

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**GENÔMICA COMPARATIVA DA CICLODEXTRINA
GLICOSILTRANSFERASE E IMOBILIZAÇÃO DO *Bacillus
trypoxylicola* SM-02 PARA A PRODUÇÃO DA ENZIMA**

TAÍS TEIXEIRA DAS NEVES

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO- 2018**

**GENÔMICA COMPARATIVA DA CICLODEXTRINA
GLICOSILTRANSFERASE E IMOBILIZAÇÃO DO *Bacillus
trypoxylicola* SM-02 PARA A PRODUÇÃO DA ENZIMA**

TAÍS TEIXEIRA DAS NEVES

Bióloga (Licenciada)

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2016.

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientadora: Dr^a. Márcia Luciana Cazetta

Co-orientador: Dr. Phellippe Arthur Santos Marbach

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

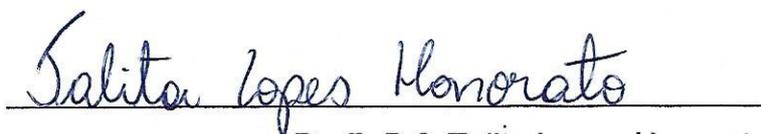
FEVEREIRO – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO

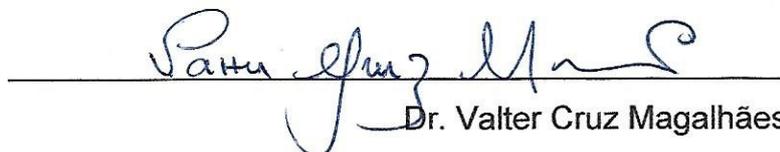
COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
Taís Teixeira das Neves



Prof^a. Dr^a. Márcia Luciana Cazetta
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)
(Orientadora)



Prof^a. Dr^a. Talita Lopes Honorato
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)



Dr. Valter Cruz Magalhães
Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)

“Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola em _____ conferindo o grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola em _____.”

FICHA CATALOGRÁFICA

N518g	<p>Neves, Tais Teixeira das. Genômica comparativa da ciclodextrina glicosiltransferase e imobilização do <i>Bacillus tryoxylicola</i> SM-02 para a produção da enzima / Tais Teixeira das Neves. – Cruz das Almas, BA, 2018. 89f.; il.</p> <p>Orientadora: Marcia Luciana Cazetta. Coorientador: Phellippe Arthur Santos Marbach.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Microbiologia – Enzimas. 2.Microorganismos – Genética microbiana. 3.Fermentação – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 579</p>
-------	--

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas – UFRB.
Responsável pela Elaboração – Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário – CRB5 / 1615). Os dados para catalogação foram enviados pela usuária via formulário eletrônico.

À Maria José Teixeira dos Santos, minha mãe e meus sobrinhos Felipe e Caique.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida, por ter me sustentado nos momentos de dificuldades.

À minha orientadora Profa. Dra. Márcia Luciana Cazetta, por ter aceitado o desafio de me guiar durante esses dois anos nos caminhos obscuros do mestrado. Exemplo de profissional, sempre disponível para ajudar qualquer pessoa em qualquer situação...uma orientadora que realmente orienta. Muito obrigada!

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Phellippe Arthur Santos Marbach, pelo seu entusiasmo e comprometimento com as pesquisas, pelos “puxões de orelha” também.

Às meninas do Laboratório de Bioquímica, Adriele e Jucilene, pelas trocas de experiências, pelas caronas, conversas, finais de semana no laboratório, congresso, passeios, por se preocupar comigo e acreditar sempre que tudo daria certo.

Aos meus amigos do mestrado da turma de 2016.1, Tâmara, Léo e Adriana, mesmo com tantos problemas que o semestre nos trouxe, acredito que a nossa amizade permanecerá para sempre. E não poderia esquecer de Anelita, mais do que uma amiga, uma irmã que o mestrado me presenteou, foram tantos momentos juntas, alegrias, tristezas, ansiedades, choros, sorrisos, finais de semanas de estudos, enfim cada uma irá seguir o seu caminho, mas com certeza sempre iremos nos encontrar pode ser no Recanto, no Totta, no Açáí, no Milkshake, em Vitória da Conquista ou em Cruz City (rsrsrs). Sou muito grata a Deus por ter conhecido você!

À minha mãe por sempre acreditar em meu potencial, e jamais ter me deixado desistir. Às minhas irmãs Renata e Rute pelo companheirismo, ao meu cunhado Riva pelas caronas, aos meus sobrinhos Felipe e Caique que me impulsionam a buscar sempre o melhor a cada dia.

Aos meus amigos da Sociedade Espírita Verdade e Vida, em especial aos meninos da Juventude Espírita Mensageiros da Paz, que sempre acreditaram em mim, e me ensinaram que na vida sempre tem alguém disposto a nos ajudar, que ainda existem pessoas boas no mundo e que os ensinamentos do mestre Jesus devem ser sempre seguidos para nos tornarmos pessoas melhores, e como de costume a frase “muitos são os chamados e poucos são os escolhidos” nunca fez tanto sentido em minha vida. Gratidão!

À Profa. Maria Gardenny R. Pimenta pela orientação e paciência durante o estágio à docência e a Profa. Talita Lopes Honorato pela disponibilidade em participar das minhas bancas de seminário e dissertação e pelas dicas para realização do trabalho.

Aos estagiários do LABEV pelas contribuições na realização das análises filogenéticas.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação de Microbiologia Agrícola – PPGMA-UFRB/EMBRAPA pelas contribuições para a minha formação acadêmica e profissional.

À Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Pessoal de nível superior – CAPES, pela concessão da bolsa.

À todos os familiares e amigos que não foram citados aqui, mas que de alguma forma contribuíram para a conclusão de mais uma etapa em minha vida.

“Porque para Deus nada é impossível”.

Lucas 1:37

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO GERAL1

CAPÍTULO 1

AS CICLODEXTRINAS4

ENZIMAS AMIOLÍTICAS8

Ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) 10

Microrganismos produtores de CGTase 14

A bioinformática e a genômica comparativa16

IMOBILIZAÇÃO CELULAR19

REFERÊNCIAS 24

CAPÍTULO 2

Resumo34

Abstract36

1. Introdução36

2. Material e métodos 39

2.1 Material biológico 41

2.2 Genômica comparativa e Análises filogenéticas 42

2.3 Sequenciamento do gene que codifica a CGTase de *Bacillus tryoxylicola* SM-02 41

2.4 Procedimento experimental 43

2.4.1 Meios de cultura para crescimento bacteriano e fermentação 43

2.4.2 Imobilização do microrganismo em alginato de cálcio 44

2.4.3 Produção de CGTase 45

2.4.4 Determinação da atividade enzimática46

2.5 Planejamento experimental 47

3. Resultados	49
3.1 <i>Genômica comparativa</i>	49
3.2 <i>Sequenciamento do gene que codifica a CGTase de Bacillus tryoxylicola SM02</i>	52
3.3 <i>Filogenia molecular das CGTases procarióticas</i>	53
3.4 <i>Produção da CGTase</i>	55
3.5 <i>Otimização da produção de CGTase utilizando DCCR 2²</i>	57
4. Discussão	59
4.1 <i>Genômica comparativa</i>	59
4.2 <i>Produção de CGTase</i>	63
Considerações finais	68
Agradecimentos	68
Referências	69

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

- Tabela 1.** Microrganismos produtores de CGTase e caracterizados quanto ao tipo de enzima em α , β e γ -CGTase..... 15
- Tabela 2.** Função dos algoritmos BLAST, encontrados no NCBI..... 18
- Tabela 3.** Estudos que utilizaram microrganismos imobilizados em alginato de cálcio para produção de compostos de interesse industrial..... 23

Capítulo 2

- Tabela 1:** Lista de *primers* utilizados para amplificar o gene da CGTase de *Bacillus trypoxylicola* SM-02..... 42
- Tabela 2.** Volumes e concentrações das soluções usadas nas reações de PCR.....43
- Tabela 3.** Composição dos meios utilizados para a produção de enzima CGTase, utilizando microrganismo imobilizado.....44
- Tabela 4.** Delineamento composto central rotacional 2^2 para produção da enzima CGTase por *Bacillus trypoxylicola* SM-02 usando farinha de mandioca e milhocina como variáveis independentes em fermentação submersa.....48
- Tabela 5.** Diversidade de procariotos com genoma totalmente sequenciado, amostrados no estudo. Dados recuperados do banco de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), atualizados em janeiro de 2017..... 50
- Tabela 6.** Distribuição das regiões conservadas da enzima CGTase, nos gêneros/espécies amostrados..... 51
- Tabela 7.** Genômica comparativa dos procariotos com genoma completo e incompleto..... 52
- Tabela 8.** Matriz do planejamento experimental da produção enzimática por *Bacillus trypoxylicola* SM-02 imobilizado em alginato de cálcio, em fermentação

submersa e valores das variáveis independentes usados no DCCR (milhocina e farinha de mandioca)..... 58

Tabela 9. Análise de variância (ANOVA) para a produção de CGTase por *Bacillus tryoxylicola* SM-02 imobilizado, em fermentação submersa utilizando manipueira, farinha de mandioca e milhocina como substratos..... 59

Tabela 10. Produção da enzima CGTase por diferentes cepas de *Bacillus* livres e imobilizadas..... 66

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Estrutura e propriedade da α -, β -, e γ -Ciclodextrina.....	5
Figura 2. Complexação de moléculas.....	6
Figura 3. Ação das enzimas envolvidas na degradação de amido.....	9
Figura 4. Estrutura da CGTase, mostrando os cinco domínios.....	11
Figura 5. Tipos de reações catalisadas pela CGTase.	13
Figura 6. Tipos de imobilização.....	20
Figura 7. (A) Estrutura da molécula de alginato. (B) Método de imobilização baseado na gelificação ionotrópica.....	22

Capítulo 2

Figura 1. Desenho esquemático dos domínios conservados da enzima CGTase. A) com cinco domínios e B) com quatro domínios.....	40
Figura 2 - Árvore filogenética da enzima CGTase. Letras em caixa baixa no início da cepa indica o tipo de CGTase produzida: a- α -CGTase; b- β -CGTase; g- γ -CGTase.....	54
Figura 3. Produção da enzima CGTase por fermentação submersa em diferentes substratos. Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, letras diferentes indicam diferenças estatísticas.....	55
Figura 4. Atividade enzimática (U/mL) para cada meio testado, utilizando células do <i>Bacillus trypoxylicola</i> SM-02 imobilizadas.....	56
Figura 5. Otimização do tempo de produção da CGTase pelo <i>Bacillus trypoxylicola</i> SM-02 imobilizado em alginato de cálcio.....	57
Figura 6. Relação filogenética entre o <i>Bacillus</i> sp. SM-02 e outras espécies do gênero <i>Bacillus</i> , utilizando o rRNA 16S.....	62

RESUMO

NEVES, T. T. GENÔMICA COMPARATIVA DA CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE E IMOBILIZAÇÃO DO *Bacillus trypoxylicola* SM-02 PARA A PRODUÇÃO DA ENZIMA.

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) é uma enzima extracelular que pertence à maior família de α -amilases de glicosídeos hidrolases, produzida exclusivamente por microrganismos e tem a capacidade de converter o amido, e moléculas relacionadas, em ciclodextrinas (CDs). Por ser capaz de formar complexos de inclusão com diversas moléculas, as CDs são empregadas nas indústrias farmacêutica, alimentar, têxtil e de cosméticos, atuando na solubilidade de moléculas, estabilização de substâncias voláteis, mascaramento do sabor indesejável, entre outros. O objetivo deste trabalho foi analisar a distribuição do gene que codifica homólogos da enzima CGTase nos táxons procarióticos, assim como avaliar a produção desta enzima utilizando o *Bacillus trypoxylicola* SM-02, imobilizado em alginato de cálcio 2%. A busca por genes que codificam homólogos da CGTase nos genomas procarióticos foi realizada nos bancos de dados NCBI e CAZY. O gene que codifica a CGTase em *B. trypoxylicola* SM-02 foi amplificado por reações de PCRs. A enzima foi produzida em fermentação submersa utilizando araruta, casca e farinha de mandioca para o microrganismo livre e farinha de mandioca para o microrganismo imobilizado. Os resultados evidenciaram presença da CGTase em espécies dos domínios Archae e Bacteria, em especial para as bactérias Gram-positivas do gênero *Bacillus*. *B. trypoxylicola* SM-02 agrupou-se com espécies que produz β -CGTase, sugerindo que este também produza este tipo de enzima. A farinha de mandioca foi a melhor fonte de amido para produção da enzima utilizando o microrganismo livre, com atividade enzimática de 370,88 U/ μ mol. O meio de cultivo composto por farinha de mandioca, milhocina e manipueira se destacou na produção de CGTase utilizando o microrganismo imobilizado, atingindo uma atividade enzimática de até 166,64 U/ μ mol.

Palavras-chave: Bactéria, fermentação, distribuição evolutiva.

ABSTRACT

NEVES, T. T. COMPARATIVE GENOMICS OF CYCLODEXTRIN GLICOSYLTRANSFERASE AND IMMOBILIZATION OF *Bacillus trypoxylicola* SM-02 FOR ENZYME PRODUCTION.

Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) is an extracellular enzyme that belongs to the largest α -amylases family of glycoside hydrolases, is exclusively produced by microorganisms and has the ability to convert starch and related molecules into cyclodextrins (CDs). By being able to form an inclusion complex with several molecules, the CDs are used in the pharmaceutical, food, textile and cosmetic industries, acting on solubility of molecules, stabilization of volatile substances, masking of undesirable taste, among others. The objective of this work was to analyze the distribution of the gene encoding CGTase enzyme homologues in prokaryotic taxa, as well as to evaluate the production of this enzyme using *Bacillus trypoxylicola* SM-02, immobilized in calcium alginate 2%. The search for genes encoding CGTase homologues in the prokaryotic genomes was performed in the NCBI and CAZY databases. The gene encoding CGTase in *Bacillus* sp. SM02 was amplified through the PCR reactions. The enzyme was produced in submerged fermentation using arrowroot, peel and cassava flour for the free microorganism and cassava flour for the immobilized microorganism. The results evidenced the presence of CGTase in species of the Archae and Bacteria domains, especially for Gram positive bacteria of the genus *Bacillus*. The *B. trypoxylicola* SM02 was grouped with species that produce β CGTase, suggesting that it also produces this type of enzyme. Cassava flour was the best source of starch to produce the enzyme using the free microorganism, with enzymatic activity of 370.88 U / μ mol. The culture medium composed of cassava flour, steep corn liquor and manipueira highlighted in CGTase production using the immobilized microorganism, reaching an enzymatic activity of up to 166.64 U / μ mol.

Keywords: Bacteria, fermentation, evolutionary distribution.

INTRODUÇÃO GERAL

Ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19), é uma enzima que pertence à maior família das α -amilases de glicosídeo hidrolases (família 13). É formada por cinco domínios (A-E). Os domínios A e B constituem o domínio catalítico, enquanto C e E estão envolvidos na ligação com o substrato, e o domínio D tem função desconhecida (LEEMIHUS; KELLY; DIJKHUIZEN, 2010). A CGTase é produzida exclusivamente por microrganismos, sendo sua produção descrita pela primeira vez por *Bacillus macerans* em 1974. Porém, apesar da produção desta enzima ser mais comum para espécies do gênero *Bacillus*, há relatos na literatura de sua produção por outros gêneros como *Paenibacillus*, *Klebsiella*, *Thermoanaerobacterium*, *Thermoanaerobacter* e *Actinomyces* spp (HAN et al., 2014).

Analisar a distribuição desses domínios nos diferentes grupos procarióticos é importante para conhecer a história evolutiva da CGTase nos diferentes táxons. A genômica comparativa é utilizada para comparar dois ou mais genomas e identificar semelhanças e diferenças entre as espécies ou cepas da mesma espécie (WEI et al., 2002).

A CGTase é a única enzima capaz de converter o amido, e moléculas relacionadas, em ciclodextrinas (CDs). Essa reação ocorre por meio da transglicosilação intramolecular (ciclização). Além de ciclização, a CGTase pode realizar desproporcionamento, acoplamento e hidrólise (VAN DER VEEN et al., 2000). Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, formados a partir da digestão microbiana do amido, os mais conhecidos apresentam 6, 7 ou 8 monômeros de glicose, unidos por ligações glicosídicas α -1,4, sendo denominados α , β , e γ -CD, respectivamente. A CD é uma molécula anfipática, pois possui uma cavidade hidrofóbica e uma superfície hidrofílica capaz de formar complexos de inclusão com pequenas moléculas sólidas, líquidas ou gasosas, alterando as propriedades biológicas, físicas e químicas dessas moléculas (SAOKHAM e LOFTSSON, 2017).

A CGTase apesar de produzir uma mistura dos três tipos de CDs, pode ser classificada de acordo com a maior produção de uma determinada CD, em α -CGTase, β -CGTase e γ -CGTase. Grande parte dos trabalhos encontrados na literatura relatam a produção da β -CGTase, que produz majoritariamente β -CD e menores quantidades de α -CD e γ -CD. Microrganismos produtores de γ -CGTase são raros, porém a γ -CD é a mais desejada devido à sua maior cavidade e maior solubilidade em água, e por isso, estudos relacionados à estrutura da proteína e especificidade do produto foram realizadas a fim de identificar a característica responsável pela produção de um tipo específico de CGTase (YAMAMOTO et al., 2000; GOH et al., 2009, LI et al., 2014b; WANG; DUAN; WU, 2016).

O interesse industrial pelas CDs está justamente na capacidade que elas possuem em formar complexos de inclusão, e assim extrair substâncias indesejáveis ou proteger aquelas desejáveis (LI et al., 2016; SCHOFFER et al., 2017). Atualmente a produção anual de CD é de mais de 10.000 toneladas, sendo que aproximadamente 30% é utilizada em produtos farmacêuticos, cerca de 20% em produtos alimentares e 50% em diversos produtos de consumo (JANSOOK, OGAWA; LOFTSSON, 2018).

A produção de CD e CGTase em escala comercial é ainda um processo custoso, principalmente pela utilização de meios de cultura convencionais. Nesse sentido estudos (IBRAHIM et al., 2005; SAKINAH et al., 2014; COELHO et al., 2016) foram realizados com o objetivo de reduzir os custos e aumentar os níveis de produção desses produtos, utilizando fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo como os resíduos da indústria de mandioca e do milho.

Ainda com o objetivo de baratear a produção, nos últimos anos diversos estudos foram realizados com o propósito de otimizar a produção da CGTase, utilizando o microrganismo imobilizado em suportes variados (ABDEL-NABY et al., 2000; MAZZER et al., 2008; PAZZETTO et al., 2011; ABDEL-NABY et al., 2011; MORIWAKI et al., 2014). A imobilização consiste em confinar células vivas ou proteínas em um suporte natural ou artificial, mantendo suas

atividades catalíticas preservadas (OLIVEIRA et al., 2011). Com a imobilização de células, importantes vantagens são observadas como, facilidade na separação de células do produto final e reutilização das células por vários ciclos, reduzindo assim os custos de produção (DUARTE et al., 2013)

O objetivo deste trabalho foi analisar a distribuição do gene que codifica a enzima CGTase nos táxons procarióticos, assim como avaliar a produção desta enzima utilizando o *Bacillus tryoxylicola* SM-02, imobilizado em alginato de cálcio.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

AS CICLODEXTRINAS

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, naturais, não redutores, solúveis em água, formados pela digestão bacteriana do amido, amilose e outros polissacarídeos relacionados. CDs consistem em unidades de D-glicanopiranoses unidas por ligações glicosídicas α -1,4. As mais conhecidas apresentam seis, sete ou oito monômeros de glicose, sendo denominadas α , β , e γ -CD, respectivamente (GOO; HWANG; PARK, 2014; SAOKHAM e LOFTSSON, 2017).

Estruturalmente, as CDs se apresentam em forma de cones truncados (Figura 1), onde a face mais larga é formada pelas hidroxilas secundárias e a face mais estreita pelas hidroxilas primárias. Os diâmetros das cavidades superior e inferior das CDs são de 4,7 e 5,3 Å para α -CD, 6,0 e 6,5 Å para β -CD e 7,5 e 8,3 Å para a γ -CD. Além disso, as moléculas de CDs possuem caráter hidrofóbico na parte interna e hidrofílico na parte externa (VENTURINI

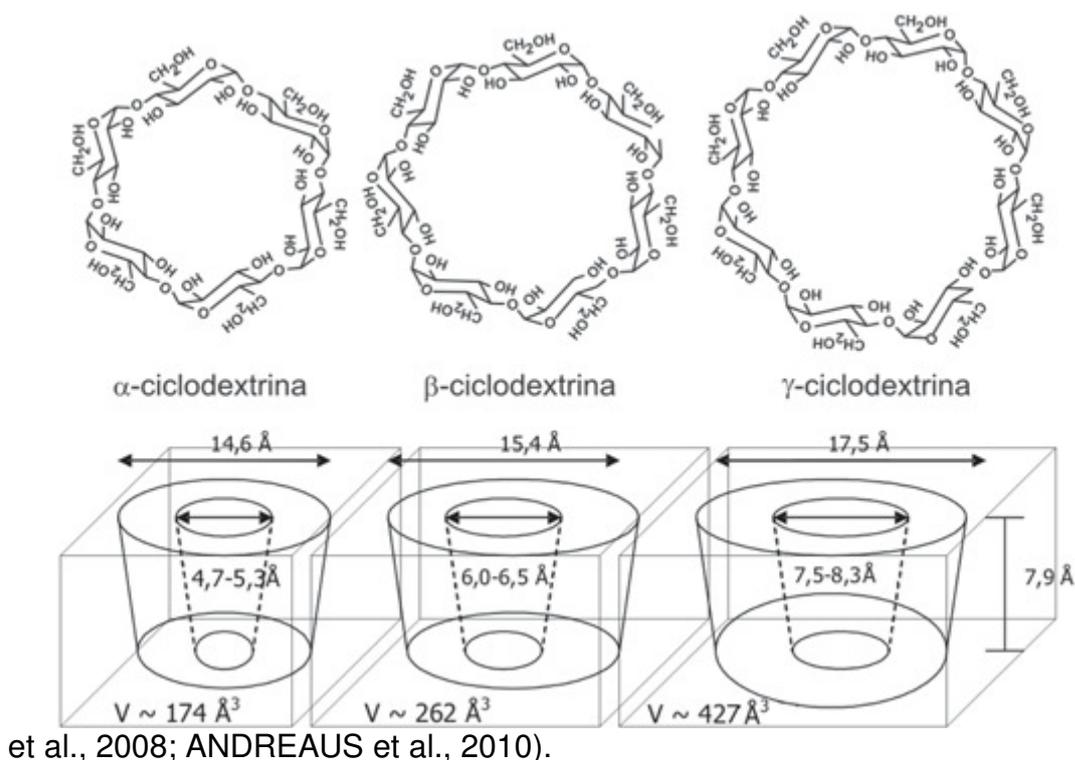


Figura 1. Estrutura e propriedade da α -, β -, e γ -Ciclodextrina. Fonte: Venturini et al. (2008).

As CDs podem abrigar seletivamente uma vasta gama de moléculas em sua cavidade hidrofóbica, formando assim, os chamados complexos de inclusão. Moléculas orgânicas e inorgânicas quando complexadas, tem suas propriedades físicas, químicas e biológicas alteradas, tais como solubilidade e estabilidade como, por exemplo, estabilização de substâncias sensíveis à luz, calor e oxidação, solubilidade em água, mascaramento de odores, cores e sabores, entre outros (MORIWAKI et al., 2009; COSTA et al., 2015).

Os principais critérios para que ocorra a formação de complexos de inclusão são o tamanho e a polaridade da molécula a ser encapsulada (Figura 2). Com base nas dimensões da cavidade, a α -CD forma tipicamente complexos de inclusão com moléculas de baixo peso molecular ou compostos de cadeias laterais alifáticas e derivados do benzeno, a β -CD é capaz de formar complexos com moléculas aromáticas e heterociclos, enquanto que a γ -CD é capaz de acomodar moléculas maiores como macrociclos e esteroides (DELL VALLE, 2004; LI et al., 2014a).

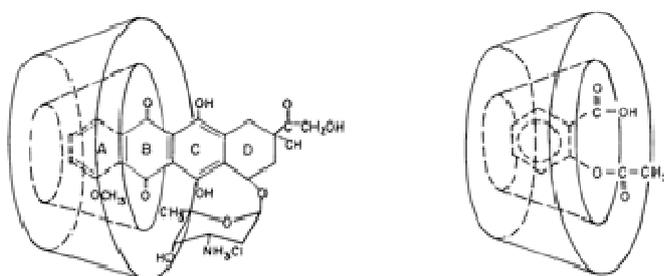


Figura 2. Complexação de moléculas. Fonte: Loftsson e Brewster (1996).

Os três tipos de CDs são termicamente estáveis (até pelo menos 200 °C) e também estáveis em soluções alcalinas (pH<14) ou soluções moderadamente ácidas (pH>3). São estáveis na presença de glicoamilases ou β -amilases, mas podem ser hidrolisadas por algumas α -amilases. Embora as α -, β - e γ -CDs sejam solúveis em água, a solubilidade das mesmas segue uma tendência irregular. A α -CD tem uma solubilidade moderada em água que é quase oito vezes maior que a da β -CD, mas aproximadamente 1,6 vezes menor que a da γ -CD a 25 °C (LI et al., 2014). A partir desses resultados é possível inferir que a γ -CD tem propriedades únicas, como uma maior cavidade

hidrofóbica, maior solubilidade em água e maior biodisponibilidade (GOO; HWANG; PARK, 2014).

As aplicações das CDs estão relacionadas com a habilidade que esta molécula possui em extrair, estabilizar, emulsificar e encapsular componentes específicos do meio onde são introduzidas. CDs podem ser atualmente encontradas em medicamentos comercializados em todo o mundo, bem como em inúmeros produtos alimentares, de higiene, cosméticos e têxteis.

Na indústria de alimentos e bebidas as CDs são utilizadas para proteger os componentes alimentares lipofílicos que são sensíveis ao oxigênio e à degradação induzida por luz ou calor, para solubilizar corantes e vitaminas alimentares, estabilizar fragrâncias, sabores, vitaminas e óleos essenciais contra mudanças indesejadas, suprimir odores ou gostos desagradáveis e liberar de forma controlada determinados constituintes de alimentos (ASTRAY et al., 2009).

As CDs são ferramentas importantes em formulações farmacêuticas para melhorar a solubilidade aparente, taxa de dissolução e estabilidade química de drogas pouco solúveis em água, além de reduzir a irritação local de alguns fármacos e da liberação controlada de medicamentos nas células (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007; KURKOV; LOFTSSON, 2013). No setor de cosméticos as principais aplicações das CDs estão na estabilização e controle de odor, melhoria do processo após a conversão de um ingrediente líquido em uma forma sólida, proteção e entrega de sabor em batons, solubilidade em água e estabilidade térmica melhorada de óleos. As composições baseadas em CD também são usadas em vários produtos cosméticos para reduzir odores corporais (DELL VALLE, 2004).

Na indústria têxtil as CDs podem ser utilizadas no tingimento, para complexar corantes, reduzindo a perda em águas residuais, na lavagem das roupas, atuando na redução dos surfactantes residuais, e no acabamento pela da formação de complexos como, CD-fragrâncias permitindo que o tecido permaneça com determinada fragrância por mais tempo ou CD-odores aprisionando odores desagradáveis (suor) que serão eliminados durante a

lavagem do tecido, CD-agentes antimicrobianos que geralmente consistem em componentes antimicrobianos ativos, que são incorporados na superfície ou dentro das fibras, que matam microrganismos quando entram em contato com eles (BHASKARA-AMRIT; AGRAWAL; WARMOESKERKEN, 2011). Os têxteis médicos com CDs podem ser incluídos dentro do corpo, como dispositivos específicos, no caso de próteses vasculares, ou em contato direto com a parte externa da derme sob a forma de: i) pijamas, que compreendem uma camiseta e calça com propriedades antialérgicas; ii) itens de vestuário de malha: meias, cotoveleiras, joelheiras com propriedades antipsoriáticas; cueca antimicótica; iii) outras roupas íntimas com ação antibacteriana, anti-infecciosa (RADU; PARTENI; OCHIUZ, 2016).

Na área ambiental as CDs desempenham papel importante na solubilização de contaminantes orgânicos, na remoção de poluentes orgânicos e metais pesados do solo, da água e da atmosfera. Usando CDs, substâncias altamente tóxicas podem ser removidas do efluente industrial pela formação do complexo de inclusão. Na química analítica, CDs são amplamente utilizadas em separações devido à sua capacidade de discriminar grupos funcionais, homólogos e enantiômeros. Além disso, as CDs também são utilizadas em cromatografia líquida de alta performance (HPLC) como fases estacionárias ligadas ao suporte sólido ou como aditivos da fase móvel e na eletroforese capilar atua na separação de compostos quirais (SINGH; SHARMA; BANERJEE, 2002).

Atualmente a produção anual de CD é de mais de 10.000 toneladas das quais cerca de 70% são β CD, 15% de α CD, e 5% de γ CD. (JANSOOK, OGAWA, LOFTSSON, 2018). Segundo Li et al. (2014) a quota de mercado da α -CD é muito menor do que a da β -CD devido ao seu baixo rendimento de produção e elevado preço. E de acordo com Lin et al. (2016), a γ -CD é mais cara do que α - e β -CD devido à sua menor produção.

ENZIMAS AMILOLÍTICAS

O amido faz parte do grupo dos biopolímeros mais abundantes na Terra. Por ser fonte de energia, é utilizado por uma grande variedade de

microrganismos. Uma série de enzimas que degradam o amido, com diferentes especificidades de reação, evoluiu nos microrganismos produzindo uma ampla variedade de produtos. Muitas enzimas são aplicadas no processamento industrial, seja para a modificação de moléculas de amido ou para a produção de produtos específicos da sua degradação (QI; ZIMMERMANN, 2005).

A degradação do amido (molécula complexa) em açúcares (moléculas simples) é realizada por enzimas amilolíticas (Figura 3), e podem ser classificadas em quatro grupos (i) endoamilases, (ii) exoamilases, (iii) enzimas desramificadoras e (iv) transferases. As enzimas desramificadoras atuam na hidrólise de ligações α (1-6), como por exemplo a isoamilase, que hidrolisa ligações α (1-6) em amilopectina e dextrina ramificada (VAN DER VEEN et al., 2000).

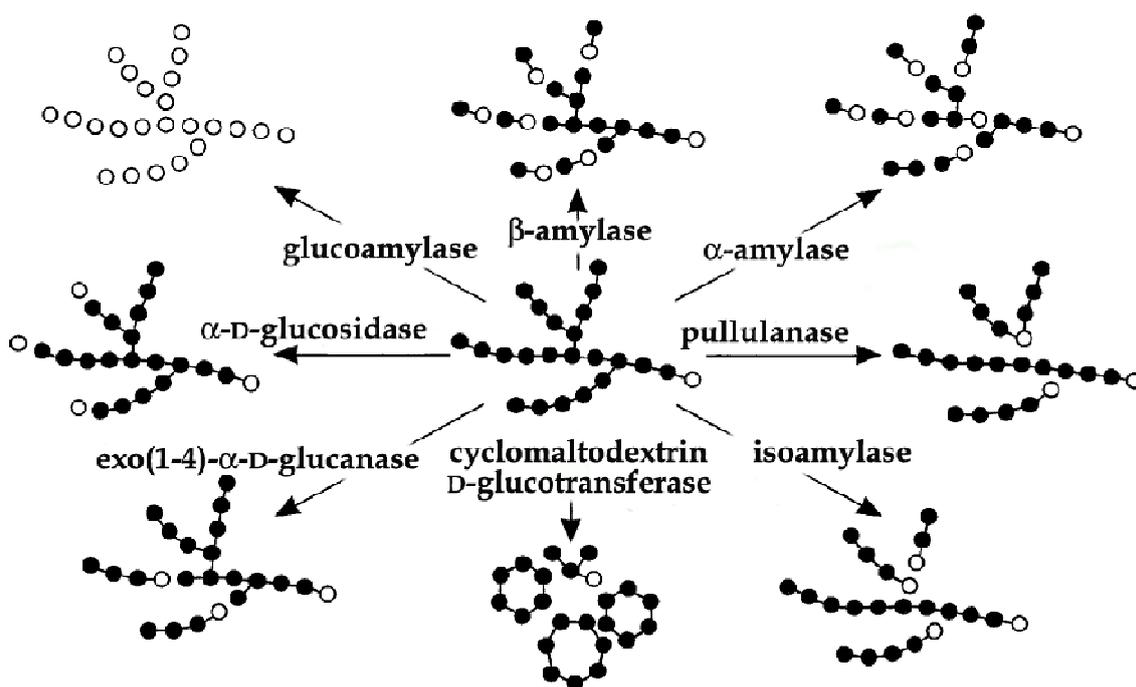


Figura 3. Ação das enzimas envolvidas na degradação de amido. Círculos brancos e pretos representam os açúcares redutores e não-redutores, respectivamente. Fonte: Ismaya et al., 2012.

As endoamilases atuam na hidrólise das ligações α (1-4) na parte interna das cadeias de amilose e amilopectina, produzindo oligossacarídeos de vários

comprimentos, sendo a α -amilase (EC 3.2.1.1) um exemplo de endoamilase. Já a β -amilase (EC 3.2.1.2) é caracterizada como uma exoamilase, pois atua na degradação das ligações $\alpha(1-4)$ da extremidade não redutora da amilose e amilopectina, produzindo açúcares de baixo peso molecular como glicose e maltose (VAN DER MAAREL et al., 2002).

O quarto grupo é o das transferases que hidrolisam ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$ da molécula doadora e transfere parte do doador para uma molécula receptora, formando uma nova ligação glicosídica. Enzimas como amilomaltase (EC 2.4.1.25) e CGTase formam uma nova ligação glicosídica $\alpha(1-4)$. A CGTase é o único membro da família das α -amilases com baixa atividade hidrolítica e, mesmo apresentando ação do tipo exo, consegue, por transglicosilação intramolecular, clivar também as ramificações (VAN DER VEEN et al., 2000).

Ciclodextrina Glicosiltransferase (CGTase)

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, E.C 2.4.1.19), conhecida como ciclodextrina glicanotransferase, ciclomaltodextrina glicanotransferase e ciclomaltodextrina glicosiltransferase, é um membro da maior família das α -amilases de glicosídeos hidrolases, a família 13 (VAN DER VEEN et al., 2000; HAN et al., 2014).

Enzimas são proteínas que possuem multidomínios. A maioria dos representantes da família 13 de glicosídeo hidrolases apresentam três domínios (A, B, C), mas a CGTase é mais complexa e tem dois domínios adicionais (D, E), sendo portanto, uma proteína que possui 5 domínios (Figura 4), com sítio catalítico entre os domínios A e B (LEEMHUIS; KELLY; DIJKHUIZEN, 2010).

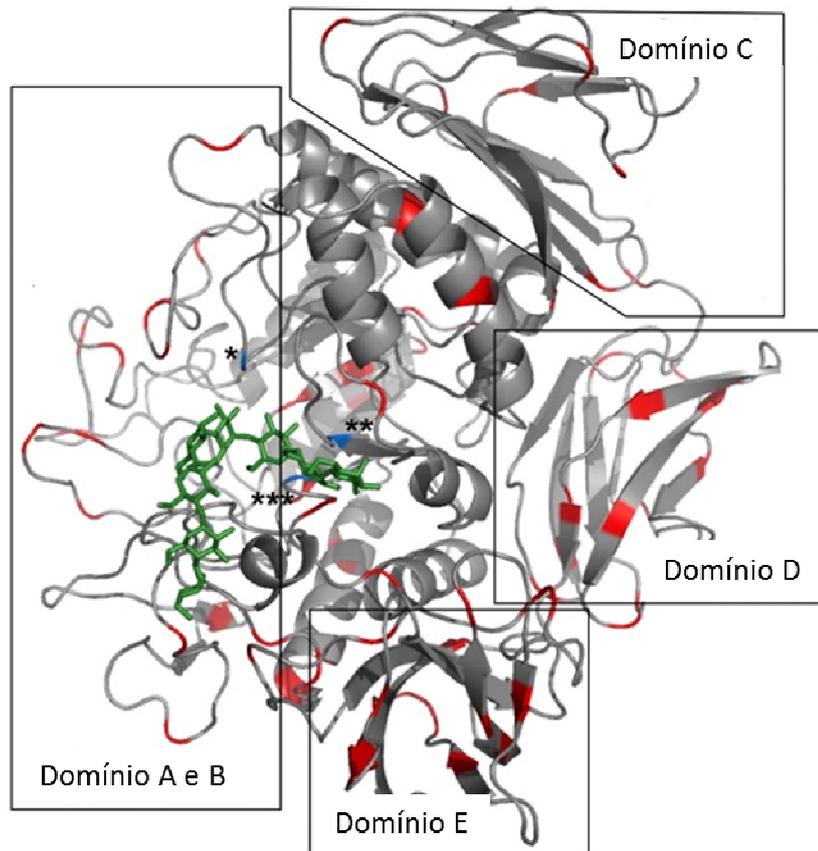


Figura 4. Estrutura da CGTase, mostrando os cinco domínios. Fonte: Melzer et al., 2015.

O domínio A (domínio catalítico) formado por 300 a 400 resíduos de aminoácidos, está presente em todas as enzimas da família α -amilase. É uma estrutura em forma de $(\beta/\alpha)_8$ -barril, ou seja, um barril de oito fitas β paralelas cercadas por oito α -hélices. Geralmente, as curvas que ligam as fitas β às α -hélices adjacentes carregam resíduos de aminoácidos do sítio ativo. A curva entre a terceira fita β e a terceira α -hélice, é suficientemente longa, sendo considerada como um pequeno domínio, o domínio B (MACGREGOR et al., 2001).

Como uma protuberância do domínio A, o domínio B, contribui para a ligação ao substrato e é responsável pela termoestabilidade da enzima, consistindo de 44 a 133 resíduos de aminoácidos. Dentre as regiões mais conservadas deste domínio estão os resíduos de aspartato (Asp175) quase invariável, envolvido na ligação de Ca^{2+} , e a tirosina (Tyr195 de *Bacillus circulans* 251) que controla a especificidade do produto, de tal forma que os

mutantes de leucina e triptofano de várias CGTases de *Bacillus* exibiram uma mudança para a síntese de produtos maiores (γ -ciclodextrinas) que são relativamente raras entre os produtos das CGTases (JANECEK, 1997; GOH; ILLIAS; GOH, 2012).

Na família α -amilase, a região C-terminal é geralmente formada pelo domínio C, que possui aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos, e que também está envolvido com a ligação ao substrato e possui uma fita β antiparalela com dobra. Na região C-terminal a CGTase possui dois domínios adicionais (D e E) (LEEMIHUS; KELLY; DIJKHUIZEN, 2010). O domínio D, com 90 aminoácidos envolvidos por imunoglobulina, é quase exclusivamente encontrado em CGTase e tem função desconhecida (VAN DER VEN et al, 2000). O domínio E, relacionado ao módulo de ligação ao amido (CBM20), possui cerca de 110 aminoácidos e é responsável pela ligação ao amido bruto, facilitando sua degradação. Este domínio está presente em aproximadamente 10% das enzimas amilolíticas, em particular nos seguintes grupos de microrganismos: fungos filamentosos, bactérias Gram-positiva (Firmicutes), Proteobacterias (γ -proteobacteria), Actinomicetos e Arqueas (JANECEK; SVENSSON; MACGREGOR, 2003).

A CGTase representa um dos grupos mais vitais de enzimas amilolíticas, produzida exclusivamente por microrganismos. É uma enzima extracelular, com fraca atividade hidrolítica, sendo a única capaz de converter amido, e substâncias relacionadas, em moléculas cíclicas, as ciclodextrinas (MORIWAKI et al., 2009; COSTA et al., 2015).

A transformação da cadeia linear do amido em moléculas cíclicas ocorre a partir da reação de transglicosilação intramolecular (ciclização). Durante a ciclização, a CGTase se liga a pelo menos nove subsítios do açúcar, que são hipoteticamente numerados de -7 a +2. O sítio ativo da enzima se liga entre os subsítios -1 e +1, resultando em um intermediário covalente com ligação do resíduo Asp 229 ao subsítio -1. Durante a ciclização, a CGTase circunda a cadeia linear deste intermediário de tal forma que o resíduo de glicose da extremidade não redutora se move do subsítio -7 para o subsítio +1. Nesse

ponto a própria cadeia linear é usada como açúcar acceptor e torna-se covalentemente ligada ao átomo C1 do açúcar no subsítio -1, formando assim um oligossacarídeo cíclico, ou ciclodextrina (Figura 5) (UITDEHAAG et al., 1999; KELLY et al., 2009).

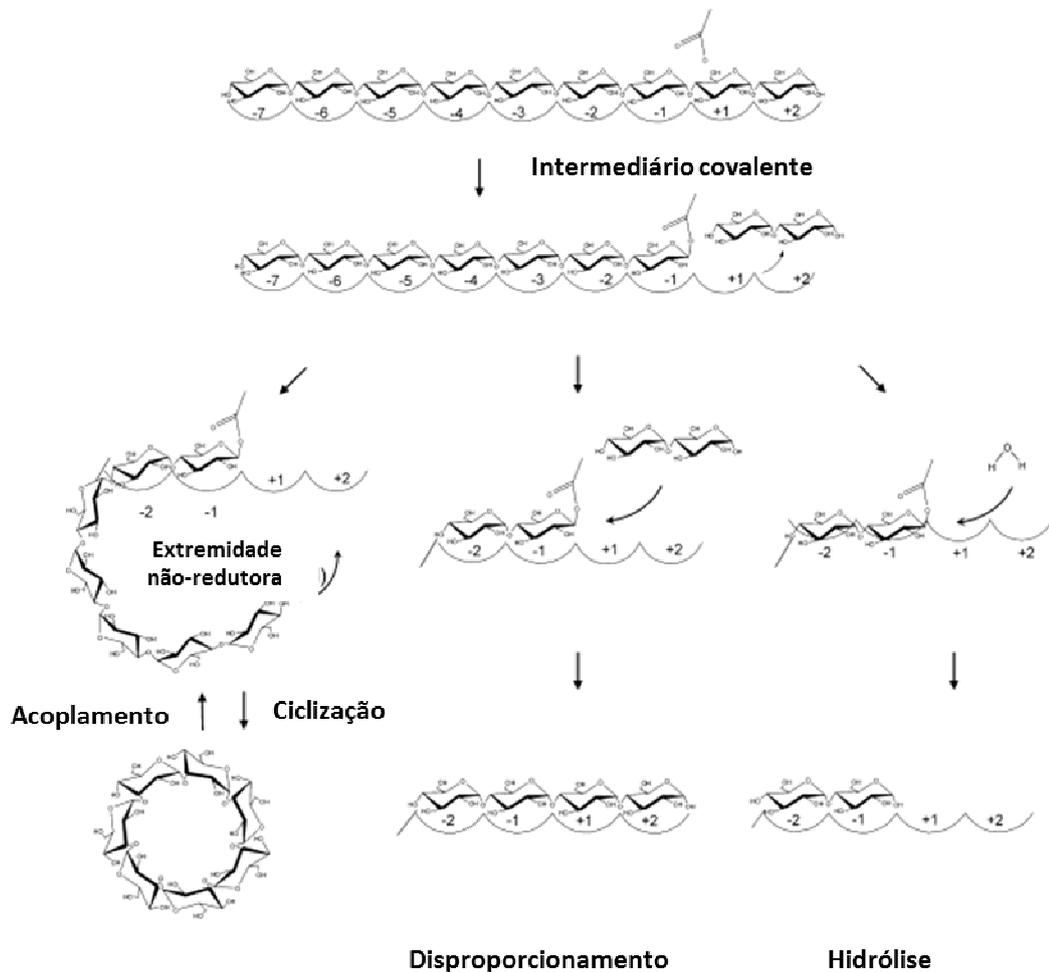


Figura 5. Tipos de reações catalisadas pela CGTase. Fonte: Kelly et al., 2009.

O mecanismo de ciclização tem sido extensivamente estudado, uma vez que somente esta enzima tem a capacidade de produzir CDs, que é uma molécula de interesse industrial. Estudos de Uitdehaag et al. (1999) e Van der Veen et al. (2000), revelaram que os subsítios -6, -3 e +2 contribuem para a ciclização e ainda, que o resíduo do aminoácido Tyr195 possui o grupo fenil no centro ativo da CGTase e pela interação hidrofóbica com os resíduos de carboidratos na torção da extremidade não redutora em direção a extremidade redutora do oligossacarídeo ligado, pode resultar na formação da ciclodextrina.

Além de ciclização, a CGTase é capaz de catalisar outros três tipos de reação como acoplamento, desproporcionamento, e hidrólise do amido. Segundo Rather et al. (2015) na reação de desproporcionamento parte do substrato doador é transferido para o substrato acceptor e nas reações de acoplamento uma ciclodextrina é clivada e o maltooligossacarídeo resultante é transferido para um substrato acceptor, convertendo uma molécula cíclica em uma molécula linear.

Uma mistura de diferentes proporções de CDs é normalmente produzida pela maioria das CGTases. Porém, a CGTase pode ser categorizada em três tipos distintos, α -CGTase, β -CGTase e γ -CGTase com base no principal tipo de ciclodextrina produzida.

Microrganismos produtores de CGTase

A primeira CGTase descrita foi obtida pelo *Bacillus macerans* em 1974, porém, apesar da produção desta enzima ser mais comum para espécies do gênero *Bacillus*, há relatos na literatura de sua produção por outras espécies de Archeas como *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 (RASHID et al., 2002), bactérias aeróbicas mesófilas como o *Bacillus circulans* A11 (RIMPHANITCHAYAKIT; TONOZUKA; SAKANO, 2005), aeróbicas termófilas como *B. stearothermophilus* NO2 (FUJIWARA et al., 1992) e anaeróbicas termófilas *Thermoanaerobacter* sp. (AVCI; DÖNMEZ, 2009).

Os microrganismos produtores da enzima foram isolados de locais extremos e variados, como solos de locais ricos em amido (KUNAMNENI et al., 2007; COELHO et al., 2016), batatas apodrecidas (FERRAROTTI et al., 1996), fonte térmica (RASHID et al., 2002), água e sedimentos de lagos salinos (IBRAHIM et al., 2012) e poço de petróleo (AVCI; DÖNMEZ, 2009).

Além disso, diversos microrganismos já tiveram sua enzima caracterizada quanto o tipo de CD (α , β , γ) produzida em maior quantidade. Leemhuis; Kelly; Dijkhuizen (2010) catalogaram esses microrganismos, obtendo um total de 49 espécies entre os anos de 1986 a 2009 (Tabela 1), sendo que 30,6% destes foram caracterizados entre os anos 2007 e 2009. Dos

microrganismos caracterizados, cerca de 69% produzem somente β -CD, 8% α -CD, 4% γ -CD, 14% produzem uma mistura de α/β -CD e 4% β/γ -CD.

Nos últimos dez anos novas espécies tiveram suas enzimas caracterizadas. Moriwaki et al. (2009) caracterizaram o *Bacillus sphaericus* 41 como produtor de β -CGTase. O *Bacillus pseudocaliphilus* 20RF, produtor de β -CGTase foi caracterizado por Atanasova et al. (2011). Os estudos desenvolvidos por Ibrahim et al. (2012) revelaram a produção de β -CGTase pelo *Amphibacillus* sp. Blanco et al. (2014) identificaram o *Bacillus lehensis* CGII como produtor de β -CGTase. A α -CGTase foi produzida em maior quantidade pelo *Bacillus agaradhaerens* Y112, nos estudos realizados por Hao et al. (2017).

Tabela 1. Microrganismos produtores de CGTase e caracterizados quanto ao tipo de enzima em α , β e γ -CGTase.

Microrganismo	CGTase	Referência
Archaea		
<i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638	β	Lee et al., 2007
<i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1	β	Rashid et al., 2002)
<i>Thermococcus</i> sp. B1001	α	Hashimoto et al., 2001
Bacteria		
<i>Bacillus agaradhaerens</i> LS-3C (alcalofílico)	β	Martins et al., 2003a
<i>Bacillus</i> sp. 1-1	β	Schmid et al., 1988
<i>Bacillus</i> sp. 17-1	β	Kaneko et al., 1989
<i>Bacillus</i> sp. 38-2	β	Hamamoto e Kaneko, 1987
<i>Bacillus</i> sp. 1011	β	Kimura et al., 1987
<i>Bacillus</i> sp. 8SBa	β	Atanasova et al., 2008
<i>Bacillus</i> sp. 20RFa	β	Atanasova et al., 2008
<i>Bacillus</i> sp. A2-5a	β	Ohdan et al., 2000
<i>Bacillus</i> sp. G-825-6	γ	Hirano et al., 2006
<i>Bacillus</i> sp. I-5	β	Shim et al., 2004
<i>Anaerobranca gottschalkii</i>	α	Thiemann et al., 2004
<i>Bacillus circulans</i> 8	β	Nitschke et al., 1990
<i>Bacillus circulans</i> 251	β	Lawson et al., 1994
<i>Bacillus circulans</i> A11	β	Rimphanitchayakit et al., 2005
<i>Bacillus circulans</i> DF 9R	α/β	Marechal et al., 1996
<i>Bacillus clarkii</i> 7384	γ	Takada et al., 2003
<i>Bacillus clausii</i> E16a	β	Alves-Prado et al., 2008
<i>Bacillus firmus</i> 290-3	β/γ	Englbrecht et al., 1988
<i>Bacillus firmus</i> 7Ba	β	Moriwaki et al., 2007
<i>Bacillus firmus</i> NCIM 5119	β	Gawande et al., 1999
<i>Bacillus firmus</i> no. 37	β	Matioli et al., 2001
<i>Bacillus licheniformis</i>	α/β	Hill et al., 1990
<i>Bacillus macerans</i>	α	Takano et al., 1986

<i>Bacillus megaterium</i>	β	Pishtiyski et al., 2008
<i>Bacillus obhensis</i>	β	Sin et al., 1991
<i>Bacillus</i> sp. B1018	β	Itkor et al., 1990
<i>Bacillus</i> sp. BL-31	β	Go et al., 2007
<i>Bacillus</i> sp. G1	β	Ong et al., 2008
<i>Bacillus</i> sp. KC201	β	Kitamoto et al., 1992
<i>Bacillus</i> sp. TS1-1	β	Rahman et al., 2006
<i>Bacillus stearothermophilus</i> NO2c	α/β	Fujiwara et al., 1992
<i>Brevibacillus brevis</i> CD162	β	Kim et al., 1998
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ET1	β	Chung et al., 1998
<i>Klebsiella pneumoniae</i> M5a1	α	Binder et al., 1986
<i>Paenibacillus</i> sp. BT01	α/β	Yampayont et al., 2006
<i>Paenibacillus</i> sp. C36	β	Kinder, 2007
<i>Paenibacillus</i> sp. RB01	β	Charoensakdi et al., 2007a
<i>Paenibacillus</i> sp. T16	β/γ	Charoensakdi et al., 2007b
<i>Paenibacillus campinasensis</i> H69-3	β	Alves-Prado et al., 2007
<i>Paenibacillus graminis</i> NC22.13	α/β	Vollu et al., 2008
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> ST-12 K	β	Doukyu et al., 2003
<i>Paenibacillus pabuli</i> US132	β	Jemli et al., 2008
<i>Thermoanaerobacter</i> sp. 501	α/β	Norman and Jorgensen, 1992
<i>Thermoanaerobacter</i> sp. ATCC 53627	β	Jørgensen et al., 1997
<i>Thermoanaerobacter</i> sp. P4	β	Avci e Donmez, 2009
<i>Thermoanaerobacterium</i> <i>thermosulfurigenes</i> EM1	α/β	Wind et al., 1998

Fonte: Leemhuis; Kelly; Dijkhuizen, 2010. Adaptado.

A bioinformática e a genômica comparativa

Os computadores emergiram como ferramentas para a Biologia Molecular no início da década de 1960. Três fatores contribuíram para esse crescimento: i) aumento do número de sequências de aminoácidos que forneciam tanto uma fonte de dados quanto um conjunto de problemas interessantes que não podiam ser resolvidos sem o auxílio de um computador; ii) a ideia de que as macromoléculas carregam informações tornou-se parte central do quadro conceitual da Biologia Molecular; iii) computadores digitais de alta velocidade, finalmente ficaram amplamente disponíveis para biólogos acadêmicos, surgindo assim a Bioinformática e a Biologia Computacional (HAGEN, 2000). A Bioinformática e a Biologia Computacional tornaram-se disciplinas independentes na década de 1980, com o desenvolvimento de algoritmos (programas) eficientes para trabalhar com um volume crescente de informações, sendo disponibilizados para a comunidade científica em geral (OUZONI e VALENCIA, 2003).

A Bioinformática é uma ciência em desenvolvimento, com uma linha de pesquisa que envolve aspectos multidisciplinares, e utiliza ferramentas computacionais para catalogar, organizar e estruturar informações de organismos vivos, provenientes da biologia molecular, genética, bioquímica, entre outros, em uma entidade de fácil compreensão para a Biologia (QUEIROZ, 2002; PROSDOCIMI et al., 2007).

Após o início do Projeto Genoma Humano em 1990, os recursos tecnológicos desenvolvidos permitiram o lançamento de outros projetos genoma, sendo possível obter o sequenciamento completo de vários organismos, entre eles os procariotos (CATANHO; DE MIRANDA; DEGRAVE, 2007). Os procariotos oferecem uma oportunidade interessante para estudar os mecanismos de evolução, pois apresentam uma grande diversidade de forma e tamanho celular, número de espécies e populações, habitats, sobrevivendo em ambientes inóspitos como fontes termais, poços de petróleo e também no interior de células eucarióticas, além disso, frequentemente adquirem e utilizam o material genético de outros organismos (ABBY e DAUBIN, 2007).

Uma sequência de genoma apresenta não apenas um conjunto completo de genes e seus locais precisos no cromossomo, mas também relações de similaridade de genes dentro do genoma e entre espécies (KANEHISA e BORK, 2003). A disponibilidade de sequências completas do genoma de organismos estreitamente relacionados apresenta uma oportunidade para reconstruir eventos de evolução do genoma (COENYE et al., 2005).

Com o grande número de dados genéticos, proveniente dos sequenciamentos de genomas, houve a necessidade da criação de bancos de dados capazes de armazenar as informações e de ferramentas da bioinformática que permitissem a interpretação destes dados. O NCBI (Centro Nacional para Informação Biotecnológica dos EUA) é considerado o banco de dados central sobre informações genômicas, e o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) é a ferramenta mais difundida e utilizada para

comparar as semelhanças entre sequências (SANTOS e ORTEGA, 2003; EMBRAPA, 2007).

O BLAST é um algoritmo de comparação de sequências com velocidade otimizada, e é usado na busca por sequências nos bancos de dados, que possuem similaridades com uma dada sequência *query* (PERTISEMLIDIS e FONDON, 2001). A Tabela 2 mostra os algoritmos do BLAST, com suas funções.

Tabela 2. Função dos algoritmos BLAST, encontrados no NCBI.

Algoritmo	Tipo de sequência <i>query</i>	Função
BLASTP	Proteína	Compara aminoácidos da sequência <i>query</i> com uma proteína da sequência da base de dados.
BLASTN	Nucleotídeo	Compara nucleotídeos da sequência <i>query</i> com nucleotídeos da sequência da base de dados.
BLASTX	Nucleotídeo (traduzido)	Compara nucleotídeos de uma sequência <i>query</i> traduzida em todas as fases de leitura contra sequências de proteínas do banco de dados.
TBLASTN	Proteína	Compara uma proteína da sequência <i>query</i> contra nucleotídeos traduzidos da sequência da base de dados, em todas as fases de leitura.
TBLASTX	Nucleotídeo (traduzido)	Compara as traduções de nucleotídeos das seis fases de uma sequência <i>query</i> contra traduções de nucleotídeos das seis fases de uma sequência da base de dados.

A genômica comparativa utiliza o padrão de conservação evolutiva, em sequências alinhadas entre espécies, para detectar elementos funcionais. O raciocínio para esta abordagem é que muitas mutações em sequências funcionais devem ser deletérias e, portanto, eliminadas da população por seleção purificadora. Isso, por sua vez, deve gerar a assinatura canônica de conservação de uma sequência entre espécies (LAWRIE e PETROV, 2014).

A Bioinformática e a Biologia Computacional produziram pelo menos duas constatações para as ciências biológicas: i) as estruturas tridimensionais de moléculas protéicas são muito mais conservadas do que suas funções bioquímicas; ii) a comparação do número total de genes codificados em um dado genoma com o número total de genes codificados em outros genomas não reflete a filogenia das espécies, mas a comparação entre suas sequências genômicas, sim (OUZOUNIS, 2002).

IMOBILIZAÇÃO CELULAR

CGTase livres ou solúveis são utilizadas para a produção industrial de CDs, no entanto, as enzimas microbianas são geralmente instáveis quando isoladas do seu ambiente natural, sendo também facilmente desnaturadas. A imobilização direta de células microbianas que desempenham uma atividade de interesse pode minimizar ou mesmo eliminar estes problemas (MORIWAKI, et al., 2014; ABDEL-NABY et al., 2015).

De acordo com Oliveira et al. (2011) a imobilização celular pode ser definida como o confinamento físico ou localização de células intactas em uma certa região do espaço para a preservação de uma atividade catalítica desejada. A imobilização celular é uma técnica estudada e aplicada em diversos campos industriais, como produção de alimentos, desenvolvimento de medicamentos, proteção ambiental, processamento de resíduos e produção agrícola, pois proporciona proteção às células de condições desfavoráveis, como lavagem, corte e rejeição imunológica (DULIEU; PONCELET; NEUFELD, 1999; SIMÒ et al., 2017).

As técnicas para imobilização celular (Figura 6), podem ser divididas em quatro categorias principais: (A) ligação ou adsorção em superfícies sólidas, (B) aprisionamento em uma matriz porosa, (C) auto-agregação por floculação (natural) ou com agentes de reticulação (induzido artificialmente) e (D) contenção mecânica de células por meio de barreiras.

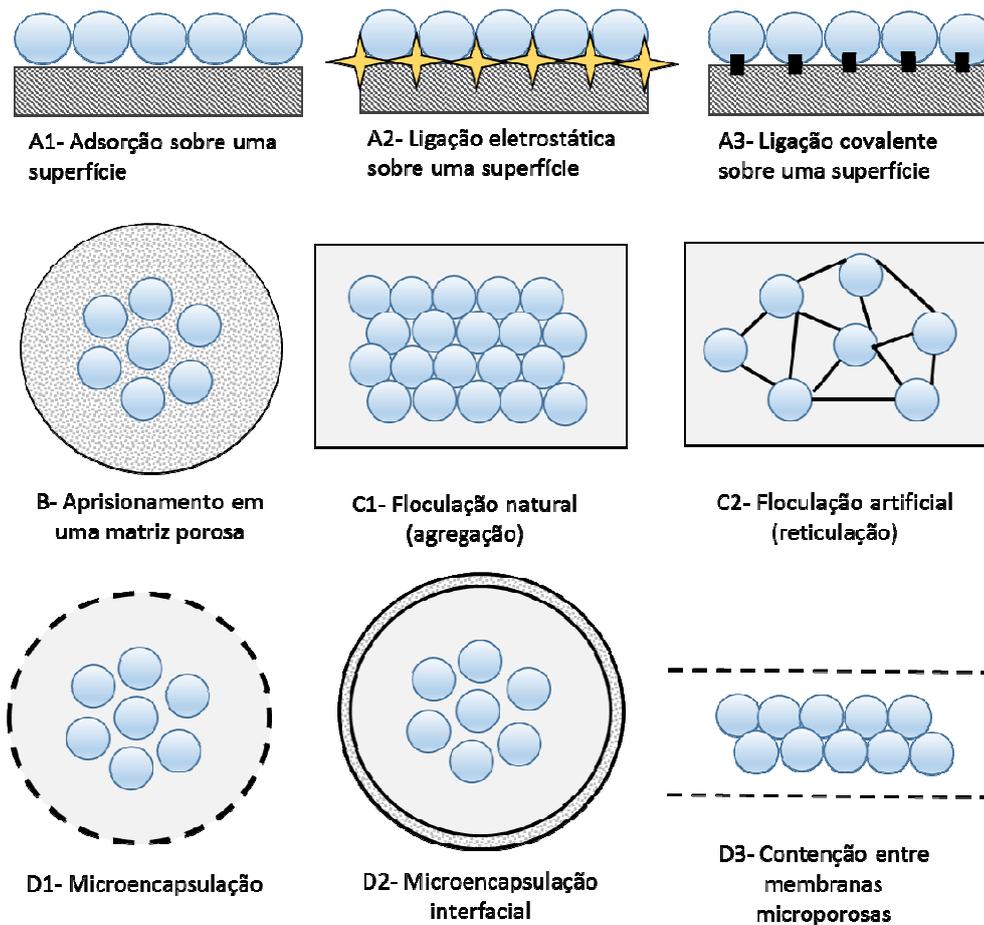


Figura 6. Tipos de imobilização celular. Fonte: adaptado de Kourkoutas et al., 2004.

Ligação ou adsorção em superfícies sólidas ocorre quando células são imobilizadas em um suporte, por meio de ligações covalentes entre a membrana celular e o suporte, ou adsorção física por forças eletrostáticas. Além disso, a adsorção e a ligação covalente podem ocorrer entre as células e uma superfície apropriada, ou entre célula e célula (GROBOILLOT et al., 1994; NEDOVIC et al., 2015).

A floculação celular é definida como a agregação de células para formar uma unidade maior, com uso potencial em reatores. A floculação pode ocorrer de forma natural ou por meio da utilização de agentes floculantes artificiais ou reticulantes, que melhoram a agregação em culturas celulares que não floculam naturalmente. A contenção mecânica por meio de uma barreira pode ser realizada a partir da utilização de filtros de membrana microporosa, pelo aprisionamento de células em uma microcápsula ou por imobilização celular

numa superfície de interação entre dois líquidos imiscíveis (KOURKOUTAS et al., 2004).

Os polímeros naturais ou sintéticos, como o alginato, a pectina, a quitosana, a κ -carragenana e a gelatina são os biopolímeros mais utilizados para aprisionamento celular, pois formam facilmente uma matriz de gel altamente flexível, biocompatível e não tóxica, capaz de solidificar sob condições suaves e formar compostos esféricos que protegem as células contra substâncias inibitórias e contaminação, favorecendo ao mesmo tempo uma melhor utilização do substrato, melhorando a estabilidade, a produtividade do composto de interesse e eficiência do processo (NEDOVIC et al., 2015).

O aprisionamento em matrizes como o alginato de cálcio é uma prática comum devido à sua facilidade de obtenção e manipulação e o baixo custo (FRANSSEN, 2013). O alginato é um biopolímero de ocorrência natural, produzido por algas marrons, principalmente *Macrocystis pyrifera*, mas também por *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Eklonia cava* e bactérias dos gêneros *Azotobacter* e *Pseudomonas*. A estrutura química do alginato (Figura 7A) corresponde a um copolímero linear, constituído de ácidos α -L-gulurônicos e β -D-manurônicos com ligações 1-4 (CASSIDY; LEE; TREVORS, 1996; MULLER et al., 2011).

O alginato apresenta propriedades únicas que lhe permite ser utilizado como uma matriz para o aprisionamento: (i) um ambiente aquoso relativamente inerte dentro da matriz; (ii) um processo de encapsulamento a temperatura ambiente leve, isento de solventes orgânicos; (iii) uma elevada porosidade do gel que permite altas taxas de difusão de macromoléculas; (iv) a capacidade de controlar esta porosidade com procedimentos de revestimento simples e (v) dissolução e biodegradação do sistema em condições fisiológicas normais (GOMBOTZ; WEE 2012).

Para a formação dos *pellets*, uma solução de alginato de sódio, que contém células microbianas vivas, é gotejada em uma solução de reticulação contendo cátions divalentes, por exemplo, Ca^{2+} . A solidificação de gotículas começa em milissegundos na superfície das gotículas por gelificação

ionotrópica, onde os íons Ca^{2+} reagem com as cadeias de polímero carregadas negativamente, para formar uma camada de estrutura rígida tridimensional contendo água, um hidrogel (Figura 7B). Através desta água, os íons Ca^{2+} se espalharão para dentro da gota de líquido, reticulando "de fora para dentro" (VEMMER; PATEL, 2013).

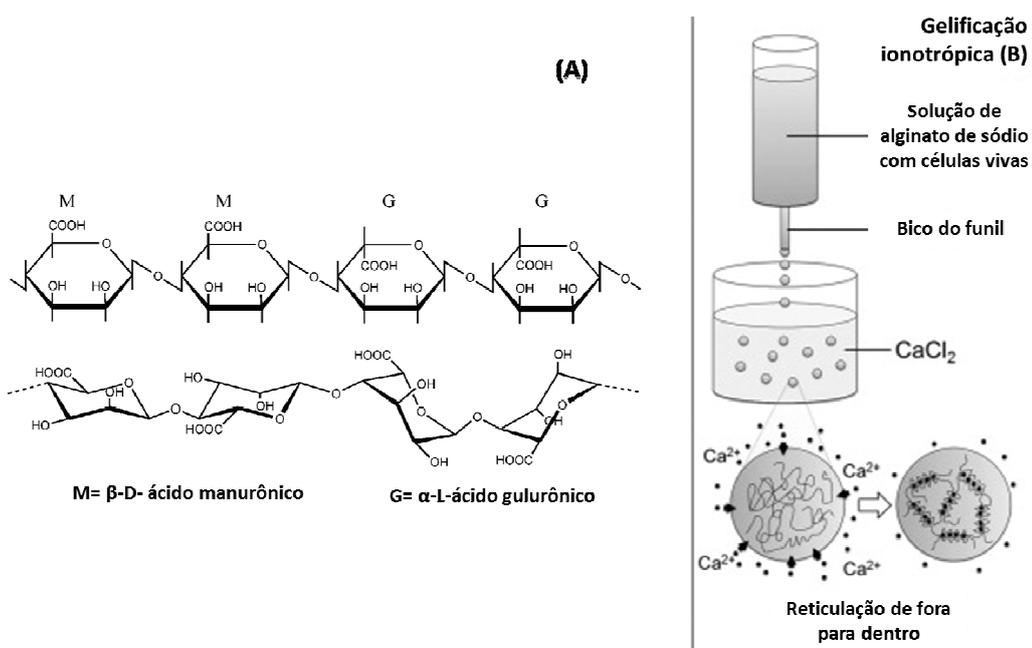


Figura 7. (A) Estrutura da molécula de alginato. (B) Método de imobilização baseado na gelificação ionotrópica. Fonte: VEMMER; PATEL, 2013; ANDERSEN et al., 2015.

O tamanho e a forma dos *pellets* dependem principalmente da viscosidade do alginato de sódio e da distância entre a seringa ou o funil de separação, de onde a solução está sendo gotejada, e a solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) (SMIDSRØD; SKJA, 1990).

A degradação do gel de alginato reticulado com Ca^{2+} , pode ocorrer por remoção do cátion Ca^{2+} . Para a retirada desse composto utiliza-se agentes quelantes como lactato, citrato e fosfato ou altas concentrações de íons Na^+ ou Mg^{2+} . Com a remoção dos íons Ca^{2+} , a reticulação diminui e o gel é desestabilizado. A degradação do gel pode ser prevenida estocando os *pellets* em solução contendo íons Ca^{2+} livres (GOMBOTZ; WEE 2012).

Na literatura, diversos estudos com imobilização de células procarióticas utilizando alginato de cálcio para obtenção de produtos de interesse biotecnológico podem ser encontrados (Tabela 3). Além disso, a associação de alginato com outros polímeros como quitosana, glutaraldeído e álcool polivinil (PVA) estão sendo utilizados com o propósito de otimizar a eficiência do encapsulamento, evitar que as células se desprendam do suporte e reduzir o tamanho dos poros formados pelo hidrogel (ZHOU et al., 2010).

Tabela 3. Estudos que utilizaram microrganismos imobilizados em alginato de cálcio para produção de compostos de interesse industrial.

Microrganismo	Suporte para imobilização	Finalidade da imobilização	Referência
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Alginato de cálcio	Produção de CGTase	Abdel-Naby et al., 2000
<i>B. alcalofílicos</i> sp.	Alginato de cálcio	Produção de CGTase	Kunammeni et al., 2007
<i>B. cereus</i> NRC7	Alginato de cálcio	Produção de CGTase	Abdel-Naby et al., 2011
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alginato de cálcio	Produção de vinho	Oliveira et al., 2011
<i>S. cerevisiae</i>	Alginato de cálcio e quitosana	Produção de etanol	Duarte et al., 2013
Bactérias oxidantes de amônia	Alginato de cálcio	Oxidar amônia	Dong et al., 2014
Bactérias oxidantes de amônia	Alginato de cálcio e álcool polivinil (PVA)	Oxidar amônia	Dong et al., 2017
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC 4997	Alginato de cálcio	Degradação de fenol	Kotresha; Vidyasagar, 2017
<i>S. cerevisiae</i>	Alginato de cálcio	Produção de etanol	Santos et al., 2018

Uma das principais vantagens da imobilização celular está na capacidade de separação das células imobilizadas dos produtos e resíduos finais da fermentação, sendo que estas células podem ser reutilizadas, facilitando o funcionamento contínuo durante um período prolongado e uma

maior produtividade do reator (ABDEL-NABY; REYAD; ABDEL-FATTAH, 2000).

A partir desta revisão de literatura, visto as diversas aplicações das ciclodextrinas e que sua produção ocorre exclusivamente pela enzima CGTase que é produzida por microrganismos, é possível inferir que a imobilização de células é uma técnica útil, pois permite a separação e reutilização das células por mais de uma vez, contribuindo para maior produtividade da enzima. Além disso, a genômica comparativa das espécies que produzem CGTase, será importante para entender a evolução desta enzima nos diferentes táxons procarióticos.

REFERÊNCIAS

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**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2000.

ABDEL-NABY, M. A.; REYAD, R. M.; ABDEL-FATTAH, A. F. Biosynthesis of cyclodextrin glucosyltransferase by the free and immobilized cells of *Bacillus cereus* NRC7 in batch and continuous cultures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 5, p. 1129-1137, 2011.

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

ANDERSEN, T; AUK-EMBLEM, P; DORNISH, M. 3D cell culture in alginate hydrogels. **Microarrays**, v. 4, n. 2, p. 133-161, 2015.

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

ASTRAY, G.; GONZALEZ-BARREIRO, C.; MEJUTO, J. C.; RIAL-OTERO, R.; SIMAL-GÁNDARA, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1631-1640, 2009.

ATANASOVA, N.; KITAYSKA, T.; BOJADJIEVA, I.; YANKOV, D.; TONKOVA, A. A novel cyclodextrin glucanotransferase from alkaliphilic *Bacillus pseudocaliphilus* 20RF: Purification and properties. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 116-122, 2011.

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

BHASKARA-AMRIT, U. R.; AGRAWAL, P. B.; WARMOESKERKEN, M. M.C.G. Applications of β -cyclodextrins in textiles. **Autex Research Journal**, v. 11, n. 4, p. 94-101, 2011.

BLANCO, K. C.; MORAES, F. F. D.; BERNARDI, N. S.; VETTORI, B.; PALMUTI, M. H.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Cyclodextrin production by *Bacillus lehensis* isolated from cassava starch: characterization of a novel enzyme. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 32, n. 1, p. 48-53, 2014.

CASSIDY, M. B.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 79-101, 1996.

COELHO, S. L. D. A.; MAGALHÃES, V. C.; MARBACH, P. A. S.; CAZETTA, M. L. A new alkalophilic isolate of *Bacillus* SM-02 as a producer of cyclodextrin glycosyltransferase using cassava flour. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 120-128, 2016.

COSTA, H., GASTÓN, J. R., LARA, J., MARTINEZ, C. O., MORIWAKI, C., MATIOLI, G., FERRAROTTI, S. A. Cyclodextrin glycosyltransferase production by free cells of *Bacillus circulans* DF 9R in batch fermentation and by immobilized cells in a semi-continuous process. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 6, p. 1055-1063, 2015.

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

DONG, Y.; ZHANG, Y.; TU, B. Immobilization of ammonia-oxidizing bacteria by polyvinyl alcohol and sodium alginate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 515-521, 2017.

DONG, Y.; ZHANG, Y.; TU, B.; MIAO, J. Immobilization of ammonia-oxidizing bacteria by calcium alginate. **Ecological Engineering**, v. 73, p. 809-814, 2014.

DUARTE, J. C.; RODRIGUES, J. A.; MORAN, P. J.; VALENÇA, G. P.; NUNHEZ, J. R. Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 31-31, 2013.

DULIEU, C.; PONCELET, D.; NEUFELD, R. J. Encapsulation and immobilization techniques. **Cell Encapsulation Technology and Therapeutics**, p. 3-17, 1999.

FERRAROTTI, S. A.; ROSSO, A. M.; MARÉCHAL, M. A.; KRYMKIEWICZ, N.; MARÉCHAL, L. R. Isolation of two strains (SR type) of *Bacillus circulans* and purification of a cyclomaltodextrin-glucoamylase. **Cellular and Molecular Biology**, v. 42, n. 5, p.653-657, 1996.

FRANSSEN, M. C., STEUNENBERG, P.; SCOTT, E. L.; ZUILHOF, H.; SANDERS, J. P. Immobilised enzymes in biorenewables production. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6491-6533, 2013.

FUJIWARA, S.; KAKIHARA, H.; WOO, K. B.; LEJEUNE, A.; KANEMOTO, M.; SAKAGUCHI, K.; IMANAKA, T. Cyclization characteristics of cyclodextrin glucoamylase are conferred by the NH₂-terminal region of the enzyme. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 4016-4025, 1992.

GOH, K. M.; MAHADI, N. M.; HASSAN, O.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; ILLIAS, R. M. A predominant β -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, 2009.

GOH, P. H.; ILLIAS, R. M.; GOH, K. M. Domain replacement to elucidate the role of B domain in CGTase thermostability and activity. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2123-2130, 2012.

GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. F. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 194-205, 2012.

GOO, B. G.; HWANG, Y. J.; PARK, J. K. *Bacillus thuringiensis*: a specific gamma-cyclodextrin producer strain. **Carbohydrate Research**, v. 386, p. 12-17, 2014.

GROBOILLOT, A.; BOADI, D. K.; PONCELET, D.; NEUFELD, R. J. Immobilization of cells for application in the food industry. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 75-107, 1994.

HAN, R., LI, J., SHIN, H. D., CHEN, R. R., DU, G., LIU, L., CHEN, J. Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 2, p. 415-428, 2014.

HAO, J. H.; HUANG, L. P.; CHEN, X. T.; SUN, J. J.; LIU, J. Z.; SUN, M. Identification, cloning and expression analysis of an alpha-CGTase produced by strain Y112. **Protein Expression and Purification**, v. 140, p. 8-15, 2017.

IBRAHIM, A. S.; AL-SALAMAH, A. A.; EL-TAYEB, M. A.; EL-BADAWI, Y. B.; ANTRANIKIAN, G. A novel cyclodextrin glycosyltransferase from alkaliphilic *Amphibacillus* sp. NPST-10: Purification and properties. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 8, p. 10505-10522, 2012.

IBRAHIM, H. M.; YUSOFF, W. M. W.; HAMID, A. A.; ILLIAS, R. M.; HASSAN, O.; OMAR, O. Optimization of medium for the production of β -cyclodextrin glucanotransferase using Central Composite Design (CCD). **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 753-758, 2005.

ISMAYA, W. T.; HASAN, K.; SUBROTO, T.; NATALIA, D.; SOEMITRO, S. Chromatography as the major tool in the identification and the structure-function relationship study of amylolytic enzymes from *Saccharomycopsis fibuligera*

R64. In: **Chromatography-The Most Versatile Method of Chemical Analysis**. InTech, 2012.

JANEČEK, Š. α -Amylase family: molecular biology and evolution. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 67, n. 1, p. 67-97, 1997.

JANEČEK, Š.; SVENSSON, B.; MACGREGOR, E. Relation between domain evolution, specificity, and taxonomy of the α -amylase family members containing a C-terminal starch-binding domain. **The FEBS Journal**, v.270, n.4, p.635-645, 2003.

JANSOOK, P.; OGAWA, N.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1-2, p. 272-284, 2018.

KELLY, R. M.; DIJKHUIZEN, L.; LEEMHUIS, H. The evolution of cyclodextrin glucanotransferase product specificity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 119-133, 2009.

KOTRESHA, D.; VIDYASAGAR, G. M. Phenol degradation in a packed bed reactor by immobilized cells of *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 4997. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 386-389, 2017.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A. A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 377-397, 2004.

KUNAMNENI, A.; PRABHAKAR, T.; JYOTHI, B.; ELLAIAH, P. Investigation of continuous cyclodextrin glucanotransferase production by the alginate-immobilized cells of alkalophilic *Bacillus* sp. in an airlift reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1538-1542, 2007.

KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 167-180, 2013.

LEEMHUIS, H.; KELLY, R. M.; DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 823-835, 2010.

LI, C.; XU, Q.; GU, Z.; CHEN, S.; WU, J.; HONG, Y.; CHENG, L.; LI, Z. Cyclodextrin glycosyltransferase variants experience different modes of product inhibition. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 203-210, 2016.

LI, Z., CHEN, S., GU, Z., CHEN, J., WU, J. Alpha-cyclodextrin: Enzymatic production and food applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 35, n. 2, p. 151-160, 2014a.

LI, Z.; BAN, X.; GU, Z.; LI, C.; HUANG, M.; HONG, Y.; CHENG, L. Mutations enhance β -cyclodextrin specificity of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 108, p. 112-117, 2014b.

LIN, Y. K.; SHOW, P. L.; YAP, Y. J.; ARIFF, A. B.; ANNUAR, M. S. M.; LAI, O. M.; TANG, T. K.; JUAN, J. C.; LING, T. C. Production of γ -cyclodextrin by *Bacillus cereus* cyclodextrin glycosyltransferase using extractive bioconversion in polymer-salt aqueous two-phase system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 6, p. 692-696, 2016.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 10, p. 1017-1025, 1996.

LOFTSSON, T.; DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1, p. 1-11, 2007.

MACGREGOR, E. A.; JANEČEK, Š.; SVENSSON, B. Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1546, n. 1, p. 1-20, 2001.

MAZZER, C.; FERREIRA, L. R.; RODELLA, J. R. T.; MORIWAKI, C.; MATIOLI, G. Cyclodextrin production by *Bacillus firmus* strain 37 immobilized on inorganic matrices and alginate gel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, n. 1, p. 79-86, 2008.

MELZER, S.; SONNENDECKER, C.; FÖLLNER, C.; ZIMMERMANN, W. Stepwise error-prone PCR and DNA shuffling changed the pH activity range and product specificity of the cyclodextrin gluconotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. **FEBS Open Bio**, v. 5, n.1, p. 528-534, 2015.

MORIWAKI, C.; FERREIRA, L. R.; RODELLA, J. R. T.; MATIOLI, G. A novel cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus sphaericus* strain 41: Production, characterization and catalytic properties. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 1, p. 124-131, 2009.

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

MÜLLER, J. M.; SANTOS, R. L. dos; BRIGIDO, R. V. Produção de alginato por microrganismos. **Polímeros**, v. 21, n. 4, p. 305-310, 2011.

NAKAMURA N; HORIKOSHI K. Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase-producing alkalophilic *Bacillus* sp. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, p. 753-757, 1976.

NEDOVIĆ, V.; GIBSON, B.; MANTZOURIDOU, T. F.; BUGARSKI, B.; DJORDJEVIĆ, V.; KALUŠEVIĆ, A; YILMAZTEKIN, M. Aroma formation by immobilized yeast cells in fermentation processes. **Yeast**, v. 32, n. 1, p. 173-216, 2015.

OLIVEIRA, M. D.; PANTOJA, L.; DUARTE, W. F.; COLLELA, C. F.; VALARELLI, L. T.; SCHWAN, R. F.; DIAS, D. R. Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilized yeast cell fermentation. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2391-2400, 2011.

PAZZETTO, R.; OLIVEIRA DELANI, T. C.; FENELON, V. C.; MATIOLI, G. Cyclodextrin production by *Bacillus firmus* strain 37 cells immobilized on loofa sponge. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 46-51, 2011.

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

RADU, C.; PARTENI, O.; OCHIUZ, L. Applications of cyclodextrins in medical textiles. **Journal of Controlled Release**, v. 224, p. 146-157, 2016.

RASHID, N.; CORNISTA, J.; EZAKI, S.; FUKUI, T.; ATOMI, H.; IMANAKA, T. Characterization of an archaeal cyclodextrin glucanotransferase with a novel C-terminal domain. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 3, p. 777-784, 2002.

RATHER, M. Y.; ARA K. Z. G.; KARLSSON, E. N.; ADLERCREUTZ, P. Characterization of cyclodextrin glycosyltransferases (CGTases) and their application for synthesis of alkyl glycosides with oligomeric head group. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 5, p. 722-728, 2015.

RIMPHANITCHAYAKIT, V.; TONOZUKA, T.; SAKANO, Y. Construction of chimeric cyclodextrin glucanotransferases from *Bacillus circulans* A11 and *Paenibacillus macerans* IAM1243 and analysis of their product specificity. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 14, p. 2279-2289, 2005.

SAKINAH, A. M.; ISMAIL, A. F.; ILLIAS, R. M.; ZULARISAM, A. W.; HASSAN, O.; MATSUURA, T. Effect of substrate and enzyme concentration on cyclodextrin production in a hollow fibre membrane reactor system. **Separation and Purification Technology**, v. 124, p. 61-67, 2014.

SANTOS, E. L. I.; ROSTRO-ALANÍS, M.; PARRA-SALDÍVAR, R.; ALVAREZ, A. J. A novel method for bioethanol production using immobilized yeast cells in calcium-alginate films and hybrid composite pervaporation membrane. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 165-173, 2018.

SAOKHAM, P.; LOFTSSON, T. γ -Cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 516, p. 278-292, 2017.

SCHÖFFER, J. N.; MATTE, C. R.; CHARQUEIRO, D. S.; MENEZES, E. W.; COSTA, T. M. H.; BENVENUTTI, E. V., RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F. Effects of immobilization, pH and reaction time in the modulation of α -, β - or γ -cyclodextrins production by cyclodextrin glycosyltransferase: Batch and continuous process. **Carbohydrate Polymers**, v. 169, p. 41-49, 2017.

SIMÓ, G.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, E.; VILA-CRESPO, J.; RUIPÉREZ, V.; RODRÍGUEZ-NOGALEZ, J.M. Research progress in coating techniques of alginate gel polymer for cell encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 170, p. 1-14, 2017.

SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U. C. Biotechnological applications of cyclodextrins. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 5, p. 341-359, 2002.

SMIDSRØD, O; SKJA, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Trends in Biotechnology**, v. 8, p. 71-78, 1990.

UITDEHAAG, J. C.; KALK, K. H.; VAN DER VEEN, B. A.; DIJKHUIZEN, L.; DIJKSTRA, B. W. The cyclization mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) as revealed by a γ -cyclodextrin-CGTase complex at 1.8-Å resolution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 49, p. 34868-34876, 1999.

VAN DER MAAREL, M. J.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 137-155, 2002.

VAN DER VEEN, B. A.; UITDEHAAG, J. C.; DIJKSTRA, B. W.; DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, n. 2, p. 336-360, 2000.

VEMMER, M.; PATEL, A. V. Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. **Biological Control**, v. 67, n. 3, p. 380-389, 2013.

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

WANG, L.; DUAN, X.; WU, J. Enhancing the α -cyclodextrin specificity of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* by mutagenesis masking subsite-7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 8, p. 2247-2255, 2016.

YAMAMOTO, T.; FUJIWARA, S.; TACHIBANA, Y.; TAKAGI, M.; FUKUI, K; IMANAKA, T. Alteration of product specificity of cyclodextrin glucanotransferase from *Thermococcus* sp. B1001 by site-directed mutagenesis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 2, p. 206-209, 2000.

ZHOU, Z. D.; LI, G. Y.; LI, Y. J. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 1, p. 21-26, 2010.

CAPÍTULO 2

**GENÔMICA COMPARATIVA DA CICLODEXTRINA
GLICOSILTRANSFERASE E IMOBILIZAÇÃO DO *Bacillus
trypoxylicola* SM-02 PARA A PRODUÇÃO DA ENZIMA**

Artigo formatado nas normas e a ser submetido à Brazilian Journal of Microbiology.

**GENÔMICA COMPARATIVA DA CICLODEXTRINA
GLICOSILTRANSFERASE E IMOBILIZAÇÃO DO *Bacillus
tryoxylicola* SM-02 PARA A PRODUÇÃO DA ENZIMA**

***Taís Teixeira das Neves¹, Lucas Sousa Sales¹, Jackeline Pereira Andrade²,
Phellippe Arthur Santos Marbach¹, Márcia Luciana Cazetta³.***

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas; ²Universidade Estadual de Feira de Santana; ³Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas (CETEC)-UFRB

Resumo: A enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) é produzida exclusivamente por microrganismos, especialmente bactérias do gênero *Bacillus*. Dentre suas propriedades está a produção de ciclodextrinas (CDs), oligossacarídeos cíclicos capazes de formar complexos de inclusão com diferentes moléculas, apresentando muitas aplicações industriais. Este trabalho teve como objetivo analisar a distribuição do gene que codifica homólogos da enzima CGTase nos táxons procarióticos, e avaliar a produção desta enzima utilizando o *B. tryoxylicola* SM-02 imobilizado em alginato de cálcio 2%. Para análise da distribuição evolutiva, foi realizada a busca por genes que codificam homólogos da CGTase nos genomas procarióticos disponíveis no banco de dados do NCBI e do CAZY. As fermentações foram realizadas com a bactéria imobilizada em diferentes meios de cultivo a base de farinha de mandioca, utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2². Os resultados das análises genômicas comparativas revelaram dois padrões de domínios conservados na CGTase, sendo que a CGTase1 está presente nos filos Archae e Bacteria Gram-positiva e a CGTase 2 apenas no filo Bacteria tanto em Gram-positiva como Gram-negativa. O meio de cultura composto por farinha de mandioca, milhocina, manipueira e hidróxido de sódio (FMMaN) se destacou com uma atividade enzimática 30,44 U/μmol, em média. A otimização deste meio atingiu atividade enzimática de até 166,64 U/μmol.

Palavras-chave: Enzimas, bactérias, distribuição evolutiva.

Abstract: The enzyme cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) is produced exclusively by microorganisms, especially bacteria of the genus *Bacillus*. Among its properties is the production of cyclodextrins (CDs), cyclic oligosaccharides capable of forming inclusion complexes with different molecules, exhibiting many industrial applications. This work aimed to analyze the distribution of the gene encoding CGTase enzyme homologues in prokaryotic taxa, and to evaluate the production of this enzyme using *Bacillus trypoxylicola* SM-02, immobilized in calcium alginate 2%. For analysis of the evolutionary distribution, were searched genes that encoding the CGTase homologs in the prokaryotic genomes available in the NCBI and CAZY database. The fermentations were carried out with the bacterium immobilized in different culture media based on cassava flour, using Central Composite Design (CCD) 2². The results of comparative genomics revealed two patterns of conserved CGTase domains, with CGTase1 being present in the Archae phyla and Gram positive Bacteria and CGTase 2 only in the Bacteria phylum in both Gram positive and Gram negative. The culture medium composed of cassava flour, corn steep liquor, manipueira, and sodium hydroxide (FMMaN) was highlighted with an average enzymatic activity of 30.44 U/ μ mol. The optimization of this medium reached enzymatic activity of up to 166.64 U / μ mol.

Keywords: Enzymes, bacteria, evolutionary distribution.

1. Introdução

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, naturais, não redutores, solúveis em água, formados pela ação de enzimas bacterianas sobre o amido e outros polissacarídeos relacionados. CDs consistem em

unidades de D-glicanopirranose unidas por ligações glicosídicas α -1,4 contendo seis, sete ou oito monômeros de glicose denominadas α , β , e γ -CD, respectivamente (Goo et al., 2014; Saokham e Loftsson, 2017).

As moléculas de CDs possuem caráter hidrofóbico em seu interior e hidrofílico na superfície e, desta forma, podem abrigar seletivamente uma vasta gama de moléculas em sua cavidade, formando os denominados “complexos de inclusão”. Moléculas orgânicas e inorgânicas quando complexadas, têm suas propriedades físicas, químicas e biológicas alteradas, tais como solubilidade e estabilidade (Moriwaki et al., 2009; Costa et al., 2015). Por ser capaz de formar complexos de inclusão, as CD estão sendo bastante empregadas nas indústrias alimentícia, farmacêutica, têxtil, de cosméticos, na química ambiental, analítica, atuando como emulsificante, estabilizante, mascarando odores, sabores, até mesmo extraindo compostos indesejáveis do meio onde são introduzidas (Dell Valle, 2004; Venturini et al., 2008).

As CDs são produzidas exclusivamente por uma enzima de origem microbiana, a ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, E.C 2.4.1.19), que pertence à maior família das alfa-amilases de glicosídeo hidrolases (família 13). A primeira CGTase descrita foi obtida pelo *Bacillus macerans* em 1974, porém apesar da produção desta enzima ser mais comum para espécies do gênero *Bacillus*, há relatos na literatura de sua produção por outros gêneros bacterianos como *Paenibacillus*, *Klebsiella*, *Thermoanaerobacterium*, *Thermoanaerobacter* e *Actinomyces* spp. (Han et al., 2014).

O elevado custo das CDs e da CGTase é um fator limitante para seu uso em escala comercial, sendo assim, vários estudos foram realizados para a

produção de CGTase e CDs a partir de substratos de baixo custo e alto valor nutricional como polvilho doce (Cucolo et al., 2006; Blanco, 2009), farelo de trigo (Prado et al., 2002), farinha de mandioca (Coelho et al., 2016), entre outros.

Assim como outras enzimas, a aplicação industrial da CGTase é muitas vezes dificultada pela falta de estabilidade a longo prazo, difícil recuperação e reutilização (Sheldon e Van Pelt, 2013). De acordo com Franssen et al. (2013), esses problemas podem ser reduzidos a partir da imobilização das enzimas, uma vez que a enzima imobilizada pode ser facilmente reutilizada. A CGTase imobilizada de *B. amyloliquefaciens*, por exemplo, exibiu maior temperatura ótima, diminuição da energia de ativação, menor taxa constante de desativação, maiores valores de meia vida ($T_{1/2}$) e maior resistência à desativação química (Abdel-Naby; Fouad; Reyad, 2015). Além disso, as células bacterianas também podem ser imobilizadas e segundo Duarte et al. (2013) a imobilização de células oferece vantagens importantes, como a facilidade de separação celular do meio, diminuição dos custos devido à reutilização celular em ciclos de reação subsequentes e menor possibilidade de contaminação.

O aprisionamento em matrizes como o alginato de cálcio é uma das técnicas mais comuns devido ao seu baixo custo (Franssen et al., 2013). Os *pellets* de alginato podem ser preparados pelo gotejamento da solução de alginato de sódio contendo a proteína ou célula desejada, dentro de uma solução de cátions divalentes, como Ca^{2+} , Sr^{2+} ou Ba^{2+} (Gombotz e Wee, 2012).

A genômica comparativa é uma abordagem holística em larga escala que compara dois ou mais genomas para verificar suas semelhanças e diferenças e estudar a biologia dos genomas individuais. Aplica-se a genomas inteiros ou regiões sintênicas de diferentes espécies, subespécies ou cepas da mesma espécie (Wei et al., 2002). As ferramentas mais importantes da genômica comparativa são os algoritmos de alinhamento global e local de pares de sequências ou de múltiplas sequências e os métodos de análise filogenética (Catanho; De Miranda; Degrave, 2007). Este estudo teve como objetivo analisar a distribuição do gene que codifica a enzima CGTase nos táxons procarióticos, assim como avaliar a produção desta enzima utilizando o *Bacillus trypoxylicola* SM-02, imobilizado em alginato de cálcio.

2. Material e métodos

2.1 Material biológico

O *Bacillus trypoxylicola* SM-02 foi isolado de amostras de solo de uma casa de farinha de mandioca no município de Cruz das Almas, Bahia, Brasil. Os isolados bacterianos foram preservados em criotubos contendo 1,5 mL de meio Nakamura e Horikoshi (1976) contendo (p/v): amido solúvel (1%), extrato de levedura (0,5%), peptona (0,5%), K₂HPO₄ (0,02%), MgSO₄.7H₂O (0,1%) e Na₂CO₃ (1,0%), sendo este último esterilizado separadamente. Os criotubos foram armazenados a -80 °C.

2.2 Genômica comparativa e Análises filogenéticas

Inicialmente foi confeccionada uma lista das espécies com genomas totalmente sequenciados, disponíveis na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) até janeiro de 2017. Posteriormente, foram

realizadas buscas por genes que codificam homólogos da CGTase nos genomas dessas espécies usando os programas BLASTP e TBLASTN. Durante as análises com o BLASTP e TBLASTN foram recuperadas todas as sequências que possuíam os domínios típicos encontrados em CGTases caracterizadas experimentalmente (Altschul et al., 1990). Adicionalmente, foram realizadas buscas por CGTases caracterizadas experimentalmente depositadas na base de dados CAZY (www.cazy.org), onde foram encontradas cepas produtoras da enzima com apenas três domínios conservados. Sendo assim foram recuperadas sequências da enzima CGTase de dois tipos, denominada de CGTase1, aquela com cinco domínios conservados e CGTase2 com quatro domínios conservados (Figura 1).

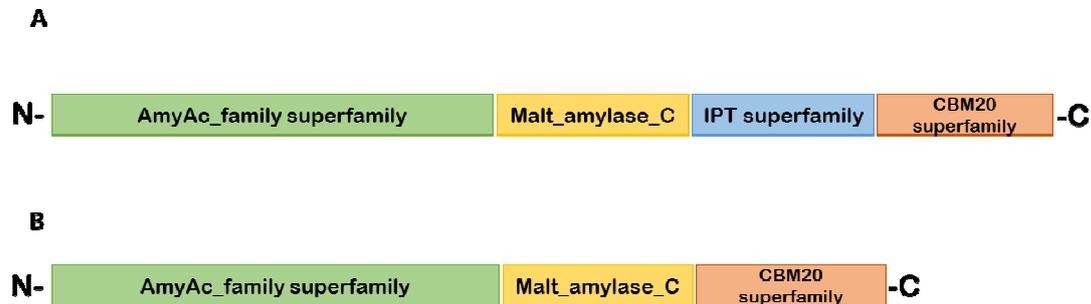


Figura 1. Desenho esquemático dos domínios conservados da enzima CGTase. **A)** com cinco domínios e **B)** com quatro domínios.

O alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos foi feito no *Guidance Server*, com o algoritmo MAFFT, utilizando os parâmetros padrões do programa. Em seguida, o alinhamento múltiplo de nucleotídeos foi traduzido

para aminoácidos e corrigido manualmente no programa MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013).

Todas as análises filogenéticas foram realizadas no programa MEGA 6.06 com posições não ambíguas dos alinhamentos múltiplos das sequências de aminoácidos da CGTase utilizando-se o método da máxima verossimilhança. A confiabilidade da topologia das árvores obtidas foi avaliada usando o método de *bootstrap*, com 1000 reamostragens, e o método heurístico *Nearest-Neighbor-Interchange* foi usado na busca pela árvore filogenética mais verossímil. A árvore filogenética obtida foi visualizada no programa *Archeopterix*.

2.3 Sequenciamento do gene que codifica a CGTase de *Bacillus tryoxylicola* SM-02

A sequência de nucleotídeos da CGTase de *Bacillus tryoxylicola* (WP_061949393.1) foi usada como *query* para fazer uma busca por sequências homólogas nas bases de dados de genomas do NCBI com até 90% de identidade. As sequências de nucleotídeos foram recuperadas de modo a incluir os genes que flanqueiam o gene que codifica a CGTase e em seguida foram alinhadas no *Guidance Server* (Sela et al., 2015). O alinhamento múltiplo obtido foi visualizado no programa MEGA 6.06 e usado para desenhar os *primers* que foram usados para amplificar a região do genoma de *B. tryoxylicola* SM02 que codifica o gene da CGTase (Tabela 1).

Tabela 1: Lista de *primers* utilizados para amplificar o gene da CGTase de *B. trypoxylicola* SM-02.

Primer	Orientação	Sequência de nucleotídeos
CGTase-F2:	Senso	5' AAAGGAATTGATGGGAT 3'
CGTase-R2:	Anti-senso	5' CCGGGTTGCTTTGTCT 3'
CGTase-F3:	Senso	5' CACATGCCGCTAAGAGA 3'
CGTase-R3:	Anti-senso	5' TGAATAGGCGTACGCATA 3'
CGTase-F:	Senso	5' CTCAGGCTGACGTTACAAA 3'
CGTase-R:	Anti-senso	5' GGAACACTTATATCATAGTACC 3'

Os *primers* foram desenhados de modo a: *i*) amplificar fragmentos de DNA que tivessem sobreposição com pelo menos um dos fragmentos amplificados; *ii*) um dos *primers* usados para amplificar as regiões 5' e 3' do gene da CGTase foi ancorado nos genes que o flanqueiam no genoma de *Bacillus trypoxylicola*.

As reações de PCRs (*Polimerase Chain Reaction*) foram realizadas conforme descrito na Tabela 2. Em seguida, os produtos das PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0 %, extraídos do gel usando o kit comercial GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification e enviado para sequenciamento na empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA. O Programa Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Mi) foi usado para montar o *contig* das sequências de nucleotídeos obtidas com o sequenciamento dos produtos das PCRs.

Tabela 2 –Volumes e concentração das soluções usadas nas reações de PCR e condições em que as PCRs foram realizadas.

Reagentes utilizados nas PCRs						
Reagentes		Vol. (µL)	Concentração Final			
Água		18,05				
Tampão 10X		2,5	1,00			
MgCl ₂ (50mM)		0,75	1,50			
dNTPs (10mM)		0,5	0,20			
Primer 1 (10 pmol/µL)		0,5	0,20			
Primer 2 (10 pmol/µL)		0,5	0,20			
Taq Polimerase (5 U/µL)		0,2	0,04			
DNA (µL)		2				

Condições das PCRs						
Primer's	Temperatura de anelamento	Tempo de extensão	Desnaturação inicial	35-Ciclos	Extensão Final	Tamanho fragmento amplificado
F1/R1	50°C	2'	95°C-2'	95°C por 45"; 50°C-30"; 72°C por 1'50"	7' a 72°C	1.903pb
F3/R2	50°C	1'50"	95°C-2'	95°C por 45"; 50°C-30"; 72°C por 1'50"	7' a 72°C	1.722pb
R3/F2	50°C	1'50"	95°C-2'	95°C por 45"; 50°C por 30"; 72°C por 1'50"	7' a 72°C	1.554pb
R2/F2	50°C	40"	95°C-2'	95°C por 45"; 50°C por 30"; 72°C por 40"	7' a 72°C	547pb

2.4 Procedimento experimental

2.4.1 Meios de cultura para crescimento bacteriano e fermentação

O meio Nakamura e Horikoshi (1976) foi utilizado para preparação do pré-inóculo e para a produção de biomassa para imobilização. Para determinar

qual melhor substrato para produção da enzima utilizando o microrganismo livre, foram testados 3 meios denominados A, B e C, onde as fontes de nitrogênio e carbono do meio Nakamura e Horikoshi (1976) foram substituídas: Meio A- as fontes de nitrogênio por milhocina e a fonte de carbono (amido) por farinha de mandioca a 3%; Meio B- casca de mandioca 2,5% e Meio C- araruta 3%. Em todos os meios a água foi substituída pela manipueira, de acordo com Peixoto (2015) e Coelho et al. (2016). Para determinação do melhor substrato para produção da enzima, utilizando o microrganismo imobilizado foram testados 8 meios descritos na Tabela 3:

Tabela 3. Composição dos meios utilizados para a produção de enzima CGTase, utilizando microrganismo imobilizado.

Sigla	Composição do meio
FAN	Farinha de mandioca e água
FMAN	Farinha de mandioca, milhocina e água
FMMaN	Farinha de mandioca, milhocina, manipueira e NaOH
FMaN	Farinha de mandioca, manipueira e NaOH
FMMaT	Farinha de mandioca, milhocina, manipueira e Tris-HCl
FMaT	Farinha de mandioca, manipueira e Tris-HCl
FMT	Farinha de mandioca, milhocina e Tris-HCl
FT	Farinha de mandioca e Tris-HCl

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), teste de Tukey e Scott-Knott (para produção da enzima utilizando microrganismos livres e imobilizados, respectivamente), ao nível de 5% de probabilidade, usando o programa estatístico R studio (R i386 3.3.3).

2.4.2 Imobilização do microrganismo em Alginato de Cálcio

Após 48 horas de incubação em B.O.D a 35 °C, uma alçada com a cultura do *B. trypoxylicola* SM-02 crescido em placa, foi transferida para frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio estéril e mantido a 35 °C e

150 rpm em câmara agitadora por mais 48 horas. Depois deste período, o meio foi centrifugado a 4 °C, 5.000 rpm, 30 min., o sobrenadante livre de células foi descartado e a biomassa foi utilizada para preparação das células imobilizadas.

A biomassa úmida do *B. trypoxylicola* SM-02, proveniente de 100 mL de cultura (aproximadamente 3,00 g células úmidas), foi resuspendida em 10 mL de solução salina 0,85% estéril e misturada em 50 mL de solução de alginato de sódio 2% (p/v). A solução foi transferida para um funil de separação e gotejada em uma solução aquosa de cloreto de cálcio (CaCl_2 , 0,1 M) a 4 °C para a formação dos *pellets*, os quais foram submetidos a um período de cura de 24 h, para a fixação do microrganismo. Após este período, os *pellets* foram filtrados, lavados com água destilada estéril e utilizados para inoculação dos meios fermentativos.

2.4.3 Produção da CGTase

Para a produção da CGTase utilizando o microrganismo livre foram utilizados os meios A, B e C (item 2.4.1). Após 48 horas de incubação em B.O.D a 35 °C, uma alçada com a cultura do *B. trypoxylicola* SM-02 crescido em placa, foi transferida para 25 mL de meio de Nakamura e Horikoshi e mantida a 35 °C e 150 rpm em câmara agitadora por 24 horas, formando o pré-inóculo. O inóculo foi obtido após transferência de 5 mL do pré-inóculo, com uma D.O._{600} fixada em 1,0, em 45 mL de meio fermentativo a 35 °C, 150 rpm durante 24 horas. Depois, um volume de 5 mL (correspondendo a 10 % de volume total do meio de cultivo) foi transferido para frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 45 mL dos meios fermentativos, incubado à 35 °C durante 72 h, 150 rpm em câmara agitadora do tipo shaker. Em seguida, o meio foi

centrifugado a 4 °C, 5.000 rpm, 30 min. e o sobrenadante livre de células foi utilizado para atividade enzimática.

Para a produção da enzima CGTase utilizando as células imobilizadas, aproximadamente 0,25 g de células úmidas imobilizadas (*pellets*), foram inoculadas em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio fermentativo com farinha de mandioca e milhocina, conforme DCCR 2² (Tabela 4) e incubados a 35 °C, 150 rpm por 96 h, em incubadora do tipo Shaker. Após este período o meio fermentativo foi centrifugado a 4 °C, 5.000 rpm, 30 min. e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade enzimática.

Os resultados apresentados pelo modelo experimental aplicado foram avaliados através do *Software Statistica Release* versão 7.1, Stat Soft. Inc., USA.

2.4.4 Determinação da atividade enzimática

A atividade da CGTase foi determinada pela medida da velocidade inicial da produção de β -ciclodextrina, como descrito por Blanco (2009), utilizando-se como substrato uma solução de amido 1%, em tampão Tris-HCl 0,05 M e CaCl_2 0,05 M, 55 °C, pelo método de dosagem espectrofotométrica com fenolftaleína, que se baseia na formação de um complexo entre a β -ciclodextrina e o corante e promove a descoloração da solução e redução da absorção colorimétrica no comprimento de onda de 550 nm.

Em reator termostaticado foram adicionados 5 mL de solução de amido 1% e 5 mL do extrato enzimático. Alíquotas de 2 mL foram retiradas nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 minutos, transferidas para um tubo de ensaio, colocados em banho-maria 100 °C por 5 minutos para inativar a enzima, e logo depois

resfriados em banho a temperatura ambiente. A quantidade de β -ciclodextrina foi dosada em função do tempo, adicionando-se 2,5 mL da solução de fenolftaleína (5,0 mL de tampão carbonato de sódio 0,6 M, pH 8,0 e 0,5 mL de solução alcoólica de fenolftaleína 3 mM, completado para 25 mL com água destilada) e 0,5 mL das amostras inativadas. Uma unidade de atividade (U) corresponde à quantidade de CGTase que libera 1 μ mol de β -CD/min nas condições reacionais citadas anteriormente. Para os cálculos de atividade enzimática, foi confeccionada uma curva padrão de β -CD e um gráfico com o valor de inclinação para cada ensaio. A atividade enzimática foi encontrada por meio da equação 3:

$$A = \alpha * \beta * F_{dil} * 1000 * \frac{V_{total}}{V_{enz.}} \quad (3)$$

Onde: A é a atividade enzimática (U/mL), α é o coeficiente angular da reta padrão (mmol.mL⁻¹/ABS), β é o coeficiente angular da curva obtida experimentalmente (ABS/min.), V_{total} é o volume total do reator, $V_{enz.}$ é o volume do extrato enzimático no reator e F_{dil} é o fator de diluição.

2.5 Planejamento experimental

A metodologia de superfície de resposta, que tem como base o planejamento experimental (Rodrigues e Iema, 2009), foi empregada para otimizar as concentrações de substrato para melhor produção da enzima CGTase por células imobilizadas, utilizando farinha de mandioca e milhocina, em fermentação submersa. Assim, foi construída uma matriz de planejamento

fatorial 2², por meio do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), resultando em 11 ensaios, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Delineamento composto central rotacional 2² para produção da enzima CGTase por *B. tryposylicola* SM-02 imobilizado, usando farinha de mandioca e milhocina como variáveis independentes em fermentação submersa.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	X1	X2	Milhocina (g)	Farinha de mandioca (g)
1	-1	-1	0,2	1,0
2	+1	-1	0,5	1,0
3	-1	+1	0,2	4,0
4	+1	+1	0,5	4,0
5	-1,41	0	0,14	2,5
6	+1,41	0	0,56	2,5
7	0	-1,41	0,35	0,5
8	0	+1,41	0,35	4,5
9	0	0	0,35	2,5
10	0	0	0,35	2,5
11	0	0	0,35	2,5
12	0	0	0,35	2,5

Este modelo é representado por uma regressão polinomial de segunda ordem, Eq.(1):

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 \quad (1)$$

onde: y é a resposta predita da atividade de CGTase; X_1 e X_2 são as formas codificadas (milhocina e farinha de mandioca, respectivamente); b_0 refere-se ao

ponto de interseção; b_1 e b_2 são coeficientes lineares; b_{12} coeficiente de interação dupla; b_{11} e b_{22} são coeficientes quadráticos.

Os níveis das variáveis estudadas foram calculados na forma codificada, utilizando para cada planejamento experimental a seguinte equação de codificação:

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{X_{+1} - X_{-1}} \quad (2)$$

onde: X_n é o valor codificado; X é o valor real da variável independente; X_0 o valor real do ponto central; X_{+1} é o valor do nível superior; X_{-1} é o valor do nível inferior.

3. Resultados

3.1 Genômica comparativa

A busca por genes que codificam homólogos da CGTase foi realizada em 2.076 genomas completamente sequenciados de espécies/cepas distribuídas em 918 gêneros procarióticos (Tabela 5). Dentre os gêneros/espécies amostrados, 19,5/29,6% não possuem nenhum domínio de CGTase conservado, cerca de 35/30% possuem apenas um domínio conservado, 43/38% dois domínios conservados, cerca de 1,0/1,0% três domínios conservados e apenas 1,4/1,2% possuem o conjunto com os quatro domínios conservados. A CGTase 1, que contém cinco domínios, foi encontrada em espécies de Archaea e em bactérias Gram-positivas e a

CGTase 2, que possui quatro domínios, foi encontrada tanto em espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Tabela 6).

Tabela 5. Diversidade de procariotos com genoma totalmente sequenciado amostrados no estudo. Dado recuperados do banco de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), atualizados em janeiro de 2017.

Domínio	Filo	Classe	Sigla	Amostragem (gênero/espécie)	
Archae	Crenarchaeota	Thermoprotei	CT	20/39 ¹	
		Euryarchaeota	?	EU	1/2
	Euryarchaeota	Archaeoglobi	EA	4/9	
		Halobacteria	EH	21/38 ¹	
		Methanobacteria	EMB	5/12	
		Methanococci	EMC	4/13	
		Methanomicrobia	EMM	17/31	
		Methanopyri	EMP	1/1	
		Thermococci	ETC	3/18	
		Thermoplasmata	ETP	6/9	
		Korarchaeota	?	KO	1/1
		Thaumarchaeota	?	TH	2/5
			Nitrososphaeria	THN	2/2
			Nanoarchaeota	?	NA
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	FB	42/215 ¹	
		Clostridia	FC	54/117 ¹	
		Erysipelotrichia	FE	5/5	
		Limnochordia	FL	1/1	
		Negativicutes	FN	6/9	
		Tissierellia	FT	1/1	
		Tenericutes	Mollicutes	TM	7/64
		Actinobacteria	Actinobacteria	ACT	113/260 ^{1,2}
			Coriobacteriia	ACC	7/8
			Rubrobacteria	ACR	1/2
		Cyanobacteria	?	CY	28/37 ²
	Oscillatoriothycideae		CYO	2/2	
	Gloeobacteria		CYG	1/2 ²	
	Aquificae		AQ	8/10	
	Chloroflexi	Anaerolineae	CHA	1/1	
		Chloroflexi	CH	5/8 ²	
	Deinococcus/Thermus	Dehalococcoidetes	CHD	2/5	
		Thermomicrobia	CHT	2/2	
		Deinococci	DE	6/22	
		Acidobacteria	AD	6/8	
		Planctomycetes	PL	7/7	
		Thermotogae	TH	9/20	
		Bacteroidetes	?	BA	3/3
		Bacteroidia	BAD	13/28	
		Chitinophagia	BAH	1/1	
		Cytophagia	BAY	20/26	
	Flavobacteriia	BAF	35/49		

Tabela 5. Continuação...

Domínio	Filo	Classe	Sigla	Amostragem (gênero/espécie)
	Verrucomicrobia	?	VE	2/3
		Opitutae	VEO	3/3
		Spartobacteria	VES	1/1
		Verrucomicrobiae	VEV	2/2
	Dictyoglomi	Dictyoglomia	DC	1/2
	Elusmicrobia	?	EL	1/1
		Elusimicrobia	ELS	1/1
		Endomicrobia	ELD	1/1
	Nitrospirae	Nitrospira	NI	4/6
	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	GE	2/2
	Synergistetes	Synergistia	SY	6/6
	Deferribacteres	Deferribacteres	DF	4/4
	Chrysiogenetes	Chrysiogenetes	CH	1/1
	Fibrobacteres	Fibrobacteria	FI	1/1
	Thermodesulfobacteria	Thermodesulfobacteria	TD	3/4
	Chlamydiae	Chlamydiae	CM	4/13
	Spirochaetes	Spirochaetia	SP	10/44
	Caldiserica	Caldisericia	CD	1/1
	Armatiomonadetes	Fimbriimonadia	AF	1/1
	Ignavibacteriae	Ignavibacteria	IG	2/2
	Microgenomates	?	MI	1/1
	Parcubacteria	?	PR	1/1
	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	PD	38/65 ²
		Epsilonproteobacteria	PE	11/43
		Alphaproteobacteria	PA	110/246
		Betaproteobacteria	PB	68/167
		Gammaproteobacteria	PG	142/327 ²

¹ CGTase com cinco domínios; ² CGTase com quatro domínios.

Tabela 6. Distribuição das regiões conservadas da enzima CGTase, nos gêneros/espécies amostrados.

Domínios conservados	Gênero (%)	Espécie (%)
Amyac_A	34,1	29,7
CBM20	0,1	0,1
IPT	0,5	0,2
Amyac_A e malt_amylase	41,1	37,0
Amyac_A e CBM20	1,9	1,0
Amyac_A, malt_amylase e CBM20 – CGTase2	1,1	0,7
Amyac_A, malt_amylase e IPT	0,3	0,5
Amyac_A, malt_amylase, IPT e CBM20 – CGTase1	1,4	1,2
Nenhum dos sítios conservados	19,5	29,6

A CGTase não está amplamente distribuída nos filós procarióticos analisados, sendo encontrada somente em espécies dos Filos Crenarchaeota e

Euryarchaeota (Domínio Archaea), Firmicutes e Actinobacteria (filos de bactérias Gram-positivas), Cyanobacteria e Proteobacteria (filos de bactérias Gram-negativas) (Tabela 7).

Tabela 7. Genômica comparativa dos procariotos com genoma completo e incompleto. Os valores indicam a quantidade de gênero/espécie que apresenta o gene da CGTase. Linhas vazias indicam ausência do gene.

Domínio	Classificação	CGTase	
		Genoma completo	Genoma incompleto
Archaea	CT	1/1	
	EH	2/2	
	ETC		1/1
Bacteria – Gram-positiva	FB	4/12	2/26
	FC	3/6	3/5
	ACT	3/6	
Bacteria – Gram-negativa	CY	4/4	
	CYG	1/2	
	PD	1/1	
	PG	2/2	1/1

3.2 Sequenciamento do gene que codifica a CGTase de *Bacillus tripoxylicola* SM-02

A montagem dos *reads* oriundos do sequenciamento dos produtos de PCR produziu um *contig* de 2.628 bases. Este *contig* inclui toda a região codante do gene da CGTase do *B. tripoxylicola* SM-02, que possui 99%/99% de identidade/similaridade com a sequência de nucleotídeos/sequência de aminoácidos da CGTase de *B. tripoxylicola* (WP_061949393.1), conforme comparação feita usando o programa BLASTN e BLASTX.

A sequência de aminoácidos da CGTase de *B. tripoxylicola* SM-02 tem 40,5% de GC e contém todos os domínios presentes nas CGTases caracterizadas experimentalmente, conforme análise realizada com o programa

CD-search disponível no site do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

3.3 Filogenia molecular das CGTases procarióticas

Para confecção da árvore filogenética foram recuperadas 60 sequências de nucleotídeos, que codificam proteínas homólogas à CGTase 1 e 15 da CGTase 2. As CGTases do banco de dados CAZY são caracterizadas em α , β e γ -CGTase. Assim, foram encontradas CGTases no grupo de Archaea, bactérias Gram-positivas, em especial no gênero *Bacillus* e em bactérias Gram-negativas

A árvore filogenética (Figura 2) das espécies que produzem a enzima CGTase evidencia que a maioria dos microrganismos analisados produzem β -CGTase e poucas espécies produzem α - e γ -CGTase. Além disso, as espécies que produzem γ -CGTase estão juntas no mesmo grupo e o *B. tryoxylicola* SM-02 agrupou-se com espécies que produzem β -CGTase. As espécies que produzem homólogos de CGTase com quatro domínios foram agrupadas na parte inferior da árvore.

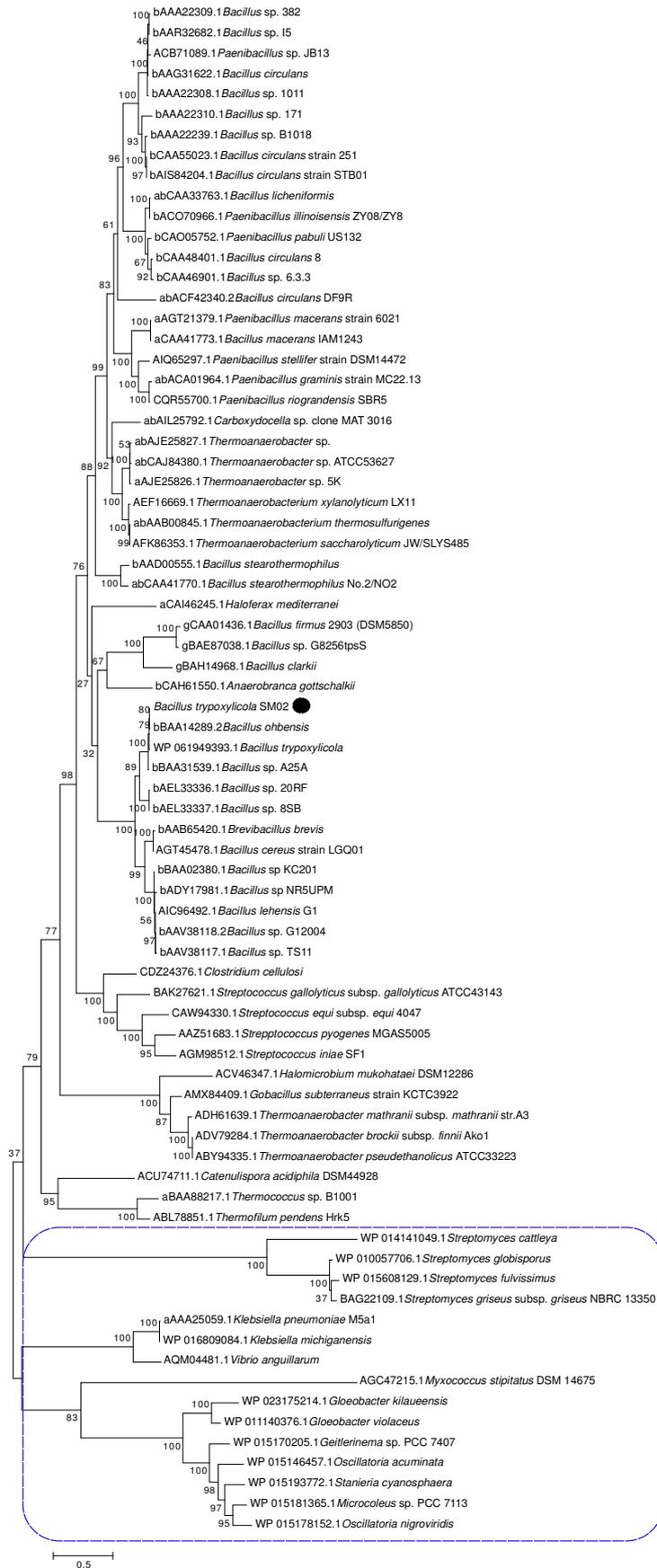


Figura 2 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança da enzima CGTase. Letras em caixa baixa no início da cepa indica o tipo de CGTase produzida: a = α -CGTase; b = β -CGTase; g = γ -CGTase. O círculo preto indica a localização do *B. tryposylicola* SM-02 e o contorno azul indica a localização das cepas com CGTase de apenas quatro domínios.

3.4 Produção da CGTase por fermentação

Os substratos derivados da mandioca foram os que apresentaram os melhores resultados. A maior atividade enzimática foi observada utilizando a farinha de mandioca, que foi cerca de 40% maior do que a casca de mandioca. (Figura 3).

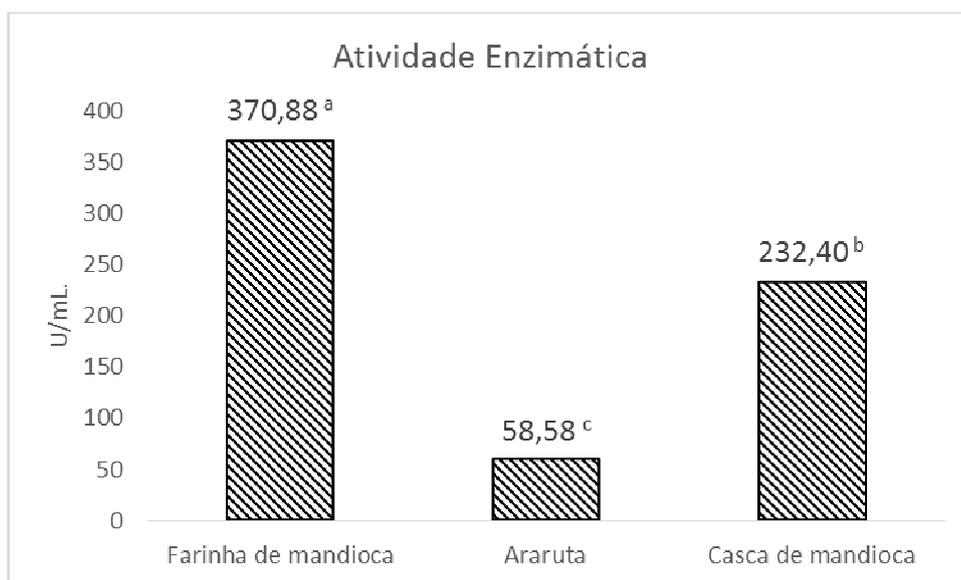


Figura 3. Produção da enzima CGTase por fermentação submersa em diferentes substratos. Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

A partir desses resultados, foi escolhido o meio A, contendo farinha de mandioca para produção da enzima utilizando o microrganismo imobilizado em alginato de cálcio.

Os *pellets* contendo células imobilizadas do *B. tryposylicola* SM-02, foram inoculados no meio A, porém, após 20 minutos de incubação em B.O.D à 35 °C, houve ruptura dos mesmos, liberando as células para o meio. Assim, foram testados meios de cultivo utilizando como base a farinha de mandioca, associada com outros nutrientes para produção da enzima utilizando as células imobilizadas de *B. tryposylicola* SM-02.

Dos oito meios testados para produção de CGTase utilizando o microrganismo imobilizado, pode-se verificar que o meio composto por farinha de mandioca, milhocina, manipueira e NaOH (FMMaN), se destacou com produção média de 30,44 U/mL, em 96 h (Figura 4).

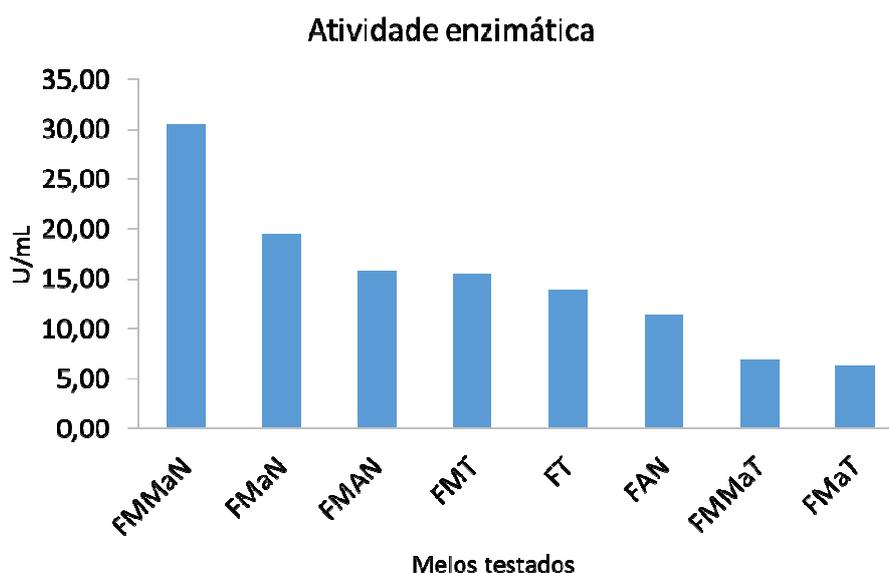


Figura 4. Atividade enzimática (U/mL) para cada meio testado, utilizando células do *B. tryposylicola* imobilizadas, com teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade (letras diferentes indicam diferenças estatísticas).

É possível inferir que nos meios em que a manipueira foi associada com o NaOH (FMMaN e FMaN) a produção da enzima foi maior, quando comparada

aos meios onde utilizou-se o tampão Tris-HCl nas mesmas condições (FMMaT e FMaT).

Na Figura 5 é possível observar o melhor tempo para produção da enzima no meio FMMaN com o microrganismo imobilizado, com atividade enzimática de 39,02 U/mL em 96 h.

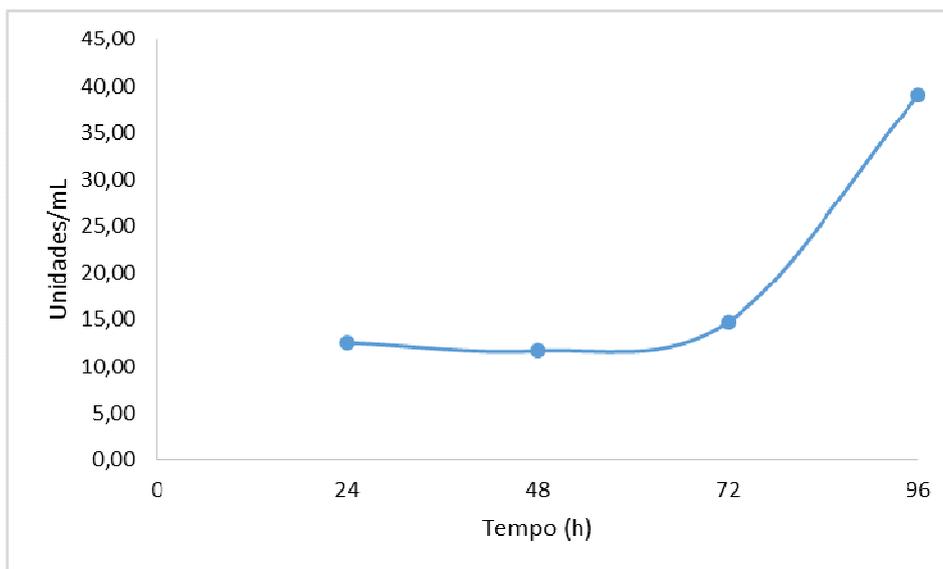


Figura 5. Otimização do tempo de produção da CGTase pelo *B. trypoxylicola* SM-02 imobilizado em alginato de cálcio a 2%.

3.5 Otimização da produção de CGTase utilizando DCCR 2²

Baseado nos resultados com os diferentes meios de cultivo, foi selecionado o meio FMMaN para a otimização da atividade enzimática.

A maior atividade enzimática foi observada no ensaio 1 (0,2 g de milhocina e 1,0 g de farinha de mandioca), com 166,64 U/mL, seguida do ensaio 8 (0,35 g de milhocina e 4,5 g de farinha de mandioca), com 70,64 U/mL, ambos após 96 horas de cultivo (Tabela 8).

Tabela 8. Matriz do planejamento experimental da produção enzimática por *B. tryposylicola* SM-02 imobilizado em alginato de cálcio, em fermentação submersa e valores das variáveis independentes usados no DCCR (milhocina e farinha de mandioca).

Ensaio s	Variáveis codificadas		Variáveis reais		Atividade enzimática (U/mL)
	X1	X2	Milhocina (g)	Farinha de mandioca (g)	
1	-1	-1	0,2	1,0	166,64
2	1	-1	0,5	1,0	16,30
3	-1	1	0,2	4,0	17,21
4	1	1	0,5	4,0	6,34
5	-1,41	0	0,14	2,5	12,68
6	1,41	0	0,56	2,5	7,52
7	0	-1,41	0,35	0,5	11,77
8	0	1,41	0,35	4,5	70,64
9	0	0	0,35	2,5	7,70
10	0	0	0,35	2,5	7,70
11	0	0	0,35	2,5	5,89

Estes dados revelaram que para uma quantidade fixa de farinha de mandioca, o aumento da concentração de milhocina reduziu a produção da enzima CGTase. Isso também ocorreu quando, para um valor fixo de milhocina, foi elevada a concentração de farinha de mandioca, sugerindo que estes valores são inversamente proporcionais. Como exceção, a associação de 0,35 g de milhocina com 4,5 g de farinha de mandioca, foi o único caso em que, comparando uma mesma quantidade de milhocina associada ao aumento da quantidade de farinha de mandioca, houve maior produção de enzima.

Entretanto, após a análise de variância (ANOVA) (Tabela 9) foi obtido um baixo valor do F calculado (2,45) comparado ao F tabelado (4,35), indicando que o modelo não foi significativo ao nível de confiança aplicado (95%).

Tabela 9. Análise de variância (ANOVA) para a produção de CGTase por *B. trypoxylicola* SM-02 imobilizado em alginato de cálcio, em fermentação submersa utilizando manipueira, farinha de mandioca e milhocina como substratos.

Fatores	GL	SQ	QM	Fc
Regressão	3	12274,93	4091,64	2,45
Resíduo	7	11671,76	1667,39	
Total	10	23946,69		

Não significativo ao nível de 5% de probabilidade; R^2 : 0,5126; F_{tab} : 4,35

Outros delineamentos foram realizados, porém o valor do R^2 foi muito baixo, evidenciando a dificuldade em reproduzir o experimento utilizando as células imobilizadas.

4. Discussão

4.1 Genômica comparativa

A amostragem dos filós apresenta distribuição desigual, onde alguns grupos taxonômicos são bem representados enquanto outros não. Além disso, poucos grupos taxonômicos contêm espécies com o gene que codifica a enzima CGTase, como pode ser observado na Tabela 5.

A CGTase 2, com ausência do domínio IPT, foi mais encontrada em espécies de bactérias Gram-negativas. Em nenhuma cepa da mesma espécie foram encontrados os dois tipos de CGTase, indicando que o mesmo genoma não codifica os dois tipos da enzima. O único filo onde se encontrou espécies que produziam CGTase 1 ou CGTase 2 foi o Filo Actinobacteria, sendo então promissora a prospecção de espécies deste filo no estudo da evolução da CGTase. As espécies bacterianas com genes homólogos à CGTase 2

formaram um grupo na parte inferior da árvore filogenética, indicando que este tipo de enzima teve origem semelhante na evolução destes microrganismos.

Os domínios que estão presentes em CGTases foram encontrados em outras enzimas, mas estas não necessariamente descritas como CGTases. As enzimas da família α -amilase exibem, em geral, grau muito baixo de similaridade. Entretanto, elas contêm várias regiões conservadas bem definidas em suas sequências de aminoácidos que são altamente conservados (Janecek, 1997). As α -amilases geralmente apresentam uma estrutura com três domínios. Porém, a CGTase é mais complexa e possui dois domínios adicionais na região C-terminal denominados domínio D e domínio E. O domínio D, também conhecido como domínio IPT, tem função ainda desconhecida, já o domínio E (CBM20) tem a capacidade de se ligar e degradar o grânulo bruto do amido e está presente em aproximadamente 10% das enzimas amilolíticas (Janecek; Svensson; MacGregor, 2003).

No presente estudo, cerca de 70% das espécies de microrganismos amostradas apresentaram pelo menos uma das regiões conservadas de enzimas amilolíticas. E espécies de pelo menos 22 Filos possuem o domínio Amyac_A, que representa os domínios A e B (domínio catalítico) da superfamília das α -amilases, indicando a produção destas enzimas por aproximadamente 58% das espécies amostradas. Enquanto que a CGTase foi encontrada em espécies de apenas 8 Filos.

De acordo com Janecek (1997) há uma relação evolutiva entre α -amilase e CGTase, o que sugere que são grupos próximos da família 13. As funções das duas enzimas são similares, diferindo apenas no segundo estágio

da reação catalítica. Além disso, traços característicos de CGTases estão presentes nas sequências de α -amilases.

A CGTase de *B. trypoxylicola* SM-02 está filogeneticamente relacionada com aquela do grupo de espécies que produzem β -CGTase, sugerindo que esta cepa também produz majoritariamente este tipo de enzima. O sequenciamento realizado é mais uma evidencia da proximidade filogenética do *B. trypoxylicola* SM-02 com o *B. trypoxylicola*, tanto pela identidade da sequência como pelo fato de ter conseguido amplificar fragmentos ancorando *primers* nos genes que flaqueiam a CGTase de *B. trypoxylicola*. O fato de ter conseguido amplificar esses fragmentos significa que são os mesmos genes que flaqueiam a CGTase de *B. trypoxylicola* SM-02, o que mostra que existe sintenia nessa região do genoma de *B. trypoxylicola* SM-02 com o *B. trypoxylicola*. A topologia da árvore do gene 16S (Figura 6) construída por Coelho et al. (2016) não é congruente com a topologia da árvore das CGTases, indicando que elas ou foram seletivamente perdidas/mantidas ou adquiridas por transferência horizontal.

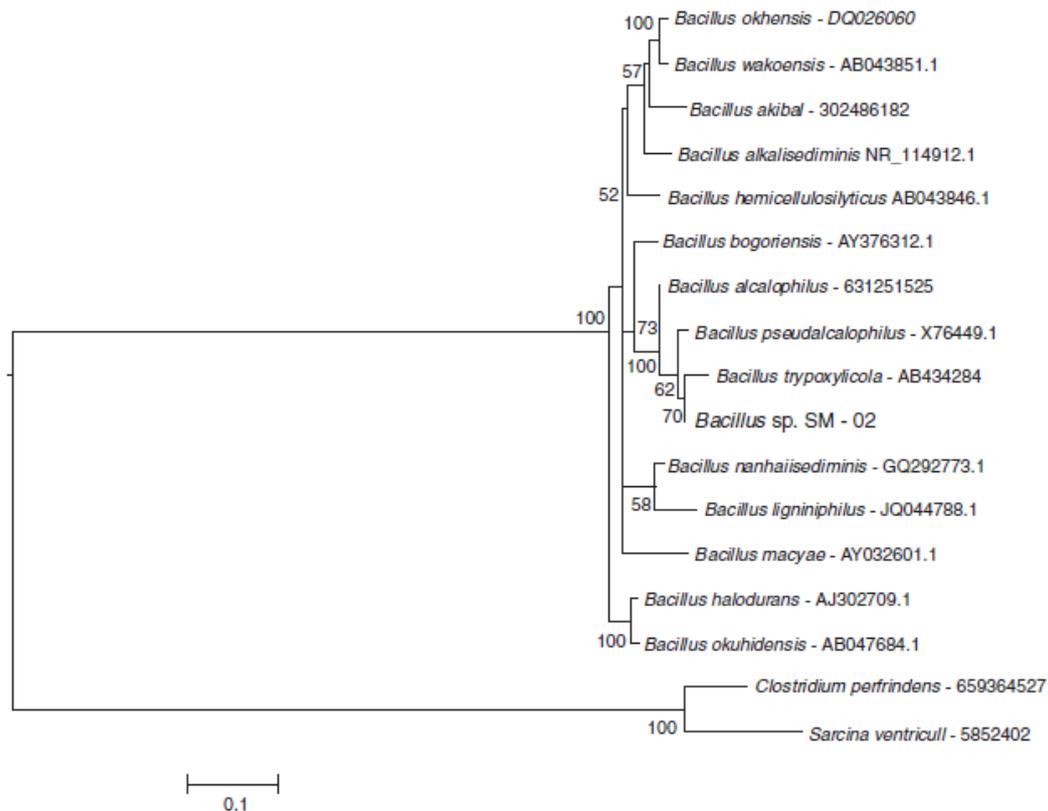


Figura 6. Relação filogenética entre o *Bacillus* sp. SM-02 e outras espécies do gênero *Bacillus*, utilizando o rRNA 16S. Fonte: Coelho et al., 2016.

A filogenia mostrou ainda, que a maioria das espécies caracterizadas produzem o tipo β -CGTase enquanto poucas espécies produzem α - e γ -CGTase. Por este motivo o custo de produção da β -CD é menor e a utilização deste tipo de CD nas indústrias é maior. Como afirmam Saokham e Loftsson (2017), a β -CD é a CD mais utilizada em produtos industriais, correspondendo a cerca de 70% da produção global de CD, enquanto α -CD é de cerca de 15% e γ -CD é de cerca de 5%.

A γ -CGTase foi verificada em apenas três espécies sendo todas do gênero *Bacillus* e o agrupamento dessas espécies indica similaridade na sequência de aminoácidos que codifica esta enzima. De acordo com Kelly; Dijkhuizen; Leemhuis (2009), no subsítio-3, posição 47, está presente um

resíduo de treonina para γ -CGTase, que difere de outros resíduos presentes em α - e β -CGTase; além disso, o *loop* entre a posição 87 – 93 é mais curto, proporcionando assim mais espaço para formação de uma CD mais larga durante o processo de ciclização.

4.2 Produção de CGTase

Os produtos à base de farinha de mandioca são abundantes no Brasil, especialmente no estado da Bahia, que é um dos maiores produtores de mandioca do país (Fiorda et al., 2013). Além dos produtos para o consumo, as indústrias de processamento de mandioca, mesmo as menores unidades, como as casas de farinha, geram resíduos sólidos (cascas, entrecasca e bagaços) e líquidos (manipueira), sendo que todos têm amido em suas composições com teores variáveis. O teor de amido na farinha de mandioca atinge valores acima de 82% (Dias; Leonel, 2006) e no resíduo da casca de mandioca, incluindo cascas, entrecascas e pontas de raízes, é de 58,1% (Caldas Neto et al., 2000). Esses dados explicam a diferença da atividade enzimática observada entre os substratos farinha e casca de mandioca.

Nas formulações de meios de cultura, o uso tradicional de fontes de carbono e nitrogênio comerciais gera custos elevados na produção industrial de enzimas. Com isso, diversas pesquisas são conduzidas para a produção de enzimas, utilizando resíduos ou substratos das agroindústrias, de menor custo, visando à substituição das fontes convencionais de carbono e nitrogênio, aumentando a viabilidade econômica da produção de enzimas em escala comercial (Damaso; Andrade; Pereira Jr., 2000).

Por apresentar baixo custo e alto teor de amido, os produtos e resíduos da indústria de processamento de mandioca são muito utilizados como substratos alternativos para produção de CGTase, sendo uma das fontes que apresenta melhor custo benefício para potencial uso industrial. Cucolo et al. (2006), utilizaram diferentes fontes de amido e verificaram maior produção da enzima β -CGTase em polvilho doce (fécula de mandioca). Peixoto (2015) e Coelho et al. (2016), estudando a produção de β -CGTase por *Bacillus* sp. SM-02 obtiveram elevadas produções da enzima em casca de mandioca e farinha de mandioca, respectivamente.

Além disso, muitos resíduos agroindustriais causam poluição ambiental e um dos resíduos oriundos do processamento da mandioca, a manipueira, é um exemplo de resíduo tóxico, devido à presença de cianeto, cujo excedente é frequentemente lançado em corpos d'água. A manipueira é definida como a água de constituição da raiz ou suco celular, misturada às águas de lavagem das raízes, que é gerada no momento da prensagem da massa ralada para a fabricação da farinha de mesa ou extração da fécula. Contêm todos os componentes solúveis presentes na raiz, inclusive com um teor residual de açúcares na ordem de 20 a 40 g/L (Wosiacki; Cereda, 2002; Botelho; Poltronieri; Rodrigues, 2009). Além disso, a manipueira apresenta alto teor de nitrogênio, potássio, cálcio e magnésio, além de ferro, cobre, manganês e zinco em menor quantidade (Garcia et al., 2014). Coelho et al. (2016), em estudo realizado para caracterização de CGTase produzida por *Bacillus* sp. SM-02, verificaram que a presença de Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ e Na^+ estimularam a atividade desta enzima. Esses dados explicam as maiores produções da CGTase nos meios suplementados com a manipueira.

A milhocina é uma espécie de licor de milho concentrado, resíduo proveniente da indústria de moagem úmida do milho. É um substrato de baixo custo, que pode contribuir para redução dos custos na formulação de meios de culturas, pois substitui as fontes convencionais de nitrogênio como o extrato de levedura e a peptona (Nascimento et al., 2009; Xiao et al., 2011).

De acordo com Chiani et al. (2010) a composição da milhocina compreende proteínas, aminoácidos, vitaminas, açúcares redutores, ácidos orgânicos, minerais e outros nutrientes elementares. Por apresentar rica constituição nutricional, este resíduo tem sido usado com sucesso em uma variedade de processos fermentativos, tal como produção de celulase (Nascimento et al., 2009), ácido láctico (Rivas et al., 2004), pululano (Sharma; Prasad; Choudhury, 2013), ácido hialurônico (Amado et al., 2017), entre outros.

A produção da CGTase pelas células imobilizadas, depende da concentração das fontes de carbono e de nitrogênio, e por isso a seleção da melhor concentração desses nutrientes é essencial para a produção desta enzima, utilizando alginato de cálcio como suporte para imobilização. Além disso, a diminuição da produção enzimática não é proporcional à redução da concentração das fontes de carbono e nitrogênio do meio (Kunamneni et al., 2007).

O meio Nakamura e Horikoshi (1976) não é indicado para produção de CGTase por células imobilizadas, pois alguns componentes deste meio como K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e Na_2CO_3 provocaram a desintegração dos *pellets*. De acordo com Gombotz e Wee (2012), agentes quelantes como lactato, citrato e

fosfato ou altas concentrações de íons Na^+ ou Mg^{2+} , removem íons Ca^{2+} , diminuindo a reticulação e destabilizando o gel alginato de cálcio.

De um modo geral, os resultados mostraram que as células do *B. trypoxylicola* SM-02 livres apresentaram maior atividade enzimática (370,88 U/mL), quando comparadas com as células imobilizadas. Alguns trabalhos na literatura também relataram maior atividade enzimática para as células livres (Tabela 10).

Tabela 10. Produção da enzima CGTase por diferentes cepas de *Bacillus* livres e imobilizadas.

Microrganismo	Células	Atividade de CGTase (U/mL)	Referência
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Livres	88,50	Abdel-Naby et al., 2000
	Imobilizadas em alginato de cálcio	70,80	
<i>Bacillus circulans</i>	Livres	346,95	Vassileva et al., 2005
	Imobilizadas em ágar	249,42	
	Imobilizadas em membrana	226,56	
<i>Bacillus cereus</i> NRC7	Livres	69,00	Abdel-Naby et al., 2011
	Imobilizadas em alginato de cálcio	44,30	
	Imobilizadas em quitosana	57,84	
	Imobilizadas em ágar	11,43	
<i>Bacillus trypoxylicola</i> SM-02	Livres	370,88	Presente trabalho
	Imobilizadas em alginato de cálcio	166,64	

O tipo de matriz para imobilização das células, as condições de agitação e a concentração inicial do substrato são fatores importantes que contribuem para maior eficiência na produção enzimática (Vassileva et al., 2005).

De acordo com Abdel-Naby et al (2011), a imobilização de células em matriz porosa impõe barreiras de difusão, apresentando problemas que não são encontrados com células livres, por exemplo, redução da disponibilidade de nutrientes e oxigênio e /ou acúmulo dos produtos dentro dos *pellets*. Essas restrições de difusão podem exercer um efeito negativo sobre a atividade das células imobilizadas.

Por outro lado, as células imobilizadas retêm boas taxas de produtividade da enzima por mais tempo quando comparada com as células livres. Os primeiros trabalhos descritos na literatura para a produção de CGTase utilizando o microrganismo imobilizado em alginato de cálcio (Ramakrishna; Jamuna; Emery, 1992; Jamuna et al., 1993) relataram produção da enzima por 30 e 15 dias, respectivamente. Mais recentemente, Kunamneni et al. (2007) conseguiram produzir CGTase por aproximadamente 18 dias e Abdel-Naby et al. (2011) por 20 dias.

Essas informações mostram a importância de se realizar novos experimentos com células imobilizadas de *B. tryposylicola* SM-02 em diferentes suportes, onde seja possível associar elevada produtividade com aumento da estabilidade da enzima.

Considerações finais

A partir da análise filogenética é possível inferir que a enzima CGTase é produzida por arqueas, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, com maior número de representantes do gênero *Bacillus*. A distribuição desta enzima nos diferentes filos procarióticos não é compatível com a história evolutiva das espécies, sugerindo que o gene que codifica para CGTase foi adquirido por transferência horizontal entre as espécies. *B. trypoxylicola* SM-02 foi agrupado com outras espécies que produzem a β -CGTase, sendo assim, é possível que este microrganismo também produza majoritariamente este tipo de enzima.

A CGTase produzida a partir da farinha de mandioca apresentou boa atividade com a utilização de células do *B. trypoxylicola* SM-02, sendo este substrato, portanto promissor para a produção desta enzima por este isolado. Entretanto, os resultados obtidos com as células imobilizadas sugerem que imobilização leva à diminuição da atividade e uma variação muito grande entre os ensaios, mostrando a necessidade de estudos posteriores para melhor caracterização da produção desta enzima utilizando o microrganismo imobilizado em alginato de cálcio, bem a utilização de outros tipos de suporte para a imobilização.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa do estudante, a Fundação Apoio à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo suporte financeiro.

Referências

Abdel-Naby, MA, El-Refai HA, Abdel-Fattah AF (2011) Biosynthesis of cyclodextrin gluconotransferase by free and immobilized cells of *Bacillus cereus* NRC7 in batch and continuous cultures. J Appl Microbiol 111:1129-1137

Abdel-Naby MA, Fouad A, Reyad RM (2015) Catalytic and thermodynamic properties of immobilized *Bacillus amyloliquefaciens* cyclodextrin glucosyltransferase on different carriers. J Mol Catal B: Enzym 116:140-147.

Abdel-Naby MA, Reyad RM, Abdel-Fattah AF (2000) Biosynthesis of cyclodextrin glucosyltransferase by immobilized *Bacillus amyloliquefaciens* in batch and continuous cultures. Biochem Eng J 5:1-9.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215:403-410.

Amado IR, Vázquez JA, Pastrana L, Teixeira JA (2017) Microbial production of hyaluronic acid from agro-industrial by-products: Molasses and corn steep liquor. Biochem Eng J 117:181-187.

Binder F, Huber O, Böck A (1986) Cyclodextrin-glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M5a1: cloning, nucleotide sequence and expression. Gene 47:269-277.

Blanco KC (2009) Produção de ciclodextrina glicosiltransferase por *Bacillus* sp. subgrupo alcalophilus: otimização por planejamento experimental. São Paulo, Brasil, 94p. (M.Sc. Dissertação. Instituto de Biociências, UNESP).

Botelho SM, Poltronieri MC, Rodrigues JELF (2009) Manipueira: um adubo orgânico para a agricultura familiar. *Revista Raízes e Amidos Tropicais* 5:1111-1116.

Chiani M, Akbarzadeh A, Farhangi A, Mehrabi MR (2010) Production of desferrioxamine B (Desferal) using corn steep liquor in *Streptomyces pilosus*. *Pakistan J Biological Sciences* 13:1151-1155.

Coelho SLA, Magalhães VC, Marbach PAS, Cazetta ML (2016) A new alkalophilic isolate of *Bacillus* as a producer of cyclodextrin glycosyltransferase using cassava flour. *Braz J Microbiol* 47:120-128.

Costa H, Gastón JR, Lara J, Martinez CO, Moriwaki C, Matioli G, Ferrarotti SA (2015) Cyclodextrin glycosyltransferase production by free cells of *Bacillus circulans* DF 9R in batch fermentation and by immobilized cells in a semi-continuous process. *Bioprocess Biosyst Eng* 38:1055-1063.

Cucolo GR, Alves-Prado HF, Gomes E, Silva R (2006) Optimization of the Production of CGTase from *Bacillus* sp. Subgroup alcalophilus E16 by the Submerged Fermentation of Cassava Starch. *Braz J Food Technol* 9:201-208.

Damaso MCT, Andrade CMMC, Pereira Jr N (2000) Use of corncob for endoxyanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* IOOC-4145. *Appl Biochem Biotechnol* 84:821-834.

Dias LT, Leonel M (2006) Caracterização físico-química de farinhas de mandioca de diferentes localidades do Brasil. *Ciência e Agrotecnologia* 30:692-700.

Fiorda FA, Soares Júnior MS, Silva FA, Souto LRF, Grossmann MVE (2013) Farinha de bagaço de mandioca: aproveitamento de subproduto e comparação com fécula de mandioca. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 43: 408-416.

Franssen MC, Steunenbergh P, Scott E L, Zuilhof H, Sanders JP (2013) Immobilized enzymes in biorenewables production. *Chem Soc Rev* 42:6491-6533.

Garcia CAB, Andrade ACS, Menezes AL, Andrade TJ, Garcia HL (2014) Caracterização química do efluente do processamento de mandioca em Sergipe. In: *Proceedings of Safety, Health and Environment World Congress*, p. 62-65.

Gombotz WR, Wee SF (2012) Protein release from alginate matrices. *Adv Drug Deliv Rev* 64:194-205.

Goo BG, Hwang YJN, Park JK (2014) *Bacillus thuringiensis*: a specific gamma-cyclodextrin producer strain. *Carbohydr Res* 386:12-17.

Han R, Li J, Shin HD, Chen RR, Du G, Liu L, Chen J (2014) Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications. *Biotechnol Adv* 32:415-428.

Jamuna R, Saswathi N, Sheela R, Ramakrishna SV (1993) Synthesis of cyclodextrin glucosyl transferase by *Bacillus cereus* for the production of cyclodextrins. *Appl biochem and Biotechnol* 43:163-176.

Janeček S (1997) α -Amylase family: molecular biology and evolution. *Prog Biophys Mol Biol* 67:67-97.

Janeček Š, Ševčík J (1999) The evolution of starch-binding domain. FEBS Lett 456:119-125.

Janeček Š, Svensson B, MacGregor E (2003) Relation between domain evolution specificity and taxonomy of the α -amylase family members containing a C-terminal starch-binding domain. Europ J Biochem 270:635-645.

Kunamneni A, Prabhakar T, Jyothi B, Ellaiah P (2007) Investigation of continuous cyclodextrin glucanotransferase production by the alginate-immobilized cells of alkalophilic *Bacillus* sp. in an airlift reactor. Enzyme Microbial Technol 40:1538-1542.

Moriwaki C, Mazzer C, Pazzetto R, Matioli G (2009) Produção, purificação e aumento da performance de ciclodextrina glicosiltransferases para produção de ciclodextrinas. Quim Nova 32:2360-2366.

Nakamura N, Horikoshi K (1976) Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase-producing alkalophilic *Bacillus* sp. Agric Biol Chem 40, 753-757.

Nascimento RP, Junior NA, Pereira Jr N, Bon EPS, Coelho RRR (2009) Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis*. Lett Appl Microbiol 48:529-535.

National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2017 Apr 06]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Neto SFC, Zeoula LM, Branco AF, Prado IN, Santos GT, Fregadolli FL, Kassies MP, Dalponte, A O (2000) Mandioca e resíduos das farinhas na alimentação de ruminantes: digestibilidade total e parcial. Rev Bras Zootecn 29:2099-2108.

Peixoto, CM (2015) Produção de ciclodextrina glicosiltransferase por *Bacillus* sp. SM-02 utilizando resíduos da indústria de farinha de mandioca e de milho como substratos para fermentação submersa e em estado sólido. Cruz das Almas, Brasil, 71p. (M.Sc. Dissertação. Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas).

Prado HFA, Hilário E, Gomes E, Silva R (2002) Seleção de microrganismos produtores de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produção e caracterização da enzima. Brazil J Food Technol 5:189-196.

Ramakrishna SV, Jamuna R, Emery AN (1992) Continuous production of thermostable α -amylase by immobilized bacillus cells in a fluidized-bed reactor. Appl Biochem Biotechnol37:275-282.

Rivas B, Moldes A B, Domínguez JM, Parajó JC (2004) Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. Int J Food Microbiol 97:93-98.

Rodrigues MI, lemma, AF (2009) Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos, 2ª ed., Campinas: São Paulo.

Rodríguez-Sanoja, R., Oviedo, N., Sanchez, S (2005) Microbial starch-binding domain. Curr Opin Microbiol 8:260-267.

Saallah S, Naim MN, Lenggoro IW, Mokhtar MN, Bakar NFA, Gen M (2016) Immobilization of cyclodextrin glucanotransferase into polyvinyl alcohol (PVA) nanofibres via electrospinning. *Biotechnol Reports*10:44-48.

Sakinah AM, Ismail AF, Illias RM, Zularisam AW, Hassan O, Matsuura T (2014) Effect of substrate and enzyme concentration on cyclodextrin production in a hollow fiber membrane reactor system. *Separ Purif Technol* 124:61-67.

Saokham P, Loftsson T (2017) γ -Cyclodextrin. *Int J Pharm* 516:278-292.

Sela I, Ashkenazy H, Katoh K, Pupko T (2015) GUIDANCE2: accurate detection of unreliable alignment regions accounting for the uncertainty of multiple parameters. *Nucleic Acids Research*1: 43 (Web Server issue): W7-W14.

Sequencher® version 5.4.6 DNA sequence analysis software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA <http://www.genecodes.com>.

Sharma N, Prasad GS, Choudhury AR (2013) Utilization of corn steep liquor for biosynthesis of pullulan, an important exopolysaccharide. *Carbohydr Polymer* 93:95-101.

Sheldon RA, Van Pelt S (2013) Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. *Chem Soc Rev* 42:6223-6235.

Tamura K, Stecher G, Peterson G, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725-2729.

Vassileva A, Beschkov V, Ivanova V, Tonkova A (2005) Continuous cyclodextrin glucanotransferase production by free and immobilized cells of *Bacillus circulans* ATCC 21783 in bioreactors. *Process Biochem* 40:3290-3295.

Wosiacki G, Cereda MP (2002) Valorização de resíduos do processamento de mandioca. Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias 8:01.

Xiao X, Hou Y, Liu Y, Liu Y, Zhao H, Dong L, Du J, Wang Y, Bai G, Luo G (2013) Classification and analysis of corn steep liquor by UPLC/Q-TOF MS and HPLC. Talanta107:344-348.