



PRODUÇÃO DE CICLOMALTODEXTRINA-GLUCANOTRANSFERASE POR *BACILLUS FIRMUS* CEPA 37 IMOBILIZADO EM CARVÃO DE OSSO BOVINO

Isabela Berbel Vargas (PIBIC/CNPq/Fundação Araucária/UEM), Larissa Alburnio Silva (colaboradora), Flávio Faria de Moraes (Orientador), e-mail: flavio@deq.uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Tecnologia/Maringá, PR.

Engenharia Química, Processos Industriais de Engenharia Química.

Palavras-chave: imobilização celular; carvão de osso bovino, CGTase.

Resumo

O objetivo geral deste trabalho foi a produção da enzima ciclomaltopectina-glicocotransferase (CGTase) por *Bacillus firmus* cepa 37, sendo este imobilizado em carvão de osso bovino. Primeiramente foram feitas as caracterizações do carvão de osso bovino e do leite fluidizado, para posterior início da produção enzimática. A produção de CGTase foi realizada em batelada e em biorreator de leite fluidizado, com duração média de 120 horas. Foram variados os parâmetros de quantidade de carvão ativado e a taxa de aeração, para melhorar a produção de CGTase. Os testes foram realizados utilizando 3,5 e 7 g de carvão de osso com três diferentes taxas de aeração iguais a 0,5, 1,0, e 2,0 vvm (volume de ar/volume de meio/minuto). A máxima produção de CGTase alcançada foi de 3,014 U/mL no tempo de 120 horas, no teste que utilizou 7 g de carvão de osso e 2 vvm de taxa de aeração.

Introdução

As enzimas são catalisadores das reações que ocorrem nos sistemas biológicos e possuem eficiência catalítica extraordinária provocando um aumento da velocidade das reações químicas. Devido ao seu alto grau de especificidade ao substrato, as enzimas são largamente utilizadas no setor industrial, como na produção de alimentos e medicamentos. (Kaplan et al., 1989)

A ciclomaltopectina-glicocotransferase (CGTase), uma enzima extracelular que produz ciclodextrinas a partir do amido, é produzida por vários tipos de micro-organismos, como algumas espécies de *Bacillus*. A



aplicação de células bacterianas imobilizadas pode ser usada como uma ferramenta para a produção de enzimas eliminando ou diminuindo a necessidade de sua purificação e possibilitando a reutilização por longos períodos, estimulando os processos contínuos. (CARVALHO et al., 2006, TONKOVA, 1998; UZUNOVA et al., 2002)

A eficiência do suporte no processo de imobilização pode ser avaliada pela capacidade da matriz em alojar a maior quantidade de células viáveis possível, sem limitar a transferência de massa entre o micro-organismo e o meio de cultivo. Assim, vale destacar o carvão de osso bovino, o qual possui excelente característica de ser muito adsorvente por ser constituído de meso e macroporos.

Materiais e métodos

Materiais

O micro-organismo utilizado para a produção da enzima CGTase foi *Bacillus firmus* cepa 37, que foi isolado do solo de plantação de mandioca e caracterizado por Matioli et al. (1997).

O meio líquido era composto por amido solúvel, polipeptona, extrato de levedura, fosfato de potássio e sulfato de magnésio hepta-hidratado.

O reator de leito fluidizado era constituído de uma coluna de vidro encamisada, com diâmetro interno de 2,1 cm, altura de 40 cm e volume de 260 cm³. A coluna era conectada com mangueiras a um erlenmeyer de 2 litros, contendo o micro-organismo junto ao meio líquido. Este fluido era bombeado para dentro da coluna, percorrendo a mesma por inteiro até o topo, retornando então ao erlenmeyer. O tempo de residência, ou seja, o tempo em que cada elemento de fluido permanecia dentro do reator, era de aproximadamente 10 segundos.

Métodos

A determinação da atividade de CGTase foi realizada em função da taxa de produção inicial de β -CD, usando maltodextrina como substrato. A concentração de β -ciclodextrina (β -CD) foi medida pelo método colorimétrico que utiliza fenolftaleína (FENF). A atividade enzimática foi calculada pela inclinação da curva de concentração de β -CD em função do tempo. Uma unidade de atividade da enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima usada para a produção de 1 μ mol de β -CD/min. O tempo de reação e a diluição da enzima foram selecionados de forma a se obter uma relação linear entre a produção de β -CD e o tempo. O branco foi obtido usando um tempo de reação de 0 min, em que a CGTase foi primeiramente inativada e o substrato foi então adicionado.

Os dados de produção de β -CD (μ moles CD produzida/mL de cultura/min) foram inseridos em um gráfico em função do tempo de reação e



do coeficiente angular da reta ajustada (K) e utilizado para calcular a atividade enzimática, pela Equação 1:

$$A = (K \cdot V_R \cdot D) / V_E \quad (1)$$

Onde A = atividade volumétrica em $\mu\text{moles CD} / (\text{min} \times \text{mL de solução enzimática})$, K = inclinação da reta de concentração de CDs produzidas em função do tempo de reação ($\mu\text{moles CD} / (\text{min} \times \text{mL})$), D = diluição real do meio enzimático, V_R = volume reacional em mL, ou seja, volume de enzima diluída, presente no tubo de ensaio, V_E = volume total de reação em mL, para o teste descrito.

Produção de CGTase em leito fluidizado com o micro-organismo imobilizado

Após o pré-inóculo permanecer 24 h no agitador (shaker), foi coletado 50% (750 mL) de seu volume e acrescentado em outro erlenmeyer de 2 L, que já continha mais 750 mL de meio estéril, totalizando 1500 mL de meio de produção. Este meio líquido com *B. firmus* foi anexado a coluna, na qual já estava presente a quantidade necessária de carvão de osso (3,5 ou 7 g). Então, iniciou-se o período de imobilização. Nesta etapa, o meio líquido com *B. firmus* passou pela coluna continuamente durante 24 h, possibilitando a adsorção do micro-organismo ao carvão de osso bovino. Após este período, o meio líquido era trocado por outro com os mesmos componentes do anterior, exceto o micro-organismo. Assim, iniciava-se a produção de enzima, que foi realizada em leito fluidizado em bateladas de 120 horas. Amostras eram coletadas a cada 6 ou 12 horas para analisar a evolução da produção enzimática, através da atividade enzimática.

Resultados e Discussão

Inicialmente, a produção de CGTase foi realizada utilizando o micro-organismo livre no meio, e observou-se que a atividade enzimática foi máxima em três períodos diferentes, sendo eles 24, 48 e 60 h, cerca de 0,84 U/mL.

Em seguida, as produções de CGTase foram executadas com o micro-organismo *Bacillus firmus* cepa 37 imobilizado em carvão de osso. A Tabela 01 apresenta a atividade enzimática máxima obtida em cada produção.

Tabela 01. Resultados de atividade enzimática para diferentes condições de produção

Quantidade de Carvão	Aeração (vvm)	Atividade Enzimática máxima (U/mL)
7g	0,5	0,1145
7g	1,0	1,322
7g	2,0	3,014
3,5g	0,5	1,738
3,5g	1,0	1,738
3,5g	2,0	1,808



Quando utilizado 7 g de carvão, observou-se uma maior produção quando a taxa de aeração foi de 2 vvm de ar. Neste ensaio, a atividade enzimática foi máxima com o valor de 3,014 U/mL no tempo de 120 horas. O resultado menos promissor foi encontrado quando, na mesma quantidade de carvão, a taxa de aeração foi de 0,5 vvm, sendo que no tempo de 120 horas a atividade enzimática foi de 0,1145 U/mL. Assim, comparando todas as produções verifica-se que quanto maior a quantidade de carvão e maior a taxa de aeração, melhor será o resultado.

Conclusões

Pode-se concluir que a produção da CGTase a partir do *Bacillus firmus* cepa 37 imobilizado em carvão foi possível e eficiente, quando comparou-se com a produção de CGTase com o micro-organismo livre no meio. A produção máxima foi obtida quando se utilizou a maior quantidade de carvão e aeração testada (7 g e 2 vvm), sendo de 3,014 U/mL.

Agradecimentos

Ao CNPq, pelo apoio financeiro, ao Prof. Flávio Faria de Moraes, pela orientação, à Dra. Larissa Alburnio Silva, por toda colaboração e ensinamentos transmitidos durante este projeto.

Referências

- CARVALHO, R. V. et al. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 28, n. 2, p.380-386. 2008.
- Kaplan, L. A.; Pesce, A. J. 1989. *Clinical Chemistry – theory, analysis and correlation*. New York: The C.V. Mosby Co. (2ª ed.).
- TONKOVA, A. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, n. 8, 1998.
- UZUNOVA, K.; VASSILEVA, A.; IVANOVA, V.; SPASOVA, D.; TONKOVA, A. Thermostable exoinulinase production by semicontinuous cultivation of membrane-immobilized *Bacillus* sp. 11 cells. *Process Biochemistry*, v. 37, n. 8, 2002.
- MATIOLI, G.; ZANIN, G. M.; GUIMARÃES, M. F.; MORAES, F. F. Production and purification of CGTase of alkaliphilic bacillus isolated from Brazilian soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, New Jersey, v. 70-72, p. 267-275, 1998.