



EFEITO DO CONTROLE DO pH NO CULTIVO DE *Bacillus firmus* CEPA 37 PARA A PRODUÇÃO DA ENZIMA CICLOMALTODEXTRINA-GLUCANO-TRANSFERASE (CGTASE)

Jéssica Bravin Carmello¹, Gisella Maria Zanin², José Eduardo Olivo³

RESUMO: A enzima ciclomaltodextrina-glucano-transferase (CGTase) catalisa a conversão do amido, formando as ciclodextrinas por meio de reações reversíveis de ciclização. Pelo fato de as enzimas serem proteínas, o caráter iônico dos grupos amino e carboxílicos da proteína é afetado pelas mudanças de pH. Valores altos ou baixos de pH podem causar a desnaturação e, às vezes, até a completa inativação da enzima. Este trabalho teve como objetivo estudar a influência do pH no cultivo de *Bacillus firmus* CEPA 37 para a produção de CGTase. Nos ensaios realizados em reator batelada foram testados dois meios de cultivo, com diferentes concentrações de amido e extrato de levedura. Outros dois meios de cultivo, idênticos aos dois primeiros, foram utilizados como padrão, isto é, sem controle de pH. 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. 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: *Bacillus firmus*, Batelada, CGTase, pH.

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

¹ 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

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

³ 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).

De acordo com Dixon & Webb (1979), citados por Matioli (2000), pelo fato de as enzimas serem proteínas, o caráter iônico dos grupos amino e carboxílicos da proteína é afetado pelas mudanças de pH. Valores altos ou baixos de pH podem causar a desnaturação e, às vezes, até a completa inativação da enzima. A existência de um pH ótimo para a maioria das enzimas pode ser resultado: do efeito da reversibilidade na velocidade da reação; do efeito do pH sobre a afinidade do complexo enzima-substrato; do decréscimo da saturação da enzima com o substrato e do efeito do pH sobre a estabilidade da enzima, que pode destruí-la irreversivelmente. No que se refere ao pH ótimo das CGTases, os valores relatados na literatura variam de acordo com a espécie de microrganismo produtor da enzima. Segundo Matioli (1997), na determinação de β -CD produzida pela CGTase de *Bacillus firmus* CEPA 37, a máxima atividade específica ocorreu em pH 6,0. No presente trabalho, um ensaio de cultivo descontínuo de *Bacillus firmus* CEPA 37 foi realizado em sistema agitado. Dois meios de cultivo com concentrações diferentes de amido de milho e extrato de levedura foram utilizados como padrão, outros dois meios, com composição semelhante aos dois primeiros, tiveram o pH controlado entre 6,0 – 8,5 ao longo do cultivo.

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.

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

Em seguida, uma alíquota do pré-inóculo foi transferida para os quatro meios de cultivo, cujas identificações e descrição das composições estão expressas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Aos meios de cultivo não foi adicionada a enzima alfa-amilase. Os meios A e AC#1 apresentam a mesma composição e mesma razão de aeração (1:2), bem como os meios I e IC#1. No entanto, os meios denominados AC#1 e IC#1 tiveram o pH controlado ao longo do cultivo.

Tabela 2: Identificação dos Meios de Cultivo

Ensaio	Identificação do Meio
3-a	Meio A
3-i	Meio I
4-ac1	Meio AC#1
4-ic1	Meio IC#1

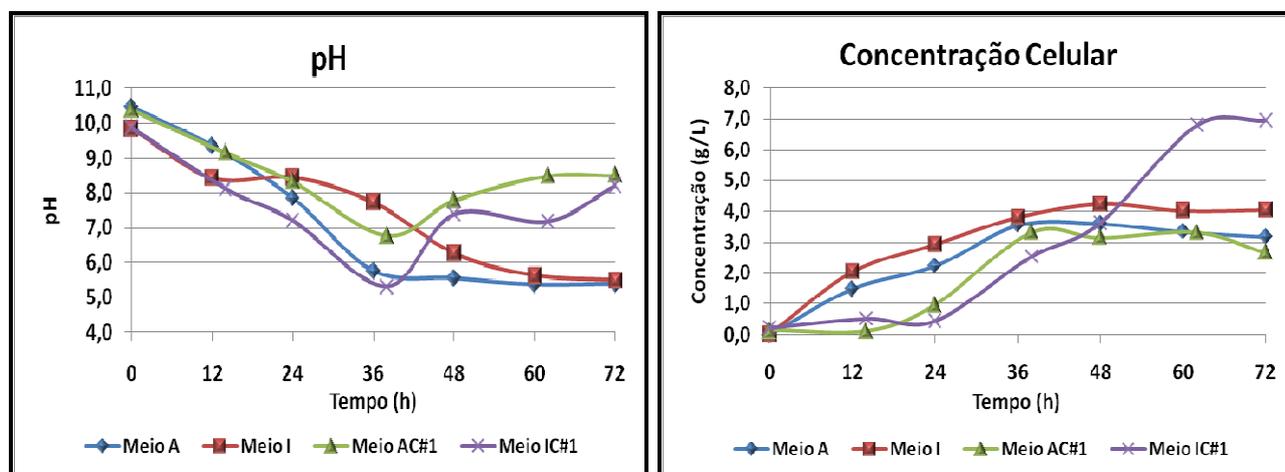
Tabela 3: Composição dos meios de cultivo

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

Os meios foram mantidos a 37°C e 150 rpm em agitador rotativo por 72 horas. 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 ressuspensão 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

Avaliando os resultados, observa-se que o pH nos meios A e I diminuiu ao longo do cultivo, chegando na faixa de 5,0 a 6,0 com 48 horas. Já nos meios AC#1 e IC#2, o pH caiu até 36 horas, chegando à faixa ácida, o que indica que o controle, feito a cada 12 horas, não foi eficiente. No entanto, após 36 horas, o pH desses dois meios se manteve entre 7,0 e 8,5. A variação de pH dos meios de cultivo pode ser observada na Figura 1.

**Figura 1:** Variação de pH vs. tempo**Figura 2:** Variação de concentração celular vs. tempo

Quanto ao crescimento microbiano, nota-se que os meios A e I apresentam perfil de crescimento semelhante, sendo que o meio I, com maior porcentagem de amido de milho e extrato de levedura em sua composição, atingiu quase 4,5 g de células/litro com 48 horas de cultivo. O meio IC#1, que teve seu pH controlado e maior concentração de nutrientes do que o meio AC#1, atingiu quase 7,0 g de células/litro, como está mostrado na figura 2.

O consumo de açúcar nos meios A e AC#1 ocorreu de forma semelhante, sendo quase total após 72 horas de cultivo. Já os meios I e IC#1 apresentaram perfis de consumo diferentes, sendo que o meio cujo pH foi controlado, apresentou consumo mais acentuado, como se pode observar na figura 3. Quanto à atividade enzimática, o meio AC#1 foi o que apresentou resultado mais significativo, atingindo 0,22 U/mL (Figura 4).

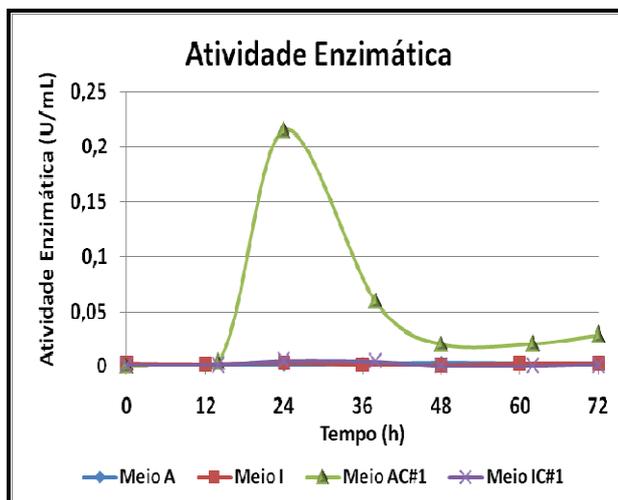
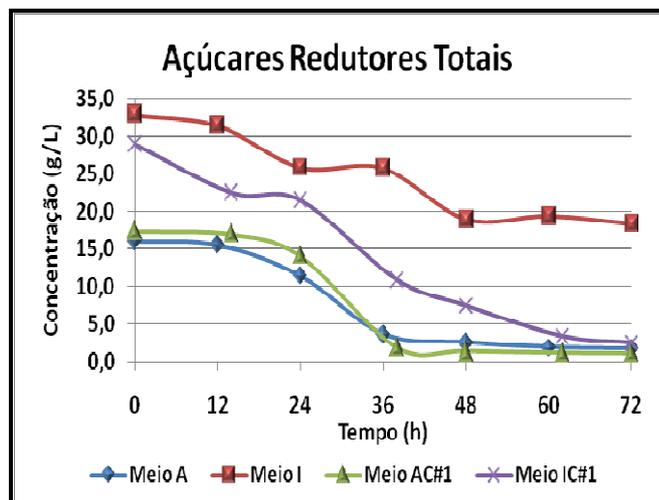


Figura 3: Variação do consumo de açúcar vs. tempo **Figura 4:** Perfil da atividade enzimática pelo tempo

A concentração de proteínas solúveis nos meios A e I apresentou pouca variação ao longo do tempo, atingindo o valor de 0,15 g/L no final do cultivo. Nos meios AC#1 e IC#1 a concentração de proteínas atingiu seu valor máximo após 24 horas, chegando a 0,40 g/L (Figura 5). Os perfis de atividade específica, definida como a razão entre atividade enzimática e a concentração de proteínas solúveis, estão expressos na figura 6. A máxima atividade específica foi 1,16 U/mg de proteínas no meio AC#1 com 24 horas de cultivo. Nesse momento, o pH no meio era de 8,3, diferente do resultado obtido por Matioli (1997), cujo maior valor de atividade específica deu-se com pH igual a 6,0.

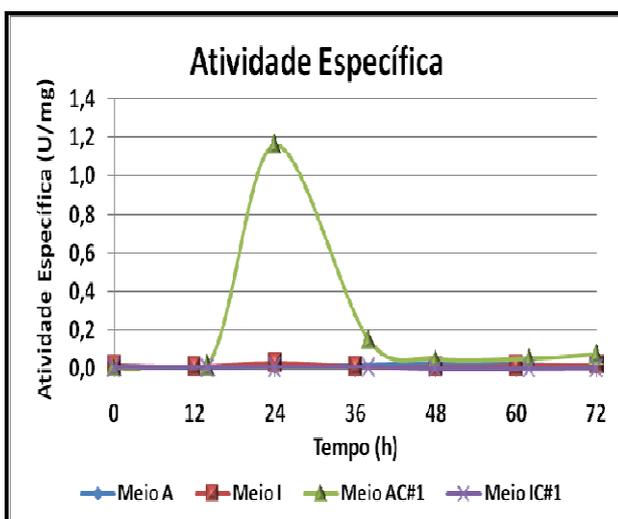
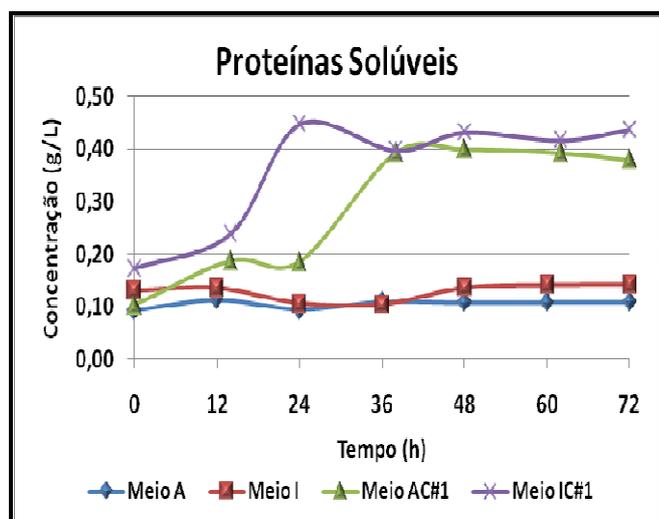


Figura 5: Variação de proteínas solúveis vs. tempo **Figura 6:** Perfil da atividade específica pelo tempo

4 CONCLUSÃO

Do presente trabalho pode-se concluir que o controle de pH na faixa de 6,0 a 8,5 favorece o crescimento celular, o consumo de açúcar e a atividade da enzima CGTase.

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.

MATIOLI, G. Seleção de microrganismo e caracterização de sua enzima ciclodextrina glicosiltransferase. Ph. D. Thesis. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.

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.