



ESTUDO DO EFEITO DO EXTRATO DE LEVEDURA E DO AMIDO DE MILHO NO CULTIVO DE *Bacillus firmus* CEPA 37 PARA A PRODUÇÃO DA ENZIMA CICLOMALTODEXTRINA-GLUCANO-TRANSFERASE (CGTASE)

*Jéssica Bravin Carmello*¹, *Caroline Winter*², *Gisella Maria Zanin*³, *José Eduardo Olivo*⁴

RESUMO: Ciclomaltodextrina-glucano-transferase (CGTase) é uma enzima monomérica, que catalisa a conversão do amido, formando as ciclodextrinas por meio de reações reversíveis de transglicosilação intramolecular. A produção de CGTase é, em geral, realizada em condições aeróbicas e em reator batelada com agitação. Os meios de cultivo utilizados para a cultura das diferentes cepas são bastante complexos. Como substratos são usados diversos tipos de amido e as fontes de proteínas, geralmente, são polipeptona, extrato de carne ou levedura. Este trabalho teve como objetivo estudar a influência da concentração de extrato de levedura e amido de milho no cultivo de *Bacillus firmus* CEPA 37 para a produção de CGTase. Nos ensaios realizados em reator batelada foram testados meios contendo 2,0% e 4,0% (p/v) 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 asépticamente 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: Amido de milho, *Bacillus firmus*, batelada, CGTase, extrato de levedura.

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

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 Acadêmica do Curso de Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. Aluna de Iniciação Científica.

³ Orientadora, Professora Doutora do Curso de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. gisella@deq.uem.br

⁴ Co-orientador, Professor Doutor do Curso de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. olivo@deq.uem.br

ciclodextrinas têm sido amplamente aplicadas industrialmente devido à capacidade de formarem complexos com algumas substâncias que passam a apresentar propriedades mais interessantes em relação à molécula de origem. Um exemplo é a aplicação das ciclodextrinas na indústria farmacêutica. A inclusão de um fármaco na ciclodextrina pode alterar consideravelmente suas características, principalmente no campo farmacotécnico: modificação da solubilidade e da biodisponibilidade, transformação do estado líquido ao estado sólido, melhoria da estabilidade no estado sólido (Matioli, 2000).

A produção de CGTase é, em geral, realizada em condições aeróbicas e em reator batelada com agitação. Os meios de cultivo utilizados para a cultura das diferentes cepas são bastante complexos. Como substratos são usados diversos tipos de amido, tais como: amido de milho, de batata, de mandioca. As fontes de proteínas, geralmente, são polipeptona, extrato de carne e levedura, farinha de soja (Matioli, 2000). Prema e colaboradores (1990), citados por Matioli (2000), conseguiram melhorar a produção de CGTase obtida de cepa selvagem de *Bacillus sp.*, variando os constituintes do meio de cultivo. A produção máxima ocorreu quando amido de mandioca a 1% p/v de concentração e extrato de levedura a 1,5% p/v foram utilizados como fonte de carbono e de nitrogênio, respectivamente. Alves (2002) e outros autores demonstraram que altas concentrações de extrato de levedura favoreciam a síntese da CGTase obtida de cepa de *Bacillus firmus* CEPA 37.

No presente trabalho, quatro ensaios de cultivo descontínuo de *Bacillus firmus* CEPA 37 foram realizados em sistema agitado (shaker) variando a concentração de extrato de levedura (2% e 4% p/v) e amido de milho (2% e 4% p/v).

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 foi adicionada a enzima alfa-amilase, a fim de hidrolisar parcialmente o amido.

Tabela 2: Identificação dos Meios de Cultivo

Ensaio	Identificação do Meio
2-e	Meio E
2-f	Meio F
2-g	Meio G
2-h	Meio H

Tabela 3: Composição dos meios de cultivo

<i>Componentes (% p/v)</i>	<i>Meio E</i>	<i>Meio F</i>	<i>Meio G</i>	<i>Meio H</i>
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	2,0	4,0	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 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

Avaliando os resultados, observa-se que o pH dos meios de cultivo com concentração de amido de milho mais baixa (2% p/v) permaneceu acima de 7,0, enquanto que os meios que continham maior porcentagem de amido apresentaram pH na faixa ácida (figura 1). Esse fato afetou diretamente o consumo de açúcar. Nota-se pelos perfis plotados na figura 2 que, à medida que o pH atingia valores abaixo de 7,0, o consumo de açúcar cessava (Meios F e H). Isso se torna mais nítido quando analisamos o Meio H; com 36 horas, o pH do meio cai para 6,1 e o consumo de açúcar, a partir de então, torna-se praticamente insignificante.

Quanto à concentração celular, observa-se que o Meio H, que continha a maior porcentagem de extrato de levedura e de amido de milho, apresentou a maior concentração de células, chegando a 8,4 g/L com 72 horas de cultivo (figura 3). No entanto, esse efeito positivo da alta concentração de nutrientes não foi observado em relação à atividade enzimática. Os quatro meios de cultivo em estudo apresentaram valores muito baixos de atividade, como mostra a figura 4.

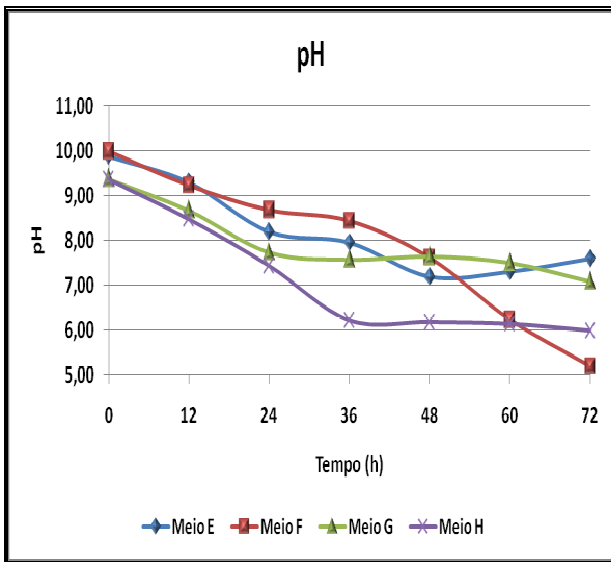


Figura 1: Variação de pH vs. tempo

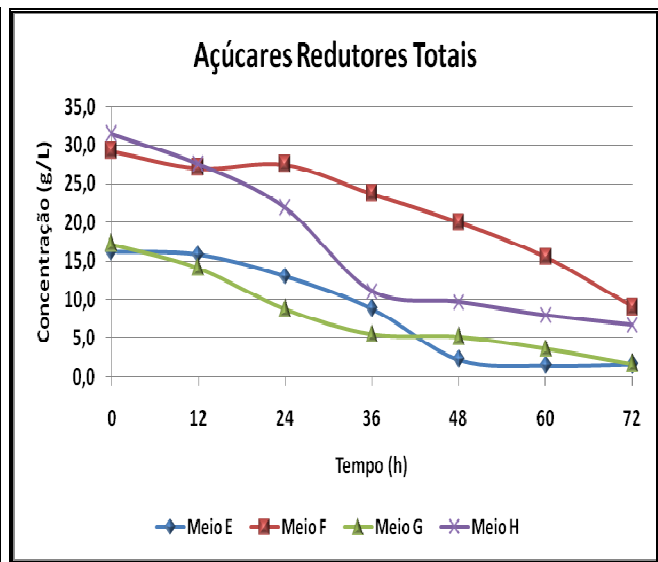


Figura 2: Variação de ART vs. tempo

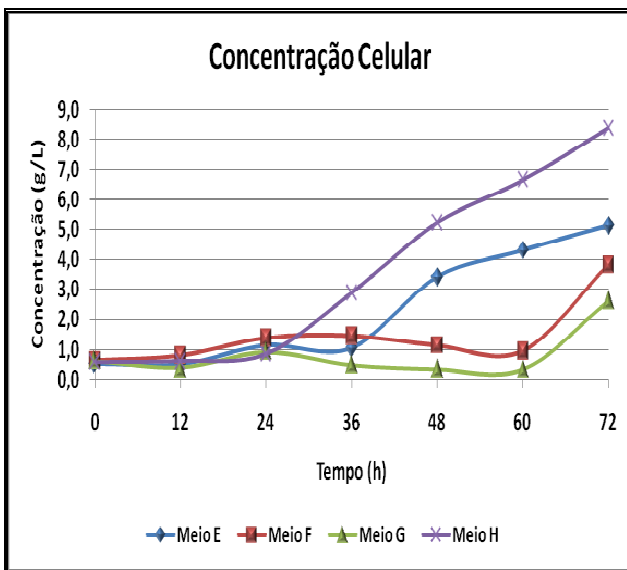


Figura 3: Variação de concentração celular vs. tempo

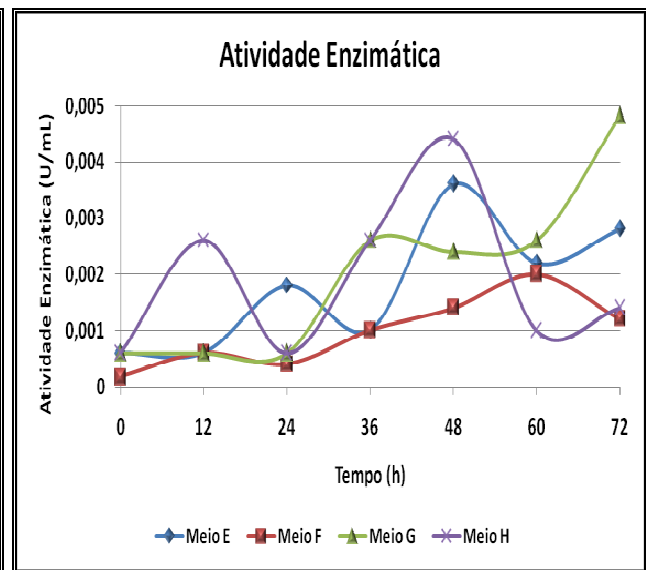


Figura 4: Variação de atividade enzimática vs. tempo

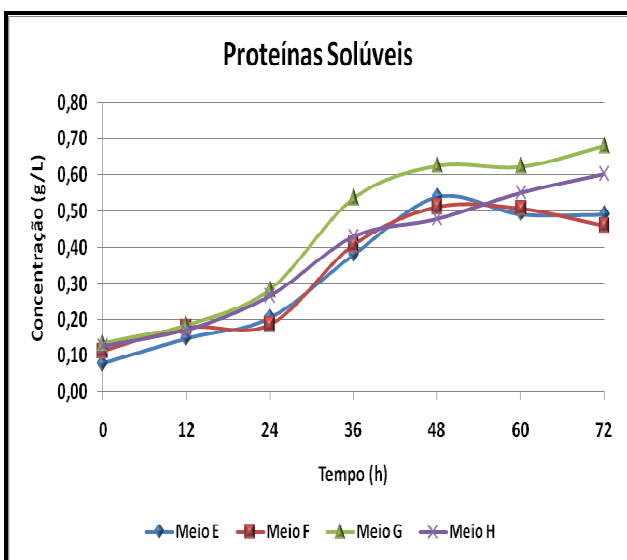


Figura 5: Variação de proteínas solúveis vs. tempo

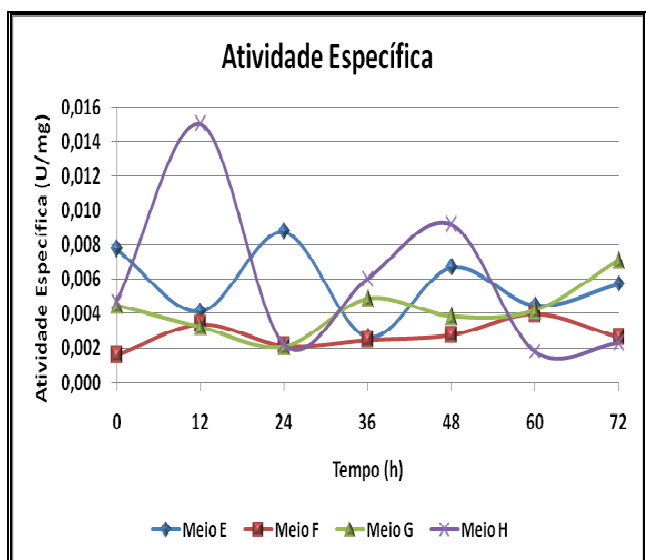


Figura 6: Variação de atividade específica vs. tempo

Na figura 5, observa-se que a variação de proteínas solúveis ao longo do cultivo é semelhante para os Meios E, F e G, enquanto que o Meio H apresenta um perfil quase linear. No entanto, o Meio G, que continha 2% p/v de amido de milho e 4% p/v de extrato de levedura, foi o que apresentou a maior concentração de proteínas, atingindo seu valor máximo com 72 horas de cultivo (aproximadamente 0,7 g/L). Nota-se que o Meio G foi o que apresentou menor crescimento celular, porém os resultados de consumo de açúcares e atividade enzimática foram satisfatórios. O controle de pH entre o valor neutro e a faixa alcalina nesse meio também se mostrou mais efetivo.

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. Os quatro meios de cultivo apresentaram valores baixos. O Meio H foi o que obteve o valor máximo; com 12 horas, a atividade específica chegou a 0,015 U/mg.

4 CONCLUSÃO

Do estudo realizado pode-se concluir que o controle de pH acima de 7,0 contribuiu para o consumo efetivo dos açúcares redutores totais disponíveis no meio. Conclui-se também que altas concentrações de extrato de levedura e de amido de milho favorecem o crescimento celular. No entanto, não se observa esse efeito positivo na atividade enzimática. O estudo de outras combinações de concentrações de extrato de levedura e amido de milho aliada ao controle de pH na faixa alcalina podem gerar resultados mais satisfatórios de atividade enzimática, considerando da literatura que o pH ideal da enzima CGtase é 8,0.

REFERÊNCIAS

ALVES, L. B.; MATIOLI, G.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. and OLIVO, J. E. Production of Cyclodextringlycosyltransferase from *Bacillus firmus*. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 44, p. 399-402, 2002.

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. **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.