

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

Produção de ciclodextrina glicosiltransferase por *Bacillus* sp. SM-02 utilizando resíduos da indústria de farinha de mandioca e de milho como substratos para fermentação submersa e em estado sólido

CARINE MASCENA PEIXOTO

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
AGOSTO- 2015**

Produção de ciclodextrina glicosiltransferase por *Bacillus* sp. SM-02 utilizando resíduos da indústria de farinha de mandioca e do milho como substratos para fermentação submersa e em estado sólido

CARINE MASCENA PEIXOTO

Bióloga

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientadora: Dr^a. Marcia Luciana Cazetta

Co-orientadora: Dr^a. Talita Lopes Honorato

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

AGOSTO – 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

P379p

Peixoto, Carine Mascena.

Produção de ciclodextrina glicosiltransferase por bacillus sp. SM-02 utilizando resíduos da indústria de farinha de mandioca e de milho como substratos para fermentação submersa e em estado sólido / Carine Mascena Peixoto. _ Cruz das Almas, BA, 2015.

71f.; il.

Orientadora: Márcia Luciana Cazetta.

Coorientadora: Talita Lopes Honorato.

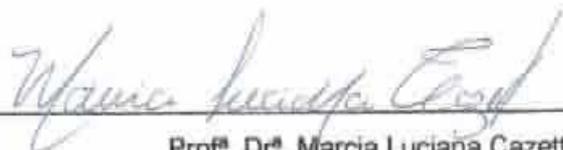
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Enzimas – Produção. 2.Resíduos – Manipueira – Milho. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.
II.Título.

CDD: 574.193

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
Carine Mascena Peixoto



Prof.ª. Dr.ª. Marcia Luciana Cazetta

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)
(Orientadora)



Prof.ª. Dr.ª. Andréa Miura da Costa

Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)



Prof.ª. Dr.ª. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

"Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola em _____ conferindo o grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola em _____."

À minha filha Gabrielle. Enquanto você dormia eu escrevia! À Messias, pelo amor e confiança e a meu pai pelo exemplo de coragem.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por ter me dado permissão de chegar até aqui, e por toda a força concedida na concretização desse sonho. Além disso, agradeço a Ele por todas as pessoas que cruzaram meu caminho e que estão aqui citadas, todas muitíssimo especiais.

Acreditar em um sonho que se sonha só, assim foram esses dois anos de mestrado. Existem momentos em que desacreditar nas pessoas é mais fácil do que acreditar, e assim o sonho vai se distanciando a cada dia. Por isso, resolvi acreditar em duas pessoas, e a elas minha eterna gratidão por confiarem em mim, por serem pacientes e me passarem ensinamentos que levarei por toda vida. Só tenho a agradecer e dizer o quanto vocês fizeram toda a diferença, me sinto como uma filha e sou feliz, por tê-las como minhas orientadoras e amigas as queridas Prof^a. Dr^a. Marcia Luciana Cazetta e Prof^a. Dr^a. Talita Lopes Honorato.

Ao meu amado Messias: Foi você quem me incentivou nessa carreira que eu não conhecia e que me faz muitíssimo feliz. Obrigada por sempre estar por trás de mim nas minhas dificuldades, minhas batalhas sem você seriam milhões de vezes mais difíceis. Eu não sou tão forte e tranquila quanto aparento, só tenho pessoas importantes por trás de mim como você.

À minha filha Gabrielle, foi por você que cheguei até aqui, e é por você que seguirei em frente.

Agradeço a Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela infraestrutura e recursos disponíveis, a CAPES e FAPESB pela bolsa e recursos concedidos, aos professores e técnicos do Laboratório de Bioquímica e a todos os profissionais envolvidos.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho,

Meu muito obrigada!!!!

**“A sabedoria é uma força difícil de dominar, mas quando dominada,
materializa sonhos e edifica a alma.”**

JAIR SANTOS

“Combati o bom combate, acabei a carreira, guardei a fé.”

TIMÓTEO 4: 7

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1: Características dos domínios estruturais da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase).....	10
Tabela 2: Substratos empregados na produção da enzima CGTase em processos fermentativos.....	13

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Delineamento composto central rotacional 2^2 para produção da enzima CGTase por <i>Bacillus</i> sp SM-02 usando casca de mandioca triturada e milhocina como variáveis em fermentação submersa.....	30
Tabela 2: Matriz do delineamento composto central rotacional 2^2 e valores das variáveis independentes (X1: casca de mandioca triturada e X2: milhocina) e as respostas (atividade enzimática e biomassa) por <i>Bacillus</i> sp. SM-02 em fermentação submersa.....	32
Tabela 3: Análise de regressão da produção de CGTase por <i>Bacillus</i> sp. SM-02 em fermentação submersa utilizando manipueira, casca de mandioca triturada e milhocina como substratos.....	34
Tabela 4: Análise de variância (ANOVA) para a produção de CGTase por <i>Bacillus</i> sp. SM-02 em fermentação submersa utilizando manipueira, casca de mandioca triturada e milhocina como substratos.....	34
Tabela 5: Efeito de íons metálicos e agentes químicos na atividade de CGTase produzida por <i>Bacillus</i> sp. SM-02 utilizando casca de mandioca triturada e	

milhocina como substrato em meio de sais diluído com manipueira em fermentação submersa.....40

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Delineamento composto central rotacional 2^2 para extração de CGTase por *Bacillus* sp. SM-02 em fermentação em estado sólido, utilizando casca de mandioca triturada como substrato e meio de sais diluído com manipueira adicionado à matéria sólida.....50

Tabela 2: Delineamento composto central rotacional 2^2 para produção de CGTase por *Bacillus* sp. SM-02 em fermentação em estado sólido, utilizando casca de mandioca triturada como substrato e meio de sais diluído com manipueira adicionado à matéria sólida.....51

Tabela 3: Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional 2^2 para extração da enzima CGTase obtida em fermentação sólida com casca de mandioca triturada e milhocina.....55

Tabela 4: Coeficientes de regressão da atividade de CGTase por *Bacillus* sp. SM-02 em fermentação em estado sólido utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos.....57

Tabela 5: Análise de regressão da extração de CGTase por *Bacillus* sp. SM-02 em fermentação em estado sólido utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos.....57

Tabela 6: Matriz do planejamento experimental da produção enzimática por *Bacillus* sp. SM-02 em fermentação em estado sólido e valores das variáveis independentes usados no DCCR (manipueira e densidade ótica da bactéria).....59

Tabela 7: Análise de regressão da produção enzimática de CGTase por *Bacillus* sp. SM-02 em fermentação em estado sólido utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos.....60

Tabela 8: ANOVA para atividade de CGTase por *Bacillus* sp. SM-02 em fermentação em estado sólido utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos.....60

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1: A ação das enzimas envolvidas na degradação do amido. (●) Molécula de glicose com extremidade redutora; (o) Molécula de glicose sem a extremidade redutora. As setas indicam a preferência pela quebra na molécula de amido.....	04
Figura 2: (a) unidades de glicopirranose; (b) ligações do tipo α -1,4; (c) estrutura da β -CD; (d) propriedades das CDs.....	05
Figura 3: Estrutura e propriedade de α -, β - e γ -CDs.....	05
Figura 4: Fluxograma da produção das ciclodextrinas.....	08
Figura 5: Árvore filogenética do alinhamento de todas as sequências de CGTase já publicadas.....	09
Figura 6: Sítios de clivagem da enzima ciclodextrina glicosiltransferase.....	10
Figura 7: Reações catalisadas por CGTase bacteriana, onde: Gn, Gm são cadeias de α - 1,4-D-glicopiranosil com n e o unidades de D-glicopiranosil. X é a parte da cadeia de α - 1,4-D-glicopiranosil	11
Figura 8: Fluxograma das etapas de processamento de farinha de mandioca.....	14

CAPÍTULO 1

Figura 1: Reação ilustrativa de formação do complexo de inclusão CD-PH durante os ensaios enzimáticos. A produção da enzima é mensurada de acordo com a intensidade de cor do reagente.....	31
--	----

Figura 2: Curvas de contorno da produção de CGTase por *Bacillus* sp. SM-02 em fermentação submersa utilizando manipueira, casca de mandioca triturada e milhocina como substratos.....35

Figura 3: Curva de produção da CGTase por *Bacillus* sp. SM-02 em fermentação submersa utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos em meio de sais diluído com manipueira.....37

Figura 4: pH ótimo da CGTase produzida por *Bacillus* sp. SM-02 utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos em meio de sais diluído em manipueira em fermentação submersa.....38

Figura 5: (a) Temperatura ótima e (b) termoestabilidade da CGTase produzida por *Bacillus* sp. SM-02 utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos em meio de sais diluído com manipueira em fermentação submersa.....39

CAPÍTULO 2

Figura 1: Estudo comparativo do melhor tempo de fermentação em estado sólido para produção de CGTase por *Bacillus* sp. SM-02 entre manipueira e água destilada adicionadas à matéria sólida.....54

Figura 2: Gráfico de curvas de contorno da extração enzimática em fermentação sólida por *Bacillus* sp. utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos.....56

Figura 3: Validação do tempo de extração enzimática em fermentação em estado sólido por *Bacillus* sp. utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos.....58

Figura 4: Curvas de contorno da produção de CGTase por <i>Bacillus</i> sp. SM-02 em função da quantidade de manipueira e concentração de inóculo para a fermentação em estado sólido, utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos.....	61
Figura 5: Temperatura ótima da CGTase sintetizada por <i>Bacillus</i> sp. SM-02 em fermentação em estado sólido utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos e 7 mL de meio de sais diluídos com manipueira adicionados à matéria sólida.....	63
Figura 6: Termoestabilidade da CGTase por <i>Bacillus</i> sp. SM-02 em fermentação em estado sólido utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos em 7 mL de meio de sais diluídos com manipueira adicionados à matéria sólida.....	64
Figura 7: pH ótimo da CGTase sintetizada por <i>Bacillus</i> sp. SM-02 em fermentação em estado sólido utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos em 7 mL de meio de sais diluídos com manipueira adicionados à matéria sólida.....	65
Figura 8: Efeito de íons metálicos e agentes químicos na atividade de ciclização da CGTase de <i>Bacillus</i> sp. SM-02 em fermentação em estado sólido utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos em 7 mL de meio de sais diluídos com manipueira adicionados à matéria sólida.....	66

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO.....	01
REVISÃO DE LITERATURA.....	03
Enzimas.....	03
Ciclodextrinas.....	04
Ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase).....	08
Produção de CGTase.....	11
Resíduos da indústria de farinha e de milho.....	13
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17

CAPÍTULO 1

Otimização da produção de ciclodextrina glicosiltransferase por <i>Bacillus</i> sp. SM-02 utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos em fermentação submersa.....	25
RESUMO.....	26
INTRODUÇÃO.....	27
PARTE EXPERIMENTAL.....	28
Micro-organismo e substratos.....	28
Ensaio fermentativos.....	28
Otimização usando delineamento composto central rotacional.....	29
Ensaio enzimático.....	30
Determinação da biomassa.....	31
Determinação das proteínas totais e açúcares redutores totais.....	31

Caracterização parcial do extrato enzimático bruto.....	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
Otimização da produção de CGTase por fermentação submersa por meio do delineamento composto central rotacional DCCR.....	32
Cinética enzimática.....	36
Caracterização parcial da enzima.....	37
CONCLUSÕES.....	41
AGRADECIMENTOS.....	41
REFERÊNCIAS.....	41

CAPÍTULO 2

Produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) por *Bacillus* sp. SM-02 empregando resíduos da indústria de farinha de mandioca por fermentação em estado sólido

RESUMO.....	47
INTRODUÇÃO.....	48
MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
Micro-organismo e substratos.....	49
Teste preliminar para o melhor tempo de fermentação em estado sólido.....	49
Ensaio de Fermentação.....	50
Otimização da extração da enzima CGTase.....	50
Otimização da produção da enzima CGTase.....	50
Otimização usando delineamento composto central rotacional.....	51
Ensaio enzimático.....	52
Caracterização enzimática.....	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53

Determinação do melhor tempo de fermentação em estado sólido.....	53
Otimização da extração enzimática.....	55
Otimização da produção de CGTase	58
Caracterização parcial do extrato enzimático bruto.....	62
CONCLUSÕES.....	67
AGRADECIMENTOS.....	68
REFERÊNCIAS.....	68
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71

RESUMO

Peixoto, C. M. Produção de ciclodextrina glicosiltransferase por *Bacillus* sp. SM-02 utilizando resíduos da indústria de farinha de mandioca e do milho como substratos para fermentação submersa e em estado sólido.

A enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) possui a capacidade de converter moléculas de amido em ciclodextrinas (CDs) que, por sua vez, apresentam a propriedade de formar complexos de inclusão com uma variada gama de substâncias, podendo ser aplicadas em diversos setores industriais. Resíduos oriundos de indústrias de processamento da mandioca e do milho têm sido vistos como excelentes substratos na produção dessa enzima, devido ao seu alto conteúdo energético, sua abundância e fácil acessibilidade, além de possuírem preços acessíveis. A casca de mandioca e a manipueira são resíduos gerados a partir do processamento da raiz de mandioca e a milhocina é oriunda da maceração úmida do milho, e apresentam todas essas vantagens podendo ser considerados substratos promissores na produção de CGTase. Este trabalho teve como objetivo estudar a produção de CGTase por *Bacillus* sp. SM-02 utilizando resíduos da indústria de farinha de mandioca como fonte de carbono e a milhocina como fonte de nitrogênio em fermentação submersa e em estado sólido. No processo de fermentação submersa foi possível otimizar a síntese da enzima alcançando uma produção média de 352,53 U/mL. Na fermentação em estado sólido a produção máxima obtida foi de 141,48 U/g, com aproximadamente 49% de umidade e inóculo com uma OD₆₀₀ fixada em 0,7. Em ambas as fermentações a enzima apresentou temperatura ótima e pH ótimo em 55°C e pH 8,0, respectivamente, sofrendo uma influência positiva do íon CaCl₂. De modo, a casca de mandioca e a manipueira se apresentaram como substratos eficazes na produção de CGTase, principalmente por conter quantidades significativas de amido em sua constituição, proporcionando elevada produção da enzima. Além disso, o uso desses resíduos em processos fermentativos pode diminuir os impactos ambientais gerados pelo descarte inapropriado dos mesmos.

Palavras-chave: resíduos agroindustriais, enzimas microbianas, otimização, bactéria.

ABSTRACT

Peixoto, C. M. Microbial production of cyclodextrin glycosyltransferase of *Bacillus* sp. SM-02 using waste from cassava flour and corn industries as substrates for submerged fermentation and solid state.

The enzyme cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) has the ability to convert starch molecules in cyclodextrins (CDs), which in turn have the property of forming inclusion complexes with a wide range of substances and can be applied in several industrial sectors. Wastes from cassava flour and corn processing industries has been proved as excellent substrates in the production of this enzyme because of its high energy content, abundance and easy accessibility, besides having prices accessible. The peel cassava and cassava water waste are wastes generated from the cassava root processing and corn steep liquor comes from wet corn steep and both of them have all of these advantages may be considered promising substrates in the production of CGTase. This work aimed to study CGTase production by *Bacillus* sp. SM-02 using cassava industry wastes as source of carbon and corn steep liquor as nitrogen source in submerged and solid state fermentations. In the submerged fermentation was possible to optimize the synthesis of the enzyme reaching an average production of 352.53 U/mL. In the solid state fermentation a maximum yield obtained was 141.48 U/g with approximately 49% humidity and inoculum with a O.D.₆₀₀ set at 0,7. In both fermentations the enzyme showed optimum temperature at 55 °C and optimum pH at 8.0, suffering a positive influence of ion CaCl₂. According to the above results of the peel the cassava and cassava water waste presented as efficient substrates for the CGTase production due significant amounts of starch in its constitution resulting in enzymatic production increase. Furthermore, the use of such wastes in in the enzyme production decrease the environmental impact generated by the same.

Keywords: agroindustrial wastes, microbial enzyme, optimization, bacteria.

INTRODUÇÃO

As amilases são enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar a molécula de amido. Dentre elas, destaca-se a Ciclodextrina Glicosiltransferase, também conhecida como CGTase, que tem a capacidade de converter amido em ciclodextrinas (CDs). As CDs são oligossacarídeos cíclicos que podem formar complexos de inclusão com diversas moléculas apresentando uma grande aplicação industrial em muitos setores na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica, têxtil, entre outras (VENTURINI et al., 2008; ASTRAY et al., 2009; ANDREAUS et al., 2010; LEEMHUIS et al., 2010).

A CGTase é uma enzima microbiana produzida exclusivamente por bactérias e sintetizadas, principalmente, pelas espécies do gênero *Bacillus*, as mais estudadas para este fim. Essas espécies de bactérias são isoladas de diversos ambientes, principalmente de solos proveniente de várias culturas como batata, milho, trigo, mandioca, cana-de-açúcar, entre outras (PRADO et al., 2002; COSTA et al., 2007; MORE et al., 2012).

Vários substratos de baixo custo contendo amido em sua constituição são empregados na produção desta enzima (MATIOLI et al., 2000; COSTA et al., 2007; BLANCO et al., 2009; MORE et al., 2012). A manipueira e a casca de mandioca apresentam-se como excelentes substratos na produção da enzima, pois são resíduos oriundos da indústria de farinha de mandioca e possuem potencial poluidor para o meio ambiente (MARQUES, 2009; SANTOS, 2009).

Além dessas fontes de carbono, muitos pesquisadores vêm usando extrato de levedura, peptona, polipeptona, triptona e vários outros substratos como fonte de nitrogênio (ABDEL-NABY et al., 2000). A milhocina também pode ser considerada uma ótima alternativa dessa fonte já que é um resíduo gerado em abundância pela indústria do milho, apresentando preços acessíveis (ZANOTTO, 2011).

A fermentação submersa e em estado sólido estão entre os processos fermentativos mais utilizados na produção da CGTase, empregando diferentes micro-organismos e substratos, com a finalidade de se obter processos economicamente viáveis industrialmente, com menor tempo para obtenção e

maior produção da enzima. Com o uso de ferramentas estatísticas, como os planejamentos fatoriais e superfícies de resposta, é possível otimizar a produção da CGTase (PRADO et al., 2002; RAHMAN et al., 2004; CUCOLO et al., 2006; RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Nesse contexto, essa revisão tem como objetivo fornecer uma base teórica sobre a enzima CGTase enfocando sua ação, produção e aplicações biotecnológicas, além de apresentar novos substratos (casca de mandioca, manipueira e milhocina) como alternativas ecológicas e economicamente viáveis para produção desta enzima.

REVISÃO DE LITERATURA

Enzimas

A capacidade catalítica das enzimas levou ao emprego dessas proteínas em diversos processos industriais com amplas aplicações, não só no setor alimentício, na produção, processamento e deterioração dos alimentos, mas em diversas outras áreas. Muitas delas apresentam propriedades que permitem seu uso como medicamentos, tais como, as lisozimas e bromelina, com ação antibiótica e anti-inflamatória, como também a papaína e tripsina que facilitam a digestão (MONTEIRO e SILVA, 2009; PALUMBO et al., 2010).

Outras enzimas são aplicadas na indústria de papel, tais como as celulases, que têm a função de hidrolisar a celulose em moléculas de glicose. Seu uso na indústria têxtil vem aumentando nas últimas décadas atuando nas fases de fiação, tingimento e acabamento de tecidos. Outras são usadas em produtos de limpeza como amilases, proteases, lipases e celulases, bem como no tratamento de efluentes e resíduos industriais (MUSSATO et al., 2007; CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

As enzimas também vêm ganhando espaço na indústria de cosméticos, no processo de fabricação de tinturas, cremes depilatórios, alisantes de cabelo, entre outros produtos (MUSSATO et al., 2007).

O processamento total ou parcial do amido apresenta-se como uma das inúmeras aplicações industriais, sendo realizadas pela ação combinada de enzimas denominadas amilases, que atuam hidrolisando as ligações α -1,4 e α -1,6 desta molécula (Figura 1) (CARNEIRO et al., 2006).

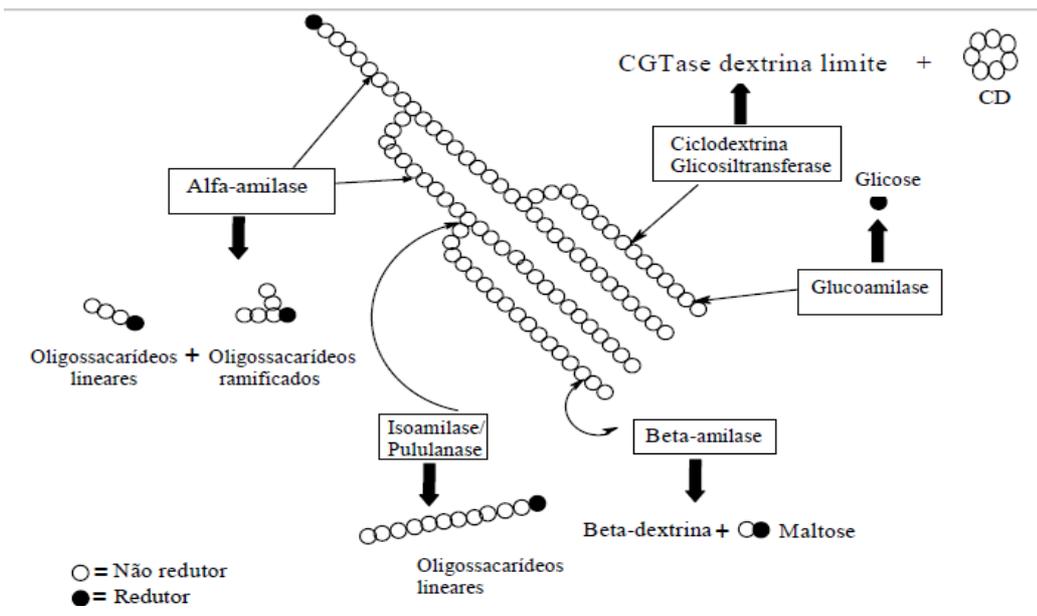


Figura 1: A ação das enzimas envolvidas na degradação do amido. (●) Molécula de glicose com extremidade redutora; (○) Molécula de glicose sem a extremidade redutora. As setas indicam a preferência pela quebra na molécula de amido. Fonte: Carneiro et al. (2006)

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) é uma enzima amilolítica e faz parte da superfamília α -amilase. É uma hexosiltransferase e está classificada dentro da classe de transferases. Essa enzima apresenta grande interesse industrial por suas inúmeras aplicações, principalmente na produção de ciclodextrinas (AGUIAR, 2001; QI e ZIMMERMANN, 2005).

Ciclodextrinas (CDs)

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos contendo de 6 a 13 unidades de D-(+) glicopirranose (Figura 2a e 2c) unidas por meio de ligações do tipo α -1,4 (Figura 2b) formando um anel cilíndrico cônico truncado cuja cavidade é hidrofóbica e seu exterior é hidrofílico (Figura 2d). Sua forma circular é adquirida pela conformação do C1 da glicose e suas ligações glicosídicas. Essa característica na estrutura das ciclodextrinas permite a formação de complexos de inclusão com uma enorme variedade de moléculas, alterando suas propriedades físico-químicas (CARNEIRO et al., 2006; ANDREAUS et al., 2010).

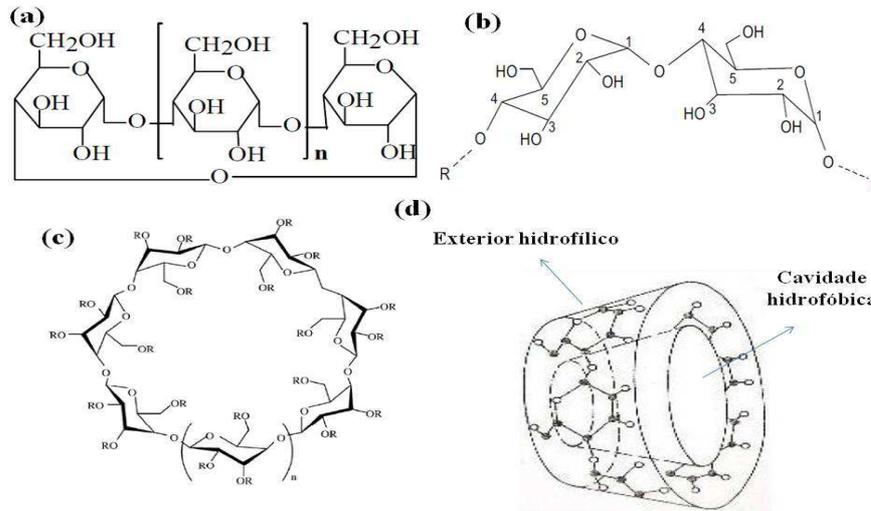


Figura 2: (a) unidades de glicopirranose; (b) ligações do tipo α -1,4; (c) estrutura da β -CD; (d) propriedades das CDs. Fonte: Adaptado de Singh et al. (2010)

A estrutura das CDs apresenta um lado com diâmetro maior, contendo grupos hidroxila secundários no C2 e C3, e o outro lado com diâmetro menor possuindo as hidroxilas primárias no C6 da molécula (CARNEIRO et al., 2006).

Existe uma grande variedade de CDs e dentre elas as α -, β - e γ -CDs são de ocorrência natural contendo 6, 7 e 8 monômeros de glicose, respectivamente, possuindo formas que se assemelham a um cone. Esses três tipos de CDs apresentam algumas características como uma cavidade com 7,9 Å de profundidade. A α -CD tem 4,7 Å e 5,3 Å de diâmetro superior e inferior, enquanto que na β -CD esses diâmetros são de 6,0 Å e 6,5 Å e na γ -CD é de 7,5 Å e 8,3 Å (Figura 3) (VENTURINI et al., 2008).

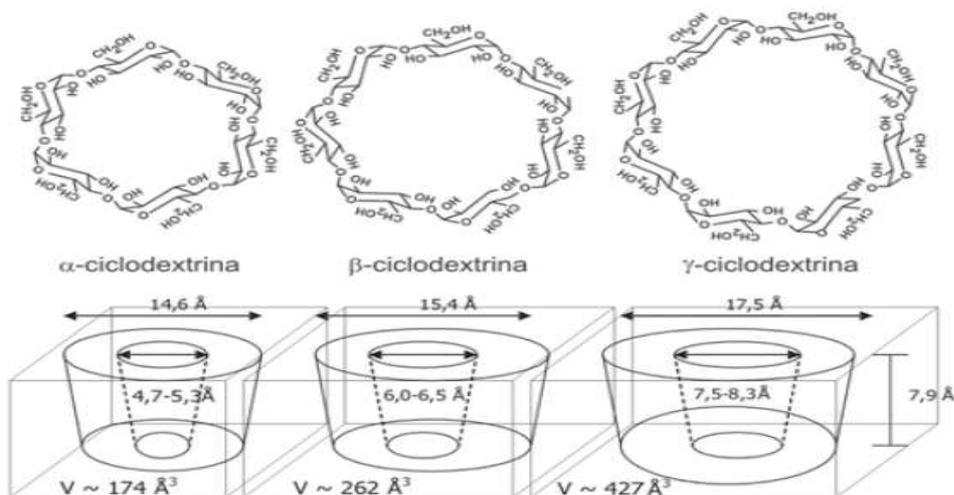


Figura 3: Estrutura e propriedade de α -, β - e γ -CDs. Fonte: Venturini et al. (2008)

As ciclodextrinas, descritas como “moléculas sedutoras”, pertencem à família dos oligossacarídeos macrocíclicos e tem despertado grande interesse da comunidade científica devido à sua habilidade de formar complexos do tipo substrato-receptor, usado como ambiente único para reações químicas, como também possuem a capacidade de formar complexos de inclusão com muitas substâncias alterando suas propriedades físico-químicas por meio da complexação (VENTURINI et al., 2008).

A complexação é descrita como o fenômeno em que moléculas inteiras, ou suas partes, são acomodadas no interior da cavidade das ciclodextrinas sem ocorrer o estabelecimento das ligações covalentes entre elas. Para a formação de complexos de inclusão é necessário que, no mínimo, o tamanho e a geometria entre a cavidade das CDs e a molécula hóspede sejam compatíveis. As ligações envolvidas na formação desses complexos são ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van De Walls (SALTÃO e VEIGA, 2001).

As ciclodextrinas têm diversas aplicações biotecnológicas em muitos setores industriais, mas são empregadas, principalmente, na indústria de alimentos, cosmética e farmacêutica (ASTRAY et al., 2010). Na indústria alimentícia, as CDs apresentam diversas aplicações envolvendo o processamento de alimentos na proteção de seus componentes lipofílicos, na solubilização de enzimas e corantes e, principalmente, na estabilização de fragrâncias e sabores, mascarando odores e sabores desagradáveis (ASTRAY et al., 2010).

Devido às reações adversas causadas nas pessoas pelo uso de substâncias para evitar o escurecimento enzimático, como o sulfito, e pela preferência do consumidor em produtos naturais mais seguros e sem aditivos químicos, o interesse por agentes antiescurecimento tem aumentado. As ciclodextrinas são usadas para esse fim nos alimentos através da complexação dessas macromoléculas cíclicas com agentes fenólicos presentes em bebidas, frutas e vegetais, aumentando a vida de prateleira desses produtos. Sua cavidade hidrofóbica encapsula os precursores antiescurecimento tornando esses compostos indisponíveis e, conseqüentemente, inibe a reação de escurecimento enzimático (CARNEIRO et al., 2006).

Os lipossomas, as nanopartículas e micropartículas são novos sistemas terapêuticos que vem sendo planejados com a finalidade de diminuir e, até mesmo, ultrapassar as dificuldades expostas por diversos medicamentos como a perda da atividade, má absorção pelo organismo e a baixa solubilidade. As ciclodextrinas são utilizadas no desenvolvimento desses novos sistemas terapêuticos permitindo a alteração da solubilidade e da velocidade de dissolução desses fármacos, além de aumentar a estabilidade e proteger a mucosa de irritações causadas por esses medicamentos (SALTÃO e VEIGA, 2001).

A melhoria da eficácia dos fármacos pela CDs ocorre devido à formação de complexos de inclusão com essas substâncias que são disseminadas no organismo, atingindo sua biofase e não causando problemas ao indivíduo, funcionando assim como uma via mais cômoda para a administração do remédio e aumentando o seu índice terapêutico (SALTÃO e VEIGA, 2001).

A formação do complexo de inclusão gera modificações químicas e físicas na estrutura de muitas moléculas hóspedes tais como estabilização das substâncias sensíveis à luz e ao oxigênio, mudança da reatividade química, fixação de diversas substâncias voláteis, melhora da solubilidade, proteção contra a degradação microbiana, além de mascarar odores, sabores desagradáveis, pigmentos e a coloração, entre outras (DEL VALLE, 2004).

Leemhuis et al. (2010) descreveram que, no processo para obtenção de ciclodextrinas puras, é necessário que o amido seja liquefeito (Figura 4) e que a conversão desse polissacarídeo em CDs muitas vezes não é total variando de 50% a 100%. Essa conversão parcial do amido em ciclodextrinas tem várias causas durante sua produção, tais como a dificuldade da enzima em hidrolisar as ligações α -1,6 das ramificações da amilopectina. A produção de CGTase é também limitada pela inibição do produto da enzima, pela hidrólise de CDs em oligossacarídeos lineares e repressão catabólica, uma vez que, sob elevadas concentrações de sacarídeos, a enzima cessa sua produção a partir do amido (LEEMHUIS et al., 2010).

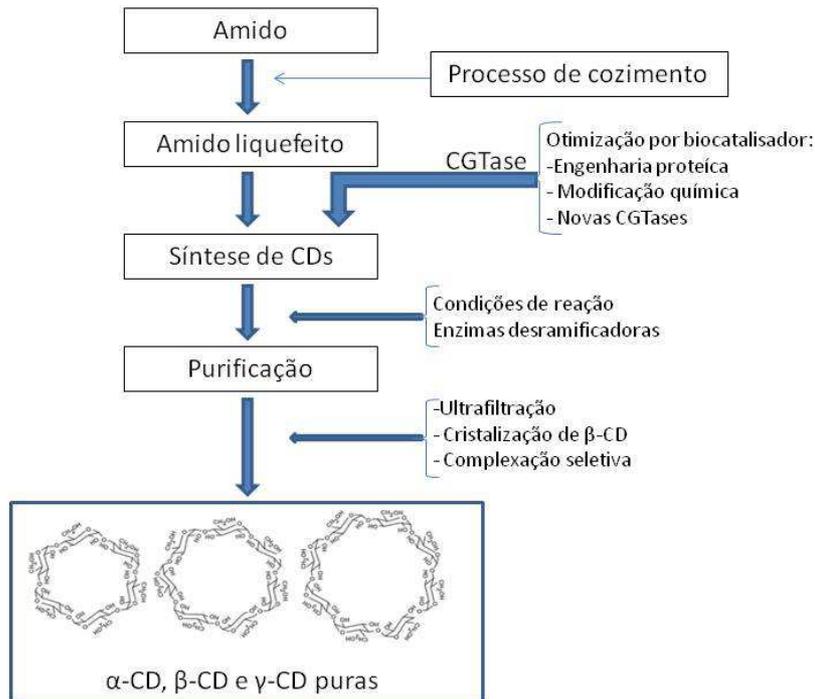


Figura 4: Fluxograma da produção das ciclodextrinas. Fonte: Adaptado de Leemhuis et al. (2010).

Ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase)

A ciclodextrina glicosiltransferase (1,4- α -D-glicopiranosil transferase), pertence à superfamília das α -amilases diferenciando-se das demais por apresentar um domínio na porção C-terminal em sua estrutura molecular (PINTO, 2007; LEEMHUIS et al., 2010).

O alinhamento dos genes de CGTases produzidas por diferentes bactérias já publicados na literatura foi realizado por QI e Zimmermann (2005) com o objetivo de se obter uma árvore filogenética. Nesse estudo a enzima foi classificada em três grupos de acordo com o produto em α -, β - e γ -CGTase (Figura 5). Existe uma similaridade de 47% a 99% das sequências de aminoácidos entre esta enzima produzida por diferentes fontes de carbono encontrando 51 resíduos de aminoácido completamente conservados envolvidos na catálise, na ligação do substrato e do cálcio situados em cinco regiões que são conservadas em todos os membros da α -amilase.

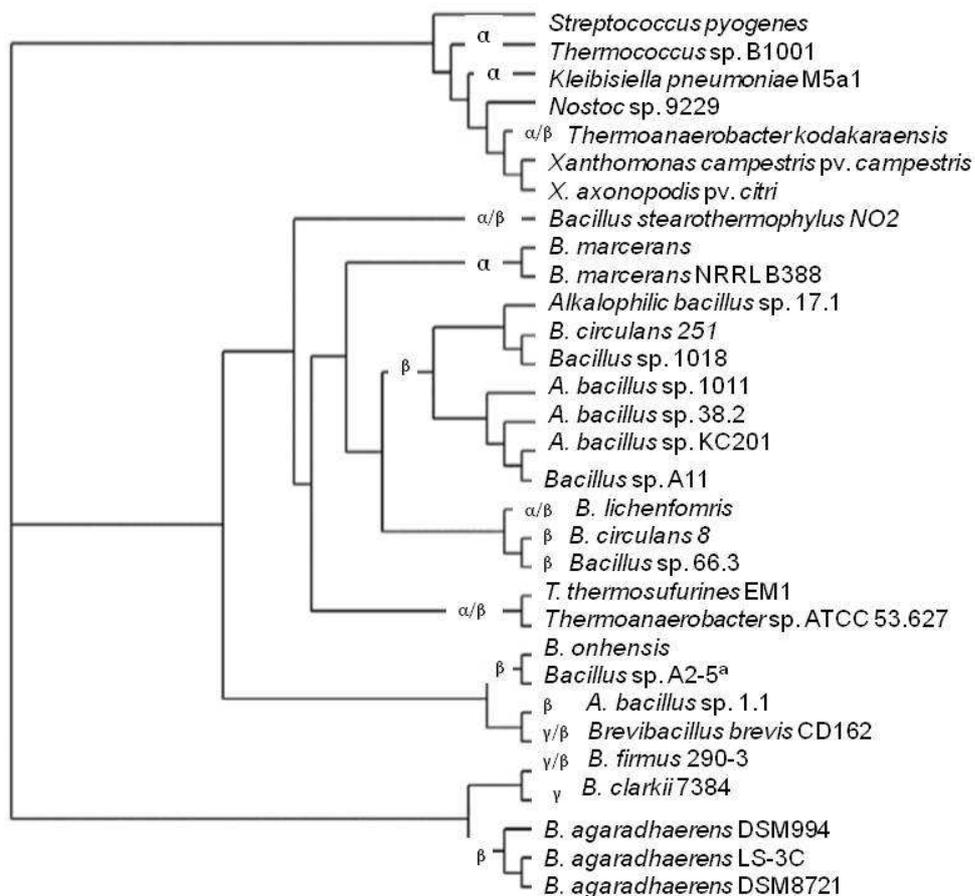


Figura 5: Árvore filogenética do alinhamento de todas as sequências de CGTase já publicadas. Fonte: Qi e Zimmermann (2005)

Essa enzima possui cinco domínios estruturais denominados de A, B, C, D e E descritos na Tabela 1 (PINTO, 2007). A enzima possui seu sítio ativo localizado no domínio A da molécula. Os domínios A e B da enzima podem acomodar, pelo menos, 7 moléculas de glicose no sítio doador e 3 moléculas de glicose em seu sítio aceptor. O sítio de clivagem da enzima encontra-se entre os subsítios -1 e +1 (LEEMHUIS et al., 2010).

A CGTase age clivando as ligações glicosídicas α -1,4 do amido usando seu sítio de clivagem, produzindo um intermediário glicosil que fica ligado ao sítio doador da molécula. Esse intermediário será deslocado para o 4-hidroxil da extremidade não redutora da enzima formando as ciclodextrinas (Figura 6) (LEEMHUIS et al., 2010).

Tabela 1: Características dos domínios estruturais da enzima ciclodextrina glicosiltransferase.

Domínios	Características
A (α/β catalíticos)	Mais conservado
B	Contribui com a ligação ao substrato
C e E (conformação β)	Ligação com o grão bruto do amido
D (conformação β)	Desconhecida

Fonte: PINTO, 2007

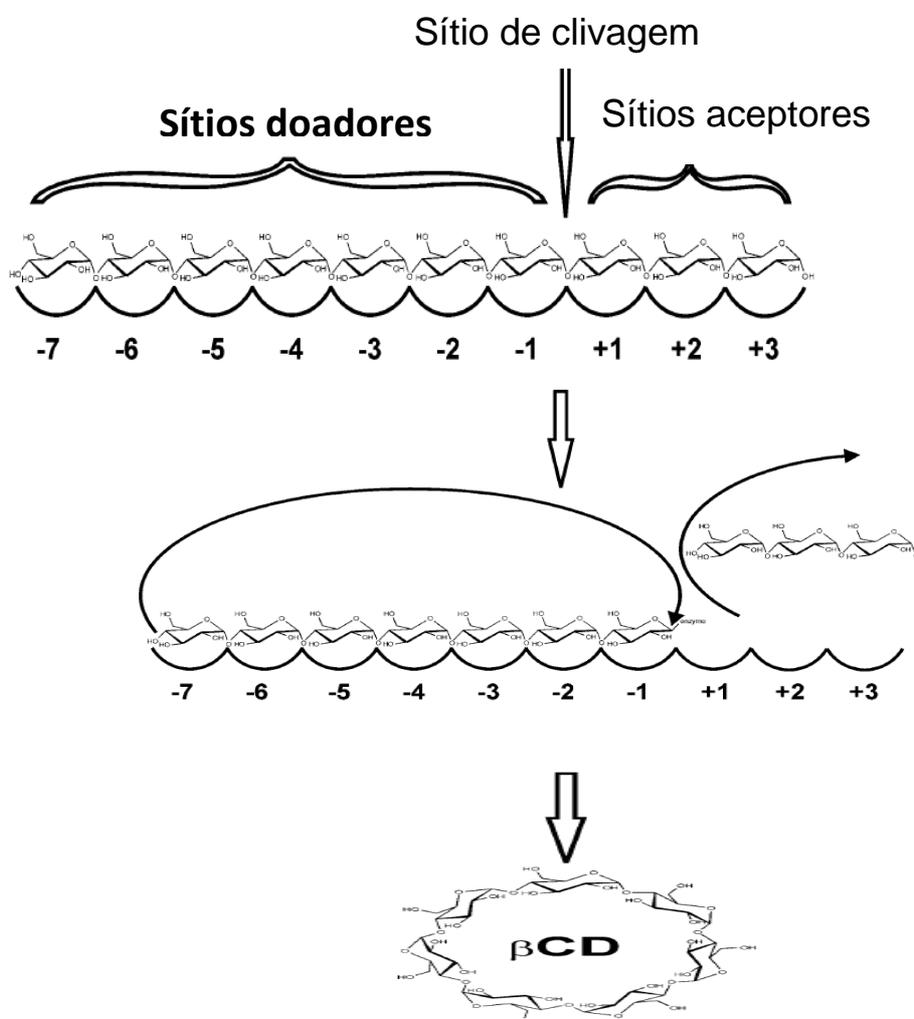


Figura 6: Sítios de clivagem da enzima ciclodextrina glicosiltransferase. Fonte: Leemhuis et al. (2010)

A CGTase é uma enzima microbiana extracelular capaz de converter o amido em maltooligossacarídeos cíclicos não reduzidos denominados ciclodextrinas (CDs) através de reações de ciclização. Essa enzima também realiza reações de acoplamento, que é reversa à ciclização, em que as ciclodextrinas são clivadas e transferidas a um receptor linear (dextrinas lineares). Nas reações de desproporcionamento os maltooligossacarídeos são clivados e transferidos também a um substrato receptor (Figura 7) (MORIWAKI et al., 2009; CHEIRSILP et al., 2010; OLIVEIRA, 2010).

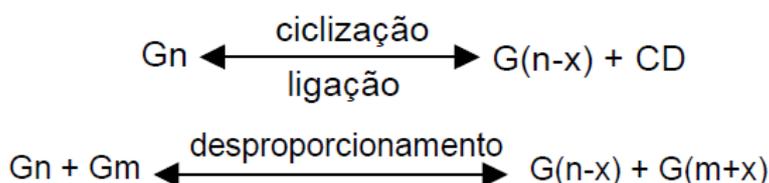


Figura 7: Reações catalisadas por CGTase bacteriana, onde: Gn, Gm são cadeias de α - 1,4-D-glicopiranosil com n e m unidades de D-glicopiranosil. X é a parte da cadeia de α - 1,4-D-glicopiranosil. Fonte: Fogarty e Kelly (1990) Apud Aguiar (2001)

Dentre os principais fatores responsáveis pela produção da enzima destacam-se a fonte a ser empregada no processo e os parâmetros reacionais como a composição do tampão, a temperatura e o pH da reação (LEEMHUIS et al., 2010).

Produção de CGTase

Vários tipos de fermentações tem sido estudadas para produção de CGTase empregando diferentes micro-organismos e substratos com a finalidade de se obter processos viáveis industrialmente, com menor custo e tempo e maior produção da enzima. Vários pesquisadores tem utilizado os processos de fermentação submersa (CHEIRSILP et al., 2010; YAP et al., 2010; IBRAHIM et al., 2012; BUENO et al., 2013; SANTOS et al., 2013; SIVAKUMAR e SHAKILABANU, 2013;). Entretanto, são relatados poucos estudos com a produção de CGTase em estado sólido (PRADO et al., 2002; PINTO, 2007).

Dentre os micro-organismos mais promissores para produção de CGTase estão as espécies de bactérias do gênero *Bacillus*, que vem sendo estudadas e empregadas por diversos pesquisadores a fim de obter uma melhor produção desta enzima. Dentre elas estão *Bacillus holodurans* (MORE et al., 2012), *Bacillus licheniformis* (BONILHA et al., 2006; SILVAKUMAR e SHAKILABANU, 2011), *Bacillus lehensis* (YAP et al., 2010), *Bacillus firmus* (MATIOLI et al., 2000; HIGUTI et al., 2003; HIGUTI et al., 2004; MORIWAKI et al., 2009), *Bacillus circulans* (KNEGTEL et al., 1995; PINTO, 2007; SZERMAN et al., 2007; GÁSTON et al., 2009), *Bacillus alcalophilic* CGII (FREITAS et al., 2004), *Bacillus agaradhaerens* KSU-A11 (IBRAHIM et al., 2011), *Bacillus macorou* (WANG et al., 2006), *Bacillus macerans* ATCC 8244 (ARYA e SRIVASTAVA, 2006), *Bacillus pseudocaliphilus* 20RF (ATASANOVA et al., 2011), *Bacillus clarkii* 7364 (TAKADA et al., 2003; NAKAGAWA et al., 2008), *Bacillus stearothermophilus* HR1 (RAHMAN et al., 2004) e *Bacillus subtilis* (LEEMHUIS et al., 2003).

Embora o uso de diferentes espécies de *Bacillus* seja mais comum para a produção de CGTase, outros micro-organismos também já foram descritos como *Stenotrophomonas maltophila*, *Klebsiella pneumoniae* AS-22, *Paenibacillus pabuli* US132, *Thermoanaerobacter kivui*, *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 (KNEGTEL et al., 1996; GAWANDE e PATKAR, 2001; LEEMHUIS et al., 2003; JEMLI et al., 2007; AVCI e DONMEZ 2009; HERMES, 2010).

Esses micro-organismos tem sido isolados de diferentes ambientes para verificar o seu potencial na produção de CGTase. Dentre estes habitats, são citados diferentes tipos de solos de cultivos agrícolas como canaviais, plantações de milho, batata, mandioca, soja, trigo, sorgo, aveia, feijão, cana-de-açúcar, abóbora, de produtos hortifrutícolas, solo rizosférico de *Colocacia esculenta*, solo aderido a casca de mandioca, entre outros. Há relatos também de bactérias produtoras da enzima isoladas de águas residuais da indústria de farinha de mandioca (PRADO et al., 2002; HIGUTTI et al., 2003; FREITAS et al., 2004; COSTA et al., 2007; MENOCCI, et al., 2008; MORA et al., 2012; MORE et al., 2012; COELHO, 2013).

Existe uma grande diversidade de substratos empregados em pesquisas dirigidas para produção da CGTase que apresentam amido em sua constituição, baixo custo e que sejam de fácil acesso. Inúmeras fontes de carbono, bem como a combinação entre elas, também são empregadas na produção desta enzima (Tabela 2). Como fonte de nitrogênio pesquisadores vem utilizando principalmente o extrato de levedura, a peptona, triptona e polipeptona (MATIOLI et al., 2000; COSTA et al., 2007; BLANCO et al., 2009; MORE et al., 2012).

Tabela 2: Substratos empregados na produção da enzima CGTase em processos fermentativos.

Fonte de carbono	Referências
Amido solúvel, amido de mandioca, amido de sagu, amido de milho, amido de batata	(HIGUTI et al., 2004; COSTA et al., 2007; MENOCCI et al., 2008; BLANCO et al., 2009; YAP et al., 2010; MORE et al., 2012)
Maltodextrina	(MATIOLI et al., 2000)
Resíduo fibroso de soja	(PINTO, 2007)
Frutose, lactose, galactose, xilose, sacarose, sorbitol, manitol, maltose, glicose	(FREITAS et al., 2004)
Polvilho doce	(CUCOLO et al., 2006)
Farelo de trigo	
Farelo de trigo + amido solúvel	
Farelo de trigo + farinha de arroz	
Farelo de trigo + batata	(PRADO et al., 2002)
Farelo de trigo + fubá	
Farelo de trigo + mandioca	
Farelo de trigo + farinha de soja	
Farelo de trigo + farinha de trigo	

Resíduos da indústria de farinha e de milho

A casca de mandioca e a manipueira, bem como a milhocina, são resíduos gerados a partir da indústria de processamento da mandioca e do

milho, respectivamente (CORREIA e DEL BIANCHI, 2008; FARIA et al., 2011; ANTUNES et al., 2013).

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta pertencente à família Euphorbiaceae, sendo o Brasil um dos maiores produtores e consumidores dessa cultura devido ao seu alto teor energético, desempenhando um importante papel na dieta alimentar dos brasileiros (CHISTÉ, 2006).

A raiz de mandioca é uma das fontes mais baratas de amido. Esse tubérculo apresenta alto teor de amido (30%), além de ser constituído por 68,2% de umidade, 1,3% de proteínas, 0,2% de lipídios e 0,3% de fibras. Sua composição química varia de acordo com a cultivar, as condições de cultivo e o estágio de desenvolvimento (ALBRQUEQUE et al., 1993; EL-DASH e GERMANI, 1994).

O processamento da raiz de mandioca ocorre logo após a colheita ou no prazo máximo de 36 horas. Primeiramente ela é lavada e descascada e, posteriormente, triturada e prensada (Figura 8). A água resultante da prensagem da massa ralada é chamada de manipueira (que em tupi-guarani significa “o que brota da mandioca”) e, por ser um resíduo líquido, necessita receber um tratamento adequado para a sua estabilização (CHISTÉ, 2006).

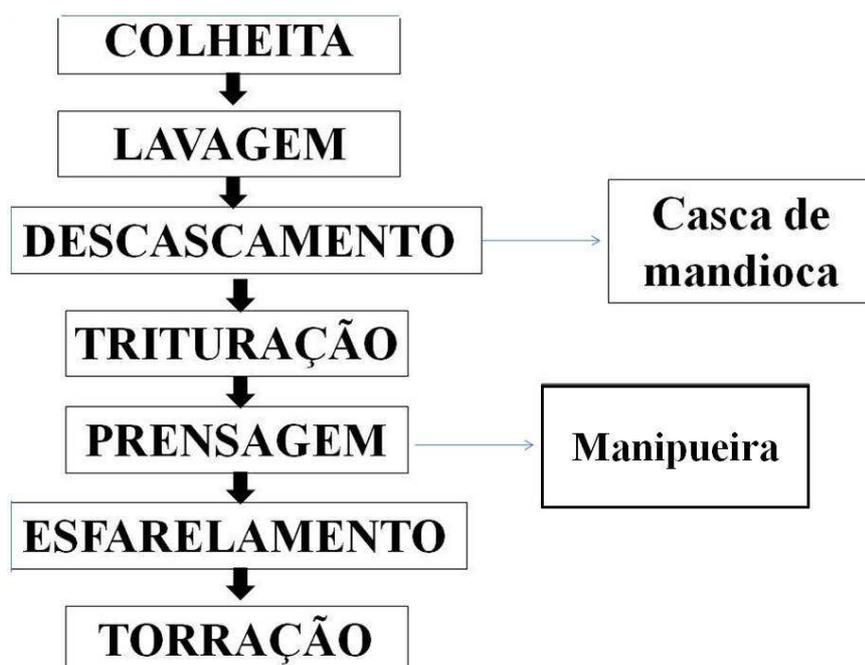


Figura 8: Fluxograma das etapas de processamento de farinha de mandioca.
Fonte: Adaptado de Chisté (2006).

A manipueira é considerada um agente poluidor dezenas de vezes superior em comparação ao esgoto doméstico. O potencial poluente deste resíduo é devido à sua carga orgânica que pode chegar a 100g DQO, sendo a maior consequência da grande quantidade de açúcares solúveis presentes neste líquido (BARANA, 2008).

Esse resíduo é jogado diretamente nos corpos d'água do próprio ambiente circundante de produção formando enormes volumes deste líquido, provocando condições de insalubridade na população local e, conseqüentemente, afetando diretamente a saúde dos moradores e a economia desta atividade. O grande potencial poluente da manipueira também é decorrente de sua toxidez devido à presença de um glicosídeo presente em todas as partes da planta da mandioca conhecido como linamarina. Esta molécula é potencialmente hidrolisável em glicose, acetona e ácido cianídrico que, por sua vez, pode afetar as células nervosas. A linamarina também consegue se combinar com a hemoglobina do sangue e desta forma inibe a cadeia respiratória (CAMPOS et al., 2006; SANTOS, 2009).

A manipueira jogada em corpos d'água pode alterar sua capacidade de autodepuração e causar a eutrofização decorrente do crescimento exacerbado de algas, devido à grande quantidade de nitrogênio e fósforo presentes na composição deste resíduo. O tratamento por processos físicos é inviável já que a manipueira apresenta em sua constituição açúcares solúveis de fácil fermentação que se degradam a ácidos orgânicos (MARQUES, 2009; SANTOS, 2009).

Além da indústria de farinha de mandioca outros setores industriais geram resíduos, como a indústria do milho. O milho (*Zea mays* L.) é uma planta que pertence à família Gramineae/ Poaceae e sua cultura encontra-se amplamente disseminada no Brasil. Isto se deve tanto à sua multiplicidade de usos na propriedade rural quanto à tradição de cultivo desse cereal pelos agricultores brasileiros (MAGALHÃES et al., 2002).

Grande parte do grão de milho é composta, basicamente, de amido (61%), glúten (7%) e água (27%). A milhocina é um subproduto gerado a partir da maceração do milho e contém grande quantidade de nitrogênio e, por isso, frequentemente é utilizado como fonte de nitrogênio em processos fermentativos. Esse resíduo apresenta uma variável composição que está

diretamente relacionada à condição e qualidade do grão de milho e seu processamento. Um dos grandes problemas de tratamento para as indústrias é a elevada quantidade de matéria orgânica presente na milhocina (ZANOTTO, 2011).

O uso da casca de mandioca, da manipueira e da milhocina podem ser destacados como uma excelente alternativa na produção de CGTase devido ao teor nutricional que estes apresentam. Vale ressaltar que os resíduos da indústria de farinha, por conter amido em sua constituição, facilitam a síntese da enzima pelo micro-organismo empregado no processo. Por fim, além de contribuir na diminuição do custo da enzima, o uso desses resíduos reduzem os impactos ambientais produzidos pelo seu descarte inapropriado.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A enorme variedade de aplicações industriais das ciclodextrinas aumenta o interesse dos pesquisadores pela busca de processos alternativos de síntese da CGTase. A fermentação submersa e em estado sólido auxiliam na atividade ciclizante dessa enzima, podendo levar a um incremento nessa produção através de estudos de otimização, reduzindo o tempo do processo de obtenção dessa enzima.

Os impactos ambientais gerados pelo descarte inapropriado dos resíduos da indústria de farinha de mandioca e do processamento de milho abre novas perspectivas para o uso desses resíduos na produção de CGTase, já que esses substratos apresentam muitas características consideradas essenciais para o processo de produção desta enzima tais como fácil acessibilidade, abundância e baixo custo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-NABY, M. A.; REYAD, R. M.; ABDEL-FATTAH, A. F. Biosynthesis of cyclodextrin glucosyltransferase by immobilized *Bacillus amyloliquefaciens* in batch and continuous cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 5, p. 1-9, 2000.

ADREAUS, J.; DALMOLIN, M. C.; OLIVEIRA JUNIOR, I. B.; BARCELLOS, I. O. Aplicação de ciclodextrinas em processos têxteis. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 929-937, 2010.

AGUIAR, A. L. Ciclodextrina glicosiltransferase, produção, ação e aplicação. **Boletim do Centro Pesquisa Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 119-138, 2001.

ALBUQUERQUE, T. T. O.; MIRANDA, L. C. G.; SALIM, J.; TELES, F. F. F.; QUIRINO, J. G. Composição centesimal da raiz de 10 variedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivadas em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Mandioca**, v.12, n.1, p.7-12, jan.1993.

ANTUNES, A. A.; ARAÚJO, H. W. C.; DA SILVA, C. A. A.; ALBURQUEQUE, C. D.C; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção de biossurfactante por *Chromobacterium violaceum* ATCC12472 utilizando milhocina e óleo de milho pós-fritura como nutrientes. **Agroecology**, v. 80, n. 3, p. 334-341, 2013.

ARYA, S. K; SRIVASTAVA, S. K. Kinetics of immobilized cyclodextrin gluconotransferase produced by *Bacillus macerans* ATCC 8244. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 507-510, 2006.

ASTRAY, G.; MEJUTO, J. C.; MORALES, J. RIAL-OTERO, R.; SIMAL-GÁNDARA, J. Factors controlling flavors binding constants to cyclodextrins and their applications in foods. **Food Research International**, v. 43, p. 1212-1218, 2010.

ATASANOVA, N.; KITAYSKA, T.; BOJADJIEVA, I.; YANKOV, D.; TONKOVA, A. A novel cyclodextrin glucanotransferase from alkaliphilic *Bacillus*

pseudocaliphilus 20RF: purification and properties. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 116-122, 2011.

AVCI, A.; DONMEZ, S. A novel thermophilic anaerobic bacteria producing cyclodextrin glycosyltransferase. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 36-42, 2009.

BARANA, A C. Despoluição da manipueira e uso em fertilização do solo. **I Simpósio Nacional sobre a Manipueira**. Vitória da Conquista-Bahia, 2008. (Palestra durante o I Simpósio Nacional sobre a Manipueira).

BLANCO, K. C.; DE LIMA, C. J. B.; DE OLIVEIRA, P. A. P. L. V.; PIÃO, A. C. S. CONTIERO, J. Cyclodextrin glycosyltransferase production by *Bacillus* sp. subgroup alcalophilus using a central composite design. **Research Journal of Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 450-459, 2009.

BONILHA, P. R. M.; MENOCCI, V.; GOULART, A. J.; POLIZELI, M. L. T. M.; MONTI, R. Cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus lincheniformis*: optimization of production and its properties. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 317-323, 2006.

BUENO, M. R., VARIZE, T. L., OLIVO, E. J., ZANIN, G. M. Obtenção de ciclomaltodextrina-glicanotransferase em processo fermentativo por *Bacillus firmus* cepa 37 para produção de ciclodextrinas. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v. 5, p.97-103, 2013.

CAMPOS, A. T.; DAGA, J.; RODRIGUES, E. E.; FRANZENER, G.; SUGUIY, M. M. T.; SYPPERRECK, V. L. G. Tratamento das águas residuárias de fecularia por meio de lagoas de estabilização. **Engenharia Agrícola**, v. 26, n. 1, p. 235-242, 2006.

CARNEIRO, A. A. J.; ALVES-PRADO, H. F.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Escurecimento enzimático em alimentos: Ciclodextrinas como agente antiescurecimento. **Revista de Alimentos e Nutrição**., v. 17, n. 3, p. 345-352, 2006.

CASTRO, A.M.; PEREIRA JR., N. P. Produção, propriedades e aplicações de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHEIRSILP, B; KITCHA, S; MANEERAT, S. Kinetic characteristics of β -cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from newly isolated *Bacillus* sp. C26. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.1, n.4, p. 1-8, 2010.

CHISTÉ, R. C. **Estudo do processo de fabricação da farinha de mandioca / por Renan Campos Chisté e Kelly de Oliveira Cohen**. – Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2006.

COELHO, S. L. A. **Produção microbiana de ciclodextrina glicosiltransferase utilizando amido de araruta e farinha de mandioca como substratos**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2013.

CORREIA, G. T.; DEL BIANCHI, V. L.; Tratamento biológico de água residuária da produção de farinha de mandioca utilizando reator anaeróbico compartimentado vertical (RACOV). **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 29, n. 2, p. 159-166, 2008.

COSTA, G. L.; PAZETTO, R.; BROL, F.; MATIOLI, G. Metodologia de seleção de cepas para produção da ciclodextrina glicosiltransferase e para purificação da enzima. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 29, n. 1, p. 45-50, 2007.

CUCOLO, G. R.; ALVES-PRADO, H. F.; GOMES, E.; SILVA, R. Otimização da produção de CGTase de *Bacillus* sp. subgrupo *alcalophilus* E16 em polvilho doce em fermentação submersa. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 3, p. 201-208, 2006.

DEL VALLE, E. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1033-1046, 2004.

EL-DASH, A.; GERMANI, R. **Tecnologia de farinhas mistas: uso de farinhas mistas de trigo e mandioca na produção de pães**. Brasília, DF: Embrapa.SPI, 1994, v.1.

FARIA, P. B.; SILVA, J. N.; RODRIGUES, A. Q.; TEIXEIRA, P. D.; MELO, L. Q.; COSTA, S. F.; ROCHA, M. F. M.; PEREIRA, A. A. Processamento da casca de mandioca na alimentação de ovinos: desempenho, características de carcaça, morfologia ruminal e eficiência econômica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 12, p.2929-2937, 2011.

FREITAS, T. L.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Production of CGTase by a *Bacillus alkalophilic* CGII strain isolated from wastewater of a manioc flour industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 255-260, 2004.

GÁSTON, J. A. R.; SZERMAN, N.; COSTA, H.; KRYMKIEWICZ, N.; FERRAROTTI, S. A. Cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R: activity and kinetic studies. **Enzyme and Microbial Biotechnology**, v. 45, p. 36-41, 2009.

GAWANDE, B. N.; PATKAR, A. Y. Purification and properties of a novel raw starch degrading-cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumonia* AS- 22. **Enzyme and Microbial Biotechnology**, v. 28, p. 735-743, 2001.

HERMES, V. S. **Purificação e caracterização de ciclodextrina glicosiltransferase produzida por *Stenotrophomonas maltophilia***. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010.

HIGUTI, I. H.; GRANDE, S. W.; SACCO, R.; NASCIMENTO, A. J. Isolation os alkalophilic CGTase-producing bactéria and characterization of cyclodextrin-glycosyltransferase. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 2, p. 183-186, 2003.

HIGUTI, I. H.; SILVA, P. A.; NASCIMENTO, A. J. Studies on alkalophilic CGTase-producing bacteria and effect of starch on cyclodextrin-glycosyltransferase activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 1, p. 135-138, 2004.

IBRAHIM, A. S. S.; AL-SALAMAH, A. A.; EL-TAYEB, M. A.; EL-BADAWI, Y. B.; ANTRANIKIAN, G. A novel cyclodextrin glycosyltransferase from alkalophilic

Amphibacillus sp. NPST-10: Purification and properties. **International Journal of Molecular Sciences**, v.1, p.10505-10522, 2012.

IBRAHIM, A. S. S.; EL-TAYEB, M. A.; ELBADAWI, Y. B.; AL-SALAMAH, A. A. Effects of substrates and reaction conditions on production of ciclodextrins using ciclodextrin glucoamyltransferase from a newly isolated *Bacillus agaradhaerens* KSU-A11. **Electronic Journal of Biotechnology**, 2011.

JEMLI, S.; MESSAOUD, E. B.; AYAD-ZOUARI, D.; NAILI, B.; KHEMAKHEM, B.; BEJAR, S. A β -cyclodextrin glycosyltransferase from a newly isolated *Paenibacillus pabuli* US132 strain: purification, properties and potential use in bread-making. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 44-50, 2007.

KNEGTEL, R. M. A.; STROKOPYTOV, B.; PENNINGA, D.; FABER, O. G.; ROZEBOOM, H. J.; KALK, K. H.; DIJKHUIZEN, L.; DIJKSTRA, B. Crystallographic studies of the interaction of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 with natural substrates and products. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 49, p. 29256-29264, 1995.

KNEGTEL, R. M.; WIND, R. D.; ROZEBOOM, H. J.; KALK, K. H.; BUITELAAR, R. M.; DIJKHUIZEN, L.; DIJKSTRA, B.W. Crystal structure at 2.3 Å resolution and revised nucleotide sequence of the thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermonaerobacterium thermosulfurigenes* EM1, **Journal of Molecular Biology**, v. 256, n. 3, p. 611-622, 1996.

LEEMHUIS, H.; DIJKSTRA, B. W.; DIJKHUIZEN, L. *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* cyclodextrin glycosyltransferase mechanism and kinetics of inhibition by acarbose and cyclodextrins. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 155-162, 2003.

LEEMHUIS, H.; KELLY, R. M.; DIJKHUIZEN, L. Engineering of ciclodextrin glucoamyltransferases and the impact for biotechnological applications. **Applied Microbiol Biotechnology**, n. 85, p. 823-835, 2010. volume

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. Fisiologia do milho. **Circular Técnica 22**, p. 1-22, 2002.

MARQUES, M. C. **Atributos do solo, qualidade do lixiviado e crescimento de plantas de milho sob aplicação de água residuária da mandioca.** Dissertação de Mestrado (Mestrado em Agronomia: Ciência do solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil, 2009.

MATIOLI, G.; MORIWAKI, C.; MAZZONI, R. B.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Estudos de parâmetros que influenciam na produção da enzima CGTase de *Bacillus firmus*, cepa nº 37. **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 2, p. 311-316, 2000.

MENOCCI, V.; GOULART, A. J.; ADALBERTO, P. R. TAVANO, O. L.; MARQUES, D. P.; CONTIERO, J.; MONTI, R. Cyclodextrin glycosyltransferase production by new *Bacillus* sp. strains isolated from brazilian soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 682-688, 2008.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. *Revista Processos Químicos*, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MORA, M. M. M.; SÁNCHEZ, K. H.; SANTANA, R. V.; ROJAS, A. P.; RAMÍREZ, H. L.; TORRES-LABANDEIRA, J. J. Partial purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from alkalophilic *Bacillus* species. **Springer Plus**, v. 1, n. 61, p. 2-6, 2012.

MORE, S. S.; NIRAJA, R.; EVELYN, C.; BYADGI, A. M.; SHWETHA, V.; DAS MANGARAJ, S. Isolation, purification and biochemical characterization of CGTase from *Bacillus holodurans*. **Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition**, v. 7, n. 1-2, p. 90-97, 2012.

MORIWAKI, C; MAZZER, C; PAZETTO, R; MATIOLI, G. Produção, purificação e aumento da performance de ciclodextrina. Glicosiltransferase para produção de ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2360-2366, 2009.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas poderosas ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

NAKAGAWA, Y.; SABURI, W.; TAKADA, M.; HATADA, Y.; HORIKOSHI, K. Gene cloning and enzymatic characteristics of a novel gamma-cyclodextrin-

specific cyclodextrinase from alkalophilic *Bacillus clarkii* 7364. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, p. 2004-2011, 2008.

OLIVEIRA, D. S. **Aplicação de xilanase/ ou ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) na produção de pães**. Tese de doutorado. Programa de pós-graduação em engenharia e ciência de alimentos – Universidade Júlio de Mesquita Filho. 2010.

PALUMBO, D.; IANNACCONE, M.; PORTA, A.; CAPPARELLI, R. Experimental antibacterial therapy with puriindolines, lactoferrin and lysozyme in *Listeria monocytogenes*-infected mice. *Microbes and infection*, v. 12, p. 538-545, 2010.

PINTO, F. S. T. **Produção de ciclodextrina glicosiltransferase pela bactéria alcalófila *Bacillus circulans* ATCC 2183: cultivo em batelada, batelada alimentada e estado semi-sólido**. Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.

PRADO, H. F.A.; HILÁRIO, E.; DASILVA, R. Seleção de microrganismos produtores de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produção e caracterização da enzima. **Brazilian Journal Food and Technology**, n. 5, p. 189-196, 2002.

QI, Q.; ZIMMERMANN, W. Cyclodextrin glucanotransferase: from gene to applications. **Applied Microbiol Biotechnology**, n. 66, p. 475-485, 2005.

RAHMAN, R. A.; ILLIAS, R. M.; NAWAWI, M. G. M.; ISMAIL, A. F.; HASSAN, O.; KAMARUDDIN, K. Optimisation of growth medium for the production of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* HR1 using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2053-2060, 2004.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F.; **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**, 2th, Campinas: São Paulo, 2009.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 1, 2001.

- SANTOS, A.; Uso e impactos ambientais causados pelo uso da manipueira na microrregião sudoeste Bahia-Brasil. **Problemas sociales y regionales en América latina. Estudio de casos**, p.11-25, 2009.
- SANTOS, J. B. C., ZANIN, G. M., OLIVO, J. E. Influence of culture medium pH on the production of CGTase by *Bacillus firmus* strain No. 37. **Acta Scientiarum Technology**, v. 35, p. 413-416, 2013.
- SILVAKUMAR, N.; SHAKILABANU, S. Standardization of optimum conditions for cyclodextrin glycosyltransferase production. **Anais International Conference on Food Engineering and Biotechnology**, v. 9, 2011.
- SINGH, R.; BHARTI, N.; MADAN, J.; HIREMATH, S. N.; Characterization of cyclodextrin inclusion complexes – A review. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 2, n. 3, p. 171-183, 2010.
- SIVAKUMAR, N.; SHAKILABANU, S. Production of ciclodextrin glycosyl transferase by *Bacillus megaterium*. **International Journal Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, p.44-55, 2013.
- SZERMAN, N.; SCHROH, I.; ROSSI, A. L.; ROSSO, A. M.; KRYMKIEWICZ, N.; FERRAROTTI, S. A. Cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2886-2891, 2007.
- TAKADA, M.; NAKAGAWA, Y.; YAMAMOTO, M. Biochemical and genetic analyses of a novel γ -cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus clarkii* 7364. **Journal Biochemistry**, v. 133, p. 317-324, 2003.
- VENTURINE, C. G., NICOLINI, J., MACHADO, C., Machado, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, p. 360-368, 2008.
- WANG, F.; DU, G.; LI, Y.; CHEN, J. Regulation of CCR in the γ -CGTase production from *Bacillus macorous* by the specific cell growth rate control. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1279-1285, 2006.

YAP, P.; ARIFF, A. B. WOO, K.; HII, S. Production of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) by *Bacillus lehensis* S8 using sago starch as carbon source. **Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 7, p. 676-681, 2010.

ZANOTO, C. **Caracterização de resíduo da indústria de beneficiamento do milho**. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2011.

CAPITULO 1

Otimização da produção de ciclodextrina glicosiltransferase por *Bacillus* sp. SM-02 utilizando casca de mandioca triturada, manipueira e milhocina como substratos em fermentação submersa

Artigo formatado nas normas e a ser submetido à Revista Química Nova

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE POR *Bacillus* sp. SM-02 UTILIZANDO CASCA DE MANDIOCA TRITURADA, MANIPUEIRA E MILHOCINA COMO SUBSTRATOS EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) é uma enzima amilolítica sintetizada, principalmente, por bactérias do gênero *Bacillus*. Por meio de uma reação de ciclização, a CGTase converte amido em ciclodextrinas, que são moléculas cilíndricas capazes de formar complexos de inclusão com uma grande variedade de substâncias. O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de CGTase usando casca de mandioca, manipueira e milhocina como substratos em fermentação submersa pelo *Bacillus* sp. SM-02. Empregando Delineamento Composto Central Rotacional foi possível otimizar a produção, sendo obtida uma produção média de 352,53 U/mL de CGTase na condição de 1,5 g de casca de mandioca e 0,6 g de milhocina. A temperatura ótima e o pH ótimo da enzima foram 55 °C e 8,0, respectivamente. Foi observado uma atividade da CGTase acima de 50% por um período de 120 minutos na temperatura ótima. A atividade da enzima foi positivamente influenciada pelo íon CaCl_2 . Os substratos empregados mostraram-se promissores na produção de CGTase em fermentação submersa.

Palavras-chave: enzimas microbianas, resíduos agroindustriais, fermentação, metodologia de superfície de resposta.

INTRODUÇÃO

O interesse pela ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19), também conhecida como ciclomaltodextrina-glucano-transferase, surgiu devido à sua capacidade em converter a molécula de amido em ciclodextrinas (CDs) por meio de uma reação de transglicosilação intramolecular (ciclização). Essa enzima é sintetizada extracelularmente por vários micro-organismos (*Klebsiella* sp., *Thermoanaerobacterium* sp.), mas bactérias do gênero *Bacillus* são as mais estudadas na produção de CGTase, destacando-se dentre elas *B. firmus*, *B. marcerans*, *B. circulans*, *B. lentus*, *B. megaterium*, entre outras espécies.^{14, 29, 47}

As ciclodextrinas são caracterizadas como oligossacarídeos cíclicos contendo de 6 (α -CD), 7 (β -CD) e 8 (γ -CD) unidades de glicopiranosose unidas por meio de ligações glicosídicas do tipo α -1,4. As CDs apresentam um formato semelhante a um anel cilíndrico cônico truncado, com exterior mais hidrofílico e interior relativamente hidrofóbico, capaz de formar complexos de inclusão com uma enorme variedade de moléculas.^{4,51}

A formação de complexos de inclusão resultante da união entre o anel das CDs com a molécula hóspede (orgânicas e inorgânicas) em meio líquido ou, eventualmente, sólido, pode alterar as propriedades físico-químicas destas substâncias aumentando ou diminuindo sua solubilidade, estabilidade, coloração e odores.^{2,4,32} As ciclodextrinas vêm sendo aplicadas como estabilizadoras de aromas e na eliminação de sabores e compostos indesejados na indústria alimentícia, para reduzir a toxicidade de alguns fármacos na indústria farmacêutica, como auxiliadoras no processo de lavagem e tingimento pela indústria têxtil, e também são empregadas em processos de remoção de poluentes do solo pela indústria química ambiental, entre outros usos⁴.

Na tentativa de reduzir os custos de produção da CGTase tem-se utilizado como alternativa o emprego de substratos residuais que possam ser encontrados em abundância, baixo custo e que apresentem elevado conteúdo nutricional. Tais características são importantes para o processo de produção da CGTase, pois tanto a enzima como as CDs apresentam preços elevados. Produtos e subprodutos derivados da mandioca já foram reportados como substratos para produção de CGTase. Prado et al.⁴² estudaram a produção de CGTase por quatro linhagens de *Bacillus* sp. subgrupo *alcalophilus* em fermentação semi-sólida utilizando amido de mandioca. Essa fonte de

carbono também foi citada na produção da enzima por *B. lichniformes*¹², por *Bacillus* sp BACN e BACRP³³ e por *B. megaterium*⁵⁰, bem como *Paenibacillus campinasensis* H69-3.⁴⁴ O farelo de mandioca, subproduto sólido gerado durante o processamento desse tubérculo, foi usado na produção de CGTase por *Bacillus* sp. subgrupo *alcalophilus* E16.¹⁸ Uma atividade enzimática de 98,86 U/mL de CGTase foi obtida utilizando fécula de mandioca como fonte de carbono por *Bacillus* sp. subgrupo *alcalophilus*⁹, mostrando que os derivados da mandioca são bons substratos para a produção de CGTase por esse gênero de bactéria. Desta forma, resíduos oriundos da indústria de farinha, como a casca de mandioca e a manipueira, e resíduos provenientes da indústria de milho, como a milhocina, são substratos considerados com bom potencial para produção de CGTase já que eles apresentam todas essas vantagens, gerando assim processos economicamente viáveis. Além disso, tanto a manipueira como a casca de mandioca apresentam em sua composição o amido, que é a matéria prima na produção da enzima.^{31, 45, 52}

A manipueira é considerada um agente poluidor dezenas de vezes superior em comparação ao esgoto doméstico devido à grande quantidade de açúcares solúveis presentes em sua composição, além de ser potencialmente tóxica, pois apresenta a linamarina em sua constituição. O descarte inadequado da manipueira em rios provoca condições de insalubridade na população local e, conseqüentemente, afeta diretamente a saúde dos moradores e a economia da produção de farinha de mandioca (MARQUES, 2009; SANTOS, 2009). Desta forma, além de contribuir na diminuição do custo de produção da enzima, o uso da manipueira na produção de CGTase pode ajudar a reduzir os impactos ambientais produzidos pelo descarte inapropriado desse resíduo.

Nesse contexto, a presente pesquisa teve por objetivo estudar a produção de CGTase utilizando manipueira e casca de mandioca triturada, como fontes de carbono, e milhocina como fonte de nitrogênio na produção da enzima em fermentação submersa utilizando *Bacillus* sp. SM-02, isolado de manipueira.

PARTE EXPERIMENTAL

Micro-organismo e substratos

Nos ensaios fermentativos foi utilizada a bactéria *Bacillus* sp. SM-02, isolada da manipueira de casa de farinha localizada no município de Cruz das Almas-BA.¹⁵ O isolado foi preservado em glicerol a 20% em freezer a -10°C. A casca de mandioca e a manipueira foram provenientes do mesmo local. As cascas de mandioca foram lavadas em água corrente para retirada do excesso de terra de cultivo e, posteriormente, secas em estufa com circulação de ar a 70°C por um período de 72 horas. Após secagem, as cascas foram trituradas em liquidificador convencional e peneiradas duas vezes até ser obtido um pó fino com aspecto de farinha.

Ensaio fermentativos

O pré-inóculo e o inóculo foram compostos pelo meio basal de Nakamura e Horikoshi³⁹ contendo (g/L): amido solúvel (10), extrato de levedura (5), peptona (5), MgSO₄.7H₂O (0,2), KH₂PO₄ (1,0) e Na₂CO₃ (10). No inóculo, o amido foi substituído pela casca de mandioca e as fontes de nitrogênio (extrato de levedura e peptona) pela milhocina (Sigma), diluídos em manipueira. Após 48 horas de incubação em B.O.D a 35 °C, uma alçada com a cultura do *Bacillus* sp. SM-02 foi transferido para 10 mL de meio de pré-inóculo e mantido a 35 °C e 150 rpm em câmara agitadora. Após 24 horas de crescimento, o pré-inóculo foi transferido para um frasco de Erlenmeyer contendo 50 mL do inóculo. O inóculo foi mantido em câmara agitadora a 35 °C por 24 horas para crescimento das células e, em seguida, foi distribuído 1 mL, com uma D.O.₆₀₀ fixada em 0,1, em 11 frascos de Erlenmeyer de 250mL contendo 25mL de meio fermentativo com composição igual a do inóculo, de acordo com a matriz do Delineamento Composto Central Rotacional 2² (Tabela 1). A rotação foi fixada em 150 rpm e a temperatura em 35 °C. Após 72 horas de fermentação, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm, a 4 °C, durante 30 minutos. O sobrenadante livre de células foi utilizado na determinação das atividades enzimáticas e o precipitado para determinação de biomassa.

Tabela 1. Delineamento composto central rotacional 2^2 para produção da enzima CGTase por *Bacillus sp SM-02* usando casca de mandioca triturada e milhocina como variáveis em fermentação submersa.

Variáveis independentes	Níveis				
Substratos	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Casca de mandioca triturada (g)	0,8	1,0	1,5	2,0	2,2
Milhocina (g)	0,2	0,32	0,6	0,88	1,0

Otimização usando Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

A otimização das concentrações de casca de mandioca triturada e milhocina foi realizada empregando a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) de acordo com Rodrigues e Iema⁴³. A atividade de CGTase (U.mL^{-1}) foi considerada como variável dependente (resposta) e as concentrações dos substratos como variáveis independentes. Uma matriz de planejamento fatorial 2^2 foi construída por meio de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), resultando em 11 ensaios. Dois níveis foram escolhidos, um superior (+1) e um inferior (-1), além do ponto central (0), sendo o único que foi realizado com três repetições para determinação do rigor da metodologia, e dois pontos axiais (+1,41 e -1,41) (Tabelas 1 e 2).

Este modelo é representado por uma regressão polinomial de segunda ordem, Eq.(1):

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 \quad (1)$$

onde: y é a resposta predita da atividade de CGTase; X_1 e X_2 são as formas codificadas (casca de mandioca triturada e milhocina, respectivamente); b_0 refere-se ao ponto de interseção; b_1 e b_2 são coeficientes lineares; b_{12} coeficiente de interação dupla; b_{11} e b_{22} são coeficientes quadráticos. Os valores dos níveis estudados foram calculados através da Eq. (2):

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2}} \quad (2)$$

onde: X_n é o valor codificado; X é o valor real da variável independente; X_0 o valor real do ponto central; X_{+1} é o valor do nível superior; X_{-1} é o valor do nível inferior.

Os resultados apresentados pelo modelo experimental aplicado foram avaliados através do *Software* Statistica Release versão 7.1, Stat Soft. Inc., USA.

Ensaio enzimático

A atividade da enzima foi determinada pelo método colorimétrico do complexo ciclodextrina-fenolftaleína (CD-PHE)²². A mistura reacional contendo 5,0 mL de solução enzimática bruta e 5,0 mL de solução de amido solúvel a 1% foi incubada em reator termostaticado a 55 °C, pH 8,0. Alíquotas de 0,5 mL da solução reacional foram retiradas nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 minutos e inativadas em água a 100 °C, durante 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de solução alcoólica de fenolftaleína 3 mM, diluída em tampão Na₂CO₃ 600 mM, pH 10,5. A leitura espectrofotométrica foi realizada em 550 nm. A produção de CGTase foi observada pela diminuição da intensidade da cor rosa do reagente devido à formação de complexos de inclusão das CDs com a fenolftaleína (Figura 1).

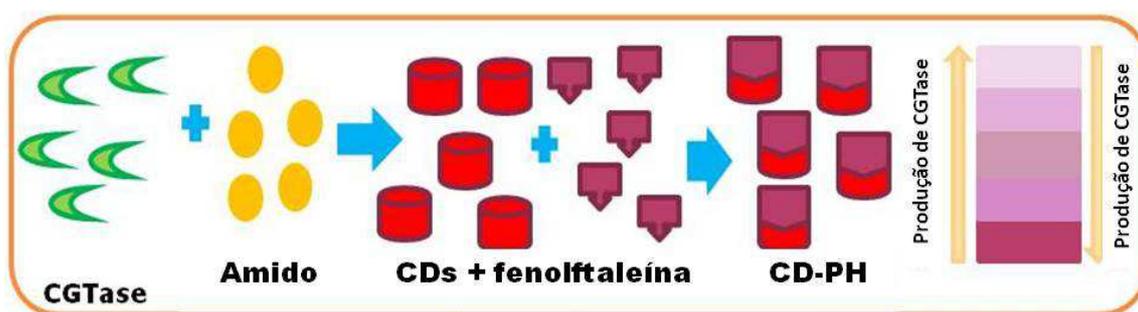


Figura 1. Reação ilustrativa de formação do complexo de inclusão CD-PH durante os ensaios enzimáticos. A produção da enzima é mensurada de acordo com a intensidade de cor do reagente. Fonte: o autor

Curva de produção enzimática

Foram realizadas fermentações na condição otimizada (1,5 g de casca de mandioca triturada + 0,6 g de milhocina) em meio de sais diluídos em manipueira por um período de 120 horas. A cada 24 horas foram determinadas a atividade enzimática (Hamon e Moraes, 1990), biomassa, proteínas totais e os açúcares redutores totais presentes nesse meio de cultivo. A biomassa foi quantificada por leitura da densidade ótica em espectrofotômetro a 600 nm através da comparação com a curva padrão de massa seca x densidade ótica. As proteínas totais presentes no sobrenadante foram

determinadas pelo método colorimétrico de Bradford¹³ e os açúcares redutores totais pelo método do DNS segundo Miller³⁴.

Caracterização parcial do extrato enzimático bruto

A temperatura ótima de atividade da CGTase foi determinada incubando-se o extrato bruto contendo a enzima nas temperatura de: 45 °C a 70 °C em pH 8,0. A estabilidade térmica da enzima foi avaliada incubando-se o extrato enzimático bruto nas temperaturas de 50 °C, 55 °C e 60 °C em banho termostático durante 5 horas. Nos tempos de 5, 15, 30 minutos e a cada hora, a reação foi interrompida incubando-se a enzima em banho de gelo por 5 minutos e, em seguida, determinando-se a atividade enzimática. A determinação do pH ótimo foi realizada utilizando-se diferentes tampões a 50 mM: glicina-HCl pH 2,0-3,0; citrato de sódio pH 3,0-6,0; fosfato pH 6,0-8,0; tris-HCl pH 8,0-9,0; glicina-NaOH pH 9,0-10,0. A influência de íons metálicos foi avaliada por meio das seguintes soluções preparadas a 50 mM: CaCl₂, FeCl₂, NaCl, ZnSO₄, EDTA, KCl, MnCl₂, CuSO₄, BaCl₂, HgCl₂ e MgCl₂. Para o controle a atividade enzimática foi realizada utilizando o sobrenadante sem adição de sais na mistura reacional.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização da produção de CGTase por fermentação submersa por meio do delineamento composto central rotacional (DCCR)

A Tabela 2 apresenta a matriz do DCCR 2² com os resultados da produção de CGTase e de biomassa obtidas utilizando-se casca de mandioca e milhocina como substratos, diluídas em manipueira, após 72 horas de fermentação, bem como os valores preditos pelo modelo.

Tabela 2. Matriz do delineamento composto central rotacional 2² e valores das variáveis independentes (X₁: casca de mandioca triturada e X₂: milhocina) e as respostas (atividade enzimática e biomassa) por *Bacillus sp. SM-02* em fermentação submersa.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais (g)		Atividade enzimática (U/ml)		Biomassa (g/L)	
	X ₁	X ₂	Casca de mandioca	Milhocina	Valores observados	Valores preditos	Valores observados	Valores preditos

1	-1	-1	1,0	0,32	288,6	247,84	5,28	5,08
2	+1	-1	2,0	0,32	136,67	202,47	6,17	7,58
3	-1	+1	1,0	0,88	73,36	43,35	12,85	11,86
4	+1	+1	2,0	0,88	122,54	199,10	5,63	6,25
5	-1,41	0	0,8	0,6	15,45	72,90	8,51	9,43
6	+1,41	0	2,2	0,6	244,2	150,94	8,59	7,23
7	0	-1,41	1,5	0,2	318,25	307,95	5,9	5,12
8	0	+1,41	1,5	1	186,48	160,97	8,64	8,98
9	0	0	1,5	0,6	340,99	352,53	7,24	6,96
10	0	0	1,5	0,6	356,97	352,53	6,97	6,96
11	0	0	1,5	0,6	359,64	352,53	6,67	6,96

As condições experimentais onde foram encontrados os maiores valores de atividade enzimática foram as do ponto central (9, 10 e 11), com uma produção média de 352,53 U/mL, utilizando 1,5 g de casca de mandioca triturada e 0,6 g de milhocina. Uma produção semelhante foi observada nas condições do ensaio 7 (1,5 g de fonte de carbono e 0,2 g de milhocina), obtendo-se 318,25 U/mL de atividade enzimática. Concentrações das fontes de carbono e nitrogênio abaixo e acima das encontradas no ponto central levaram à diminuição da produção da enzima (Tabela 2).

De acordo com os resultados dos coeficientes de regressão (Tabela 3), apenas a casca de mandioca, em seu termo quadrático, foi estatisticamente significativo no nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Esses resultados mostram que a única variável que influenciou na produção da CGTase foi a fonte de carbono. Os valores de F_{calc} de 15,82 e do R^2 de 82,71% indicam que os resultados foram altamente significativos e a correlação entre os valores preditos e observados foi muito boa (Tabela 4). Desta forma, pode-se afirmar que resultados se ajustam bem ao modelo, e os valores dos coeficientes de regressão podem ser utilizados para gerar a equação do modelo (Equação 3):

$$\text{Atividade enzimática} = 352,53 + 27,59 X_1 - 120,31 X_1^2 - 51,97 X_2 - 59,04 X_2^2 + 50,28 X_1 X_2$$

(Eq. 3)

Tabela 3 - Análise de regressão da produção de CGTase por *Bacillus sp. SM-02* em fermentação submersa utilizando manipueira, casca de mandioca triturada e milhocina como substratos.

Fatores	Coefficientes de regressão	Erro padrão	t(5)	p – valor
Média	352,533	41,40023	8,51525	0,000367
Casca de mandioca (L)	27,594	25,35236	1,08842	0,326070
Casca de mandioca (Q)	-120,305	30,17534	-3,98686	0,010459
Milhocina (L)	-51,965	25,35236	-2,04972	0,095678
Milhocina (Q)	-59,035	30,17534	-1,95639	0,107785
Casca de mandioca x Milhocina	50,278	35,85365	1,40230	0,219758

L=Linear; Q=Quadrático; R²=0,8271

Tabela 4. Análise de variância (ANOVA) para a produção de CGTase por *Bacillus sp. SM-02* em fermentação submersa utilizando manipueira, casca de mandioca triturada e milhocina como substratos.

Fatores	GL	SQ	QM	Fc
Regressão	3	174414,0	58138,0	15,82 ^a
Resíduo	7	25709,4	3672,8	
Total	10	148704,6		

^a Significativo ao nível de 5% de probabilidade; R²: 0,8271

Com os resultados apresentados na Tabela 2 foi possível construir um gráfico de superfície de resposta (Figura 2) por meio do qual foi possível confirmar que, dentro da faixa estudada para as variáveis, a região do ponto central foi a que apresentou as maiores produções de CGTase. A metodologia de superfície de resposta é muito útil para a modelação e análise de problemas nos quais a resposta é influenciada por múltiplas variáveis, no qual o grande objetivo é a otimização da resposta.⁴³ Além disso, este tipo de gráfico permite visualizar uma ampla faixa de concentração dos substratos onde a produção da enzima permanece elevada. Isso é muito importante quando se utiliza resíduos ou subprodutos agroindustriais como substratos para o processo fermentativo, que apresentam bastante variação em sua composição.

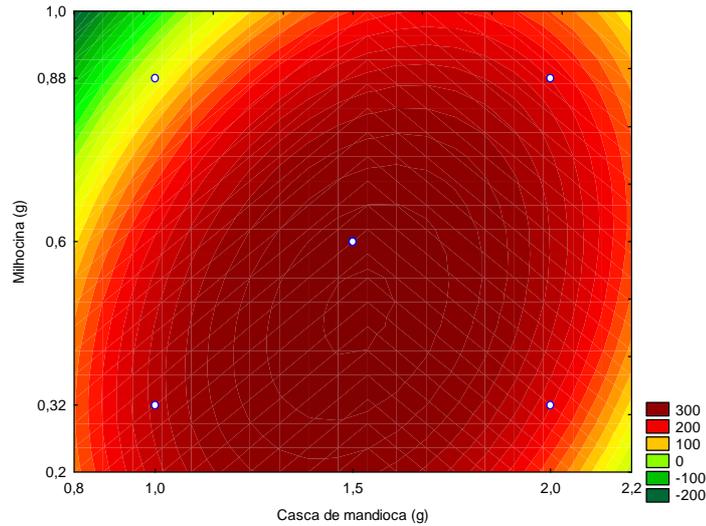


Figura 2. Curvas de contorno da produção de CGTase por *Bacillus sp. SM-02* em fermentação submersa utilizando manipueira, casca de mandioca triturada e milhocina como substratos.

O substrato mais frequentemente utilizado na produção de CGTase é o amido solúvel industrial, no qual valores elevados de atividade foram obtidos por espécies do gênero *Bacillus sp.* Uma produção de 245,0 U/mL foi alcançada por *Bacillus circulans*.⁹ Essa mesma fonte de carbono também foi usada na produção da enzima por *Bacillus sp.* TS1-1 obtendo uma atividade de 73,4 U/mL.³⁰

Entretanto, os resíduos do processamento da mandioca, como as cascas e manipueira, ainda não tinham sido utilizados para produção de CGTase, embora haja relatos de sua utilização na produção de outras enzimas, como amilase,¹⁷ protease e lipase.⁶ A fécula e o farelo de mandioca⁷ e a manipueira foram citados na produção de CDs e no isolamento de micro-organismos produtores de CGTase¹⁵.

Substratos de origem agroindustrial são bastante citados na literatura por serem mais nutritivos em comparação aos substratos convencionais, como o amido solúvel industrial. O amido de tapioca foi utilizado na produção de CGTase por *Bacillus G1* alcançando uma atividade enzimática de 62,6 U/ml.²⁷ Em um cultivo em batelada, a atividade máxima de CGTase obtida foi de 1.155 U.mL⁻¹ usando resíduo fibroso de soja como substrato por *B. circulans*.⁴⁰ A farinha de mandioca foi utilizada para otimização da enzima por *Bacillus sp. SM-02* alcançando uma produção máxima de 1.087,99 U.mL⁻¹ em fermentação submersa.¹⁵ Isso indica que substratos de origem agrícola são bastante eficientes na produção da enzima. Possivelmente, isso ocorre devido à

composição química mais completa em macro e micronutrientes que os substratos de origem agroindustrial apresentam, suplementando o meio de fermentação e consequentemente elevando a produção de CGTase.

A síntese da enzima também pode ser influenciada pelo micro-organismo empregado no processo fermentativo. Embora as bactérias do gênero *Bacillus* sejam as mais citadas na produção de CGTase, outros micro-organismos são relatados na produção dessa enzima. Espécies do gênero *Paenibacillus* sp. mostraram uma tendência de produção enzimática menor quando comparada às produções por *Bacillus* sp. Jemili²⁸ encontrou uma atividade de 0,9 U/mL por *P. pabuli* US123 empregando amido como substrato, enquanto que uma produção de 0,8 U/mL foi sintetizada por *Paenibacillus* sp. F37 utilizando a dextrina como precursor da enzima.⁴¹

Curva de produção enzimática

A produção de CGTase acompanhou a fase de crescimento exponencial de *Bacillus* sp. SM-02 até 72 horas de fermentação e, após esse intervalo, houve uma tendência de queda na produção enzimática, coincidindo com a fase de declínio da curva de crescimento microbiano. Observou-se, concomitantemente, o consumo quase completo dos açúcares proporcionado pela atividade metabólica do micro-organismo (Figura 3). A queda no crescimento celular e, consequentemente, na atividade enzimática após 72 horas parece estar relacionado com a baixa concentração dos açúcares no meio de cultivo. Isso sugere que, para manter a produção da enzima elevada, é necessário manter elevada, também, a concentração dos açúcares no meio de cultivo, o que pode ser obtido com a utilização de processos fermentativos do tipo batelada alimentada, que alimentam constantemente o sistema com os substratos.

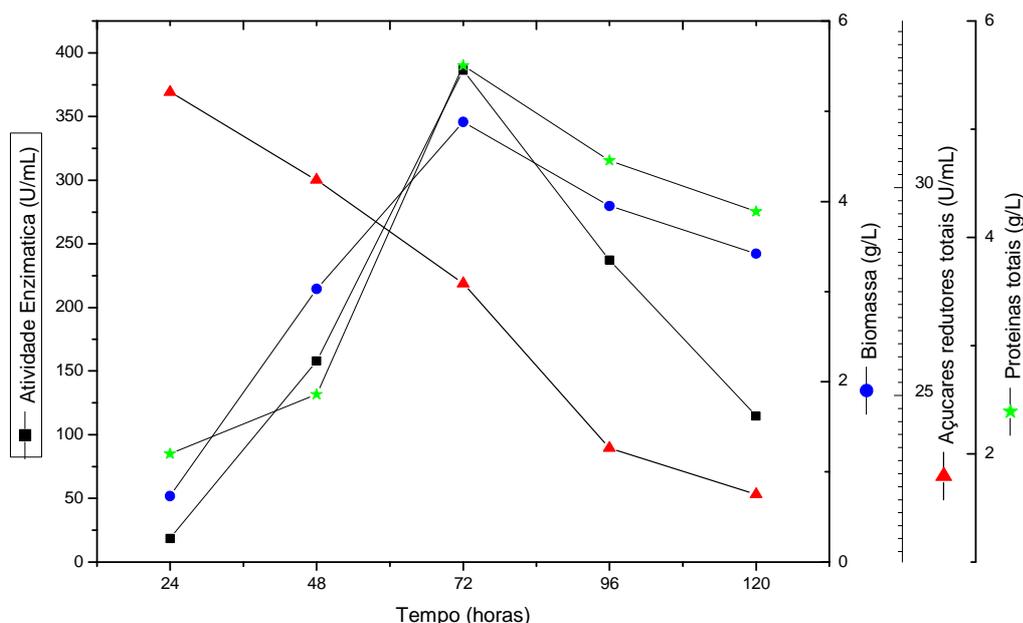


Figura 3. Curva de produção da CGTase por *Bacillus sp.* SM-02 em fermentação submersa utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos em meio de sais diluído com manipueira.

O mesmo comportamento cinético foi observado em um estudo de produção de CGTase por outras espécies de *Bacillus* como *Bacillus sp.* H25 e *Bacillus sp.* subgrupo *alcalophilus* (E16, H27 e H54), em que a síntese da enzima acompanhou a fase de crescimento exponencial que ocorreu nas primeiras 24 horas de fermentação. Após esse período sua produção diminuiu e se estabilizou por volta de 48 horas, coincidindo com a fase estacionária do crescimento microbiano.⁴²

Um estudo realizado em reator batelada com pulsos de amido em 48 e 96 horas de cultivo empregando *B. firmus* 37 demonstrou efeitos positivos sobre o crescimento celular e sobre a atividade enzimática durante esses pulsos, bem como um rápido consumo dos açúcares redutores no início da fermentação¹⁴ evidenciando, dessa forma, que a produção da enzima está diretamente relacionada com o crescimento celular.

Caracterização parcial da enzima

A caracterização físico-química foi realizada utilizando o extrato enzimático bruto obtido nas condições otimizadas de fermentação. A enzima apresentou atividade reduzida em pHs ácidos, de 2 a 6. Nos pHs 7,0 e 8,0 a CGTase apresentou atividade acima de 80 %, com pH ótimo em 8,0. A partir do pH 9,0 a atividade enzimática caiu, mas manteve atividade acima de 50% até pH 10 (Figura 4).

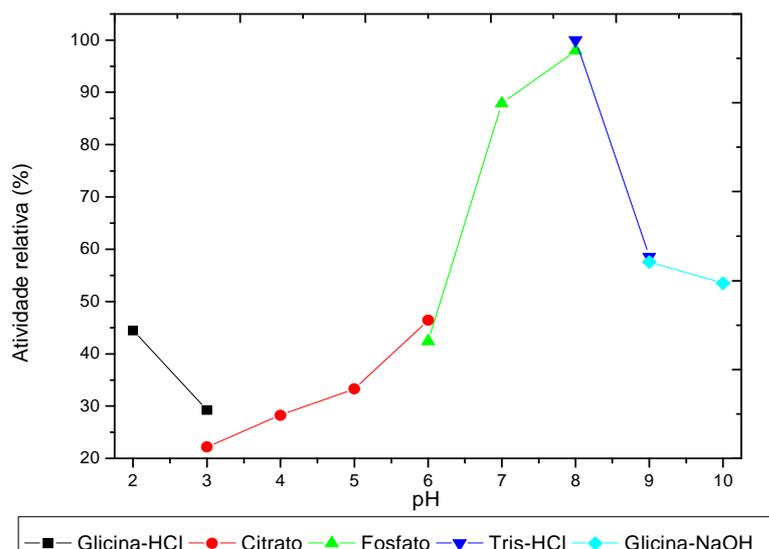


Figura 4. pH ótimo da CGTase produzida por *Bacillus sp. SM-02* utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos em meio de saís diluído em manipueira em fermentação submersa.

CGTases produzidas por diferentes espécies de *Bacillus*, de um modo geral, apresentam pHs ótimos na faixa neutra e alcalina, com poucas exceções em pHs ácidos. A máxima atividade em pH 8,0 também foi observada em estudos de uma nova CGTase sintetizada por uma espécie alcalófila de *Amphibacillus*²⁵, como também pela espécie *B. firmus* cepa n° 37⁴⁶, por *B. Levensis*¹¹ e por *B. alcalophilic* CGII.¹⁹ A CGTase produzida por *Bacillus sp.* subgrupo *alcalophilus* E16 apresentou o pico de atividade em pH 7,0.¹⁸ Atividade enzimática ótima na faixa ácida foi observada por *Bacillus sp.* (pH 5,0)³⁵ e por *B. firmus* (pH 6,0).³⁷

A CGTase produzida por bactérias de outros gêneros apresentam pH ótimo variando do ácido ao alcalino, dependendo da espécie. Um estudo realizado usando *Klebsiela pneumoniae* AS22, a CGTase foi mais ativa em uma faixa de pH de 5,5 a 9,0 com máxima atividade em pH 7-7,5.²⁰ Uma bactéria anaeróbica termofílica pertencente ao gênero *Thermoanoerobacter sp.* P4 mostrou atividade ótima em pH 7,0.⁵

A temperatura ótima da CGTase produzida por *Bacillus sp. SM-02* foi de 55 °C, mas manteve uma atividade em cerca de 50% nas temperaturas de 50 °C, 60 °C e 65 °C, sendo quase completamente inativada a 70 °C (Figura 5a). Em relação à estabilidade térmica, a CGTase de *Bacillus sp. SM-02* manteve sua atividade acima de 50% por um período de 120 minutos em sua temperatura ótima de atuação. Em 70 °C foi observada uma rápida perda da atividade da enzima após 15 minutos de incubação (Figura 5b).

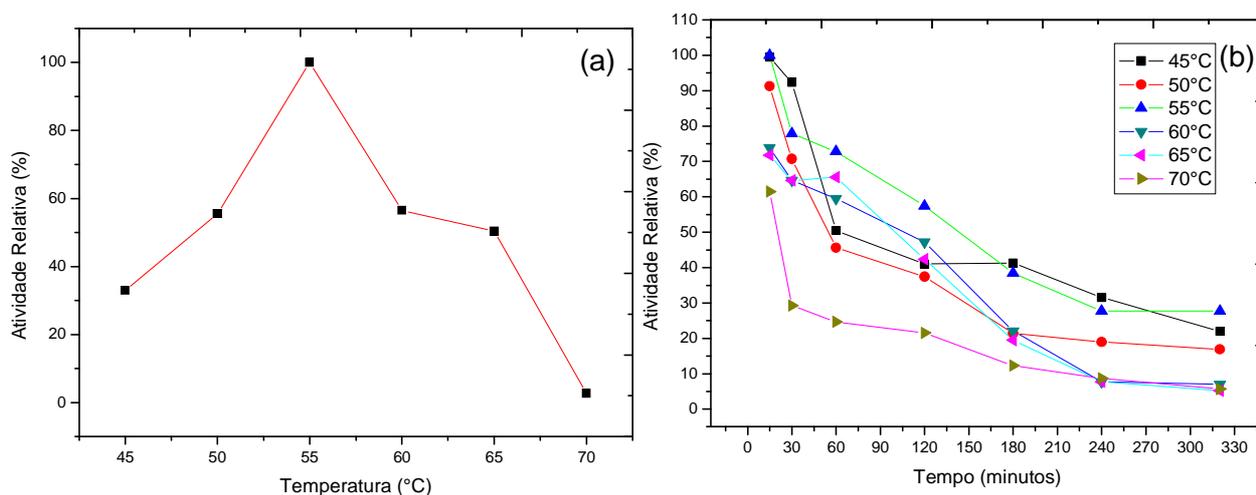


Figura 5. (a) Temperatura ótima e (b) termoestabilidade da CGTase produzida por *Bacillus* sp. SM-02 utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos em meio de sais diluído com manípueira em fermentação submersa.

A temperatura de 55 °C é a mais apontada pelos pesquisadores como sendo a temperatura ótima de produção da CGTase por espécies de *Bacillus*.^{18, 19, 26, 35} No entanto, temperaturas mais elevadas já foram citadas na literatura por várias espécies de *Bacillus*, como 60 °C para *B. holodurans*³⁶ e 70 °C para *Bacillus* MK6.¹ Alguns trabalhos citam dois picos de temperatura ótima para CGTase. A determinação da temperatura ótima da enzima produzida por *B. licheniformes* mostrou atividades mais elevadas a 25 °C e a 55 °C que, segundo os autores, pode estar relacionado com a produção de mais de uma isoforma da CGTase por este microrganismo.¹²

A temperatura ótima da CGTase varia para espécies de bactérias não *Bacillus* como *Stenotrophomonas maltophilia*, que apresentou pico de produção a 60 °C²³, enquanto que a CGTase produzida por *Amphibacillus* sp. NPST-10 e *Thermoanaerobacter* sp P4 exibiram máxima atividade a 50 °C e de 80 °C a 90 °C, respectivamente.^{25,5} O mesmo ocorre com a termoestabilidade da enzima, que varia de acordo com o micro-organismo produtor da enzima. A estabilidade térmica da enzima por *Bacillus* MK6 variou de 30 °C-80 °C pelo período de 1 hora de incubação.¹ A enzima sintetizada por *Amphibacillus* sp. foi estável de 30 °C a 55 °C por uma hora de incubação.²⁵ Segundo Gawande²¹, as propriedades catalíticas da CGTase são fortemente afetadas pela composição do meio de fermentação. Isso explica a enorme variação nos pHs e temperaturas ótimos, bem como na termoestabilidade enzimática relatados na literatura.

Na avaliação da influência dos íons, foi observado que a produção enzimática foi positivamente influenciada por CaCl_2 (Tabela 5), que proporcionou um aumento da atividade enzimática em comparação como controle. A enzima também foi fracamente inibida pelos íons MgCl_2 , FeCl_2 , NaCl e CuSO_4 , alcançando atividades quase próximas ao controle. A CGTase foi fortemente inibida pelo EDTA e por BaCl_2 , caindo para valores abaixo de 75% de atividade.

Os íons Mn^{+2} , Mg^{+2} e Ca^{+2} são os íons mais citados na literatura que influenciam de forma positiva na produção da CGTase sintetizada por espécies de *Bacillus*, enquanto que Cu, Co e Hg inibem a atividade enzimática. Alguns íons como Fe e Zn mostram tanto um aumento como uma diminuição na atividade ciclizante da enzima dependendo da espécie de micro-organismo empregado na produção de CGTase.^{3, 19, 36, 49}

Tabela 5. Efeito de íons metálicos e agentes químicos na atividade de CGTase produzida por *Bacillus sp. SM-02* utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substrato em meio de sais diluído com manipueira em fermentação submersa.

Íons metálicos	Atividade residual (%)
Controle	255,74
CaCl_2	351,64
EDTA	66,6
MgCl_2	213,12
FeCl_3	213,12
NaCl	220,22
ZnSO_4	149,18
KCl	163,39
MnCl_2	113,66
CuSO_4	241,53
BaCl_2	60,38
HgCl_2	156,28

Informações sobre os íons que afetam a atividade de CGTase são importantes para a escolha dos substratos utilizados no processo fermentativo que, dependendo da composição, podem influenciar de forma positiva ou negativa na síntese da enzima. O

cálcio, ferro, manganês e magnésio são íons que estão presentes na composição dos produtos e subprodutos da mandioca^{31, 45} e isso pode explicar a elevada produção enzimática obtida por *Bacillus* sp. SM-02 nestes substratos.

CONCLUSÕES

A casca de mandioca triturada, a manipueira e a milhocina podem ser considerados substratos promissores na produção de CGTase por *Bacillus* sp. SM-02 em fermentação submersa.

A enzima produzida apresenta características atrativas para aplicações industriais. Seu pH alcalino proporciona um menor risco de contaminação pela maioria dos micro-organismos competidores. Além disso, a temperatura ótima da CGTase produzida por *Bacillus* sp. SM-02, de 55 °C, bem como sua relativa termoestabilidade, facilitam o uso dessa enzima em processos industriais que utilizam temperaturas elevadas.

O uso da manipueira como substrato alternativo para processos fermentativos pode reduzir os impactos ambientais causados pelo descarte inapropriado desse resíduo no meio ambiente. O emprego da casca de mandioca também pode gerar mais uma alternativa para o uso desse resíduo. É possível diminuir os custos de produção da CGTase, pois as fontes de carbono envolvidas no estudo são caracterizadas como abundantes, de baixo custo e, além disso, possuem elevado teor de nutrientes em sua constituição, propiciando, dessa forma, a geração de processos economicamente viáveis.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Apoio à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo suporte financeiro e a Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela infraestrutura para realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. AI-NOI, S.; ABD-AZIZ, S.; ALITHEEN, N.; HASSAN, O.; KARIM, M.I.A. *Biotechnol.* **2008**, 7, 10 – 18.

2. ANDREAUS, J.; DALMOLIN, M. C.; OLIVEIRA JUNIOR, I. B.; BARCELLOS, I. O. *Quim. Nova*. **2010**, 33, 929-937.
3. ARYA, S. K.; SRIVASTAVA, S. K. *Enzyme Microb. Tech.* **2006**, 39, 507-510.
4. ASTRAY, G.; GONZALEZ-BARREIRO, C.; MEJUTO, J. C.; RIAL-OTERO, R.; SIMAL-GÁNDARA, J.; *Food Hydrocolloids*. **2009**, 23, 1631-1640.
5. AVCI, A; DONMEZ, S. *Afr. J. Biotechnol.* **2012**, 11, 10407-10415.
6. BARROS, F. F. C.; SIMIQUELI, A. P. R.; ANDRADE, C. J.; PASTORE, G. M. *Biotechnol. Res. Int.* **2013**, 2013, 1-9.
7. BERTOLINI, A. C.; CEREDA, M. P.; CHUZEL, G. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **1998**, 18, 1-12.
8. BERTOLINI, A. C.; CEREDA, M. P.; CHUZEL, G. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **1998**, 18, 224-229.
9. BLANCO, K. C. *Dissertação de mestrado – Universidade Estadual Paulista*, **2009**.
10. BLANCO, K. C.; DE LIMA, C. J. B.; DE OLIVEIRA, P. A. P. L. V.; PIÃO, A. C. S. CONTIERO, J.; *Research J. Microbiol.* **2009**, 4, 450-459.
11. BLANCO, K. C.; DE MORAES, F. F.; BERNADI, N. S.; VETTORI, M. H. P. B.; MONTI, R.; CONTIERO, J. *Czech J. food Sci.* **2014**, 32, 48-53.
12. BONILHA, P. R. M.; MENOCCI, V.; GOULART, A. J.; POLIZELI, M. L. T. M.; MONTI, R. *Braz. J. Microbiol.* **2006**, 37, 317-323.
13. BRADFORD, M. M. *Anal. Biochem.* **1972**, 72, 248-254.
14. BUENO, M. R.; VARIZE, T. L.; OLIVO, E. J.; ZANIN, G. M. *Rev. Eng. Tecnol.* **2013**, 5, 97-103.
15. COELHO, S. L. A. *Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia*, **2013**.
16. COSTA, G. L.; PAZZETTO, R.; BROL, F.; MATIOLI, G. *Acta Sci. Health Sci.* **2007**, 29, 45-50.
17. CRUZ, E. A.; MELO, M. C.; SANTANA, B. N.; FRANCO, M.; SANTANA, R. S. M.; SANTOS, L. S.; GONÇALVES, Z. S.. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas a da Saúde*. **2011**, 13: 245-249.
18. CUCOLO, G. R.; ALVES-PRADO, H. F.; GOMES, E.; SILVA, R. *Braz. J. Food Technol.* **2006**, 9, 201-208.
19. FREITAS, T. L.; MONTI, R.; CONTIERO, J. *Braz. J. Microbiol.* **2004**, 35, 255-260.

20. GAWANDE, B. N.; PATKAR, A. Y. *Enzyme Microbial Technol.* **2001**, 28, 735-743.
21. GAWANDE, B.N.. SONAWANE, A.; JOGDAND, V.; PATKAR, A. Y. *Biotechnol. Progress.* **2003**, 19, 1697- 1702.
22. HAMON, V.; MORAES, F.F. *Research Report*, **1990**.
23. HERMES, V. S. *Dissertação de Mestrado* – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **2010**.
24. HIGUTI, I. H.; GRANDE, S. W.; SACCO, R.; NASCIMENTO, A. J. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2003**, 46, 183-186.
25. IBRAHIM, A. S. S.; AL-SALAMAH, A. A.; EL-TAYEB, M. A.; EL-BADAWI, Y. B.; ANTRANIKIAN, G. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, 13, 10505-10522.
26. IBRAHIM, A. S. S.; EL-TAYEB, M. A.; ELBADAWI, Y. B.; AL-SALAMAH, A. A. *Electronic J. Biotechnol.* **2011**, 14, 1-12.
27. IBRAHIM, H. M.; YUSOFF, W. M. W.; HAMID, A. A.; OMAR, O. *Biotechnol.* **2010**, 4, 506-512.
28. JEMLI, S.; MESSAOUD, E. B.; AYAD-ZOUARI, D.; NAILI, B.; KHEMAKHEM, B.; BEJAR, S. *Biochem. Eng. J.* **2009**, 34, 44-50.
29. LEEMHUIS, H.; KELLY, R. M.; DIJKHUIZEN, L. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, 85, 823-835.
30. MAHAT, M. K.; ILLIAS, R. M.; RAHMAN, R. A.; RASHID, N. A. A.; MAHMOOD, N. A.N.; HASSAN, O.; AZIZ, S. A.; KAMARUDDIN, K. *Enzyme Microbial Technol.* **2004**, 35, 467-473.
31. MARQUES, M. C.; *Tese de Mestrado* - Universidade Federal Rural de Pernambuco, **2009**.
32. MATIOLI, G.; MORIWAKI, C.; MAZZONI, R. B.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. *Acta Sci.* **2000**, 22, 311-316.
33. MENOCCI, V. *Braz. J. Microbiol.* **2008**, 39, 682-688.
34. MILLER, G.L. *Anal. Chem.* **1959**, 31, 426-428.
35. MORA, M. M. M.; SÁNCHEZ, K. H.; SANTANA, R. V.; ROJAS, A. P.; RAMÍREZ, H. L.; TORRES-LABANDEIRA, J. J. *Springerplus.* **2012**, 1, 2-6.
36. MORE, S. S.; NIRAJA, R.; EVELYN, C.; BYADGI, A. M.; SHWETHA, V.; DAS MANGARAJ, S. *Croatian J. Food Technol. Biotechnol. Nutrit.* **2012**, 7, 90-97.
37. MORIWAKI, C.; COSTA, G.L.; PAZZETTO, R.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; PORTILHO, F.; MATIOLI, G. *Process Biochem.* **2007**, 42, 1384-1390.

38. MORIWAKI, C.; PAZZETTO, R.; MATIOLI, G. *Quím. Nova.* **2009**, 32, 2360-2366.
39. NAKAMURA, N., HORIKOSHI, K. *Agricultural Biological Chem.* **1976**, 40, 935-941.
40. PINTO, F. S. T. *Dissertação de mestrado* – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **2007**.
41. PRADO, C. D. *Dissertação de mestrado* – Universidade Federal de São Carlos, **2014**.
42. PRADO, H. F.A.; HILÁRIO, E.; DASILVA, R. *Braz. J. Food Technol.* **2002**, 5, 189-196.
43. RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F.; *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos*, 2th, Campinas: São Paulo, **2009**.
44. SANCHES, R. D. O. *Dissertação de mestrado* – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, **2014**.
45. SANTOS, A. *Problemas sociales y regionales en América latina. Estudio de casos.* **2009**, 11-25.
46. SANTOS, J. B. C.; ZANIN, G. M.; OLIVO, J. E. *Acta Sci. Technol.* **2013**, 35, 413-416.
47. SCHOFFER, J. N. *Tese de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Brasil, **2013**.
48. SILVAKUMAR, N.; SHAKILABANU, S. Standardization of optimum conditions for cyclodextrin glycosyltransferase production. *Anais International Conference on Food Engineering and Biotechnology.* **2011**, 9, 102-106.
49. SINGH, R.; BHARTI, N.; MADAN, J.; HIREMATH, S.N. *J. Pharma. Sci. Technol.* **2010**, 2, 171-183.
50. SIVAKUMAR, N.; SHAKILABANU, S. *Intern. J. Cur. Microbiol. App. Sci.* **2013**, 2, 44-55.
51. VENTURINE, C. G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V. G. *Quim. Nova.* **2008**, 31, 360-368.
52. ZANOTO, C. *Trabalho de conclusão de curso* – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, **2011**.

CAPITULO 2

Produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) por *Bacillus* sp. SM-02 empregando resíduos da indústria de farinha de mandioca por fermentação em estado sólido

Artigo formatado nas normas e a ser submetido à Revista Scientia Agrícola

RESUMO

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) é uma enzima amilolítica produzida exclusivamente por bactérias, principalmente do gênero *Bacillus*. Essa enzima possui a capacidade de hidrolisar o amido e formar ciclodextrinas (CDs), oligossacarídeos cíclicos de glicose, com capacidade de formar complexos de inclusão com uma grande variedade de moléculas, com ampla aplicação em diversos setores da indústria alimentícia, farmacêutica, ambiental, entre outros. Este trabalho teve como objetivo otimizar, utilizando a metodologia do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), a produção da CGTase em fermentação em estado sólido (FES) utilizando casca de mandioca triturada, manipueira e milhocina como substratos pela bactéria *Bacillus* sp. SM-02. A produção máxima da enzima, de 141,48 U/g foi obtida nos ensaios fermentativos com aproximadamente 50 % de umidade e inóculo com D.O.₆₀₀ de 1,0. A caracterização parcial do extrato enzimático bruto mostrou que a temperatura ótima da CGTase foi de 55 °C e o pH ótimo foi 8,0, bem como termoestabilidade a 45 °C e 50 °C durante 4 horas. Somente os íons CaCl₂, FeCl₂ e MgCl₂ influenciaram positivamente, elevando a atividade enzimática. Os resíduos obtidos da indústria de farinha apresentaram-se como substratos promissores para produção desta enzima por FES.

Palavras-chave: enzimas microbianas, substratos agroindustriais, processos fermentativos.

INTRODUÇÃO

A ciclodextrina glicosiltransferase (1,4- α -D-glucana; CGTase), pertencente a superfamília das α -amilases, é uma enzima microbiana extracelular capaz de converter o amido e a maltodextrina linear em maltooligossacarídeos cíclicos não reduzidos denominados ciclodextrinas (CDs) por meio de reações de transglicosilação intramolecular (ciclização) (Leemhuis et al., 2010).

As ciclodextrinas contêm de 6 a 13 unidades de D-(+) glicose unidas por ligações do tipo α -1,4, formando um anel cilíndrico cônico truncado cuja cavidade é hidrofóbica e exterior hidrofílico. As CDs têm despertado grande interesse da comunidade científica devido à sua habilidade em formar complexos do tipo substrato-receptor usado como ambiente único para reações químicas (Andreas et al., 2010; Venturini et al., 2008).

Dentre os micro-organismos mais promissores para produção de CGTase estão as bactérias do gênero *Bacillus* (Bueno et al., 2013; Cheirsilp et al., 2010; Ibrahim et al., 2012; Santos et al., 2013; Sivakumar et al., 2013; Yap et al., 2010). Pesquisadores vêm estudando o emprego de diferentes substratos para aumentar o rendimento da produção da CGTase com a finalidade de tornar os processos economicamente mais viáveis. Porém, são insipientes os estudos sobre a produção de CGTase em estado sólido, podendo ser citados os trabalhos de Prado et al. (2002) e Pinto (2007) que utilizaram meio composto de farelo de trigo e o resíduo fibroso de soja, respectivamente, como substratos na produção da enzima por espécies de *Bacillus*.

Na tentativa de reduzir os custos de produção da enzima vem se buscando, como alternativa, substratos a base de resíduos ou sub-produtos agro-industriais que possam ser obtidos em abundância, baixo custo e que apresentem elevado conteúdo nutricional. Tais características são importantes para o processo de produção da CGTase, pois tanto

a enzima como as CDs apresentam preços elevados. A manipueira e a casca de mandioca são resíduos provenientes de farinheiras e apresentam bom potencial para produção de CGTase, uma vez que apresentam todas essas vantagens (Marques, 2009; Santos, 2009).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi otimizar a extração da enzima e sua produção por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) empregando resíduos da indústria de farinha de mandioca, por meio de fermentação em estado sólido (FES) utilizando *Bacillus* sp. SM-02.

MATERIAIS E MÉTODOS

Micro-organismo e substratos

Foi utilizada a bactéria *Bacillus* sp. SM-02 isolada da manipueira de uma casa de farinha localizada do município de Cruz das Almas - BA (Coelho, 2013). A bactéria foi preservada em glicerol a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para os ensaios fermentativos foram utilizadas casca de mandioca e manipueira provenientes do mesmo local. A casca de mandioca foi lavada em água corrente para retirada do excesso de resíduos e posteriormente seca em estufa com circulação de ar a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período de 72 horas. Após secagem, a casca de mandioca foi triturada até obtenção de um pó grosso. Além disso, foi utilizado milhocina (Sigma) como fonte de nitrogênio.

Teste preliminar para o melhor tempo de fermentação em estado sólido

Foram realizados experimentos preliminares com o objetivo de verificar o tempo de fermentação que acarretaria em uma maior produção enzimática. Para isto, foram realizadas fermentações em estado sólido durante 120 horas empregando 8 g de casca de mandioca triturada. O substrato sólido foi umedecido com 7 ml de meio de sais Nakamura e Horikoshi (1976) modificado, substituindo o amido pela casca de mandioca

e as fontes de nitrogênio (extrato de levedura e peptona) pela milhocina utilizando um inóculo com densidade ótica (D.O.) de 0,7 de *Bacillus* sp. SM-02. O controle foi realizado substituindo-se a manipueira pela água destilada.

Ensaio de fermentação

Os ensaios de fermentação (extração e produção de CGTase) ocorreram em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 8 g de casca de mandioca triturada umidificada com 7 mL de meio Nakamura e Horikoshi (1976), composto de: 0,2 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,0 g/L de KH_2PO_4 e 10 g/L Na_2CO_3 , 10 g/L de milhocina, diluído em manipueira.

Otimização da extração da enzima CGTase

A otimização da extração enzimática foi realizada empregando a metodologia de superfície de resposta. A atividade de CGTase (U/g) foi considerada como variável dependente e temperatura e rotação (rpm) as variáveis independentes. Uma matriz de planejamento fatorial 2^2 foi construída por meio de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), resultando em 11 ensaios (Tabela 1).

Tabela 1 - Delineamento composto central rotacional 2^2 para extração de CGTase por *Bacillus* sp. SM-02 em fermentação em estado sólido, utilizando casca de mandioca triturada como substrato e meio de sais diluído com manipueira adicionado à matéria sólida.

Variáveis Independentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Rotação (rpm)	18	30	60	90	102
Temperatura (°C)	20	24	35	46	50

Otimização da produção da enzima CGTase

Foi realizado um planejamento experimental utilizando as seguintes variáveis: volume de manipueira (mL) e concentração de inóculo (D.O.) com o objetivo de

otimizar a produção da enzima (Tabela 2). O tempo de fermentação (24 horas) foi definido em testes preliminares. Após 24 horas de cultivo a enzima foi extraída adicionando-se 40 mL de tampão Tris-HCl em câmara agitadora a 35 °C, 60 rpm durante 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado com auxílio de um filtro de papel, centrifugado a 5000 rpm por 20 minutos e o extrato bruto foi utilizado na determinação da atividade enzimática.

Tabela 2 - Delineamento composto central rotacional 2^2 para produção de CGTase por *Bacillus* sp. SM-02 em fermentação em estado sólido, utilizando casca de mandioca triturada como substrato e meio de sais diluído com manipueira adicionado à matéria sólida.

Variáveis Independentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Volume de manipueira (mL)	4,0	5,0	7,0	9,0	10,0
Concentração do inóculo (Densidade Ótica)	0,4	0,5	0,7	0,9	1,0

Otimização usando Delineamento Composto Central Rotacional

Uma matriz do planejamento fatorial 2^2 foi construída por meio de delineamento composto central rotacional (Rodrigues e Iemma, 2009), resultando em 11 ensaios. Assim, dois níveis foram escolhidos, um superior (+1) e um inferior (-1), além de mais um ponto central (0), sendo o único em que foi realizado três repetições para determinação do rigor da metodologia, e dois pontos axiais (+1,41 e -1,41) (Tabelas 1 e 2). Este modelo é representado por uma regressão polinomial de segunda ordem, Eq.(1):

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 \quad (1)$$

onde, y é a resposta predita de atividade de CGTase; X_1 e X_2 são as formas codificadas (variáveis independentes); b_0 refere-se ao ponto de interseção; b_1 e b_2 são coeficientes lineares; b_{12} coeficiente de interação dupla; b_{11} e b_{22} são coeficientes quadráticos. Os valores dos níveis estudados foram calculados através da Eq. (2):

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2}} \quad (2)$$

onde, X_n é o valor codificado; X é o valor real da variável independente; X_0 o valor real do ponto central; X_{+1} é o valor do nível superior; X_{-1} é o valor do nível inferior.

Todos os resultados gerados a partir desse estudo foram avaliados através do *Software Statistica Release versão 7.1*, Stat Soft. Inc., USA.

Ensaio enzimático

A atividade da enzima foi determinada pelo método colorimétrico do complexo ciclodextrina-fenolftaleína (CD-PHE) (Hamon e Moraes, 1990). A mistura reacional contendo 5,0 mL de solução enzimática bruta e 5,0 mL de solução de amido solúvel a 1% foi incubada em reator termostatizado a 55 °C, pH 8,0. Alíquotas de 0,5 mL da solução reacional foram retiradas nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 minutos e inativadas em água a 100 °C, durante 5 minutos. Em seguida, a cada amostra inativada foram adicionados 2,5 mL de solução alcoólica de fenolftaleína 3 mM, diluída em tampão Na₂CO₃ 600 mM, pH 10,5. A leitura foi realizada em espectrofotômetro digital a 550 nm. A produção de CGTase foi observada pela diminuição da intensidade da cor do reagente devido à formação de complexos de inclusão das CDs com a fenolftaleína. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a necessária para produzir 1 μmol de β-ciclodextrina por minuto.

Caracterização enzimática

Foram realizadas variações no ensaio enzimático referente à temperatura (45 °C a 70 °C), pH (3,0 a 9,0) e influência de íons para determinar quais as melhores condições do meio reacional para a atividade da CGTase.

Para a determinação da temperatura ótima de atividade o ensaio enzimático foi realizado em diferentes temperaturas: 45 °C a 70 °C, com intervalo de 5 °C, e pH 8,0.

Para os ensaios de termoestabilidade, o extrato enzimático foi incubado nas temperaturas de 45 °C a 70 °C em banho termoestatizado durante 5 horas. Alíquotas de 5 mL do extrato foram retiradas nos tempos 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos. A atividade enzimática das alíquotas foi determinada a 55 °C, pH 8,0.

Para a determinação do pH ótimo, a atividade enzimática foi determinada em diferentes tampões, 50 mM: pH 2,0 – 3,0: glicina-HCl; pH 3,0 – 6,0: citrato de sódio; pH 6,0 – 8,0: Fosfato; pH 8,0 – 9,0: Tris-HCl; pH 9,0 – 10,0: Glicina-NaOH).

A influência de íons metálicos na atividade de CGTase foi avaliada determinando-se a atividade enzimática por meio das seguintes soluções preparadas a 50 mM: CaCl₂, FeCl₂, NaCl, ZnSO₄, EDTA, KCl, MnCl₂, CuSO₄, BaCl₂, HgCl₂ e MgCl₂.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação de melhor tempo de fermentação em estado sólido

Foram realizados testes preliminares para determinar o melhor tempo de fermentação em estado sólido, realizados com água (controle) e manipueira. A Figura 1 mostra uma curva de produção enzimática apresentando um pico de produção da enzima no tempo de 24 horas quando foi utilizada manipueira e no tempo de 48 horas quando foi utilizada água destilada, atingindo 186,45 U/g e 147,4 U/g de CGTase, respectivamente. Após esse tempo, foi observada uma tendência de queda na atividade da enzima.

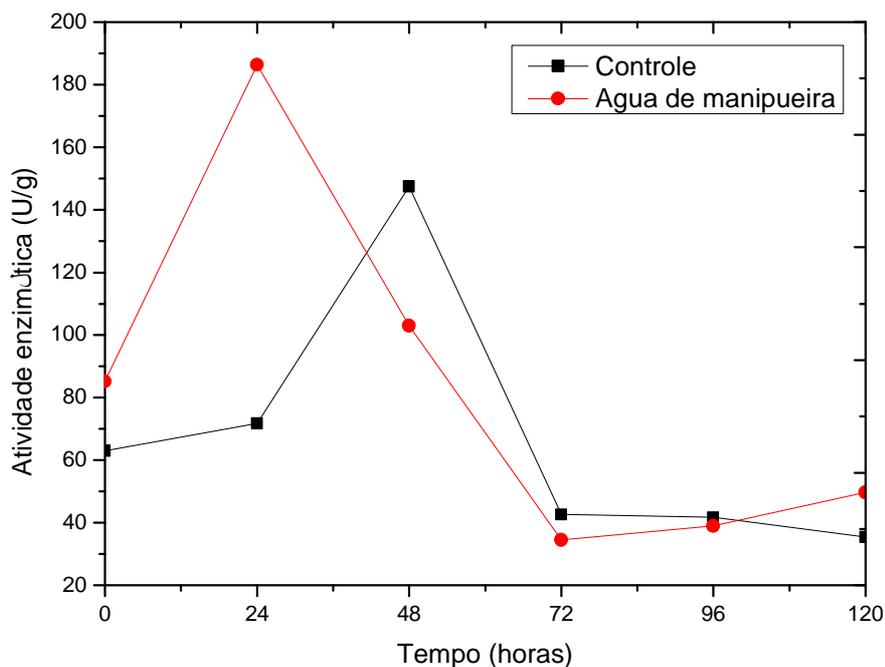


Figura 1 - Estudo comparativo do melhor tempo de fermentação em estado sólido para produção de CGTase por *Bacillus* sp. SM-02 entre manipueira e água destilada (controle) adicionadas à matéria sólida.

Os resultados mostram que a composição do meio de fermentação influenciou no tempo do processo. A manipueira contém nutrientes como nitrogênio, fósforo, cálcio, magnésio, ferro e outros oligoelementos (Marques, 2009). A maior quantidade de micro e macro nutrientes, além do amido na composição, favoreceu tanto no aumento da produção da enzima, que foi maior com manipueira, quanto no tempo, que foi menor (24 horas) em comparação com a produção observada apenas em água destilada (48 horas). A maioria dos estudos envolvendo produção de CGTase apresentam um pico de atividade com 72 horas de fermentação (Prado et al., 2002; Pinto, 2007, Bueno et al., 2013, Santos et al., 2013).

São relatados poucos estudos que verificaram a produção de CGTase em 24 horas (Ai-Noi et al., 2008; Sivakumar et al., 2013). Sivakumar et al. (2013) associaram a alta densidade celular de *B. mergaterium* com a produção de CGTase, pois a densidade celular atingiu um nível máximo significativo no período de 24 horas. Ai-Noi

et al. (2008) usou o amido de sagu como substrato na produção da enzima por *Bacillus* sp. Essa fonte de carbono é derivada da mandioca e também contém elevado teor de amido o que contribuiu para uma maior produção de CGTase em pouco tempo de fermentação.

Dessa forma, os ensaios de fermentação em estado sólido para produção da enzima por *Bacillus* sp. SM-02 foram todos padronizados para o tempo de 24 horas.

Otimização da extração enzimática

Para determinar as melhores condições de extração da enzima do meio sólido, foram realizados testes preliminares utilizando como variáveis independentes a rotação (rpm) e a temperatura, por meio de um DCCR 2². A atividade máxima de CGTase, de 101,2 U/g em média, foi atingida nos ensaios do ponto central (9, 10 e 11), mostrando que a taxa máxima de extração da enzima foi obtida a 35°C e 60 rpm (Tabela 3).

Tabela 3 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional 2² para extração da enzima CGTase obtida em fermentação sólida com casca de mandioca triturada e milhocina.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais		Atividade enzimática (U/g)	
	X ₁	X ₂	Rotação (rpm)	Temperatura (°C)	Valores observados	Valores preditos
1	-1	-1	30	24	22,6	13,3
2	+1	-1	90	24	30,3	35,5
3	-1	+1	30	46	37,7	32,8
4	+1	+1	90	46	42,7	52,3
5	-1,41	0	18	35	31,5	41,7
6	+1,41	0	102	35	40,5	30,1
7	0	-1,41	60	20	20,9	23,9

8	0	+1,41	60	50	40,4	37,2
9	0	0	60	35	101,2	81,6
10	0	0	60	35	101,2	111
11	0	0	60	35	101,2	111

O gráfico de superfície de resposta gerado pelo modelo (Figura 2) mostra, entretanto, que a extração da enzima se mantém otimizada na faixa de temperatura de 30 °C a 40 °C e na faixa de agitação de 55 rpm até 65 rpm.

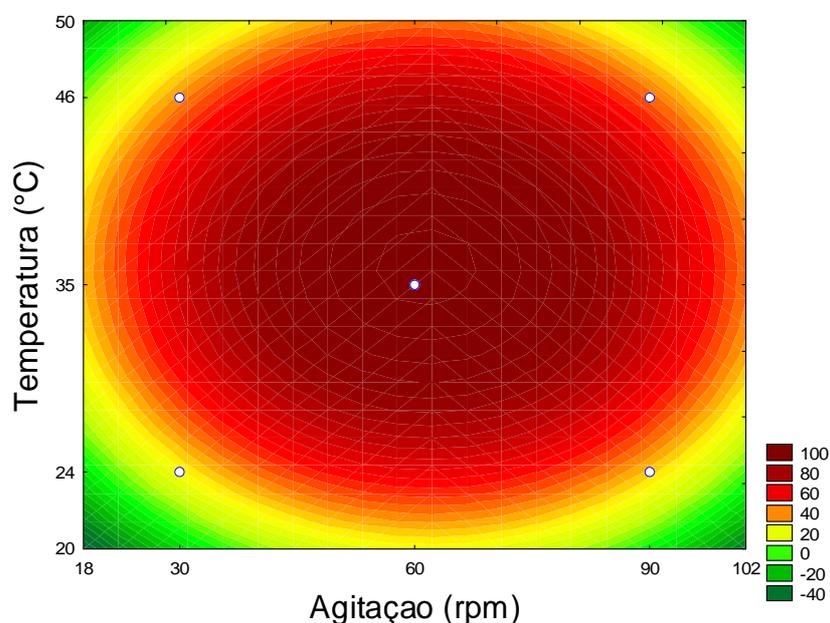


Figura 2 - Gráfico de curvas de contorno da extração enzimática em fermentação sólida por *Bacillus* sp. SM-02 utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos.

Apenas os termos lineares das variáveis temperatura e agitação foram significativos ($p < 0,05$). Os valores de F_{calc} de 23,76 e do R^2 de 91,06% mostram que os resultados foram altamente significativos e a correlação entre os valores preditos e observados foi muito boa (Tabelas 6 e 7). Desta forma, pode-se afirmar que resultados se ajustam bem ao modelo, e os valores dos coeficientes de regressão podem ser utilizados para gerar a equação do modelo (Equação 1):

$$Y = 121,46 + 3,80 X_1 - 39,10 X_1^2 + 8,28 X_2 - 42,30 X_2^2 - 0,81 X_1 X_2$$

Tabela 4 - Coeficientes de regressão da atividade de CGTase por *Bacillus* sp. SM-02 em fermentação em estado sólido utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos.

Fatores	Coeficientes de		Erro	
	regressão	padrão	t(5)	p - valor
Média	121,4600	9,964285	12,18954	0,000066
Temperatura (L)	3,8031	6,001853	0,62327	0,560432
Temperatura (Q)	-39,1019	7,262658	-5,38396	0,002981
Rotação (L)	8,2814	6,101853	1,35719	0,232770
Rotação (Q)	-42,2994	7,262658	-5,82423	0,002108
Temperatura x Rotação	-0,8100	8,629324	-0,09387	0,928861

L=Linear; Q=Quadrático; R²=0,9106

Tabela 5 - Análise de regressão da extração de CGTase por *Bacillus* sp. SM-02 em fermentação em estado sólido utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos.

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F calc
Regressão	15164,95	3	5054,98	25,76
Resíduo	1489,31	7	212,76	
Total	16654,26	10		

R²=0,9106; F_{tab.}=4,35

Para determinar o melhor tempo de extração da enzima foram realizados ensaios, em triplicata, na condição otimizada (35°C, 60 rpm) durante 0, 5, 15 e 30 minutos. Dessa forma, foi possível observar que o melhor tempo para realização da extração de CGTase se deu em 15 minutos (Figura 3).

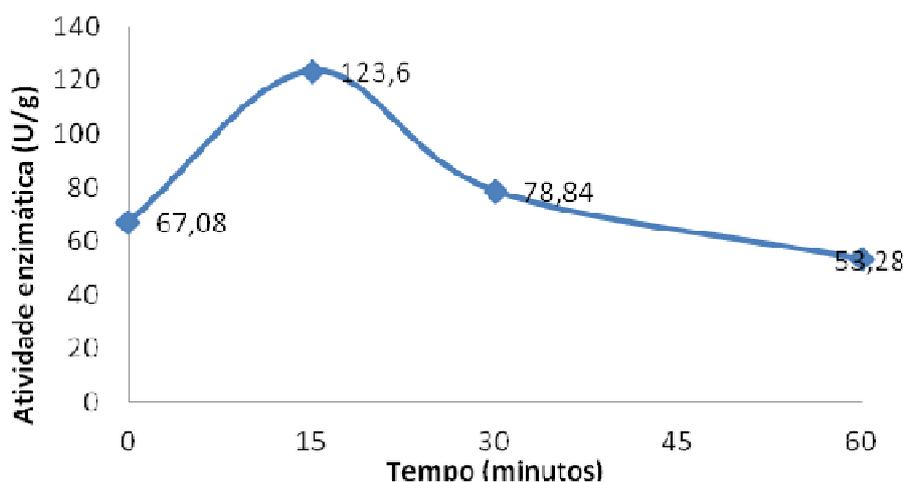


Figura 3 - Validação do tempo de extração enzimática em fermentação em estado sólido por *Bacillus* sp. utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos.

Otimização da produção de CGTase

A maior produção da enzima foi obtida no ensaio 8, com 113,66 U/g, seguida pelos ensaios do ponto central (9, 10 e 11), com produção média de 107,7 U/g. Esses ensaios tem em comum um volume de manipueira de 7 mL, correspondente a 49 % de umidade, e inóculos com D.O. entre 0,7 e 1,0. O aumento na concentração de inóculo parece acarretar em aumento na produção da enzima, o que pode ser observado, também, comparando-se os ensaios 1 e 2 (Tabela 8).

Tabela 6 - Matriz do planejamento experimental da produção enzimática por *Bacillus* sp. SM-02 em fermentação em estado sólido e valores das variáveis independentes usados no DCCR (manipueira e densidade ótica da bactéria).

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais		Atividade enzimática (U/g)	
	X ₁	X ₂	Manipueira (mL)	Densidade ótica (D.O.)	Valores observados	Valores preditos
1	-1	-1	5	0,5	65,7	68,3
2	+1	-1	5	0,9	98,5	107,2
3	-1	+1	9	0,5	100,3	104,7

4	+1	+1	9	0,9	74,5	85,0
5	-1,41	0	4	0,7	77,2	74,9
6	+1,41	0	10	0,7	99,4	88,6
7	0	-1,41	7	0,4	101,2	95,9
8	0	+1,41	7	1	113,6	105,8
9	0	0	7	0,7	106,5	106,2
10	0	0	7	0,7	103,0	106,2
11	0	0	7	0,7	109,2	106,2

Entretanto, de acordo com as análises de regressão (Tabela 9), somente a variável manipulada, em seu termo quadrático, bem como a interação entre as variáveis, tiveram influência na produção da enzima ($p < 0,05$), no nível de significância de 95 %. De fato, a maioria dos ensaios onde a quantidade de manipulada variou entre 7 mL e 9 mL foram os que apresentaram as maiores atividades enzimáticas, de 100,3 U/g a 113,6 U/g, independente da concentração do inóculo, cujos p-valores foram sempre maiores que 0,05. Ou seja, a variação nas concentrações do inóculo, dentro da faixa estudada, não influenciou na produção da enzima.

A atividade de água, descrita como a umidade relativa da atmosfera gasosa em equilíbrio com o substrato, é descrita como um dos fatores mais importantes na fermentação sólida, uma vez que viabiliza o crescimento microbiano. O controle deste parâmetro pode ser usado para modificar a produção metabólica de um micro-organismo. Teores de umidade acima de 80% podem levar a contaminação bacteriana, acompanhado de contaminação fúngica, devido à diminuição da porosidade da fonte de carbono que impede a penetração de oxigênio e a eliminação de dióxido de carbono. Por outro lado, um baixo teor de umidade pode levar a um menor crescimento e pouca acessibilidade dos nutrientes aos micro-organismos (Cruz et al., 2011; Pandey, 1992).

Tabela 7 - Análise de regressão da produção enzimática de CGTase por *Bacillus* sp. SM-02 em fermentação em estado sólido utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos.

Fatores	Coefficientes de regressão	Erro padrão	t(5)	p – valor
Média	106,2333	5,434172	19,54913	0,000006
Manipueira (L)	4,7994	3,327737	1,44225	0,208810
Manipueira (Q)	-12,2417	3,960800	-3,09071	0,027138
Densidade ótica (L)	3,5170	3,327737	1,05688	0,338931
Densidade ótica (Q)	-2,6917	3,960800	-0,67958	0,526954
Manipueira x Densidade ótica	-14,6500	4,706131	-3,11296	0,026462

L=Linear; Q=Quadrático; $R^2=0,81838$

A análise de variância (Tabela 10) apresentou um valor do F calculado de 15,17, quase 3,5 vezes superior ao F tabelado, indicando que o modelo foi significativo no nível de confiança aplicado (95%).

Tabela 8 - ANOVA para atividade de CGTase por *Bacillus* sp. SM-02 em fermentação em estado sólido utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos.

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F calc
Regressão	2879,0	3	959,67	15,17
Resíduo	442,95	7	63,28	
Total	2436,042	10		

$R^2=0,81838$; $F_{tab.}= 4,35$

Legenda: SQ = Soma dos quadrados; GL= Grau de liberdade ; QM= Quadrados médios; F = Teste F/Nível de significância.

Estes resultados permitem que os dados dos coeficientes de regressão sejam utilizados para gerar a equação do modelo (Equação 3), bem como o gráfico de superfície de resposta (Figura 4), que mostra as regiões de otimização (vermelho escuro) do processo de produção da enzima CGTase pelo *Bacillus* sp. SM-02. A

equação do modelo permite, dentro da faixa estudada, calcular a produção da enzima sem que haja necessidade de realização de experimentos.

$$Y = 106,23 + 4,80 X_1 - 12,24 X_1^2 + 3,52 X_2 - 2,69 X_2^2 - 14,65 X_1X_2 \quad (\text{Eq. 3})$$

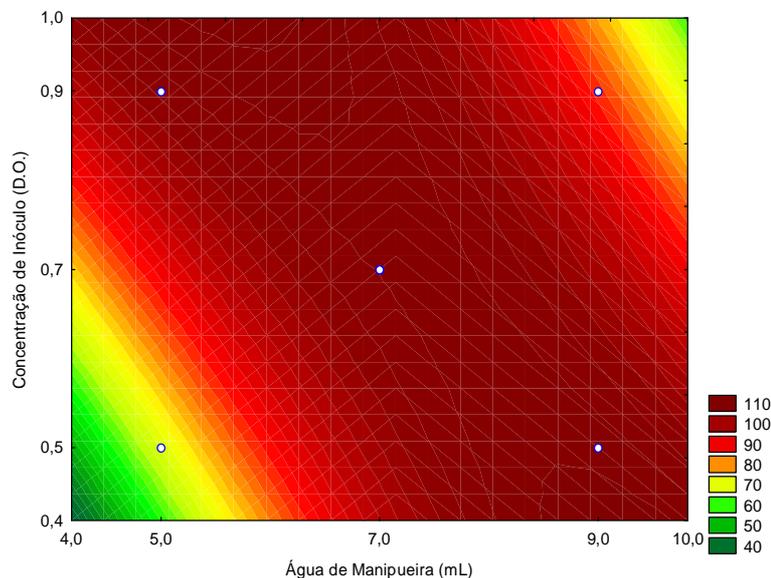


Figura 4 – Curvas de contorno da produção de CGTase por *Bacillus* sp. SM-02 em função da quantidade de manipueira e concentração de inóculo para a fermentação em estado sólido, utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos.

Para validação do resultados, foram realizadas fermentações, em triplicata, nas condições do ensaio 8 (7mL de umidade e inóculo com D.O. de 1,0). Com isso, foi possível atingir uma produção média de 141,48 U/g de CGTase, confirmando que na condição otimizada é possível obter elevadas produções da enzima.

São poucos os trabalhos que descrevem a produção de CGTase por fermentação em estado sólido e, especialmente com resíduos da indústria de farinha de mandioca, nenhum trabalho ainda foi descrito. O farelo da casca e entrecasca da mandioca já foi descrito apenas para produção de α -amilase por *Aspergillus niger* e, também neste trabalho, a maior influência sobre a produção da α -amilase foi atribuída à variação da umidade. No trabalho destes autores, houve uma tendência de queda na atividade enzimática com o aumento da umidade independentemente do tempo de fermentação (Cruz et al., 2011).

Prado et al (2002) estudou a produção de CGTase por quatro linhagens de *Bacillus* sp. (H25, H27, E16 e H54) e as melhores produções da enzima variaram de 68,3 U/g a 77,5 U/g em meio composto por uma mistura de farelo de trigo e farinha de mandioca, com uma umidade final de 60% no processo de fermentação. Pinto (2007) obteve produção de 32,7 U/g empregando resíduo fibroso de soja como substrato para o *B. circulans*.

Ramakrishna et al. (1994) demonstram em seus estudos que a fermentação sólida apresentou uma produção um pouco maior da enzima (59 U/mL) em 24 horas de cultivo por *Bacillus cereus* quando comparada com a produção em estado semi-sólido (58 U/ml) e em fermentação submersa (40 U/mL), empregando farelo de trigo como substrato. Isso mostra que, dependendo do micro-organismo, do substrato e das variáveis estudadas, a fermentação sólida se apresenta como um processo eficiente na produção dessa enzima.

Caracterização parcial do extrato enzimático bruto

A CGTase produzida pelo *Bacillus* sp. SM-02 apresentou sua temperatura ótima em 55 °C, mas ainda manteve atividade acima de 80 % nas temperaturas de 60 °C e 65 °C, porém, caindo drasticamente a 70 °C (Figura 5). Esse mesmo padrão de temperatura ótima foi observado por Mora et al. (2012) com a GCTase produzida por espécies alcalofílicas de *Bacillus*.

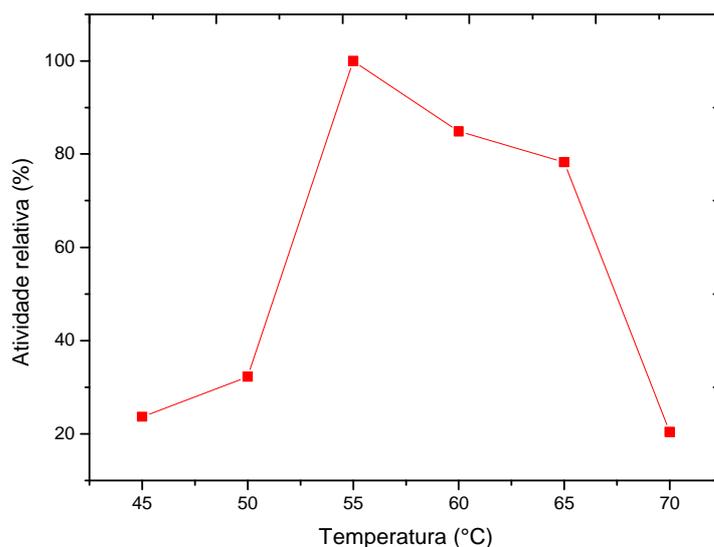


Figura 5 - Temperatura ótima da CGTase sintetizada por *Bacillus* sp. SM-02 em fermentação em estado sólido utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos e 7 mL de meio de sais diluídos com manipueira adicionados à matéria sólida.

Prado et al. (2002) produziram a enzima em fermentação sólida com picos de atividade em diferentes temperaturas, que variavam de acordo com o micro-organismo empregado. A CGTase produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 apresentou máxima atividade a 55 °C e 60 °C, enquanto que *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* H27 e H54 apresentaram maior atividade ciclizante entre 65 °C e 70 °C e 60 °C e 65 °C, respectivamente. Nesse mesmo estudo 65 °C foi apontada como melhor temperatura para produção enzimática por *Bacillus* sp H25.

Em um estudo realizado empregando *Bacillus holodurans*, a enzima manteve uma atividade acima de 50 % nas temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C apresentando reduzida atividade em temperaturas superiores a 70 °C (More et al., 2012).

Gomes et al. (2007) sugerem que mesoenzimas e termoenzimas apresentam a mesma conformação funcional e, por isso, suas estruturas permanecem inalteradas apesar da diferença de temperatura de atuação de ambas. Isso explica o fato de a CGTase apresentar diferentes temperaturas ótimas de atuação, fazendo com que essa

enzima, ao mesmo tempo, possa atuar em ambientes mesófilos e termófilos sem sofrer desnaturação.

A CGTase produzida por fermentação sólida apresentou uma boa estabilidade térmica, mantendo sua atividade enzimática acima de 50 % por um período de 180 minutos nas temperaturas de 45 °C, 50 °C e 55°C (Figura 6). Essa boa termoestabilidade que a CGTase de *Bacillus* sp. SM-02 apresentou, associada com sua temperatura ótima de atuação, é uma característica muito atrativa para aplicações industriais pois a enzima será produzida em níveis otimizados sem sofrer desnaturação por pelo menos 2 horas de incubação. A partir de 60 °C a enzima perdeu atividade rapidamente, nos primeiros 15 minutos de reação sendo quase que completamente inativada a 70 °C após 300 minutos de incubação (Figura 6).

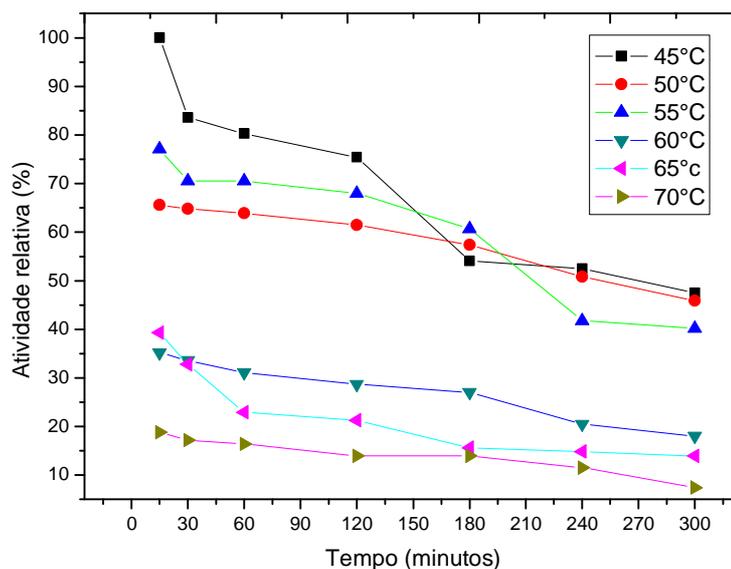


Figura 6 - Termoestabilidade da CGTase por *Bacillus* sp. SM-02 em fermentação em estado sólido utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos em 7 mL de meio de sais diluídos com manipueira adicionados à matéria sólida.

A estabilidade térmica da enzima está relacionada à termoestabilidade dinâmica que representa 50 % da enzima desdobrada, e à estabilidade cinética, que reflete na meia vida da enzima. Essa termoestabilidade enzimática está associada ao dobramento da

proteína que é estabilizado pelo equilíbrio entre as forças de dobramento e desdobramento (Gomes et al., 2007). Dessa forma, podemos inferir que nas temperaturas acima de 55 °C a CGTase produzida por *Bacillus* sp. SM-02 apresentou um desequilíbrio entre essas forças, perdendo dessa forma sua estabilidade nessa faixa de temperatura.

Na determinação do pH ótimo da CGTase foi observado uma atividade ciclizante acima de 65 % em pHs alcalinos, com pH ótimo em 8,0, e reduzida atividade, abaixo de 50 %, em pHs ácidos e neutro (Figura 7).

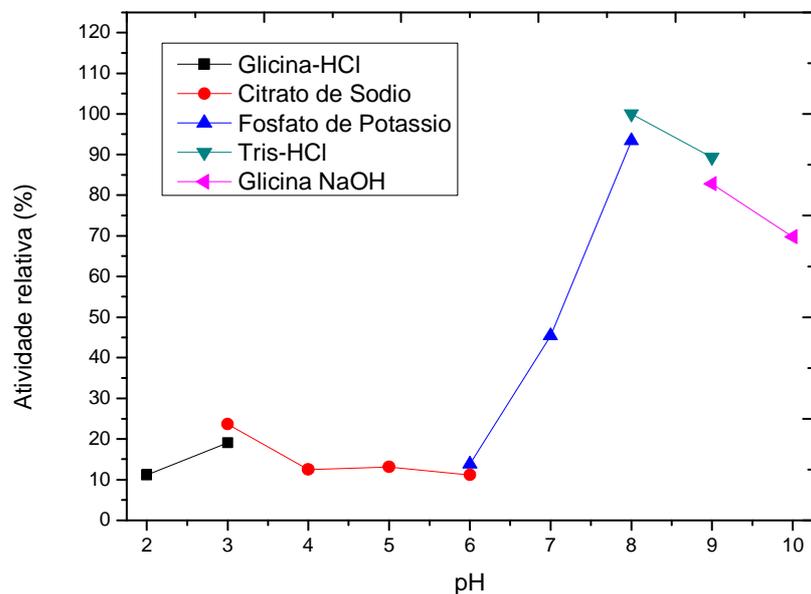


Figura 7 - pH ótimo da CGTase sintetizada por *Bacillus* sp. SM-02 em fermentação em estado sólido utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos em 7 mL de meio de sais diluídos com manipueira adicionados à matéria sólida.

Assim como para temperatura, os valores de pH ótimo variam de acordo com a espécie de micro-organismo empregado. Nossos resultados estão de acordo com estudo realizado por Santos et al. (2013) onde foi observado pH ótimo de pH 8,0 para *Bacillus firmus* cepa n°37.

Prado et al. (2002) relataram em seus estudos reduzida atividade da enzima em pHs entre 7,0 e 7,5, e dois picos de atividade, observando um em pH ácido e outro em pH alcalino. Neste mesmo trabalho, picos de produção da enzima, ocorrendo em pH 8,0,

foram observados por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* H54 e *Bacillus* sp H25. A CGTase sintetizada por *Bacillus holodurans* também apresentou dois picos de produção, um ocorrendo em pH neutro (7,0) e outro em pH alcalino (9,0) (More et al., 2012).

Enzimas que apresentam pHs alcalinos tem a vantagem de serem um atrativo em aplicações industriais, como por exemplo na formulação de detergentes (Carvalho et al., 2008; Varalakshmi et al., 2009).

O efeito dos íons metálicos e agentes químicos na atividade de ciclização da CGTase mostraram que os íons $MgCl_2$, $CaCl_2$ e $FeCl_2$ potencializaram a atividade da enzima, enquanto todos os outros íons e agentes químicos levaram a uma redução em sua atividade ciclizante (Figura 8). Esses mesmos íons já foram reportados como íons que influenciam de forma positiva na produção dessa enzima por espécies de *Bacillus* (FREITAS et al., 2004; MORE et al., 2012).

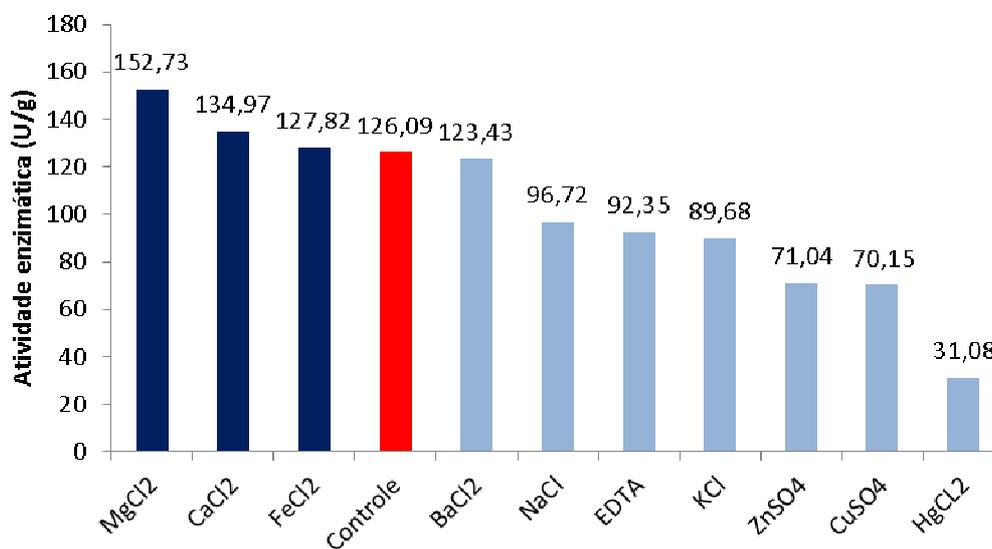


Figura 8 - Efeito de íons metálicos e agentes químicos na atividade de ciclização da CGTase de *Bacillus* sp. SM-02 em fermentação em estado sólido utilizando casca de mandioca triturada e milhocina como substratos em 7 mL de meio de sais diluídos com manipueira adicionados à matéria sólida.

Vale salientar que nos ensaios preliminares apresentados para padronização do tempo de fermentação, foram obtidos os maiores valores de atividade enzimática em apenas 24h nos ensaios contendo manipueira como um dos substratos do meio, em cuja composição aparecem estes sais. Silva et al. (2005) e Marques (2009) encontraram na composição deste resíduo maiores valores dos minerais magnésio, cálcio e ferro, o que nos leva a concluir que os minerais citados influenciaram positivamente no crescimento celular e na produção da enzima CGTase.

A enzima também teve sua atividade muito inibida pelos íons $ZnSO_4$, $CuSO_4$ e $HgCl_2$. Esses mesmos íons também contribuíram para uma diminuição da atividade de CGTase produzida por *Bacillus macerans* ATCC 8244. O efeito dos íons metálicos na atividade da enzima parece depender do micro-organismo produtor de CGTase (ARYA e SRIVASTAVA, 2006).

CONCLUSÕES

Apesar dos poucos trabalhos citados na literatura sobre produção de CGTase por FES, esse processo mostrou-se viável para a produção da enzima CGTase de *Bacillus* sp. SM-02 utilizando resíduos da indústria de farinha de mandioca como substratos. Além disso, o uso da casca de mandioca, da manipueira e da milhocina na produção dessa enzima pode representar uma alternativa ao descarte inapropriado desses resíduos, bem como uma nova fonte de renda, uma vez que pode agregar valor a esse material.

A manipueira apresentou-se como uma boa fonte de suplementação do meio de cultivo, devido ao seu teor de nutrientes, incrementando desta forma a produção da CGTase.

Além disso, as características físico-químicas da CGTase de *Bacillus* sp. SM-02, como boa termoestabilidade, pH e temperatura ótimos elevados, faz com que esta

enzima apresente bom potencial para aplicações em processos industriais que utilizem temperatura elevada e pH alcalinos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Apoio à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo suporte financeiro e a Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela infraestrutura para realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

Adreus, J.; Dalmolin, M. C.; Oliveira Junior, I. B.; Barcellos, I. O., 2010. Aplicação de ciclodextrinas em processos têxteis. *Química Nova*, 33: 929-937.

Ai-Noi, S.; Abd-aziz, S.; Alitheen, N.; Hassan, O.; Karim, M.I.A., 2008. Optimization of Cyclodextrin Glycosyltransferase production by response surface methodology approach. *Biotechnology*, 7: 10 – 18.

Arya, S. K.; Srivastava, S. K., 2006. Kinetics of immobilized cyclodextrin gluconotransferase produced by *Bacillus macerans* ATCC 8244. *Enzyme Microbiology Technology*, 39: 507-510.

Bueno, M. R., Varize, T. L., Olivo, E. J., Zanin, G. M., 2013. Obtenção de ciclomaltodextrina-gluconotransferase em processo fermentativo por *Bacillus firmus* cepa 37 para produção de ciclodextrinas. *Revista de Engenharia e Tecnologia*. 5: 97-103.

Carvalho, R. V.; Côrrea, T. L. R.; Silva, J. C. M.; Mansur, L. R. C. O.; Martins, M. L. L., 2008. Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 102-107.

Cheirsilp, B; Kitcha, S; Maneerat, S., 2010. Kinetic characteristics of β -cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from newly isolated *Bacillus* sp. C26. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13: 1-8.

Coelho, S. L. A., 2013. Produção microbiana de ciclodextrina glicosiltransferase utilizando amido de arautá e farinha de mandioca como substratos. Dissertação de mestrado – Mestrado em Microbiologia Agrícola. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Cruz, E. A.; Melo, M. C.; Santana, B. N.; Franco, M.; Santana, R. S. M.; Santos, L. S.; Gonçalves, Z. S., 2011. Produção de alfa-amilase por *Aspergillus niger* em resíduo de casca de mandioca. UNOPAR Científica Ciências Biológicas a da Saúde, 13: 245-249.

Freitas T.L.D., Monti R., Contiero J., 2004. Production of CGTase by a *Bacillus alkalophilic* CGII strain isolated from wastewater of a manioc flour industry. Brazilian Journal of Microbiology, 35: 255–260.

Gomes, E; Guez, M. A. U; Martin, N; Silva, R., 2007. Enzimas termoestáveis: Fontes, produção e aplicação industrial. Química Nova, 30: 136-145.

Hamon, V., Moraes, F.F., 1990. Etude preliminaire a L'immobilisation de L'enzyme CGTase WACKER. In: Research Report, Laboratoire de Technologie Enzymatique. Compiègne, France: Université de Technologie de Compiègne.

Ibrahim, A. S. S.; Al-Salamah, A. A.; El-Tayeb, M. A.; El-Badawi, Y. B.; Antranikian, G., 2012. A novel cyclodextrin glycosyltransferase from alkalophilic *Amphibacillus* sp. NPST-10: Purification and properties. International Journal of Molecular Sciences, 1: 10505-10522.

Leemhuis, H.; Kelly, R. M.; Dijkhuizen, L., 2010. Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications. Applied Microbiology Biotechnology, 85: 823-835.

Marques, M. C., 2009. Atributos do solo, qualidade do lixiviado e crescimento de plantas de milho sob aplicação de água residuária da mandioca. Tese de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.

Matioli, G.; Moriwaki, C.; Mazzoni, R. B.; Zanin, G. M.; Moraes, F. F., 2000. Estudos de parâmetros que influenciam na produção da enzima CGTase de *Bacillus firmus*, cepa n° 37. Acta Scientiarum, 22: 311-316.

Mora, M. M. M.; Sánchez, K. H.; Santana, R. V.; Rojas, A. P.; Ramírez, H. L.; Torreslabandeira, J. J., 2012. Partial purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from alkalophilic *Bacillus* species. Springer Plus, 1: 2-6.

More, S. S.; Niraja, R.; Evelyn, C.; Byadgi, A. M.; Shwetha, V.; Das Mangaraj, S., 2012. Isolation, purification and biochemical characterization of CGTase from *Bacillus holodurans*. Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition, 7: 90-97.

Nakamura, N., Horikoshi, K., 1976. Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic B. sp. Agricultural and Biological Chemistry, 40: 935–941.

Pandey, A., 1992. Recent process developments in solid-state fermentation. Process Biochemistry, 27: 109-117.

Pinto, F. S. T., 2007. Produção de ciclodextrina glicosiltransferase pela bactéria alcalófila *Bacillus circulans* ATCC 2183: cultivo em batelada, batelada alimentada e estado semi-sólido. Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prado, H. F.A.; Hilário, E.; Dasilva, R., 2002. Seleção de microrganismos produtores de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produção e caracterização da enzima. *Brazilian Journal of Food Technology*, 5: 189-196.

Ramakrishna, S. V.; Saswathi, N.; Sheela, R.; Jamuna, R., 1994. Evaluation of solid, slurry and submerged fermentation for the production of cyclodextrin glycosyltransferase by *Bacillus cereus*. *Enzyme and Microbiol Technology*, 16: 441-444.

Rodrigues, M.I., Iemma, A.F., 2009. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos, second ed., Cárita Editora, Brasil.

Santos, A., 2009. Usos e impactos ambientais causados pela manipueira na microrregião sudoeste da Bahia-Brasil. *Problemas sociales y regionales en américa latina. Estudio de casos*. 11-25.

Santos, J. B. C., Zanin, G. M., Olivo, J. E., 2013. Influence of culture medium pH on the production of CGTase by *Bacillus firmus* strain n°. 37. *Acta Scientiarum Technology*, 35: 413-416.

Sivakumar, N.; Shakilabanu, S., 2013. Production of ciclodextrin glycosyl transferase by *Bacillus megaterium*. *International Journal Current Microbiology and Applied Sciences*, 2: 44-55.

Varalakshmi, K. N.; Kumudini, B. S.; Nandini, B. N.; Solomon, J.; SUHAS, R.; Mahesh, B.; Kavitha, A. P., 2009. Production and characterization of α -amilase from *Aspergillus Níger* JGI 24 isolated in Bangalore. *Polish Journal of Microbiology*, 58: 29-36.

Venturine, C. G., Nicolini, J., Machado, C., Machado, V. G., 2008. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Química Nova*, 31: 360-368.

Yap, P.W., A. B. Ariff, K. K. Woo and Hii, S.L. 2010. Production of CyclodextrinGlycosyltransferase (CGTase) by *Bacillus lehensis* S8 using Sago Starch as Carbon Source. *Journal of Biological Sciences*, 10: 676-681.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os substratos residuais da indústria de farinha de mandioca utilizados neste trabalho, casca de mandioca, manipueira, bem como da indústria de processamento do milho, a milhocina, apresentaram-se como bons substratos para a produção de CGTase, tanto em fermentação submersa quanto em estado sólido.

O planejamento estatístico de delineamento composto central rotacional foi muito eficiente na otimização da extração e produção da enzima CGTase pelo *Bacillus* sp. SM-02, sendo possível determinar as melhores condições de fermentação com número reduzido de experimentos.

A CGTase, produzida em ambas as fermentações, possui características físico-químicas muito interessantes do ponto de vista industrial, uma vez que apresentou pH ótimo na faixa alcalina, além de temperatura ótima elevada, o que diminui o risco de contaminação por micro-organismos competidores durante o processo de produção. A boa termoestabilidade da enzima também faz com que esta seja favorável para aplicações industriais.

O *Bacillus* sp. SM-02 mostrou-se bastante eficiente na produção da enzima CGTase, atingindo produções elevadas, comparáveis, ou mesmo superiores, às descritas na literatura. Assim, tanto essa bactéria quanto os resíduos agroindustriais do processamento da mandioca, tem grande potencial para produção de CGTase, o que pode representar uma alternativa ao descarte inadequado desses resíduos, bem como uma nova fonte de renda, uma vez que pode agregar valor a esse material.