is hydrophilic. Due to this structure, CDs can form a complex inclusion with many organic and inorganic lipophilic molecules (5, 6), changing their physicochemical properties such as solubility and chemical stability (7). The use of CDs is rapidly increasing in the pharmaceutical, agricultural, chemical, cosmetic, and food industries (8). CGTases also catalyze coupling and disproportionation reactions by intermolecular transglycosylation. Moreover, the enzyme possesses a weak starch hydrolyzing activity (1). Described CGTases are usually monomeric enzymes, with molecular weight around 75 kDa, presenting a sequence of amino acids with similar structure to α -amylase (GH13 family) (1, 8). CGTases can be classified into three main groups: α -CGTase, β -CGTase, and γ -CGTase, depending on the main CD that are produced. However, most CGTases convert starch mainly to β -CD in a mixture of different proportions of CDs and are inhibited by these cyclic products (3, 7, 9). The composition of the CD products obtained by CGTase synthesis reaction is determined primarily by the type of the enzyme employed and can be modified by the addition of complexing agents or organic solvents to the reaction (10).

Mainly produced by aerobic alkalophilic strains of the genus *Bacillus*, from which it was originally identified in 1903, this extracellular enzyme has been isolated from several bacteria, among them *Anaerobranca*, *Klebsiella*, *Thermococcus*, *Thermoanaerobacter*, *Mirococcus*, *Thermoanaerobacterium*, *Brevibacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, and *Thermoactinomyces* (1, 8, 9, 11, 12, 13).

The high production costs of CGTase and CDs is considered to be the limiting factor for CD applications on an industrial scale (11). As a consequence, many efforts are being made in order to improve the production, recovery, and purification of these cyclic oligosaccharides (14). For CGTase purification, adsorption on starch is the commonest used purification technique so far, with reports showing

the use of corn, cassava, potato, and wheat starch to perform affinity precipitation (15, 16). Another technique which has been reported is the use of affinity chromatography (17). However, other purification steps are usually necessary in order to improve the purity of the enzyme, such as ultrafiltration and other preparatory chromatographies (2, 5, 6, 8, 11, 17). In this research, we describe the purification and biochemical characterization procedures of a new CGTase from a bacterium isolated from the soil. So far, this is the first report of CGTase produced by *Stenotrophomonas maltophilia*.

Material and Methods

Microorganisms selection and growth conditions for CGTase production

The microorganism used in this research was screened for CGTase activity from a collection of microorganisms isolated from soil samples of soybean fields in the south of Brazil and their isolation and characterization were described by Sehnem *et al.* (2010) (18). The bacterium isolated was characterized as a gram-negative rod shaped and it was identified by 16S rDNA as *Stenotrophomonas maltophilia*. PCR products of the 16S rDNA fragment were purified using the EZ-10 Spin Column PCR Products Purification kit and sequenced on a Megabase 1000 Sequencer (GE), using the DYEnamic ET terminator kit.

For CGTase activity, the bacterium was pre-inoculated in BHI medium (HiMedia, Mumbai, India) and grown for 24 h at 37° C with shaking (150 rpm). These pre-inoculum were then seeded to a medium containing 2g/L of soluble starch (Synth, Diadema, SP, Brazil), 5 g/L of yeast extract (AES Laboratoire, Combourg, France), 5g/L of peptone (Himedia, Mumbai, India), 0.2g/L of MgSO₄ (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) and 1g/L de KH₂PO₄ (Nuclear, Diadema, SP, Brazil) at pH 9.7-10 for 18 h at 37° C with shaking (180 rpm). At the end of growth, cells were harvested and the supernatant obtained by centrifugation at 5,000 g for 15 minutes was used as crude extract of enzyme.

Protein determination was estimated according to Lowry (1951) (19) with bovine serum albumin (Sigma, St. Louis, MO, USA) as the standard.

The CGTase activity was determined as described by Pinto et al (2007) (13). One unit of CGTase activity was defined as the amount of enzyme that produced 1 μmol of $\beta\text{-CD}$ per minute.

Protein Purification

Starch affinity precipitation

The purification was carried out according to Rosso *et al.* (2005) (16) with modifications as follows. Raw corn starch and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) were added to crude enzyme extract to a final concentration of 11% and 1.6% (w/v), respectively, in a water-ice bath. The absorbed starch-enzyme complex was separated by centrifugation for 10 minutes at 5,000 *g* and washed twice with 1.6% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution at 0° C. Extraction of CGTase from the starch complex was assessed with 10mM $\beta\text{-CD}$ (Sigma, St. Louis, MO, USA) solution with shaking (240 rpm) at 40° C for 30 minutes followed by centrifugation at 3,000 *g* for 15 minutes.

Ultrafiltration

The supernatant was concentrated by ultrafiltration using Amicon Ultra 30 kDa NMWL Millipore membranes at 4,000 *g* for 20 minutes at 4° C. Proteins retained by the membranes were recovered with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0.

Chromatography

The concentrated enzyme was loaded at a flow rate of 1 mL/min on 20 mL in an ion-exchanger packed column DEAE-Sepharose (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), which had previously been equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0. To remove the unbound proteins, the matrix was washed with the same buffer until the absorbance of the eluent buffer at 280 nm reached zero; followed by a NaCl (F. Maia, Cotia, SP, Brazil) gradient (0-0.5 M) applied to release the adhered proteins. The fractions with maximal activities were pooled and dialyzed against 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.

The protein from the above step was loaded on a hydrophobic interaction Phenyl Sepharose (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) column (1x3.0 cm) pre-equilibrated with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6, with 1 M ammonium sulfate and washed with the same buffer at the flow rate of 1.5 mL/min to remove the

unbound proteins. Three milliliter fractions were collected and absorbance was monitored at 280 nm. After this procedure, 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6 with 1M ammonium sulfate gradient (0.5-0 M) was applied to release the adhered proteins.

Molecular weight determination

Molecular weight of the samples from different purification steps was estimated by SDS-PAGE according to Laemmli (1970) (20) on a vertical slab gel using 10 % (w/v) acrylamide gel at a constant voltage of 250 V for 2 h. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R®-250 (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil). The molecular weight marker used was BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen™) from 10 to 220 kDa.

Effect of pH and temperature on CGTase activity

The effect of pH e temperature was measured at pH varying from 4.0 to 10 at 60° C using sodium acetate buffer 0.1 M (pH 4-5), sodium phosphate buffer 0.1 M (pH 6-8) and glycine-NaOH buffer (pH 9-10). The effect of temperature on CGTase activity was measured at 40-80° C in sodium phosphate buffer 0.1 M, pH 6.0. The reaction was carried out using the CGTase assay procedure mentioned above.

Kinetic parameters of the purified CGTase

The kinetic parameters were determined by incubating the pure enzyme in 0.5-50 mg/mL soluble starch solution in 0.1 M sodium phosphate pH 6 at 60° C for 15 minutes. The amount of β -CD formed was estimated by phenolphthalein assay (13). The values of K_m and V_{max} were then determined using The Lineweaver-Burk plot.

Results and Discussion

Protein Purification

The crude enzymatic extract containing CGTase was purified in a 4-steps operation: starch affinity precipitation followed by ultrafiltration, DEAE-Sepharose column chromatography, and a final phenyl-sepharose column chromatography. The chromatography elution profiles are shown in figures 1 and 2. Final specific activity and purification factor are summarized in Table 1.

Enzymatic adsorption into starch has been described for the purification of CGTase but the reported yields of recovery are generally low. Martins and Hatti-Kaul, (2002) (15), using only precipitation with starch showed increased specific activity of about 42 times and a 43-fold purification for CGTase from *Bacillus agaradhaerens*. Turn, Rosso *et al.*, (2005) (16), obtained 17-fold purification and specific activity 20 times higher than the crude extract using α -CD to recover CGTase from *Bacillus circulans* adsorbed in starch. Charoensakdi *et al.*, (2007) (6), described the purification of CGTase from *Paenibacillus* sp. strain RB01, obtaining a final specific activity of 4,435 U.mg⁻¹ protein with a 29-fold purification using starch adsorption, while the extra purification step in a DEAE-cellulose chromatography, activity reached 5,504 U.mg⁻¹ protein and 36-fold purification.

In our work, starting from a specific activity of 80.6 U.mg⁻¹ protein in the crude protein suspension to 1,487.2 U.mg⁻¹ protein with a 18.5-fold purification factor after the starch precipitation. The following step, the ultrafiltration, produced an enzymatic preparation with specific activity around 100,000 U.mg⁻¹ protein, and a purification factor 1,218-fold; values higher than those reported by Gawande *et al.*, in 1999 (17) for *Bacillus firmus*, using membranes with 20 kDa cut-off, obtaining a specific activity 15 times higher than cell free supernatant and a 14-fold purification. The authors also carried out adsorption affinity chromatography and gel filtration, obtaining specific activities of 160 U.mg⁻¹ protein and a purification factor of 400 times.

In the 2 chromatography steps of ion exchanger column DEAE-Sepharose and a hydrophobic interaction chromatography (HIC) column of Phenyl-Sepharose enzyme was purified to a final purification factor reached 2,507-fold. This is the highest degree of purification so far reported in the literature for CGTase. Cao *et al.*, (2005) (5), reported an increase in specific activity from 603 U.mg⁻¹ in crude extract to 5,753 U.mg⁻¹ protein for CGTase from an alkalophilic *Bacillus* strain after ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose column chromatography, and Sepharose CL-6B column chromatography. CGTase from *Paenibacillus*

campinasensis H69-3 was purified to a final specific activity 8 times higher and 115-fold purification factor after gel filtration (Sephadex G-50) and two steps ion exchange chromatography (Q-Sepharose and Mono-Q column) (11). An other study with CGTase produced by *Paenibacillus pabuli* US132 strain, a increased of the specific activity of 175 U.mg⁻¹ protein in crude supernatant to 4,000 U.mg⁻¹ protein with a purification factor of 22.9 after HIC and starch adsorption (2). Finally, CGTase produced by *Bacillus firmus* was purified to a 47-fold factor after ammonium sulfate precipitation and specific affinity column chromatography (Sepharose 6B) (8).

Molecular weight

SDS-PAGE is presented in figure 3. Results show a main band at 70 kDa for the purified enzyme. Cao *et al.* (2005) (5), found a molecular weight of 69 kDa for CGTase from alkalophilic *Bacillus* sp, while Martins & Hatti-Kaul (2002) (15) reported an estimated molecular weight 110 kDa for CGTase of *B. agaradhaerens*. Several works reported CGTase from various strains of *Paenibacillus* as having around 65-70 kDa (2, 6, 11). All results showed a unique protein band, indicating that the enzymes are monomeric in nature.

Effect of pH and temperature on CGTase activity

The enzyme activity remained almost stable to incubation in pH 6 to 10, losing its activity below pH 4, indicating its alkalotolerant nature. With soluble starch as the substrate, the optimal temperature for enzyme activity was 60° C, but for incubation temperatures above 70° C the pure CGTase showed less than 50% of activity over this substrate.

Kinetics parameters

The K_m and V_{max} values for CGTase measured using soluble starch as substrate were 2.5 mg/mL and 12.5 U/mg protein, respectively. Gawande *et al.* (1999) (17), reported K_m of 1.21 mg/mL for CGTase of *Bacillus firmus*,. Goh *et al.*, (2009) (7), reported K_m of 2.9 mg/mL and V_{max} 3.8 U/mg protein for *Bacillus* sp. G1 CGTase. K_m is measures the affinity of the enzyme for the substrate, the lower the

K_m , higher the affinity. Therefore, affinity of CGTase from *B. firmus* for soluble starch is reportedly higher than that of CGTase from *S. maltophilia* and *Bacillus* sp. G1. Using maltodextrin as substrate, Alves-Prado *et al.* (2007) (11) reported K_m and V_{max} of 1.69 mg/mL and 4.97 U/mg, respectively, for CGTase from *Paenibacillus campinasensis*. Finally, BONILHA *et al.* (2006) (12) reported K_m of 1.77 mg/mL for *Bacillus licheniformis* CGTase (12).

Conclusions

A new CGTase isolated from *Stenotrophomonas maltophilia* was purified and characterized. The purification carried out in this research followed a 4-step procedure and resulted in a purified enzyme suspension with the highest reported specific activity for this microbial product of 200,000 U.mg⁻¹ protein after a 2,500-fold factor of purification. This enzyme has a 70 kDa molecular weight, which is compatible with the molecular size of other CGTases. Its optimal temperature for cyclization of starch was 60° C and the enzyme activity remained stable in high pH. The results obtained in this research suggest that this new CGTase has good industrial potential and further research are granted to determine its aminoacid sequence and 3D structure.

Acknowledgements

The authors wish to thank *Coordenação da Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES*, and the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS* for their financial support.

References

1. COSTA, H.; CANTO, S.; FERRAROTTI, S.; BONINO, M.B.J. (2009). Structure-function relationship in cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R. *Carbohydr Res.*, 344, 74-79.
2. JEMLI, S.; MESSAOUD, E.B.; AYADI-ZOUARI, D.; NAILI, B.; KHEMAKHEM, B.; BEJAR, S. (2007). A b-cyclodextrin glycosyltransferase from a newly isolated

- Paenibacillus pabuli* US132 strain: Purification, properties and potential use in bread-making. *Biochem. Eng. J.*, 34, 44-50.
3. MENOCCI, V.; GOULART, A.J.; ADALBERTO, P.R.; TAVANO, O.L.; MARQUES, D.P.; CONTIERO, J.; MONTI, R. (2008). Cyclodextrin glycosyltransferase production by new *Bacillus* sp. strains isolated from Brazilian soil. *Brazil. J Microbiol.*, 39, 682-688.
 4. TONKOVA, A. (1998). Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme Microbial. Technol.*, 22, 678-686.
 5. CAO, A.X.; JIN, Z.A.; WANG, X.B.; CHEN F.B. (2005). A novel cyclodextrin glycosyltransferase from an alkalophilic *Bacillus* species: purification and characterization. *Food Res. Int.*, 38, 309-314.
 6. CHAROENSAKDI, R.; IIZUKA, M.; ITO, K.; RIMPHANITCHAYAKIT, V.; LIMPASENI, T. (2007). A recombinant cyclodextrin glycosyltransferase cloned from *Paenibacillus* sp. Strain RB01 showed improved catalytic activity in coupling reaction between cyclodextrins and disaccharides. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 57, 53-59.
 7. GOH, K.M.; MAHADI, N.M.; HASSAN, O.; RAHMAN, R.N.Z.R.A.; ILLIAS, R.M. (2009). A predominant β -CGTase G1 engineered to elucidate the relationship between protein structure and product specificity. *J Mol. Catal. B: Enzym.*, 57, 270-277.
 8. MORIWAKI, C.; COSTA, G.L.; PAZETTO, R.; ZANIN, G.M.; MORAES, F.F.; PORTILHO, M.; MATIOLI, G. (2007). Production and characterization of a new cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* isolated from Brazilian soil. *Process. Biochem.*, 42, 1384-1390.
 9. RAHMAN, K.; ILLIAS, R.M.; HASSAN, O.; MAHMOOD, N.A.N.; RASHID, N.A.A. (2006). Molecular cloning of a cyclodextrin glucanotransferase gene from alkalophilic *Bacillus* sp. TS1-1 and characterization of the recombinant enzyme. *Enzyme Microbial. Technol.*, 39, 74-84.
 10. WANG, Z.; QI, Q.; WANG, P.G. (2006). Engineering of Cyclodextrin Glucanotransferase on the Cell Surface of *Saccharomyces cerevisiae* for Improved Cyclodextrin Production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 1873-1877.
 11. ALVES-PRADO, H.F.; GOMES, E.; SILVA, R. (2007). Purification and characterization of a cyclomalto-dextrin glucanotransferase from *Paenibacillus campinasensis* H69-3. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 136-140, 41-56.

12. BONILHA, P.R.M.; MENOCCI, V.; GOULART, A.J.; POLIZELI, M.L.T.M.; MONTI, R. (2006). Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus licheniformis*: optimization of production and its properties. *Braz. J. Microbiol.*, 37, 317-323.
13. PINTO, F.S.T; FLÔRES, S.H.; AYUB, M.A.Z.; HERTZ, P.F. (2007). Production of cyclodextrin glycosyltransferase by alkaliphilic *Bacillus circulans* in submerged and solid-state cultivation. *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, 30, 377-382.
14. SZERMAN, N.; SCHROH, I.; ROSSI, A.L.; ROSSO, A.M.; KRYMKIEWICZ, N.; FERRAROTTI, S.A. (2007). Cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R. *Bioresource Technol.*, 98, 2886-2891.
15. MARTINS, R.F. & HATTI-KAUL, R. (2002). A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens* isolated: purification and characterization. *Enzym. Microbia. Technol.*, 30, 116-124.
16. ROSSO, A.; FERRAROTTI, S.; MIRANDA, M.V.; KRYMKIEWICZ, N.; NUDEL, B.C.; CASCONI, O. (2005). Rapid affinity purification process for cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans*. *Biotechnol. Lett.*, 27, 1171-1175.
17. GAWANDE, B.N.; GOEL, A.; PATKAR, A.Y.; NENE, S.N. (1999). Purification and properties of a novel raw starch degrading cyclomaltodextrin glucoamylase from *Bacillus firmus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 504-509.
18. SEHNEM, N.T.; SOUZA-CRUZ, P.; PERALBA, M.C.R.; AYUB, M.A.Z. (2010). Biodegradation of tebuconazole by bacteria isolated from contaminated soils. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 45, 67-72.
19. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
20. LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Table 1. CGTase 4-steps purification results

Fraction	Volume (mL)	CGTase activity (U.mL ⁻¹)	Protein (mg.mL ⁻¹)	Specific activity (U.mg ⁻¹)	Purification factor	Recovery (%)
Supernatant	450	223.1	2.77	80.6	-	100
Starch affinity precipitation	60	974.9	0.66	1,487.2	18.5	58.3
Ultrafiltration DEAE	2.6	18,864.9	0.19	98,152.7	1,218.4	48.9
Sepharose Chromatography Phenyl	2	19,016.7	0.12	161,239.5	2,001.5	37.9
Sepharose Chromatography	0.4	21,934.8	0.11	202,014.9	2,507.7	7.9

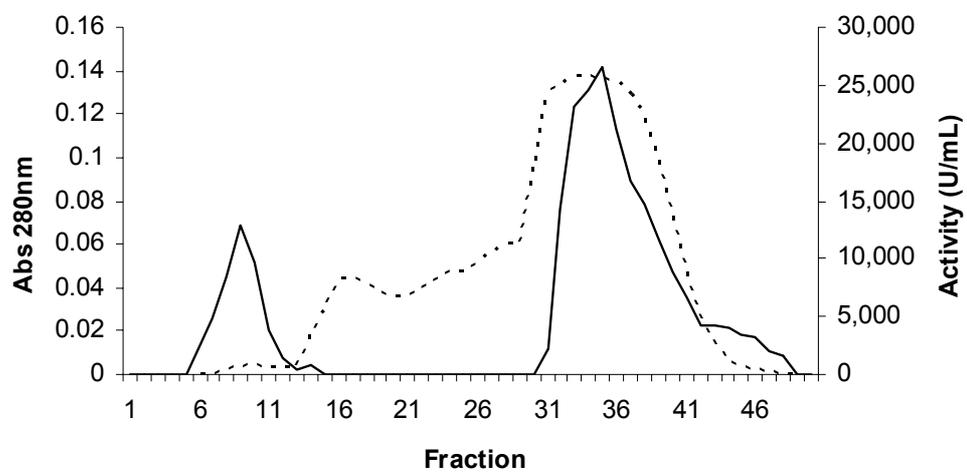


Fig.1. Chromatographic profile of CGTase purification by ion exchanger on DEAE- Sepharose column (1 x 20 cm) (— Abs 280nm - - - Activity).

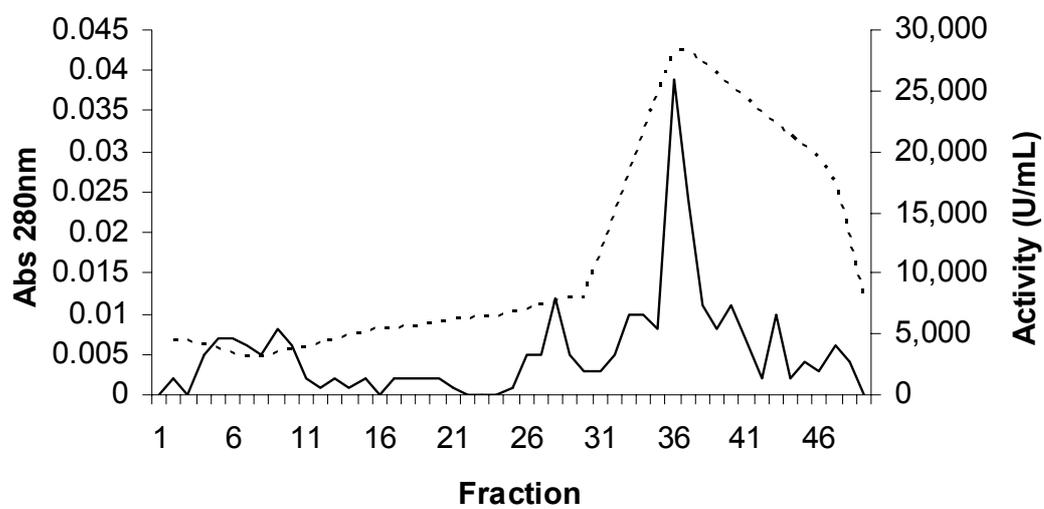


Fig.2. Chromatographic profile of CGTase purification by hydrophobic interaction on Phenyl-Sepharose column (1 x 3 cm) (— Abs 280nm - - - Activity).

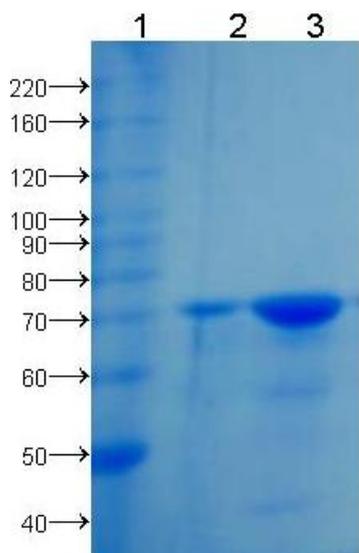


Fig 3. Determination of molecular weight on SDS-PAGE. *Lane 1*, molecular weight markers; *lane 2*, purified CGTase; *lane 3*, crude supernatant.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização do protocolo de purificação descrito neste trabalho foi definida buscando-se uma técnica prática, rápida e de baixo custo para purificação de CGTase produzida por *Bacillus circulans* (ATCC 21783), o qual vinha sendo foco de pesquisa para otimização de produção dessa enzima. Nosso objetivo inicial, dando seguimento a este trabalho de otimização, era purificar e, posteriormente, imobilizar essa CGTase. Sendo assim, optou-se pelo protocolo de purificação desenvolvido por Rosso *et al.* (2005), pois ele descrevia uma simples precipitação por adsorção em amido para CGTase também de um *B. circulans*, amostra DF 9R. Neste trabalho, para recuperação da CGTase, foi utilizada a α -CD, a qual liga-se ao sítio ativo da enzima, desligando-a do amido. Entretanto, esse oligossacarídeo cíclico possui custo elevado. Sendo assim, após a realização de alguns experimentos com a α -CD, foi testada a utilização de β -CD, a qual é financeiramente mais viável, além de ser o principal produto da reação de CGTase com amido. Também, visando melhorar o rendimento da purificação e eliminar qualquer resquício de CD que pudesse interferir na análise de atividade enzimática, foi adicionada uma etapa de ultrafiltração com membranas com poros de 30kDa, uma vez que a CGTase, geralmente, tem seu peso molecular variando de 65kDa a 110kDa.

O resumo deste trabalho pode ser observado no Apêndice A. Um fluxograma mostrando todos os passos da purificação é mostrado no Apêndice B. Os resultados dessa purificação da CGTase produzida por *B. circulans* foram divididos em duas etapas: 1) comparação da purificação utilizando α -CD com os resultados de Rosso *et al.* (2005) (tabela no Apêndice C); e 2) comparação da purificação utilizando α -CD com a purificação utilizando β -CD e ultrafiltração (tabela no Apêndice D).

A partir destes resultados, resolveu-se aplicar este protocolo de purificação, modificado para a enzima de um novo microrganismo produtor encontrado dentro da coleção de bactérias isoladas do solo. Ao identificar essa bactéria como *Stenotrophomonas maltophilia* e, verificar que não existiam relatos na literatura desse microrganismo produzindo CGTase, decidiu-se aprofundar o conhecimento sobre essa enzima. Foram acrescentadas então mais etapas de purificação, cromatografia de troca iônica e cromatografia de interação hidrofóbica, e foi analisado seu perfil em SDS-PAGE, estimando-se sua massa molecular, a qual ficou próxima aos valores relatados na literatura, 70kDa. A caracterização através dos

parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) e o efeito de pH e temperatura na atividade enzimática também mostraram valores de acordo com os reportados anteriormente para CGTase de diferentes microrganismos; K_m 2,5 mg/mL, V_{max} 12,5 U/mg proteína, temperatura ótima de atividade 60°C e pH ótimo 6-10.

Para dar continuidade ao trabalho, pretende-se averiguar dados de produção enzimática, tais como biomassa e consumo de substrato, além de mais estudos de caracterização da enzima, como possíveis inibidores da CGTase e a relação de CDs sintetizadas (α , β , γ) pela reação enzimática com o amido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABDEL-NABY, M.A.; REYAD, R.M.; ABDEL-FATTAH, A.F. Biosynthesis of Cyclodextrin Glucosyltransferase by Immobilized *Bacillus amyloliquefaciens* in Batch and Continuous Cultures. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v.5, p.1-9, 2000.

ALKAN, S; CEYLAN, H; ARSLAN, O. Bentonite-supported catalase. **J. Serb. Chem. Soc.**, v.70, p.721-726, 2005.

ALMEIDA, MTG; BERTELLI, ECP; ROSSIT, ARB; BERTOLLO, EMG; MARTINEZ, MB. Infecções Hospitalares por *Stenotrophomonas maltophilia*: aspectos clínico-epidemiológicos, microbiológicos e de resistência antimicrobiana. **Arquivos de ciências da saúde**, v.12, p.154-158, 2005.

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

ALVES-PRADO, HF ; GOMES, E ; SILVA, R. Purification and characterization of a cyclomaltodextrin gluconotransferase from *Paenibacillus campinasensis* H69-3. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.136-140. p.41-56, 2007.

ARYA, SK & SRIVASTAVA, SK. Kinetics of immobilized cyclodextrin gluconotransferase produced by *Bacillus macerans* ATCC 8244. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.507-510, 2006.

BERG, G; ROSKOT, N; SMALLA, K. Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. **J Clin Microbiol**, v.37, p.3594-3600, 1999.

BONILHA, PRM ; MENOCCI, V ; GOULART, AJ ; POLIZELI, MLTM ; MONTI, R. Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus licheniformis*: optimization of production and its properties. **Brazilian Journal of Microbiology**. V.37, p.317-323, 2006.

CAO, AX; JIN, ZA; WANG, XB; CHEN FB. A novel cyclodextrin glycosyltransferase from an alkalophilic *Bacillus* species: purification and characterization. **Food Research International**, v.38, p.309-314, 2005.

CHAROENSAKDI, R ; IIZUKA, M ; ITO, K ; RIMPHANITCHAYAKIT, V ; LIMPASENI, T. A recombinant cyclodextrin glycosyltransferase cloned from *Paenibacillus* sp. Strain RB01 showed improved catalytic activity in coupling reaction between cyclodextrins and disaccharides. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.57, p.53-59, 2007.

COSTA, H ; CANTO, S ; FERRAROTTI, S ; BONINO, M.B.J. Structure-function relationship in cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R. **Carbohydrate Research**, v.344, p.74-79, 2009.

FERRAROTTI, SA; BOLIVAR, JM; MATTEO, C; WILSON, L; GUIBAN, JM, FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization and stabilization of a cyclodextrin glycosyltransferase by covalent attachment on highly activated glyoxil-agarose supports. **Biotechnol Prog**, v.22, p.1140-1145, 2006.

FIEDLER, G.; PAJATSCH, M.; BÖCK, A. Genetics of a Novel Starch Utilisation Pathway Present in *Klebsiella oxytoca*. **Journal of Molecular Biology**, London, v.256, p.279-291, 1996.

GAWANDE, BN; GOEL, A; PATKAR, AY; NENE, SN. Purification and properties of a novel raw starch degrading cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus*. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v.51, p.504-509, 1999.

GOH, KM; MAHADI, NM; HASSAN, O; RAHMAN, RNZRA; ILLIAS, RM; A predominant β -CGTase G1 engineered to elucidate the relationship between protein structure and product specificity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.57, p.270-277, 2009.

GOPALAKRISHNAN, R; HAWLEY, HB; CZACHOR, JS; Markert, RJ; Bernstein, JM. *Stenotrophomonas maltophilia* infection and colonization in the intensive care units of two community hospitals: A study of 143 patients. **Heart Lung**, v.28, p.134-141, 1999.

GUZIK, U; GREN, I; WOJCIESZYNSKA, D; LABUZEK, S. Isolation and characterization of a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* possessing various dioxygenases for monocyclic hydrocarbon degradation. **Brazilian Journal Microbiology**, v.40, p.285-291, 2009.

JAMUNA, R; SASWWATHI, N; SHEELAR, R; RAMAKRISHINA, V. Synthesis of Cyclodextrin Glucosyl Transferase by *Bacillus cereus* for the Production of Cyclodextrins. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Berlin, v.43, n.3, p.163-176, 1993.

JEMLI, S; MESSAOUD, EB; AYADI-ZOUARI, D; NAILI, B; KHEMAKHEM, B; BEJAR, S. A β -cyclodextrin glycosyltransferase from a newly isolated *Paenibacillus pabuli* US132 strain: Purification, properties and potential use in bread-making. **Biochemical Engineering Journal**, v.34, p.44-50, 2007.

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

KATO, T & HORIKOSHI, K. Immobilized cyclodextrin glucanotransferase of an alkalophilic *Bacillus sp.* **Biotechnol Bioeng**, v.24, p.595-598, 1984.

KWEON, D; KIM, S; HAN, NS; LEE, JH; CHUNG, KM; SEO, J. immobilization of *Bacillus macerans* cyclodextrin glycosyltransferase fused with poly-lysine using cation exchanger. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, p.571-578, 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LEE, SH; SHIN, HD; LEE, YH. Evaluation of the immobilization methods for cyclodextrin glucanotransferase and characterization of its enzymatic properties. **Journal Microbiol Biotechnol**, v.1, p.54-62, 1991.

LEEMHUIS, H; KRAGH, KM; DIJKSTRA, BW; DIJKHUIZEN, L. Engineering cyclodextrin glycosyltransferase into a starch hydrolase with a high exo-specificity. **Journal of Biotchnology**, v.103, p.203-212, 2003.

LOWRY, OH; ROSERBROUGH, NJ; FARR, AL; RANDAR, RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.193, p.265-275, 1951.

MARTÍN, MT; PLOU, FJ; ALCALDE, L M; BALLESTEROS, A. Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, v.21, p.299-308, 2003.

MARTINS, RF & HATTI-KAUL, R. A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens* isolated: purification and characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, p.116-124, 2002.

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

MENOCCI, V; GOULART, AJ; ADALBERTO, PR; TAVANO, OL; MARQUES, DP; CONTIERO, J; MONTI, R. Cyclodextrin glycosyltransferase production by new *Bacillus* sp. strains isolated from Brazilian soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.682-688, 2008.

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

NANGIA, Y; WANGOO, N; GOYAL, N; SHEKHAWAT, G; SURI, CR. A novel bacterial isolate *Stenotrophomonas maltophilia* as living factory for synthesis of gold nanoparticles. **Microbial Cell Factories**, v.8:39, 2009.

PALLERONI, NJ; BRADBURY, JF. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings *et al.* 1983. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, p. 606-609, 1993.

PINTO, FST; FLÔRES, SH; AYUB, MAZ; HERTZ, PF. Production of cyclodextrin glycosyltransferase by alcaliphilic *Bacillus circulans* in submerged and solid-state cultivation. **Bioprocess Biosyst Eng**, v.30, p.377-382, 2007.

PROUSOONTORN, MH & PANTATAN, S. Production of 2-O-a-glucopyranosyl L-ascorbic acid and β -cyclodextrin using immobilized cyclodextrin glycosyltransferase. **J Incl Phenom Macrocycl Chem**, v. 57, p.39-46, 2007.

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

RAHMAN, K ; ILLIAS, RM ; HASSAN, O ; MAHMOOD, NAN ; RASHID, NAA. Molecular cloning of a cyclodextrin gluconotransferase gene from alkalophilic *Bacillus* sp. TS1-1 and characterization of the recombinant enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.74-84, 2006.

RHA, C ; LEE, D, KIM, S ; MIN, W ; BYUN, S ; KWEON, D ; HAN, NS, SEO, J. Production of cyclodextrin by poly-lysine fused *Bacillus macerans* cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on cation exchanger. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, v.34, p.39-43, 2005.

ROSSO, A ; FERRAROTI, S ; MIRANDA, MV ; KRYMKIEWICZ, N ; NUDEL, BC ; CASCONE, O. Rapid affinity purification process for cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans*. **Biotechnology Letters**, v.27, p.1171-1175, 2005.

SASWATHI, N. *et al.* Synthesis of Cyclodextrin Glycosyl Transferase by Immobilized Cells of *Bacillus circulans*. **Bioprocess Engineering**. New York, v.12, n.6, p.283-286, 1995.

SCOPES, R.K. **Protein Purification: principles and practice**. 3.ed. USA. Springer, 1994. 380p.

SOBRAL, KA ; RODRIGUES, RO ; OLIVEIRA, RD ; DEMORAES, F ; ZANIN, GM. Evaluation of supports and methods for immobilization of enzyme cyclodextrin glycosyltransferase. **Appl Biochem Biotechnol**, p.809-819, 2003.

STROKOPYTOV, B; KNEGTEL, RM; PENINGA, D; ROZEBOOM, HJ; KALK, KH, DIJKHUIZEN, L; DIJKSTRA, BW. Structure of Cyclodextrin Glycosyltransferase Complexed with a Maltononase Inhibitor at 2.6Å Resolution. Implications for Product Specificity. **Biochemistry**, The Netherlands, v.35, p.4241-4249, 1996.

SZEJTLI, J; SZENTE, L. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.65, p.115-125, 2005.

SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. **Food science & Technology**, London, v.15, p.137-142, 2004.

SZERMAN, N; SCHROH, I; ROSSI, AL; ROSSO, AM; KRYMKIEWICZ, N; FERRAROTTI, SA. Cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R. **Bioresource Technology**, v.98, p.2886-2891, 2007.

TONKOVA, A. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.22, p.678-686, 1998.

UITDEHAAG, JCM; KALK, KH; VAN DER VEEN, BA; DIJKHUIZEN, L; DIJKSTRA, BW. The Cyclization Mechanism of Cyclodextrin Glycosyltransferase as revealed by a α -Cyclodextrin-CGTase Complex at 1.8 Å Resolution. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.274, p.34868-34876, 1999.

UITDEHAAG, JCM; VAN DER VEEN, BA; DIJKHUIZEN, L; DIJKSTRA, BW. Catalytic mechanism and product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase, a prototypical transglycosylase from the α -amylase family. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.30, p.295-304, 2002.

VAN DER KAAIJ, RM; YUAN, XL; FRANKEN, A; RAM, AFJ; PUNT, PJ; VAN DER MAAREL, MJEC; DIJKHUIZEN, L. Two Novel, Putatively Cell Wall-Associated and Glycosylphosphatidylinositol-Anchored α -Glucanotransferase Enzymes of *Aspergillus niger*. **Eukaryotic Cell**, v.6, p. 1178-1188, 2007.

VAN DER MAAREL, MJEC; VAN DER VEEN, BA; UITDEHAAG, JCM; LEEMHUIS, H; DIJKHUIZEN, L. Properties and Applications of Starch-Converting Enzymes of the α -Amylase Family. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.94, p.137-155, 2002.

VAN DER VEEN, BA; UITDEHAAG, JCM; DIJKSTRA, BW; DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1543, p.336-360, 2000a.

VAN DER VEEN, BA; UITDEHAAG, JCM; PENNINGA, D; ALEBEEK, GWM; SMITH, LM; DIJKSTRA, BW; DIJKHUIZEN, L. Rational design of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 to increase α -cyclodextrin production. **Journal of Molecular Biology**, London, v.296, p.1027-1038, 2000b.

VASSILEVA, A; BESCHKOV, V; IVANOVA V; TONKOVA A. Continuous Cyclodextrin Glucanotransferase Production by Free and Immobilized Cells of *Bacillus circulans* ATCC 21783 in Bioreactors. **Process Biochemistry**. London, v.40, p.3290-3295, 2005.

WANG, Z; QI, Q; WANG, PG. Engineering of Cyclodextrin Glucanotransferase on the Cell Surface of *Saccharomyces cerevisiae* for Improved Cyclodextrin Production. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.1873-1877, 2006.

YADAV, E; PATHAK, DV; SHARMA, SK; KUMAR, M; SHARMA, PK. Isolation and characterization of mutants of *Pseudomonas maltophilia* PM-4 altered in chitinolytic activity and antagonistic activity against root rot pathogens of clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba*). **Indian Journal of Microbiology**, v.47, p.64-71, 2007.

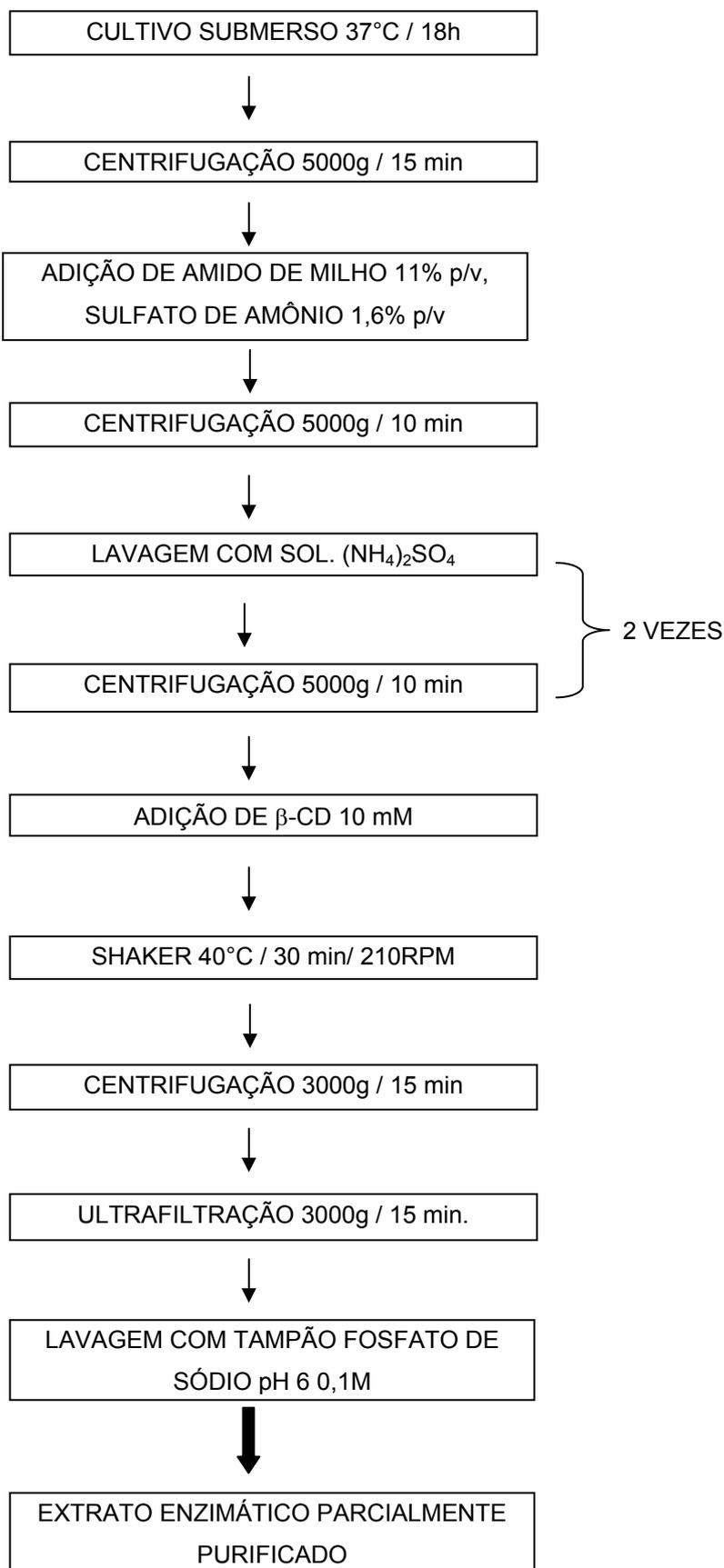
APÊNDICES

Apêndice A – resumo enviado ao IX Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas (SHEB), Maringá, PR, Brasil; 2009.

Purificação de ciclodextrina glicosiltransferase produzida por *Bacillus circulans*

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) pertence à família das α -amilases, sendo a exoenzima com menor atividade hidrolítica dentro deste grupo. É a única enzima capaz de produzir, através da reação de ciclização, ciclodextrinas (CDs) a partir do amido. Este produto é a base da aplicação industrial da CGTase por possuir a capacidade de encapsular outras moléculas (hidrofóbicas) formando complexos de inclusão. Este trabalho teve por objetivo aperfeiçoar as técnicas de purificação por afinidade da CGTase produzida pelo *Bacillus circulans*, comparando com protocolo de referência. Para obter um extrato enzimático parcialmente purificado, seguiu-se o protocolo de Rosso *et al.* (2005), ao qual foi adicionada a etapa de ultrafiltração visando a otimização do processo de purificação. Além disso, foi testada a β - ciclodextrina em substituição à α - ciclodextrina para desligar, por competição, o amido do sítio ativo da enzima. Os resultados obtidos, comparando atividade específica antes da purificação (Ativ. Específica AP) e pós-purificação (Ativ. Específica PP), fator de purificação e rendimento com técnica de referência, mostraram maior atividade específica e fator de purificação e menor rendimento. Já comparando as purificações utilizando α -CD e β -CD, a atividade específica foi menor, entretanto o fator de purificação e o rendimento apresentaram valores maiores. Esses resultados mostram que a adição da etapa de ultrafiltração no processo de purificação, além de aumentar mais de 600 vezes a atividade específica da enzima purificada, alcançou um fator de purificação 20 vezes maior. Já em relação ao uso da β -CD, os resultados demonstram que ela pode ser utilizada como bom substituinte da α -CD no processo de purificação, melhorando os valores do fator de purificação e rendimento, além de reduzir os custos.

Apêndice B – Fluxograma de purificação apresentado em pôster no IX Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas (SHEB), Maringá, PR, Brasil; 2009



Apêndice C - Tabela comparativa de purificação com o protocolo de referência

	Atividade específica AP	Atividade específica PP	Fator de purificação	Rendimento (%)
Rosso <i>et al.</i> (2005)	3,6	64	17	64
Otimizado	88,6	42539,9	378,5	10,7

Apêndice D - Tabela comparativa de purificações da CGTase de *Bacillus circulans*

	Atividade específica AP	Atividade específica PP	Fator de purificação	Rendimento (%)
a-CD	88,6	42539,9	378,5	10,7
b-CD		32455,1	429,9	12,3