



## **EFEITO DA APLICAÇÃO DE PULSO DE AMIDO NO CULTIVO DE *Bacillus firmus* CEPA 37 PARA A PRODUÇÃO DA ENZIMA CICLOMALTODEXTRINA-GLUCANO-TRANSFERASE (CGTASE)**

*Jéssica Bravin Carmello<sup>1</sup>, Gisella Maria Zanin<sup>2</sup>, José Eduardo Olivo<sup>3</sup>*

**RESUMO:** Ciclomaltodextrina-glucano-transferase (CGTase) é uma enzima com peso molecular da ordem de 74,5 kD e que apresenta uma seqüência de aminoácidos que revela uma similaridade estrutural com a enzima alfa-amilase, sendo por isso considerada uma enzima da família das amilases. Essa enzima catalisa a conversão do amido, formando as ciclodextrinas por meio de reações de ciclização. Exibe, ainda, atividade em reações de acoplamento, desproporcionamento e de hidrólise do amido. Com o objetivo de aumentar a produção da CGTase, realizou-se um cultivo de *Bacillus firmus* CEPA 37. Nos ensaios realizados em reator batelada foram testados três meios contendo diferentes concentrações de extrato de levedura e amido. Inicialmente, o microrganismo foi semeado em placas de Petri e mantido a 37°C em estufa incubadora por 72 horas. Em seguida, a massa celular presente nas placas foi transferida assepticamente para o pré-inóculo, que foi mantido a 150 rpm e 37°C por 48 horas. Então, uma alíquota do pré-inóculo foi adicionada aos meios de cultivo, que permaneceram em agitador rotativo a 150 rpm e 37°C por 72 horas. Após 24 horas de cultivo, foi aplicado um pulso de solução de amido com concentração de 40 g/L nos três meios. Amostras dos meios foram retiradas a cada 12 horas. As análises utilizadas para avaliação do processo fermentativo foram: espectrofotometria para a determinação da concentração celular, método de Bradford para determinar o teor de proteínas solúveis, método DNS para análise de açúcares redutores totais e o método descrito por HAMON & MORAES (1990) para análise de atividade enzimática.

**PALAVRAS-CHAVE:** Amido de milho, *Bacillus firmus*, Batelada, CGTase, Pulso.

### **1 INTRODUÇÃO**

A enzima ciclomaltodextrina-glucano-transferase (CGTase) é uma enzima monomérica, com um peso molecular da ordem de 74,5 kD e que apresenta uma seqüência de aminoácidos que revela uma similaridade estrutural com a enzima alfa-amilase, sendo por isso considerada uma enzima da família das amilases. Essa enzima catalisa a conversão do amido, formando as ciclodextrinas por meio de reações reversíveis de transglicosilação intramolecular (ciclização). Exibe, ainda, atividade em reações de acoplamento e desproporcionamento e em reações de hidrólise do amido. As ciclodextrinas têm sido amplamente aplicadas industrialmente devido à capacidade de

<sup>1</sup> Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). jessicabravin@hotmail.com

<sup>2</sup> Orientadora, Professora Doutora do Curso de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. gisella@deq.uem.br

<sup>3</sup> Co-orientador, Professor Doutor do Curso de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. olivo@deq.uem.br

formarem complexos com algumas substâncias que passam a apresentar propriedades mais interessantes em relação à molécula de origem (Matioli, 2000).

Em estudos feitos anteriormente, alguns mecanismos foram aplicados com o intuito de aumentar a produção da enzima CGTase. Em seu trabalho, MARQUES (2004) testou diversas concentrações e fornecedores dos componentes básicos do meio de cultivo do bacilo para a produção de CGTase, a saber: amido solúvel, extrato de levedura, polipeptona, carbonato de sódio. Além disso, MARQUES (2004) estudou o efeito de fontes de íons, como cobalto e zinco, em meio de cultivo de *Bacillus firmus* CEPA 37 para a produção de CGTase. A maior atividade enzimática obtida por MARQUES (2004) foi de 0,84 U/mL com meio contendo 2,5% p/v de amido de milho.

Com o objetivo de aumentar a produção da enzima CGTase, três ensaios de cultivo descontínuo de *Bacillus firmus* CEPA 37 foram realizados em sistema agitado (shaker), sendo que, com 24 horas de cultivo, um pulso de amido foi aplicado nos três meios.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A primeira etapa dos ensaios consistiu em semear o microrganismo, *Bacillus firmus* CEPA 37, 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, a fim de iniciar a multiplicação das células no estado vegetativo. Após 72 horas, a massa celular presente nas placas foi transferida assepticamente para o pré-inóculo, cuja composição é semelhante ao meio semi-sólido, exceto ágar (Tabela 1). Ao pré-inóculo foi adicionada a enzima alfa-amilase. Assim, parte do amido de milho foi reduzida a açúcar fermentescível, disponível ao microrganismo 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.

**Tabela 1:** Composição do meio semi-sólido e do pré-inóculo.

<i>Componentes (% p/v)</i>	<i>Semi-Sólido</i>	<i>Pré-inóculo</i>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,02	0,02
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1	0,1
Polipeptona	0,5	0,5
Extrato de Levedura	0,5	0,5
Amido de Milho	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,0	1,0
Agar	1,0	-

Em seguida, uma alíquota do pré-inóculo foi transferida para os três meios de cultivo, cujas identificações e descrição das composições estão expressas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

**Tabela 2:** Identificação dos Meios de Cultivo

Ensaio	Identificação do Meio
5-pi2	Meio PI#2
5-ac2	Meio AC#2
5-ic3	Meio IC#3

**Tabela 3:** Composição dos meios de cultivo

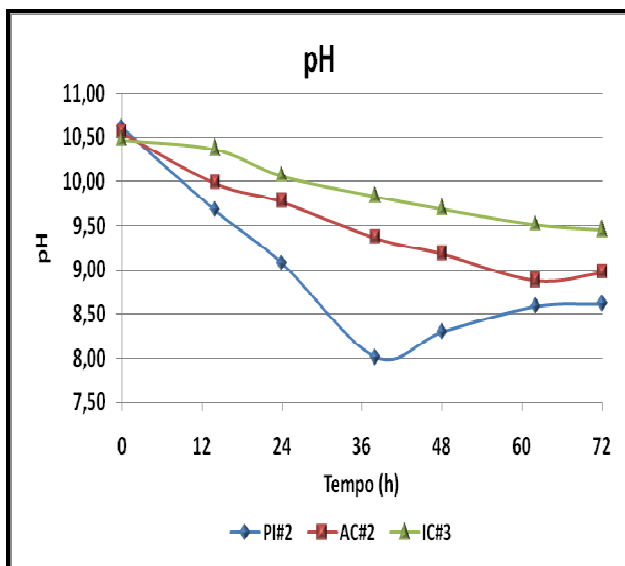
<i>Componentes (% p/v)</i>	<i>Meio PI#2</i>	<i>Meio AC#2</i>	<i>Meio IC#3</i>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,02	0,02	0,02
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1	0,1	0,1
Polipeptona	0,5	0,5	0,5
Extrato de Levedura	0,5	2,0	4,0
Amido de Milho	1,0	2,0	4,0
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,0	2,0	4,0

Os meios foram mantidos a 37°C e 150 rpm em agitador rotativo por 72 horas. Após 24 horas de cultivo, um pulso de uma solução de amido estéril com concentração de 40 g/L foi aplicado nos meios. Amostras de 20 mL foram retiradas a cada 12 horas. Após a centrifugação das amostras, as frações líquidas foram armazenadas sob refrigeração para análises posteriores. O precipitado foi ressuspenso para análise de concentração celular, com leitura direta em espectrofotômetro a 610nm, conforme descrita por Olivo (1985). 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).

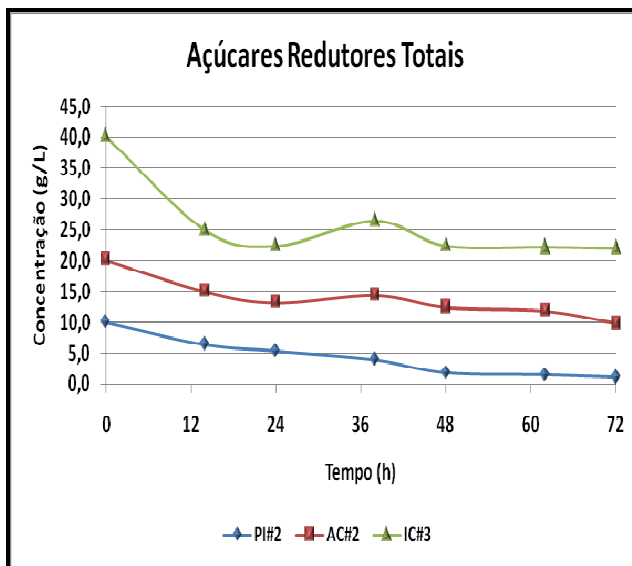
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando os resultados, observa-se que o pH dos meios de cultivo permaneceram acima de 8,0 ao longo das 72 horas (figura 1). Isso ocorreu, pois a porcentagem de carbonato de sódio, utilizado como tampão do meio, foi adicionado proporcionalmente à concentração de amido de milho inicial. Dessa forma, o controle de pH mostrou-se eficaz. No entanto, a quantidade de açúcares redutores totais foi razoavelmente alta após 72 horas nos meios AC#2 e IC#3. Nota-se pelos perfis plotados na figura 2 que, apenas no meio PI#2 o consumo de açúcar foi quase total. Esse comportamento pode estar relacionado com o pH. Nos meios cujo pH se manteve acima de 9,0 ao longo do cultivo, o consumo de açúcar foi inibido de alguma forma; já no meio em que o pH se manteve na faixa de 8,0-8,5, a quantidade de açúcares foi reduzindo gradativamente, chegando ao consumo quase que total. A resposta ao pulso aplicado com 24 horas pode ser notada nos meios AC#2 e IC#3 devido ao ligeiro aumento da concentração de açúcares redutores em 38 horas; no meio PI#2 não se observa o mesmo perfil, possivelmente porque o açúcar injetado pelo pulso tenha sido imediatamente consumido.

Quanto à concentração celular, observa-se que o Meio PI#2, que continha a menor porcentagem de extrato de levedura e de amido de milho, apresentou a maior concentração de células, chegando a quase 3,0 g/L com 48 horas de cultivo (figura 3). Isso pode ser explicado pelo consumo mais efetivo de açúcar no meio PI#2. O comportamento das curvas de crescimento microbiano, bem como das curvas de açúcares redutores totais, leva a crer que se o período de cultivo fosse prolongado, talvez o crescimento de células atingisse valores parecidos com os obtidos no meio PI#2. A resposta ao pulso de amido também foi mais evidente no meio PI#2, resultando em um delta de consumo de aproximadamente 1,5 g/L de 24 para 38 horas (0,1g/L.h).

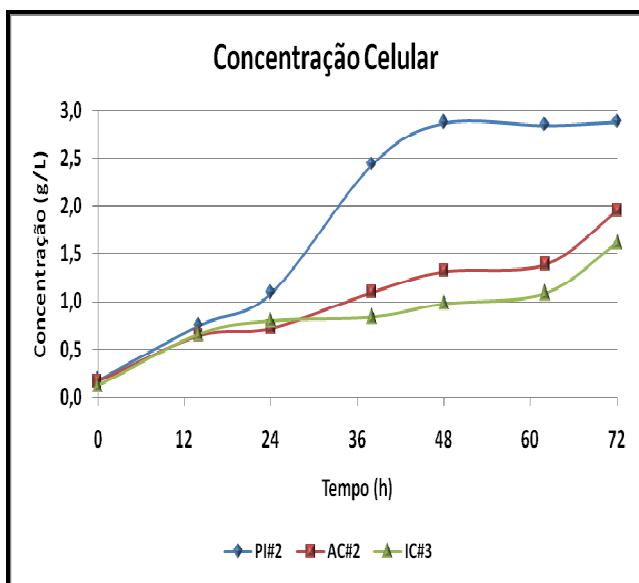


**Figura 1:** Variação de pH vs. tempo

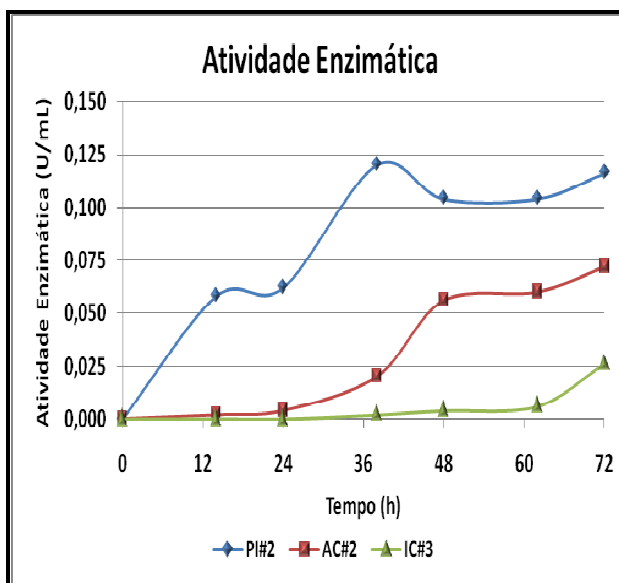


**Figura 2:** Variação de ART vs. tempo

A atividade enzimática mostrou valores mais significativos para o meio PI#2, como pode ser observado na figura 4. O valor máximo obtido foi de 0,122 U/mL com 38 horas de cultivo, ou seja, após o pulso de amido. Até 72 horas, os valores de atividade enzimática para o Meio PI#2 se mantiveram entre 0,100 e 0,125 U/mL. O mesmo comportamento pode ser observado para os outros dois meios. Embora com valor muito baixo, após o pulso, a atividade enzimática nos meios AC#2 e IC#3 se manteve constante ou crescente até o final do cultivo.



**Figura 3:** Variação de concentração celular vs. tempo



**Figura 4:** Variação de atividade enzimática vs. tempo

Na figura 5, observa-se que o meio PI#2 mantém perfil de concentração de proteínas solúveis crescente após o pulso de amido com 24 horas. O mesmo não ocorre com os outros dois meios; o meio AC#2 mostra perfil decrescente após o pulso e o meio IC#3 apresenta diminuição da concentração de proteínas até 38 horas quando esta volta a aumentar, chegando a se aproximar do valor inicial de 0,22 g/L.

A figura 6 mostra a variação da atividade específica ao longo do cultivo, sendo a atividade específica a razão entre a atividade enzimática e a concentração de proteínas solúveis no meio. A máxima atividade específica foi de 1,05 U/mL no meio PI#2.

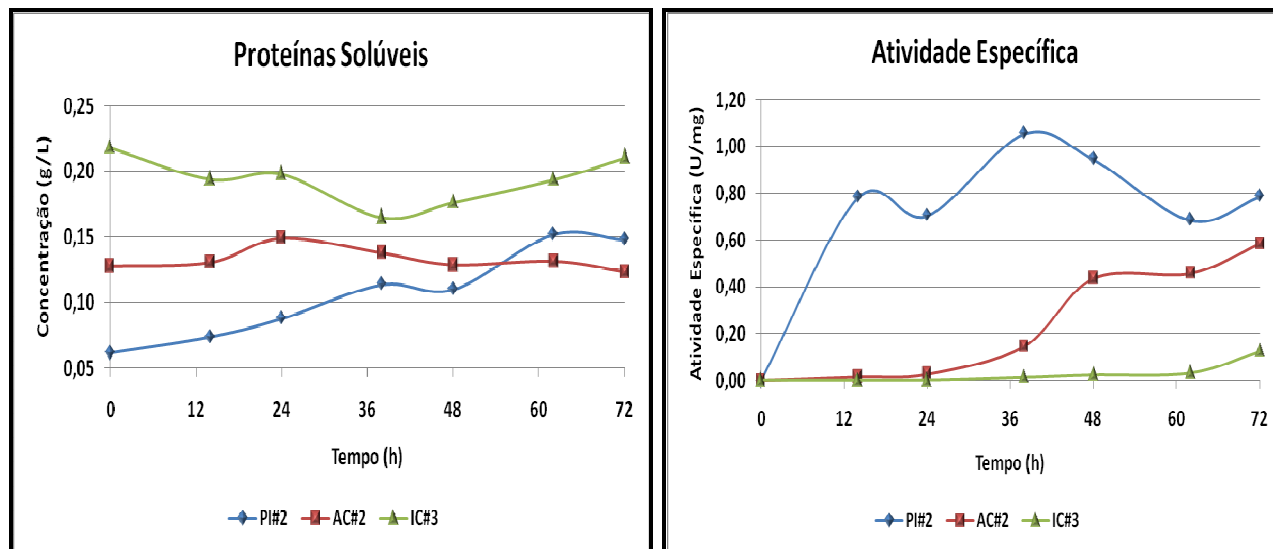


Figura 5: Variação de proteínas solúveis vs. tempo

Figura 6: Variação de atividade específica vs. tempo

#### 4 CONCLUSÃO

Do estudo realizado pode-se concluir que o pulso de amido aplicado com 24 horas de cultivo resultou em efeito positivo para concentração celular e atividade enzimática no meio cujo pH foi mantido na faixa de 8,0-8,5. Conclui-se também que, o controle de pH acima de 9,0 afetou negativamente o consumo de açúcar e, conseqüentemente, o crescimento celular e a atividade enzimática.

#### REFERÊNCIAS

BRADFORD, M. M. **Analyt. Biochem.** v. 72, p. 248-254, 1976.

FALCONE, M. & MARQUES, A. B. **Tecnologia de Alimentos e Bebidas**, v. 4, p. 24-30, 1965.

HAMON, V. & MORAES, F. F. Etude Preliminare a L'Immobilisation de L'Enzime CGTase WACKER. Relatório de Pesquisa, Laboratoire de Technologie Enzymatique, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France, 234 p., 1990.

MARQUES, M. B. A. Produção de Ciclodextrina-Glicosil-Transferase em Diferentes Meios de Cultivo Utilizando o *Bacillus firmus* Alcalofílico – CEPA 37. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, 2004.

MATIOLI, G. **Ciclodextrinas e suas Aplicações em: Alimentos, Fármacos, Cosméticos, Agricultura, Biotecnologia, Química Analítica e Produtos Gerais**. Editora UEM, Maringá, Paraná, 38p., 2000.

Olivo, J. E. Efeito da Concentração Inicial de Microrganismos (*S.cerevisiae*) e da Recirculação de Células em Parâmetros Cinéticos de Processos Simultâneos de Sacarificação e Fermentação de Meios Preparados a Partir de Farinha de Raspa de

Mandioca. Dissertação (Mestrado). Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.

**Anais Eletrônico**

VII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar  
CESUMAR – Centro Universitário de Maringá  
Editora CESUMAR  
Maringá – Paraná - Brasil