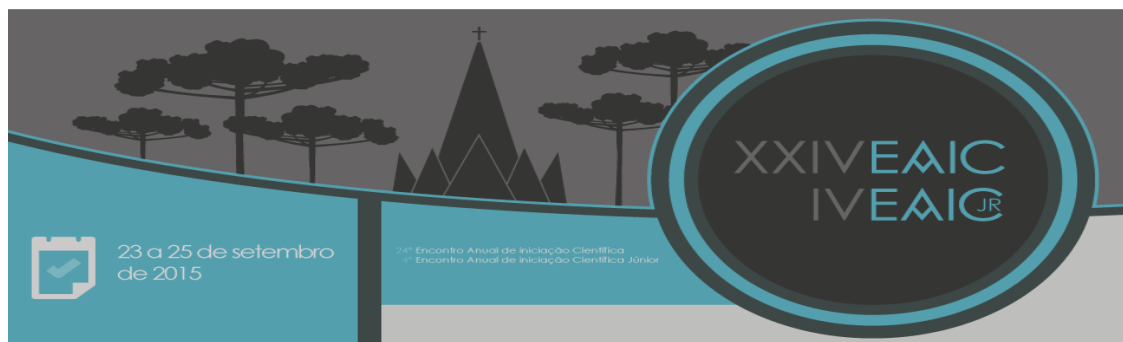




## **CULTIVO DE *Bacillus Firmus* CEPA 37 NA PRODUÇÃO DE CICLOMALTODEXTRINA-GLUCANO-TRANSFERASE (CGTASE) EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO.**

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**

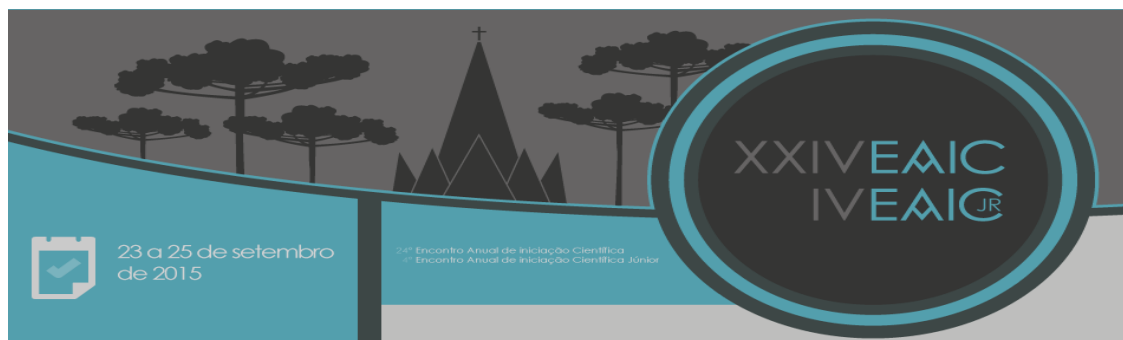
**Palavras-chave:** CGTase, fermentação, comportamento cinético.

### **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. Nesta pesquisa, a produção de CGTase se dá a partir do cultivo de *Bacillus firmus* cepa 37, isolado em solo de plantação de mandioca. Buscou-se nos ensaios realizados a avaliação das variáveis que possibilitaram aumentos da produtividade microbiana e da enzima em estudo. A estratégia experimental utilizada foi a realização de ensaios descontínuos de crescimento de *Bacillus firmus*, entre eles: ensaio **AS**, amido solúvel 2% e extrato de levedura 0,5% e ensaio **AEL**, amido solúvel 2% e extrato de levedura 2%, para a verificação do comportamento cinético das variáveis representativas ao longo do tempo.

### **Introdução**

A enzima 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 (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, compostos de seis, sete ou oito unidades de glucopiranoses respectivamente, unidas por ligações glicosídicas do tipo alfa-1, 4, denominadas respectivamente de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD e são provenientes de amidos modificados. Elas têm a capacidade de formar



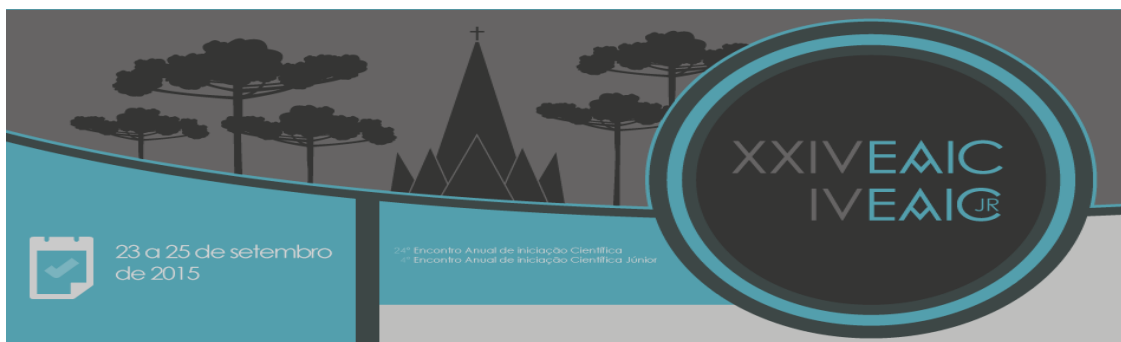
complexos de inclusão com uma vasta gama de moléculas, modificando suas propriedades físicas e químicas e, portanto, tem sido amplamente aplicadas em indústrias de alimentos, de produtos agrícolas, química, de cosméticos e farmacêutica. A degradação do amido em ciclodextrinas se dá por meio de reações reversíveis de transglicosilação intramolecular (ciclização) que tem como catalisador a CGTase que são enzimas extracelulares produzidas por uma variedade de bactérias e predominantemente por *Bacillus spp* (CHANG et al.,1998). Considerando os resultados obtidos por outros pesquisadores, estabeleceu-se o objetivo deste trabalho, que foi o de estudar a síntese da enzima CGTase, de *Bacillus firmus* Cepa 37 em fermentação descontínua em diferentes composições do meio para a verificação do comportamento cinético das variáveis representativas ao longo do tempo.

## 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* em diferentes meios de cultivo. O primeiro meio de cultivo utilizado possuiu as seguintes composições, em (% p/v): **meio AS** – amido solúvel 2,0, peptona 1,0, extrato de levedura 0,5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 0,02, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,0; **meio AEL** – amido solúvel 2,0, peptona 1,0, extrato de levedura 2,0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 0,02, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,0.

**Tabela 1** - Composição do meio semi-sólido, pré-inóculo e meio de cultivo.

| Componentes (%p/v) | Semi-sólido |
|--------------------|-------------|
| Amido              | 2,0         |
| Peptona            | 0,5         |

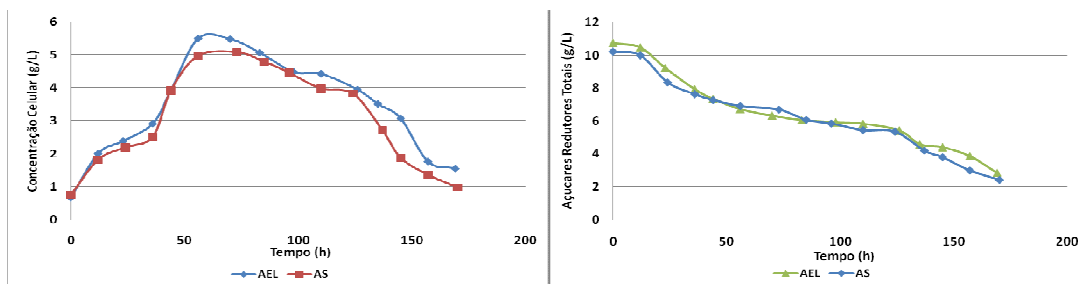


|                                 |      |
|---------------------------------|------|
| Extrato de Levedura             | 1,0  |
| MgSO <sub>4</sub>               | 0,02 |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0,1  |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 1,0  |
| Ágar                            | 1,5  |

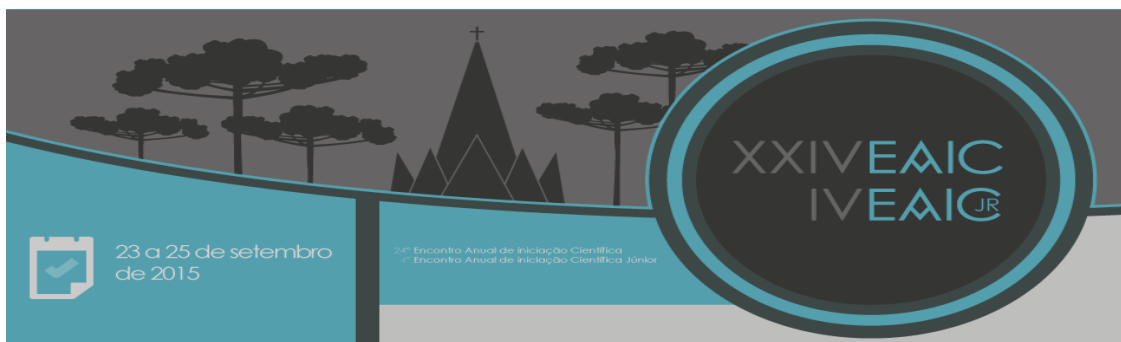
Para análise de açúcares redutores totais, as amostras foram submetidas a um processo prévio de hidrólise ácida (Falcone & Marques, 1965), com posterior neutralização e reação com DNS (ácido 2,5-dinitrosalicílico), procedendo-se a leitura espectrofotométrica a 600 nm. Para a medida do teor de proteínas solúveis, utilizou-se o método colorimétrico de Bradford (1976). A atividade enzimática foi determinada pelo método das velocidades iniciais envolvendo a complexação da beta-ciclodextrina, produzida pela enzima CGTase com a fenoltaleína (Hamon & Moraes, 1990).

## Resultados e Discussão

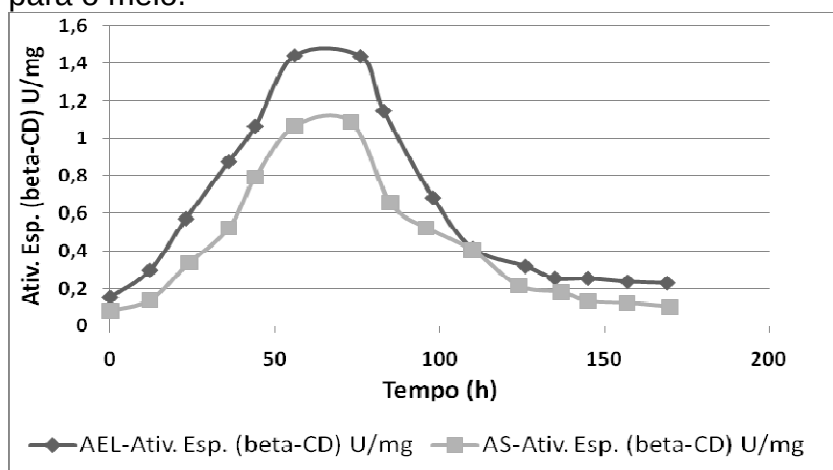
Foram realizados testes com os meios **AS** e **AEL**, sendo que de cada meio foram obtidos dados experimentais referentes à concentração celular, AR, ART, proteínas solúveis e atividade enzimática. Os ensaios foram realizados com processo **descontínuo** crescimento para o ensaio **AS**, amido solúvel 2% e extrato de levedura 0,5% e ensaio **AEL**, amido solúvel 2% e extrato de levedura 2%, para a verificação do comportamento cinético das variáveis representativas ao longo do tempo. Passando-se para a análise do cultivo microbiano verifica-se na Figura 1 que o crescimento celular nos meios **AS** e **AEL** foi semelhante, contudo o meio **AS**, embora atingindo no final do cultivo concentrações celulares semelhantes ao do outro ensaio, apresentou ao longo do cultivo um crescimento mais lento. Nota-se também que os meios **AS** e **AEL** apresentaram um consumo compatível com o crescimento celular, evidenciando que após o pico máximo de concentração celular houve morte celular que está diretamente ligada à falta de substrato no meio de cultivo.



**Figura 1** - Controle off-line das variáveis concentração celular e ART .



Da Figura 2 observam-se diferentes perfis de atividade enzimática para os dois meios. O meio **AEL** apresentou uma atividade enzimática máxima em torno de 1,44 U/mg. Já o meio **AS** a atividade máxima encontra-se em torno de 1,08 U/mg. Analisando os resultados do meio **AEL**, pode-se sugerir que a suas altas atividades devem ter ocorrido devido ao excesso de extrato de levedura para o meio.



**Figura 2** - Controle off-line das variáveis de Atividade Enzimática.

## Conclusões

Nota-se que os resultados da atividade enzimática para os meio **AEL** sugerem a existência de um efeito positivo associado ao excesso de extrato de levedura para o meio.

## 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. 191-202, 1998.