



CULTURA DE BACILLUS FIRMUS CEPA 37 POR PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO PARA PRODUÇÃO DE CICLOMALTODEXTRINA-GLUCANO-TRANSFERASE (CGTASE).

Luana Thais Varize (PIBIC/FA-UEM), Maicon Ramon Bueno, Thiago Masukawa, José Eduardo Olivo (Orientador), e-mail: olivo@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Engenharia Química/Maringá, PR.

Engenharias/Engenharia Química

Palavras-chave: CGTase, fermentação, descontínuo alimentado.

Resumo:

A ciclomaltodextrina-glucano-transferase, ou CGTase, é uma enzima de origem bacteriana que tem como principal função catalisar a conversão do amido, para a formação de ciclodextrinas. As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, constituídos por um número variável de unidades de glicose que possuem muitas aplicações no ramo industrial. Esta pesquisa de iniciação científica teve como objetivo o estudo do comportamento do *Bacillus firmus* cepa 37 na produção da enzima CGTase, tanto em um biorreator operado de forma descontínua quanto de forma descontínua alimentada. Buscou-se a avaliação das variáveis que possibilitaram aumentos da produtividade microbiana e da enzima em estudo. A estratégia experimental deste estudo foi dividida em duas etapas: a primeira, composta pela realização de ensaios descontínuos de crescimento de *Bacillus firmus* para a verificação do comportamento cinético das variáveis representativas do sistema (biomassa, substratos, produtos) ao longo do tempo, e a segunda, na realização de ensaios descontínuo alimentados, para a verificação do comportamento das mesmas variáveis em condições de diminuição dos efeitos de inibição por altas concentrações de substrato limitante.

Introdução

A ciclomaltodextrina-glucano-transferase, ou CGTase, é uma enzima de origem bacteriana que tem como principal função catalisar a conversão do amido, para a formação de ciclodextrinas. Elas têm a capacidade de formar complexos de inclusão com uma vasta gama de moléculas, modificando



suas propriedades físicas e químicas e, portanto, tem sido amplamente aplicadas em indústrias de alimentos, de produtos agrícolas, química, de cosméticos e farmacêutica. Apesar de o processo descontínuo ter apresentado resultados satisfatórios de atividade da enzima CGTase em estudos anteriores e considerando ainda que o biorreator conduzido de forma descontínua sempre será utilizado como base para comparações de eficiências atingidas com relação a outros processos, sua baixa eficiência estimula o surgimento de processos alternativos (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001). Dentre os processos alternativos, o processo descontínuo alimentado, conforme preconizado por (YOSHIDA; YAMANE e NAKAMOTO, 1973), é idêntico ao sistema batelada, exceto que o substrato é alimentado gradativamente até o volume de trabalho ser atingido, de modo a se minimizar os efeitos inibitórios pela variação súbita de concentração de açúcares no meio (FERREIRA, 2008). Nesse ponto a fermentação descontínua alimentada se torna uma excelente alternativa para a produção da enzima CGTase, pois evita choques de concentração, permitindo um melhor controle de possíveis inibições e conduzindo a melhores resultados e maiores rendimentos de produção. Considerando os resultados obtidos por outros pesquisadores, a realização de cultivos descontínuos preliminares e a possibilidade de aplicação de um novo processo para a produção da enzima CGTase, estabeleceu-se o objetivo deste trabalho, que foi o de estudar a síntese da enzima CGTase de *Bacillus firmus* Cepa 37 em fermentação descontínua alimentada. Primeiramente, foi realizado cultivo descontínuo em fermentador, com a finalidade de estudar o comportamento cinético de crescimento de biomassa, consumo de substrato e produção da enzima CGTase. A partir do ensaio descontínuo realizado em biorreator foi efetuado o estudo em cultivo descontínuo alimentado.

Materiais e métodos

Primeiramente o microorganismo, *Bacillus firmus* CEPA 37, foi semeado em placas de Petri contendo meio semi-sólido, cuja composição está apresentada na Tabela 1. As placas foram mantidas em estufa incubadora a 37 °C por 72 horas, para o desenvolvimento das células no estado vegetativo. Após 72 horas, a massa celular presente nas placas foi coletada e transferida assepticamente para o pré-inóculo, cuja composição assemelha-se ao meio semi-sólido, exceto ágar (Tabela 1). Adicionou-se a enzima alfa-amilase ao pré-inóculo e também ao meio de cultivo, fazendo com que parte do amido de milho reduzisse a açúcar fermentescível, disponível ao microorganismo para seu consumo imediato. O pré-inóculo foi colocado em agitador rotativo, onde permaneceu por 48 horas a 37 °C e sob agitação de 150 rpm. Na sequência uma alíquota do pré-inóculo



(aproximadamente 150 mL) foi transferida para o fermentador já com o meio de cultivo preparado e devidamente esterilizado. A enzima CGTase foi produzida utilizando-se o *Bacillus firmus* com o meio de cultivo que possui o melhor resultado em ensaios anteriores já realizados por esse grupo de estudo. As seguintes composições são (% p/v): **meio AEL** – amido solúvel 2,0, peptona 1,0, extrato de levedura 2,0, K_2HPO_4 0,1, $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 0,02, Na_2CO_3 1,0.

Tabela 1 - Composição do meio semi-sólido.

Componentes (% p/v)	Semi-sólido
Amido	1,0
Peptona	0,5
Extrato de Levedura	1,0
$MgSO_4$	0,02
K_2HPO_4	0,5
Na_2CO_3	1,0
Ágar	1,5

Resultados e Discussão

Os ensaios foram realizados com processo **descontínuo**, para análises preliminares e **descontínuo alimentado** de crescimento para o ensaio **AEL**, amido solúvel 2% e extrato de levedura 2%, para a verificação do comportamento cinético das variáveis representativas ao longo do tempo.

A figura 1 ilustra as análises realizadas relativas ao Ensaio 01, cujo tempo de duração foi de 122 horas em processo descontínuo. O pH do sobrenadante permaneceu estável em torno de 10,0. Os açúcares redutores totais, bem como os açúcares redutores são quase completamente consumidos, evidenciando grande atividade metabólica do *Bacillus firmus*. A atividade enzimática apresentou valores significativos, sendo o valor máximo obtido 1,07 U/mm com 54 horas de cultivo, decrescendo durante todo o restante do tempo. A concentração celular atingiu o valor máximo de 2,3 g/L com 30 horas de cultivo.

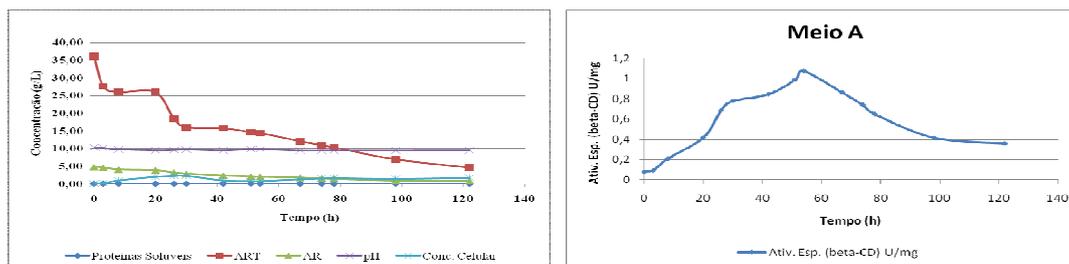




Figura 1 - Controle offline das variáveis concentração celular, pH do sobrenadante após centrifugação, açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART), proteínas solúveis e Atividade Enzimática relativo ao Ensaio 01.

O Ensaio 02 teve duração de 128 horas, sendo os resultados das análises mostrados na figura 2. Após 68 horas de cultivo, um pulso de solução de amido estéril (amido de milho), foi aplicado ao meio, sendo caracterizado o processo descontínuo alimentado. A resposta aos pulsos de amido aplicados pode ser notada devido ao ligeiro aumento da concentração de açúcares redutores. Nota-se também que os açúcares redutores são quase completamente consumidos até a aplicação do pulso de amido, evidenciando grande atividade metabólica do *Bacillus firmus*. A máxima atividade obtida foi de 1,44 U/mg de beta-CD, com 80 horas de cultivo, evidenciando que o pulso de amido resultou em efeitos positivos sobre o crescimento celular e a atividade enzimática.

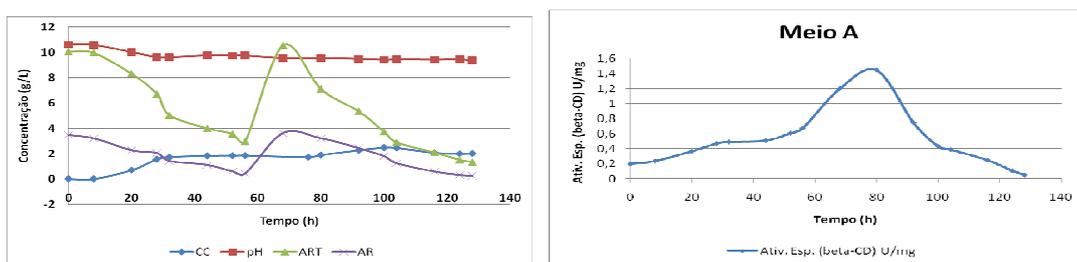


Figura 2 - Controle offline das variáveis concentração celular, pH do sobrenadante após centrifugação, açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART), proteínas solúveis e Atividade Enzimática relativo ao Ensaio 02.

Conclusões

Nota-se que ensaio descontínuo alimentado foi satisfatório, pois se obteve melhores resultados para a atividade da enzima.

Agradecimentos

À Fundação Araucária, pelo apoio financeiro, e ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá, pelo suporte técnico.

Referências

CHANG, H.; IRWIN, P. M.; NIKOLOV, Z. L. Effects of mutations in the starch binding domain of *Bacillus macerans* cyclodextrin glycosyltransferase. *Journal of Biotechnology*, v. 65, n. 23, p. 191202, 1998.



23 a 25 de setembro
de 2015

XXIV Encontro Anual de Iniciação Científica
XXV Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior

XXIV EAIIC
XXV EAIIC JR



23 a 25 de setembro
de 2015

XXIV Encontro Anual de Iniciação Científica
XXV Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior

XXIV EAIIC
XXV EAIIC JR