

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

**SHEILA LORENA ARAUJO COELHO**

**PRODUÇÃO MICROBIANA DE CICLODEXTRINA  
GLICOSILTRANSFERASE UTILIZANDO AMIDO DE ARARUTA E  
FARINHA DE MANDIOCA COMO SUBSTRATOS**

**CRUZ DAS ALMAS  
SETEMBRO - 2013**

**PRODUÇÃO MICROBIANA DE CICLODEXTRINA  
GLICOSILTRANSFERASE UTILIZANDO AMIDO DE ARARUTA E  
FARINHA DE MANDIOCA COMO SUBSTRATOS**

**SHEILA LORENA ARAUJO COELHO**

**Bióloga**

**Universidade do Estado da Bahia, Campus II, 2011**

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.

Orientação: Dr<sup>a</sup>. Marcia Luciana Cazetta

**CRUZ DAS ALMAS**

**SETEMBRO - 2013**

## FICHA CATALOGRÁFICA

C672

Coelho, Sheila Lorena Araujo.

Produção microbiana de ciclodextrina glicosiltransferase utilizando amido de araruta e farinha de mandioca como substratos / Sheila Lorena Araujo Coelho.\_ Cruz das Almas, BA, 2013.

109f.; il.

Orientadora: Márcia Luciana Cazetta.

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

1.Microbiologia – Microorganismos. 2.Microbiologia – Enzimas. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 579

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

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
SHEILA LORENA ARAUJO COELHO**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marcia Luciana Cazetta  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)  
(Orientadora)

---

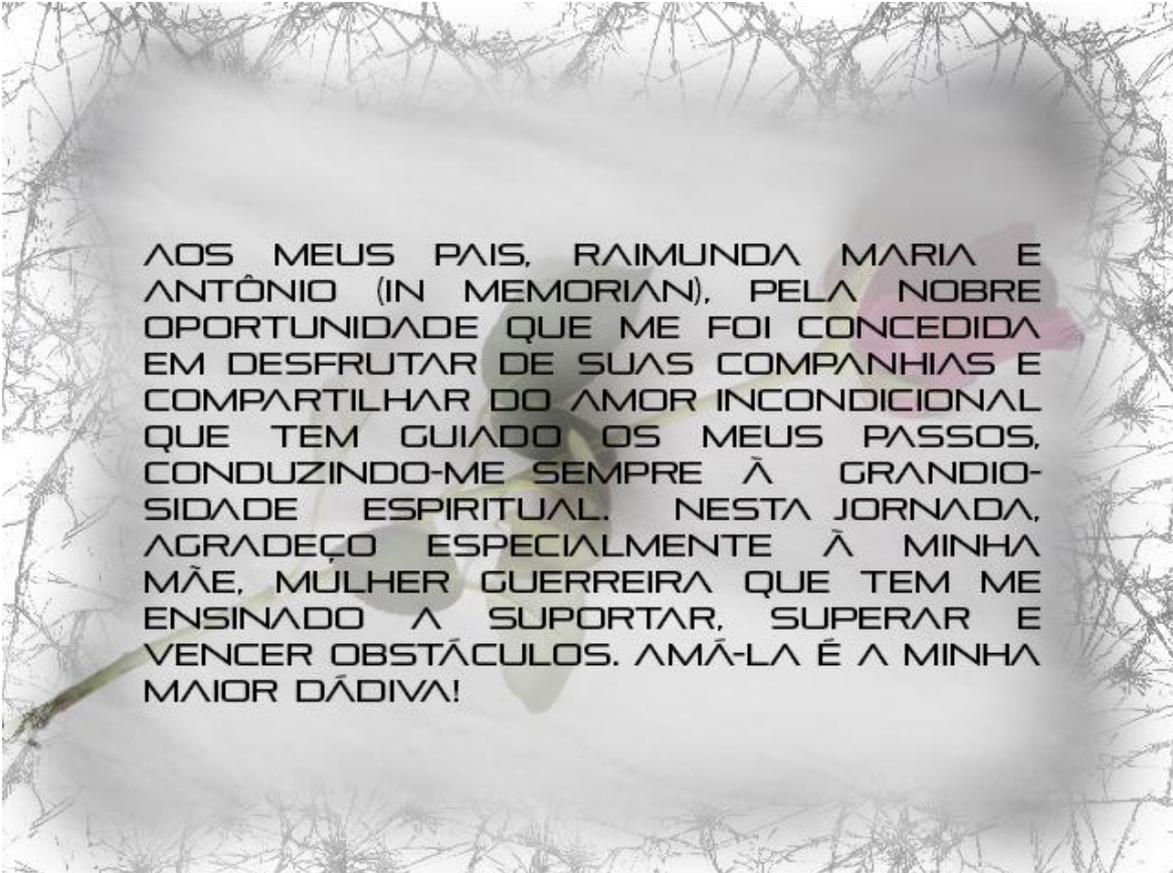
Prof. Dr. Jonas Contiero  
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

---

Prof. Dr. Guilherme Garcia da Silveira  
Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

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

**CRUZ DAS ALMAS  
SETEMBRO – 2013**



AOS MEUS PAIS, RAIMUNDA MARIA E ANTÔNIO (IN MEMORIAN), PELA NOBRE OPORTUNIDADE QUE ME FOI CONCEDIDA EM DESFRUTAR DE SUAS COMPANHIAS E COMPARTILHAR DO AMOR INCONDICIONAL QUE TEM GUIADO OS MEUS PASSOS, CONDUZINDO-ME SEMPRE À GRANDIOSIDADE ESPIRITUAL. NESTA JORNADA, AGRADEÇO ESPECIALMENTE À MINHA MÃE, MULHER GUERREIRA QUE TEM ME ENSINADO A SUPORTAR, SUPERAR E VENCER OBSTÁCULOS. AMÁ-LA É A MINHA MAIOR DÃDIVA!

## AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo, Esta Força magnífica que emana da natureza, por toda a “explosão” de vida configurada na exuberante biodiversidade e por ter me iluminado e guiado constantemente de forma tão presente em meu caminho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo apoio financeiro.

Meus sinceros agradecimentos à professora Dr<sup>a</sup>. Marcia Luciana Cazetta pela orientação imprescindível que nos conduziu ao sucesso deste trabalho, pela paciência durante a minha estada no Laboratório de Bioquímica e pela confiança depositada em minha capacidade de realização.

Aos meus irmãos, Antonione e Victor Hugo, pelo amor, carinho e compreensão ofertados durante a minha jornada da vida.

Ao meu amigo Gean Carlo Capinam, pelas sugestões concedidas a respeito do que poderia ser aplicado neste trabalho, além de ter cedido uma parte do seu tempo ajudando-me durante as coletas.

Ao meu amigo Valter Magalhães, por sua amizade imprescindível e pelo auxílio durante a identificação do micro-organismo.

À família Santiago composta por D. Ninha, “Seu” Antônio e Ana Paula que me acolheu amorosamente como um verdadeiro membro da família.

A todos os estagiários do Laboratório de Bioquímica da Universidade do Recôncavo da Bahia pelo companheirismo durante a minha jornada.

À Eliane Souza por ter contribuído enormemente durante as coletas.

À Msc. Kate Cristina Blanco e à Dra. Heloiza do Prado pelo auxílio durante a fase de execução da metodologia deste trabalho.

Ao Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, à Embrapa Mandioca e Fruticultura e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade de realização deste trabalho.

*O entusiasmo me trouxe até aqui!*

## RESUMO

### **COELHO, S.L.A. Produção microbiana de ciclodextrina glicosiltransferase utilizando amido de araruta e farinha de mandioca como substratos.**

Ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) é a enzima responsável pela conversão do amido em ciclodextrinas. Estes maltooligossacarídeos cíclicos não-redutores apresentam diversas aplicações devido à formação de complexos de inclusão com uma infinidade de substâncias de interesse industrial. O presente estudo teve como objetivo otimizar a produção de CGTase pelo isolado SM-02 utilizando Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para o planejamento dos experimentos e superfície de resposta para análise dos resultados. O *screening* para isolamento e seleção do micro-organismo foi realizado a partir de 8 amostras de solo e água de manipueira de casas de farinha e de solo de culturas de mandioca de municípios do Recôncavo da Bahia, utilizando-se a técnica de diluição seriada. A cepa SM-02 foi identificada como a melhor produtora da enzima por meio da medida do halo produzido em placa de Petri, utilizando meio de cultura específico, e selecionada para os estudos de otimização utilizando amido de araruta (*Maranta arundinacea* L.) e farinha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) como fontes de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio. Para cada fonte de carbono foi realizada uma matriz de planejamento fatorial do tipo DCCR 2<sup>2</sup>. Nos experimentos com amido de araruta foi possível otimizar a produção da enzima na condição de 30,0 g.L<sup>-1</sup> de amido e 3,5 g.L<sup>-1</sup> de milhocina, sendo alcançada a produção de 989,53 U.mL<sup>-1</sup> e produtividade de 51,44 U.mL<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>. Com farinha de mandioca, a produção da CGTase foi otimizada na condição de 25,0 g.L<sup>-1</sup> e 3,5 g.L<sup>-1</sup> de milhocina, com produção máxima de 1.087,99 U.mL<sup>-1</sup> e produtividade de 67,07 U.mL<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>. Os resultados indicam que a cepa SM-02, bem como os substratos utilizados, são promissores para a produção de CGTase.

**Palavras-chave:** ciclodextrinas, otimização, substratos agroindustriais, micro-organismos

## ABSTRACT

**COELHO, S.L.A. Microbial production of cyclodextrin glycosyltransferase using arrowroot starch and cassava flour as substrates.**

Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) enzyme is responsible for the conversion of starch to cyclodextrins. These non-reducing cyclic maltooligosaccharides present several applications due to the formation of inclusion complexes with several substances of industrial interest. This study aimed to optimize the production of CGTase by the isolated SM-02 applying Central Composite Rotational design (CCR) for the planning of experiments and response surface methodology to analyze the results. The screening to isolation and selection microorganism was realized from 8 samples of soil and cassava wastewater (manipueira) from cassava flour mills and soil of cassava growing from municipalities of Reconcavo of Bahia, using the serial dilution technique. The isolated SM-02 was identified as the best production of the enzyme by measuring the halo produced in Petri dishes using specific culture medium and selected for optimization studies using starch arrowroot (*Maranta arundinacea* L.) and cassava flour (*Manihot esculenta* Crantz) as carbon sources and corn steep liquor as nitrogen source. For each carbon source was utilized an array of factorial design CCR 2<sup>2</sup>. In experiments with arrowroot starch was possible to optimize the production of the enzyme in the condition of 30.0 g.L<sup>-1</sup> of arrowroot starch and 3.5 g.L<sup>-1</sup> of corn steep liquor, reaching the yield of 989.53 U.mL<sup>-1</sup> and productivity of 51.44 U.mL<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>. With cassava flour, the production of CGTase was optimized on the condition of 25.0 g.L<sup>-1</sup> and 3.5 g.L<sup>-1</sup> of corn steep liquor, with yield of 1087.99 U.mL<sup>-1</sup> and productivity of 67.07 U. mL<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>. The results indicate that the SM-02 strain and the substrates are promising for producing CGTase by fermentative processes.

**Keywords:** cyclodextrins, optimization, agroindustrial substrates, microorganisms

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Secção da amilose destacando as ligações do tipo  $\alpha$ -1,4 entre as unidades de glicose..... 4
- Figura 2.** Secção da molécula da amilopectina destacando as ligações do tipo  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6..... 5
- Figura 3.** *Maranta arundinacea*. (a) Planta de araruta. (b) Rizomas de araruta..... 7
- Figura 4.** *Manihot esculenta*. (a) Raízes de mandioca. (b) Farinha de mandioca..... 8
- Figura 5.** Ligações O-glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4 (em vermelho)..... 9
- Figura 6.** Estrutura da ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). (A) CGTase termoestável de *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1. (B) Modelo que ilustra a estrutura  $(\beta/\alpha)_8$ -barril da CGTase: (A') domínio catalítico  $(\beta/\alpha)_8$ ; (B') pode estar envolvido com a ligação do  $\text{Ca}^{2+}$ ; (C', D' e E') são domínios antiparalelos, onde E' representa o módulo de ligação ao substrato..... 10
- Figura 7.** Ilustração criada com PyMOL representando a ligação do substrato no sítio ativo da CGTase de *Bacillus circulans* 251. Verde: resíduo do aminoácido Try195; vermelho: subsítios +1 e +2; laranja: subsítio -3; branco: subsítio -6; e roxo: subsítio -7..... 12
- Figura 8.** Representação esquemática das reações de transglicosilação catalisadas pela CGTase: formação de uma molécula de  $\beta$ -ciclodextrina. No primeiro passo da reação, um Asp é ligado covalentemente no sitio de clivagem, formando um oligossacarídeo intermediário. Em seguida, esse oligossacarídeo é transferido para uma molécula receptora..... 13

**Figura 9.** Reações de transglicosilação da ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). Esferas verdes representam resíduos de glicose. Esferas brancas representam as extremidades reductoras. (A) Hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4; (B) desproporcionamento; (C) ciclização; (D) acoplamento..... 14

**Figura 10.** Estruturas das ciclodextrinas. (A)  $\alpha$ -ciclodextrina contendo seis unidades de glicose. (B)  $\beta$ -ciclodextrina contendo sete unidades de glicose. (C)  $\gamma$ -ciclodextrina contendo oito unidades de glicose..... 20

**Figura 11.** Dimensões das ciclodextrinas naturais  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ..... 22

## CAPÍTULO I

**Amido de araruta e milhocina como substratos para produção de ciclodextrina glicosiltransferase por fermentação submersa..... 43**

**Fig. 1.** Halo indicando produção de CGTase pela cepa SM-02, após 72 h de crescimento em meio Nakamura e Horikoshi (1976) contendo o corante fenolftaleína..... 50

**Fig. 2.** Temperatura ótima de fermentação da cepa SM-02, em meio Nakamura e Horikoshi (1976)..... 52

**Fig. 3.** Valores observados e preditos pelo sistema para otimização da produção de CGTase ( $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) pela cepa SM-02..... 55

**Fig. 4.** (a) Superfície de resposta da produção de CGTase pela cepa SM-02. (b) Curvas de contorno destacando a zona de otimização (vermelho escuro)..... 56

**Fig. 5.** Efeito da temperatura na atividade de ciclização da CGTase da cepa SM-02. A atividade da enzima foi mensurada sob condições padrões de ensaio em diferentes temperaturas, em pH 8.0, na presença de  $\text{Ca}^{+2}$ ..... 58

**Fig. 6.** Efeito da temperatura na estabilidade da CGTase da cepa SM-02. A atividade da enzima foi mensurada sob condições de ensaio a 55 °C, pH 5.0, na presença de Mg<sup>+2</sup> ..... 59

**Fig. 7.** Efeito do pH na atividade de ciclização da CGTase da cepa SM-02. A atividade da enzima foi mensurada sob condições de ensaio em diferentes valores de pH a 50 mM, na temperatura de 55 °C, na presença de Ca<sup>+2</sup> ..... 60

**Fig. 8.** Cinética de produção enzimática, crescimento celular e açúcares redutores totais em condições otimizadas durante 120 horas, a 35 °C e 150 rpm..... 64

## CAPÍTULO II

**Otimização da produção microbiana de ciclodextrina glicosiltransferase utilizando farinha de mandioca e milhocina como substratos..... 69**

**Fig. 1** Valores observados e preditos pelo sistema para otimização da produção de CGTase (U.mL<sup>-1</sup>) pela cepa SM-02..... 79

**Fig. 2 a** Superfície de resposta da produção de CGTase pela cepa SM-02. **b** Curva de contorno destacando a zona de otimização..... 80

**Fig. 3 a** Efeito da temperatura na atividade de ciclização da CGTase da cepa SM-02. **b** Efeito da temperatura na estabilidade térmica..... 81

**Fig. 4** Efeito do pH na atividade de ciclização da CGTase da cepa SM-02. A atividade da enzima foi mensurada sob condições de ensaio em diferentes valores de pH a 50 mM, na temperatura de 55 °C, na presença de Ca<sup>+2</sup>..... 82

**Fig. 5** Cinética de produção enzimática, crescimento celular, açúcares redutores e proteínas totais em condições otimizadas durante 120 horas, a 35 °C e 150 rpm... 84

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Parâmetros dos viscogramas (*Rapid Visco Analyser*) do amido de araruta comparado com os amidos de mandioca e batata..... 7

**Tabela 2.** Bactérias produtoras de CGTase com sequências genéticas hospedadas no NCBI..... 15

### CAPÍTULO I

**Amido de araruta e milhocina como substratos para produção de ciclodextrina glicosiltransferase por fermentação submersa..... 43**

**Tabela 1.** *Screening* realizado em meio Nakamura e Horikoshi (1976) para seleção de bactérias produtoras de  $\beta$ -CGTase.....51

**Tabela 2.** Matriz do planejamento experimental e valores das variáveis independentes ( $X_1$ : amido de araruta e  $X_2$ : milhocina) usados no DCCR.....53

**Tabela 3.** Efeitos estimados para a produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) utilizando amido de araruta como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio..... 54

**Tabela 4.** Coeficientes de regressão para a produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) utilizando amido de araruta como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio..... 54

**Tabela 5.** Análise de variância (ANOVA) para a produção de ciclodextrina glicosiltransferase utilizando amido de araruta como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio.....55

**Tabela 6.** Caracterização de algumas CGTases produzidas por diferentes isolados..... 61

**Tabela 7.** Efeito de íons metálicos e agentes químicos na atividade de ciclização da CGTase da cepa SM-02..... 62

**Tabela 8.** Produção, rendimento e produtividade de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) pela cepa SM-02 em amido de araruta e milhocina..... 62

## CAPÍTULO II

**Otimização da produção microbiana de ciclodextrina glicosiltransferase utilizando farinha de mandioca e milhocina como substratos ..... 69**

**Tabela 1** Matriz do planejamento experimental e valores das variáveis independentes ( $X_1$  representando as concentrações de farinha de mandioca e  $X_2$  representando as concentrações de milhocina) usados no DCCR..... 77

**Tabela 2** Efeitos estimados para a produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) utilizando farinha de mandioca como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio..... 78

**Tabela 3** Coeficientes de regressão para a produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) utilizando farinha de mandioca como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio..... 78

**Tabela 4** Análise de variância (ANOVA) para a produção de ciclodextrina glicosiltransferase utilizando farinha de mandioca como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio.....79

**Tabela 5** Efeito de íons metálicos e agentes químicos na atividade de ciclização da CGTase da cepa SM-02..... 82

**Tabela 6** Produção, rendimento e produtividade de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) pela cepa SM-02 em farinha de mandioca e milhocina..... 83

## SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Amido.....	3
2.1.1 Amido de araruta.....	6
2.1.2 Farinha de mandioca.....	8
2.2 Ciclodextrina glicosiltransferase.....	9
2.3 Bactérias produtoras de CGTase.....	14
2.4 Ciclodextrinas.....	18
2.4.1 Histórico.....	18
2.4.2 Características gerais.....	19
2.4.3 Aplicações das ciclodextrinas.....	22
2.5 Perspectivas futuras.....	26
3 REFERÊNCIAS.....	26
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	94

### Capítulo I

<b>Amido de araruta e milhocina como substratos para produção de ciclodextrina glicosiltransferase por fermentação submersa.....</b>	<b>43</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>44</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>44</b>
<b>2. Material e métodos.....</b>	<b>46</b>
<b>3. Resultados e discussão.....</b>	<b>50</b>
<b>Agradecimentos.....</b>	<b>64</b>
<b>Referências.....</b>	<b>64</b>

## Capitulo II

<b>Otimização da produção microbiana de ciclodextrina glicosiltransferase utilizando farinha de mandioca e milhocina como substratos.....</b>	<b>69</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>70</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>71</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>72</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>76</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>84</b>
<b>Agradecimentos.....</b>	<b>88</b>
<b>Referências.....</b>	<b>88</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O mercado mundial de enzimas de origem microbiana de interesse industrial e ambiental tem se desenvolvido exponencialmente nos últimos anos. Este fato está diretamente relacionado à grande capacidade destas enzimas de atuar sobre uma imensa variedade de substratos, modificando a estrutura dos mesmos e, desta forma, gerando produtos de maior valor agregado com menor gasto energético, ao mesmo tempo em que gera menor quantidade de resíduos ou subprodutos indesejáveis. Em vista disto, as enzimas microbianas têm sido largamente estudadas e melhoradas, bioquímica e/ou geneticamente, com o intuito de ampliar sua aplicação biotecnológica (GÜBITZ; CAVACO-PAULO, 2003; GÜBITZ; CAVACO-PAULO, 2007).

Inevitavelmente, o sucesso de diversos processos industriais, clínicos e ambientais, do ponto de vista da enzimologia, depende do conhecimento detalhado a respeito do comportamento das enzimas (ASGHER et al., 2008). Em comparação com os métodos químicos convencionais, os processos biotecnológicos que empregam enzimas microbianas exibem características econômicas e operacionais que conferem mais vantagens como menor gasto energético, menor produção de resíduos e menor tempo de operação, por meio de processos fermentativos bem estabelecidos (AEHLE, 2007). Além disso, a engenharia genética dispõe de ferramentas capazes de controlar e modificar os micro-organismos, ampliando a possibilidade de manipular rotas metabólicas, com o objetivo de expandir a utilização de fontes de carbono durante a fermentação, conferindo o aumento da capacidade de produção enzimática (HASUMANA et al., 2012). Neste contexto, a tecnologia enzimática vem ganhando uma nova roupagem desenvolvendo-se em torno de várias pesquisas que seguem desde o domínio das técnicas de fermentações convencionais até os campos mais complexos relacionados à engenharia genética, computacional e proteômica.

Uma vasta gama de enzimas tem sido estudada para fins biotecnológicos, dentre elas, a ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) vem recebendo destaque devido a ampla aplicabilidade do seu principal produto de reação, as ciclodextrinas (CDs).

A CGTase (EC 2.4.1.19) é uma enzima microbiana, responsável por converter o amido em um tipo de açúcar cíclico denominado ciclodextrina, através das reações de ciclização, acoplamento e desproporcionamento (BENDER, 1986; TONKOVA, 1998). Desde que foram acidentalmente descobertas por Villiers, em 1891, as ciclodextrinas vêm sendo frequentemente investigadas. A formação de complexos de inclusão não específicos com uma infinidade de substâncias, que naturalmente têm suas propriedades alteradas durante a fase de complexação, faz das ciclodextrinas excelentes candidatas a diversas aplicações industriais como uma alternativa de melhorar as características físico-químicas das moléculas-hóspedes (VENTURINI et al., 2008). Dentre os campos industriais que têm investido na aplicabilidade das ciclodextrinas destacam-se as indústrias farmacêuticas, alimentícias, têxteis, de cosméticos, de produtos agroquímicos, de bioconversão e fermentação (SINGH et al., 2002; SZENTE; SZEJTLI, 2004; DEL VALLE, 2004; BREWSTER; LOFTSSON, 2007; VENTURINI et al., 2008; ASTRAY et al., 2009; ANDREAUS et al., 2010).

Apesar de várias linhagens de bactérias produtoras de CGTase já terem sido isoladas de diversos ambientes diferentes (FERRAROTTI et al., 1996; TIEN, 2001; KHAIRIZAL, 2002; ALVES-PRADO et al., 2006; MORIWAKI et al., 2007; MENOCCI et al., 2008; ATANASOVA et al., 2008; SEHNEM et al., 2010), solos do Estado da Bahia, Brasil, ainda carecem de estudos voltados para o isolamento de micro-organismos com potencial biotecnológico direcionado à produção desta enzima. Solos de cultivos que contêm amido como a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), araruta (*Maranta arundinacea* L.), milho (*Zea mays* L.), soja (*Glycine max* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], entre outras, provavelmente aumentam as possibilidades de presença de bactérias produtoras de CGTase, conseqüentemente, facilitando o seu isolamento.

Apesar da excelência irrefutável das ciclodextrinas, sua aplicabilidade ainda sofre restrições devido ao alto custo de produção desta enzima e, por esta razão, estudos focando a produção da CGTase a partir do emprego de substratos de baixo custo tornaram-se essenciais. Existe um número relevante de trabalhos que buscam otimizar a atividade da CGTase, estabelecer condições de reação, desenvolver métodos de purificação da enzima e recuperação de ciclodextrinas.

Além disso, pesquisas direcionadas à busca por substratos amiláceos de baixo custo de origem agroindustrial têm sido focadas com o objetivo de baratear o seu custo de produção em escala comercial (KIM et al., 1997; MAHAT et al., 2004; IBRAHIM et al., 2005; ZAIN et al., 2007; Al-NOI et al., 2008). Neste contexto, o amido extraído de tuberosas tropicais como a mandioca e a araruta é um forte candidato a se tornar uma boa fonte de carbono para crescimento de bactérias produtoras de CGTase. São produtos agroindustriais que produzem amido de excelente qualidade, além de conferir a vantagem de ser facilmente obtido com baixo custo. Assim, o presente estudo teve como objetivo otimizar a produção de CGTase pela bactéria SM-02 aplicando Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e superfície de resposta.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Amido

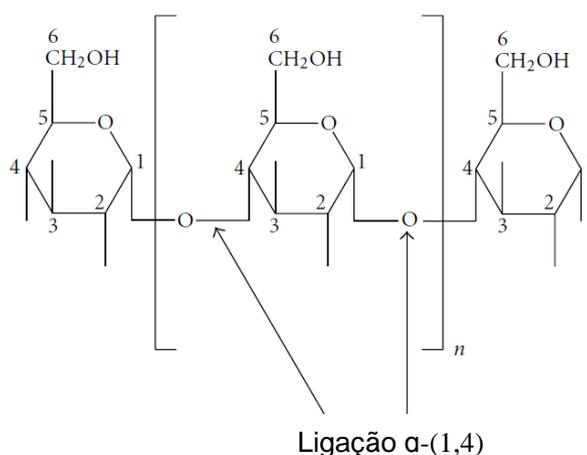
O amido ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub>, polissacarídeo sintetizado nos plastídios de plantas superiores, apresenta-se nos vegetais sob a forma de grânulos intracelulares formados durante a assimilação da fotossíntese, nos quais constituem depósitos de reserva de carboidrato (REGULY, 1996). Possui diversas aplicações industriais que dependem de suas propriedades físico-químicas e funcionais exclusivas, ligadas à origem botânica da qual foi extraído (LEONEL e CEREDA, 2007). Tanto o amido em estado bruto ou nativo quanto o modificado desempenha um papel extraordinário na indústria de alimentos devido às suas propriedades energéticas. Além disso, está envolvido em processos de produção de biomateriais e largamente aplicado nas indústrias cosmética e farmacêutica (FERRARI et al., 2005).

Em sua forma nativa, o amido ainda possui pouca aplicação industrial, limitando-se apenas a agir como agente espessante ou ligante. Entretanto, suas propriedades físico-químicas podem ser facilmente alteradas através de processamentos sofisticados, para que desenvolvam características que atendam às necessidades das indústrias, expandido seu rol de aplicações (JOBLING, 2004). Por outro lado, o modo como geralmente o amido é processado, por meio

do uso de agentes químicos, dificulta a sua comercialização e, subsequente aplicação em alimentos, já que o mercado alimentício reconhece este produto como um aditivo, contradizendo as tendências mundiais de consumo de produtos naturais (FERRARI et al., 2005).

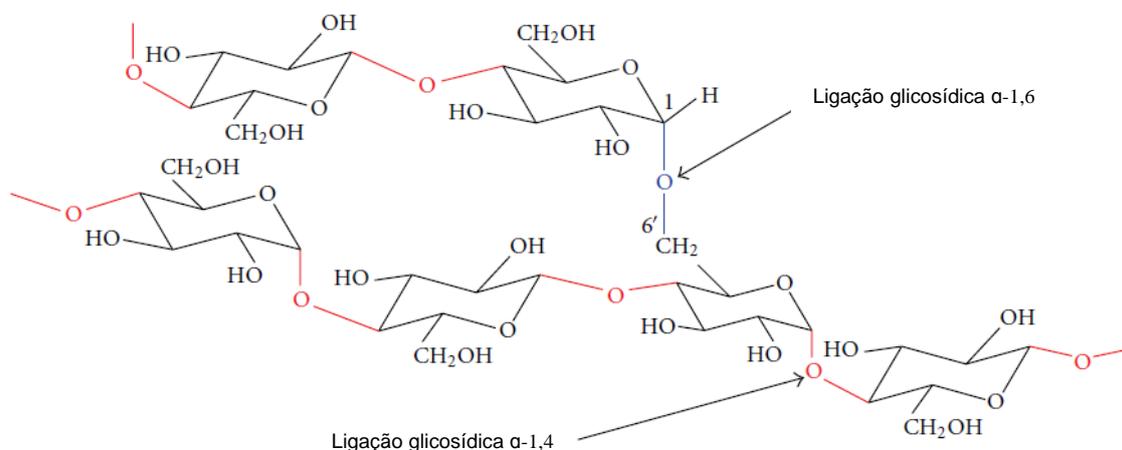
O amido é originado a partir do processamento de sementes, raízes, raizames e tubérculos de diversas plantas tropicais, equivalendo à reserva mais abundante de carboidrato, cerca de 16-24% (HOOVER, 2001; JOBLING, 2004). Destacam-se como principais fontes de amido raízes e tubérculos como mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), batata (*Solanum tuberosum* L.), batata-doce (*Ipomoea batatas* L.), grãos como a soja (*Glycine max* L.) e cereais como o milho (*Zea mays* L.), o arroz (*Oryza sativa* L.) e o trigo (*Triticum aestivum* L.). A possibilidade de extração de amidos de outras fontes menos usuais tem sido estudada devido ao alto teor de amido que apresentam, como é o caso da araruta (*Maranta arundinacea* L.), sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft), gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), inhame (*Dioscorea alata* L.), além de outras fontes (SILVA; CABELLO, 2006; APLEVICZ, 2006; PIRES, 2005; PERONI et al., 2006).

O amido é um polissacarídeo de composição relativamente simples, organizado em um arranjo estrutural composto por dois polímeros, a amilose e a amilopectina. A amilose, que constitui de 14% a 27% da molécula do amido, é um polímero essencialmente linear, solúvel em água, formado por unidades de glicose ligadas entre si por ligações do tipo  $\alpha$ -1,4 (Figura 1).



**Figura 1.** Seção da amilose destacando as ligações do tipo  $\alpha$ -1,4 entre as unidades de glicose.  
Fonte: Madihah et al. (2001).

A amilopectina (Figura 2) constitui a maior parte da composição do amido, 73% a 86%. É formada por inúmeras cadeias curtas de  $\alpha$ -1,4 glicanas ancoradas entre si por ligações do tipo  $\alpha$ -1,6, formando um arranjo altamente ramificado (BOBBIO e BOBBIO, 2001; JOBLING, 2004). A proporção de amilose e amilopectina depende da origem da planta da qual o amido foi extraído (REGULY, 1996; AEHLE, 2007). O amido da mandioca, por exemplo, possui em sua constituição aproximadamente de 16,7 – 20% de amilose e 80 – 83,3% de amilopectina (BOBBIO e BOBBIO, 2001). Já na constituição das raízes de araruta, Leonel et al. (2002) encontraram aproximadamente 24% de amilose e 76% de amilopectina. A porcentagem de amilose e amilopectina é um fator que deve ser considerado durante o processo de formação de ciclodextrinas, pois, segundo Szerman et al. (2007), o alto percentual de amilose em relação à amilopectina interfere drasticamente na formação de ciclodextrinas, levando a baixas taxas de rendimento.



**Figura 2.** Secção da molécula da amilopectina destacando as ligações do tipo  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6. Fonte: Madinah et al. (2001).

A combinação de enzimas amilolíticas que atuam nas ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 é capaz de modificar a estrutura do amido promovendo a sua degradação (VAN DER VEEN et al., 2000a). A ciclodextrina glicosiltransferase é uma das enzimas que possui este modo de atuação, promovendo a hidrólise das ligações

O-glicosídicas e uma subsequente cascata de reações específicas do tipo intra- e intermolecular para a formação da estrutura cíclica da molécula de ciclodextrina.

### 2.1.1 Amido da araruta

A araruta (*Maranta arundinacea*), pertencente à família das marantáceas, é uma planta herbácea perene, originária de regiões tropicais da América Latina, encontrada em florestas venezuelanas, em sua forma nativa (Figura 3a). No Brasil, existe três cultivares de importância econômica: a crioula, a banana e a comum, sendo esta última a mais difundida (LEONEL et al., 2002). Apresenta-se com casca marrom brilhante, escamosa e caules na forma de rizomas fusiformes (Figura 3b), dos quais tufo de raízes são projetados para o exterior, sendo o amido a principal fonte de reserva acumulada em seus rizomas (MONTEIRO e PERESSIN, 2002). De excelente qualidade, o produto vem ganhando o mercado internacional, alcançando preços elevados. Ainda assim, a produção mundial é irrelevante diante de outras culturas que fornecem o mesmo polissacarídeo (FERRARI et al., 2005). Por considerar a importância econômica e a qualidade do amido da araruta, além do fato de que esta espécie botânica vem sofrendo ameaça de extinção, desde 2008 a Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA), vinculada à Secretaria de Agricultura, tem promovido a revitalização da cultura através da produção e distribuição de mudas na região do Recôncavo da Bahia. Somente em 2012, cerca de 150 pequenos agricultores que têm como base de sobrevivência a agricultura familiar foram capacitados na região de Cruz das Almas. O incentivo direcionado ao cultivo da planta tem estimulado a produção da fécula com o objetivo de se elevar a sua comercialização em larga escala, aumentando a competitividade entre agricultores e reduzindo os preços do produto no mercado, que varia em torno de R\$ 15,00 a R\$ 20,00 por quilo de amido (EBDA, 2013).

Ferrari et al. (2005) estudaram o amido da araruta em diferentes estágios de desenvolvimento da planta e concluíram que a idade da cultura interfere na composição físico-química dos rizomas e do polissacarídeo extraído, sendo que plantas de 12 a 14 meses de idade apresentam melhor qualidade do grânulo de amido. Analisando seus rizomas, Leonel et al. (2002) concluíram que estes

apresentam considerável teor de amido, cerca de 84,3%. A composição físico-química, aliada às características viscoamilográficas do amido de araruta o enquadra nos parâmetros de qualidade exigidos pelas indústrias de processamento, tornando-o apropriado para a produção em escala comercial (LEONEL et al., 2002; FERRARI et al., 2005). Características como alta viscosidade de quebra, tornam o amido da araruta pouco resistente à temperatura e ao atrito mecânico e mais propenso ao rompimento. Além disso, a alta viscosidade de pico aumenta a capacidade de retenção de água antes do rompimento dos grânulos (FERRARI et al., 2005). São características que podem facilitar o acesso de enzimas amilolíticas às cadeias de amilose e amilopectina, tornando interessante o uso do amido extraído dos rizomas da araruta em processos fermentativos. As características viscoamilográficas do amido de araruta estão apresentados na Tabela 1, comparado a outros amidos de tuberosas tropicais como a mandioca e a batata.



**Figura 3.** *Maranta arundinacea*. (a) Planta de araruta. (b) Rizomas de araruta. Fonte: ASBRAER.

**Tabela 1.** Parâmetros dos viscogramas (*Rapid Visco Analyser*) do amido de araruta comparado com os amidos de mandioca e batata.

Amido	Viscosidade				Temperatura de pasta (°C)
	Pico	Quebra	Final	Tendência à retrogradação	
Araruta	364,1	237,8	206,2	79,8	67,1
Mandioca	247,8	153,1	169,7	74,9	66,7
Batata	753,6	540,2	261,2	47,8	64,8

Fonte: Leonel et al. (2002).

### 2.1.2 Farinha de mandioca

A família das euforbiáceas engloba uma das culturas mais importantes e tradicionais da agricultura brasileira, a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). É uma planta herbácea largamente cultivada e com diversas finalidades comerciais. O Brasil se enquadra entre os maiores produtores desta cultura, além de se destacar como um dos maiores mercados consumidores. De suas raízes processadas extrai-se o amido como principal produto, popularmente conhecido como fécula, polvilho doce ou goma (Figura 4a). Além deste produto, a farinha de mandioca (Figura 4b) tem importância econômica em diversas regiões brasileiras, em especial, nas regiões Norte e Nordeste (DIAS; LEONEL, 2006; CHISTÉ; COHEN, 2011).

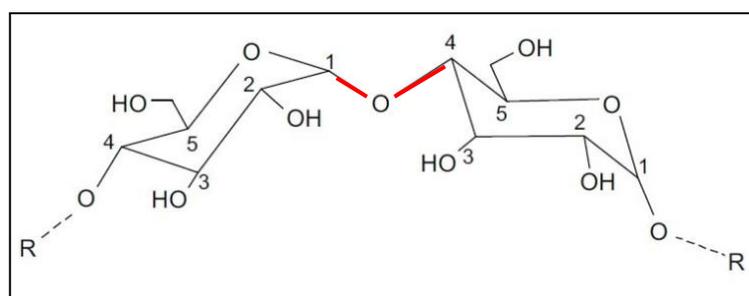
Estudando a composição da farinha comercial obtida de diferentes cultivares da mandioca, Souza et al. (2008) encontraram variações de 8,61 a 12,02% de umidade; 1,60 a 2,71% de fibra alimentar; 0,85 a 2,58% de proteína bruta; 0,21 a 1,91% de lipídios; 0,38 a 0,93% de cinzas e 83,34 a 88,36% de carboidratos totais. As diferenças observadas entre farinhas de mandioca comercializadas ocorrem devido a fatores como genótipo, clima, idade da planta, ponto de colheita, solo, variabilidade genética, matéria-prima e método de processamento das raízes. O elevado teor de amido da farinha de mandioca é considerado um fator interessante em processos fermentativos com enzimas amilolíticas.



**Figura 4.** *Manihot esculenta*. (a) Raízes de mandioca. (b) Farinha de mandioca.

## 2.2 Ciclodextrina glicosiltransferase

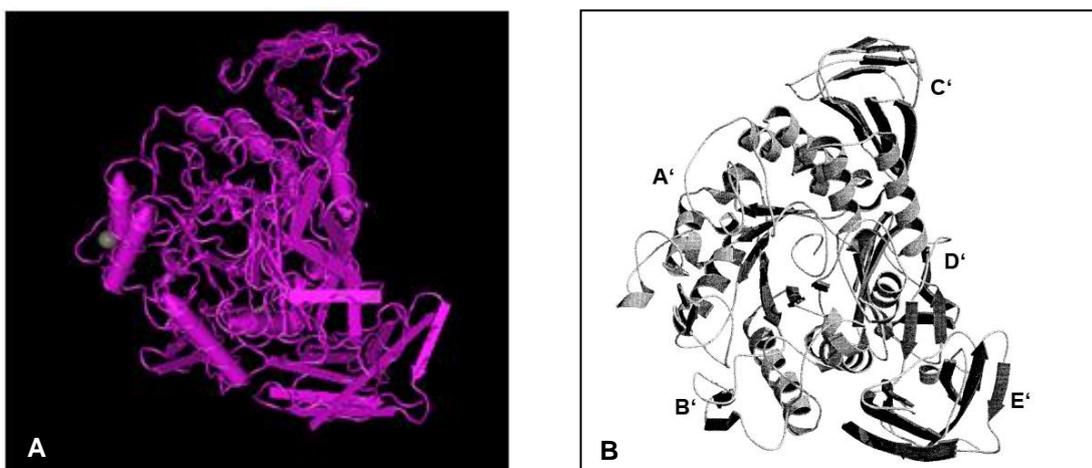
Ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) é uma enzima extracelular que catalisa a hidrólise das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 (Figura 5) e a subsequente reação de transglicosilação intramolecular (ciclização) e intermolecular (desproporcionamento e acoplamento) de  $\alpha$ -1,4-glicanas. A CGTase é uma hexosiltransferase, pertencente ao grupo das transferases e da superfamília 13 das  $\alpha$ -amilases (STAM et al, 2006). Dentro deste grupo, existem poucas enzimas transferases e a CGTase é a mais conhecida, sendo classificada juntamente com outros membros da família  $\alpha$ -amilase devido à sua atividade hidrolítica, ainda que seja fraca (JANECEK, 1997). Todos os membros desta família compartilham características comuns, tais como: (i) atuam em ligações O-glicosídicas, produzindo mono ou oligossacarídeos  $\alpha$ -anoméricos a partir da ação de hidrólise e/ou formando novas ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4 ou  $\alpha$ -1,6 por meio da reação de transglicosilação; (ii) apresentam uma estrutura  $(\beta/\alpha)_8$ -barril; (iii) apresentam uma sequência primária com quatro regiões altamente conservadas, contendo todos os aminoácidos essenciais para a catálise; (iv) apresentam três grupos de ácidos carboxílicos, sendo um resíduo de ácido glutâmico (Glu) e dois resíduos de ácido aspártico (Asp), os quais são essenciais à catálise (VAN DER MAAREL et al., 2002; JANECEK, 2002).



**Figura 5.** Ligações O-glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4 (em vermelho). Fonte: Astray et al. (2009).

A primeira estrutura em 3D da CGTase, revelou que esta é uma enzima com multidomínios, demonstrados na Figura 6 (KLEIN; SCHULZ, 1991; LEEMHUIS et al., 2010). Dos três domínios catalíticos comuns apresentados por todos os membros da família  $\alpha$ -amilase, um deles encontra-se em uma dobra altamente simétrica de oito fitas  $\beta$  paralelas. Estão organizadas em forma tubular

e cercadas por oito  $\alpha$ -hélices, dobradas dentro de uma estrutura característica de  $(\beta/\alpha)_8$ -barril, chamado domínio A. É o domínio mais conservado da família  $\alpha$ -amilase e apresenta cerca de 300 a 400 aminoácidos. Das oito  $\alpha$ -hélices identificadas, sete regiões são de sequências conservadas nomeadas de I a VII e, apesar disso, a similaridade entre as enzimas que fazem parte da família  $\alpha$ -amilase é menor que 30%. As regiões mais conservadas entre as sete são I, II, III e IV, localizadas nas fitas  $\beta_3$ ,  $\beta_4$ ,  $\beta_5$  e  $\beta_7$  (MacGREGOR et al., 2001; JANECEK, 2002).



**Figura 6.** Estrutura da ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). (A) CGTase termoestável de *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1. (B) Modelo que ilustra a estrutura  $(\beta/\alpha)_8$ -barril da CGTase: (A') domínio catalítico  $(\beta/\alpha)_8$ ; (B') pode estar envolvido com a ligação do  $\text{Ca}^{2+}$ ; (C', D' e E') são domínios antiparalelos, onde E' representa o módulo de ligação ao substrato. Fonte: NCBI (2011); MacGregor et al. (2001).

As quatro regiões mais conservadas das fitas  $\beta$  do domínio A contêm resíduos de aminoácidos que permanecem os mesmos nos diferentes membros da família das  $\alpha$ -amilases, com diferentes funções investigadas por meio de cristalografia de raios-X, mutações sítio dirigidas e modificações químicas. Nas  $\alpha$ -amilases e CGTases são encontrados um ácido glutâmico e dois ácidos aspárticos, considerados essenciais para a atividade catalítica. Na  $\alpha$ -amilase de *Aspergillus oryzae* são encontrados Glu230, Asp206 e Asp297. Em CGTase de *Bacillus circulans* cepa 251 são encontrados Glu257, Asp229 e Asp328. Os aminoácidos Asp206 e Glu230 desempenham papel indispensável no caráter básico e ácido, respectivamente, durante a catálise. Já as possibilidades de Asp297 atuarem no caráter ácido são reduzidas. No entanto, em *Bacillus circulans* cepa 251, o equivalente a Asp297 está envolvido na ligação ao

substrato e pode ser o responsável por manter o equilíbrio do grupo carboxílico protonado de Glu230 em pHs elevados. Em CGTase, dois resíduos conservados de histidina (His140 e His327) estão envolvidos na ligação ao substrato. Além disso, outra histidina presente em algumas  $\alpha$ -amilases e CGTases (His233) é também responsável pela ligação do substrato e atua como um ligante de  $\text{Ca}^{+2}$ , assim como o Asn139 (JANECEK, 1997).

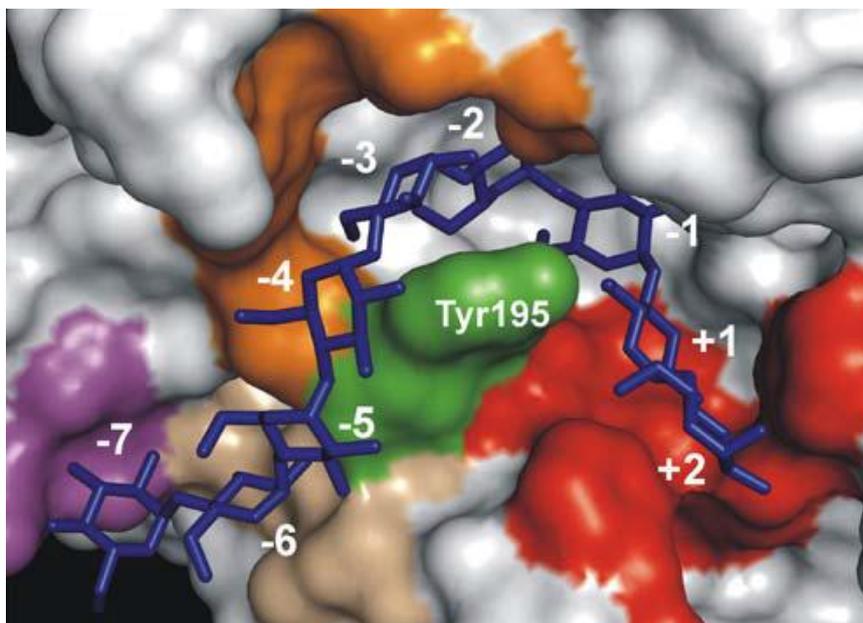
Portanto, as regiões de I a IV, que constroem o domínio A, carregam resíduos de aminoácidos bastante conservados, localizados no sítio ativo ou próximos a ele, atuando diretamente na clivagem da ligação glicosídica, ligação ao substrato, estabilização do estado de transição e na ligação do  $\text{Ca}^{+2}$ . A especificidade do tipo de ligação  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 é uma responsabilidade das regiões II e III. A região V, no domínio B, contém o resíduo Asp199, um dos mais conservados envolvidos na ligação do cálcio na família  $\alpha$ -amilase. As regiões VI e VII estão envolvidas com a especificidade da enzima, embora sua importância seja pouco conhecida (JANECEK, 2002).

Uma sequência composta de 44 a 133 aminoácidos constitui o domínio B. Está localizado entre a terceira fita  $\beta$  e a terceira  $\alpha$ -hélice do  $(\beta/\alpha)_8$ -barril e o seu tamanho e estrutura variam de acordo com cada membro da família. Forma grande parte da ligação com o substrato, oferece flexibilidade à molécula e acredita-se que esteja ligado à especificidade do substrato. Os aminoácidos envolvidos na estrutura de ligação do cálcio, importante para a manutenção da estabilidade da estrutura requerida para a catálise, estão presentes neste domínio (JANECEK et al., 1997).

O domínio C constitui a região C-terminal, formado por uma fita  $\beta$  interna e antiparalela contendo um motivo do tipo chave-grega, que auxilia na estabilização do domínio catalítico e na ligação com o substrato. Além dos domínios comuns a todos os membros da família  $\alpha$ -amilase, a CGTase possui mais dois domínios, D e E, ambos localizados na porção C-terminal, muito variáveis na família  $\alpha$ -amilase. A função do domínio D ainda não está elucidada (PENNINGA, 1996). Entretanto, o domínio E está relacionado ao módulo de ligação ao carboidrato (LEEMHUIS et al., 2010; MÓTYÁNA et al., 2011).

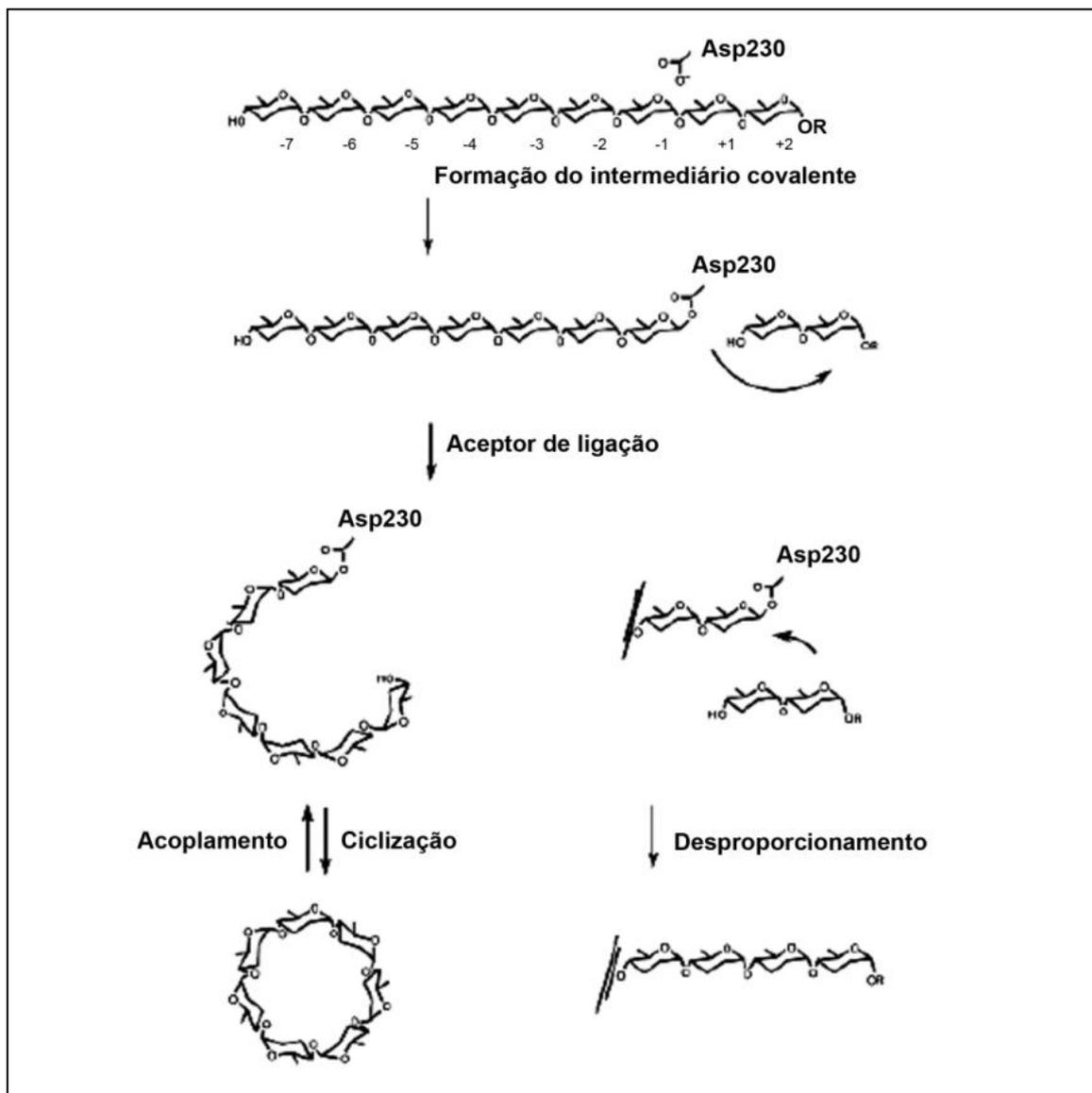
O mecanismo catalítico da CGTase é constituído por subsítios responsáveis pela ligação do açúcar, resultante da cadeia de aminoácidos

localizada entre os *loops* das fitas  $\beta$  e  $\alpha$ -hélice do domínio A. Uma unidade de glicose proveniente do substrato interage com cada um desses subsítios (Figura 7), através de pontes de hidrogênio com grupos hidroxila da glicose ou por interações hidrofóbicas.



**Figura 7.** Ilustração criada com PyMOL representando a ligação do substrato no sítio ativo da CGTase de *Bacillus circulans* 251. Verde: resíduo do aminoácido Tyr195; vermelho: subsítios +1 e +2; laranja: subsítio -3; branco: subsítio -6; e roxo: subsítio -7. Fonte: DeLano (2002).

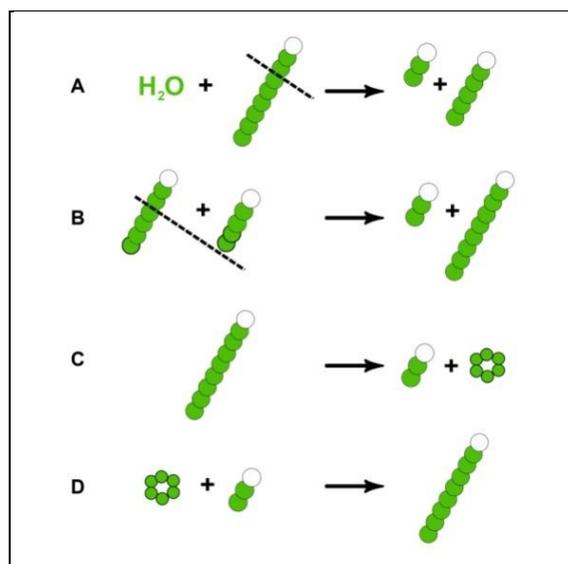
A Figura 8 é uma representação esquemática das reações de transglicosilação catalisadas pela CGTase para a formação de uma molécula de  $\beta$ -ciclodextrina. Estudos cinéticos revelaram que a ligação ao substrato ocorre por meio de um sulco formado na superfície da enzima, constituído pelos domínios A e B, que acomoda até 7 resíduos de glicose no subsítio doador e 3 resíduos no subsítio receptor. A clivagem da cadeia de açúcar ocorre entre os subsítios +1 e -1. O número e a constituição dos subsítios estão atrelados às diferenças na especificidade ao produto da enzima e são responsáveis pelos tipos de ciclodextrinas formadas (MacGREGOR et al., 2001; LEEMHUIS et al., 2003; LEEMHUIS et al., 2010).



**Figura 8.** Representação esquemática das reações de transglicosilação catalisadas pela CGTase: formação de uma molécula de  $\beta$ -ciclodextrina. No primeiro passo da reação, um Asp é ligado covalentemente no sítio de clivagem, formando um oligossacarídeo intermediário. Em seguida, esse oligossacarídeo é transferido para uma molécula receptora. Fonte: Leemhuis et al. (2003).

Obtida de diversas linhagens de bactérias, a CGTase é a única que tem a capacidade de converter o amido em uma mistura de açúcares não redutores denominados ciclodextrinas, além de açúcares lineares e dextrinas, sendo que a composição relativa dessa mistura depende da origem da enzima (GASTÓN et al., 2012). Para a conversão em ciclodextrinas, outros polissacarídeos como dextrinas, amilose e amilopectina podem ser utilizados como substrato (MacGREGOR et al., 2001).

Além da reação de hidrólise, a CGTase modifica a molécula de amido e a converte em ciclodextrinas através de três reações sincronizadas, diferentemente de outras enzimas que também fazem parte da família  $\alpha$ -amilase, que apenas hidrolisam (Figura 9). Após catalisar a hidrólise das ligações glicosídicas, a CGTase promove uma reação de *desproporcionamento*, onde um maltooligossacarídeo é clivado e transferido para um substrato receptor linear. A *ciclização* promove a clivagem de uma ligação glicosídica e subsequente formação de ciclodextrinas, moléculas cíclicas compostas por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4. A reação de *acoplamento* é inversa à *ciclização*, onde ocorre a clivagem de uma ligação glicosídica de uma ciclodextrina e, em seguida, o maltooligossacarídeo linear resultante é transferido para um substrato receptor



**Figura 9.** Reações de transglicosilação da ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). Esferas verdes representam resíduos de glicose. Esferas brancas representam as extremidades reductoras. (A) Hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4; (B) desproporcionamento; (C) ciclização; (D) acoplamento. Fonte: Qi et al. (2004).

### 2.3 Bactérias produtoras de CGTase

A produção de CGTase tem sido estudada em inúmeras linhagens de bactérias, sendo identificada predominantemente em espécies do gênero *Bacillus*. Qi e Zimmermann (2005) realizaram uma análise genética de alinhamentos sequenciais com 31 cepas produtoras de CGTase, entre elas, 5 candidatas à

produção da enzima, depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information). Elas demonstraram uma similaridade entre CGTases de origens diferentes de 47 a 99% (Tabela 2). O alinhamento indicou a presença de 51 resíduos de aminoácidos completamente conservados. Estão localizados principalmente nas cinco regiões mais conservadas entre os membros da família das  $\alpha$ -amilase (regiões I, II, III e IV, do domínio A e região V, localizada no *loop* 3 do domínio B).

**Tabela 2.** Bactérias produtoras de CGTase com sequências genéticas hospedadas no NCBI.

Origem	Nº de Acesso	Tipos	Referência
<i>Bacillus</i> sp. 1.1 alcalofílico	P31746	$\beta$	Schmid et al. (1988)
<i>Bacillus</i> sp. 1011 alcalofílico	P05618	$\beta$	Kimura et al. (1987)
<i>Bacillus</i> sp. 17.1 alcalofílico	P30921	$\beta$	Kaneko et al. (1989)
<i>Bacillus</i> sp. 38.2 alcalofílico	P09121	$\beta$	Hamamoto et al. (1987)
<i>Bacillus</i> sp. KC201 alcalofílico	BAA02380	$\beta$	Kitamoto et al. (1992)
<i>B. agaradhaerens</i> DSM8721	CAD23265	$\beta$	Jorgensen; Fulgsang (2002)
<i>B. agaradhaerens</i> DSM9948	CAD38091	$\beta$	Maurer et al. (2002)
<i>B. agaradhaerens</i> LS-3C	AY251462	$\beta$	Martins et al. (2003)
<i>B. circulans</i> 251	P43379	$\beta$	Lawson et al. (1994)
<i>B. circulans</i> 8	P30920	$\beta$	Nitschke et al. (1990)
<i>B. clarkii</i> 7384	BAB91217	$\gamma$	Takada et al. (2003)
<i>B. firmus</i> 290-3	CAA01436	$\gamma/\beta$	Englbrecht et al. (1988)
<i>B. lichenfomis</i>	P14014	$\alpha/\beta$	Hill et al. (1990)
<i>B. macerans</i>	P31835	$\alpha$	Takano et al. (1986)
<i>B. macerans</i> NRRL B388	P04380	$\alpha$	Fujiwara et al. (1992)
<i>B. obhensis</i>	P27036	$\beta$	Sin et al. (1991)
<i>B. stearothermophilus</i> NO2	P31797	$\alpha/\beta$	Fujiwara et al. (1992)
<i>Bacillus</i> sp. 1018	S09196	$\beta$	Itkor et al. (1990)
<i>Bacillus</i> sp. 6.6.3	P31747	$\beta$	Akhmetzjanov et al. (1992)
<i>Bacillus</i> sp. A11	AAG31622	$\beta$	Rimphanitchayakit et al. (2000)
<i>Bacillus</i> sp. A2-5 <sup>a</sup>	BAA31539	$\beta$	Ohdan et al. (2000)
<i>Brevibacillus brevis</i> CD162	AAB65420	$\gamma/\beta$	Kim et al. (1998)
<i>K. pneumoniae</i> M5a1	P08704	$\alpha$	Binder et al. (1986)
<i>Nostoc</i> sp. 9229 <sup>a</sup>	AAM16154	-	Wouters et al. (2003)
<i>Streptococcus pyogenes</i> <sup>a</sup>	NP269428	-	Ferretti et al. (2001)
<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	BAB78538	$\alpha/\beta$	Rashid et al. (2002)
<i>Thermoanaerobacter</i> sp. ATCC 53.627	Z35484	$\alpha/\beta$	Joergensen et al. (1997)
<i>Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes</i> EM1	P26827	$\alpha/\beta$	Wind et al. (1995)
<i>Thermococcus</i> sp. B1001	BAB18101	$\alpha$	Hashimoto et al. (2001)
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citr</i> <sup>a</sup>	NP642909	-	da Silva et al. (2002)
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> <sup>a</sup>	NP637817	-	da Silva et al. (2002)

<sup>a</sup> Bactérias supostamente produtoras de ciclodextrina glicosiltransferase. Fonte: QI e Zimmermann (2005).

Outras linhagens foram caracterizadas como produtoras de CGTase. *Micrococcus* sp. ATCC 31606 isolado por Starnes (1990), *Micrococcus luteus*, *Micrococcus varians* (ABELYAN et al., 1995), *Klebsiella oxytoca* 19-1 (LEE et al., 1992), *Brevibacterium* sp. n° 9605 (MORI et al., 1994, 1995), *Paenibacillus pabuli* (JEMLI et al., 2007), *Paenibacillus* F8 (LARSEN et al., 1998) e anaeróbias termoalcalofílicas como *Anaerobranca gottschalkii* (THIEMANN et al., 2004). No Brasil, já foram relatadas como produtoras da enzima *Bacillus lentus* por Sabioni e Park (1992), *Bacillus circulans* n° 76 por Salva et al. (1997), e as linhagens n° 37 e n° 41 por Matioli et al. (1998), *Bacillus alkalophilic* CGII por Freitas et al. (2004), entre outras.

Atanasova et al. (2011) estudaram a produção da CGTase do *Bacillus pseudocaliphilus* 20RF, isolado de solos de cultivo de arroz da Bulgária. Em meio basal (NAKAMURA; HORIKOSHI, 1976) a atividade enzimática do extrato bruto foi equivalente a 74,14 U.mL<sup>-1</sup> e atividade específica de 459,6 U.mg<sup>-1</sup>. Após purificação por ultrafiltração houve aumento da sua atividade para 406,98 U.mL<sup>-1</sup> e específica para 924,9 U.mg<sup>-1</sup>. Resultados ainda mais interessantes foram obtidos após purificação por adsorção do amido que rendeu uma atividade de 751,33 U.mL<sup>-1</sup> e específica de 8348,1 U.mg<sup>-1</sup>. A enzima demonstrou eficácia durante a conversão do amido bruto em ciclodextrinas do tipo β- e γ- em amplas faixas de pH variando entre 5,0 e 10,0 e temperaturas de 60 – 70 °C. A CGTase demonstrou estabilidade significativa na presença de diferentes íons metálicos e reagentes a 15 mM após 30 minutos de incubação a 25 °C. De acordo com os autores, a alta conversão de amido bruto de milho comercial em ciclodextrinas equivalente a 47% pela CGTase do *B. pseudocaliphilus* 20RF faz desse micro-organismo um excelente candidato à produção industrial de β- e γ-ciclodextrinas.

Mahat et al. (2004) otimizaram a produção da CGTase produzida por *Bacillus* sp. TS1-1 utilizando delineamento composto central rotacional verificando a influência de amido extraído de sorgo, extrato de levedura, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. As variáveis MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> não tiveram efeito significativo sobre a atividade da enzima. Uma atividade enzimática equivalente a 84,32 U.mL<sup>-1</sup> foi obtida em um segundo planejamento fatorial realizado do tipo 2<sup>2</sup> utilizando 1,48% (p/v) de amido de sorgo e 1,89% (p/v) de extrato de levedura.

Ibrahim et al. (2005) otimizaram o meio de produção de *Bacillus* cepa G1 isolado de solos da Turquia por Tien (2001) com 4% de amido de tapioca, 2% de peptona, 0,04% de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e 1% de  $Na_2CO_3$  e concluíram que sua CGTase produzia alta atividade equivalente a  $54,90 \text{ U.mL}^{-1}$ .

Gawande et al. (1999) estudaram a produção de CGTase produzida por *Klebsiella pneumoniae* cepa AS-22. Durante as fermentações, a otimização dos diferentes parâmetros de funcionamento, tais como temperatura, pH, velocidade de agitação, e concentração da fonte de carbono resultou em um aumento na atividade de CGTase em mais de 6 vezes. Utilizando uma alimentação à base de glucose para aumentar a densidade celular, seguida por alimentação à base de amido para induzir a produção da enzima resultou em alta densidade celular de 76 g de peso celular seco por litro, embora a produção de CGTase tenha sido baixa. Quando a alimentação foi realizada com dextrina, houve uma produção de CGTase 20 vezes mais elevada em relação às fermentações com meios contendo amido de tapioca. Após 28 horas de fermentação, a produção enzimática de  $21,4 \text{ U.mL}^{-1}$  foi alcançada em meio constituído de  $49,3 \text{ g.L}^{-1}$  de dextrina,  $20,6 \text{ g.L}^{-1}$  de peptona,  $18,3 \text{ g.L}^{-1}$  de extrato de levedura,  $6,7 \text{ g.L}^{-1}$  de dihidrogeno-O-fosfato de amônio e  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de sulfato de magnésio.

Pinto et al. (2007) estudaram a produção de CGTase produzida por *Bacillus circulans* ATCC 21783 utilizando parâmetros otimizados através da metodologia estatística de planejamento experimental e de superfície de resposta. A produção foi avaliada utilizando-se cultivos submersos, batelada, batelada alimentada e cultivo semi-sólido. A atividade máxima de CGTase foi obtida nos cultivos em batelada, aproximadamente  $1155 \text{ U.mL}^{-1}$ , em aerobiose. Além disso, foi observado que fluxo de ar e agitação são condições que influenciam acentuadamente a produção da enzima, obtendo-se alta produtividade, com velocidade de agitação de 400 rpm e 1,7 vvm para fluxo de ar.

A alta produtividade de CGTase depende das diferentes condições de cultivo que variam de acordo com o tipo de micro-organismo estudado. O conhecimento dos parâmetros ideais de cultivo como temperatura, pH, concentração dos substratos, velocidade de agitação e fluxo de ar torna-se o viés mais adequado para se otimizar o sistema de produção, alcançando alta produtividade enzimática.

## 2.4 Ciclodextrinas

### 2.4.1 Histórico

A descoberta acidental de cristais de carboidrato em meio de cultura conduziu à descoberta da CGTase, única enzima capaz de converter o amido em maltooligossacarídeos cíclicos denominados ciclodextrinas. Estes açúcares foram descobertos por Villiers, em 1891 quando, além da formação de um material cristalino a partir de dextrinas, uma pequena quantidade de cristais de carboidrato também se formava a partir da digestão do amido, em álcool (VENTURINI et al., 2008).

“[...] é formado em quantidades muito pequenas (cerca de 3 g/Kg de amido) um carboidrato no qual forma lindos cristais que irradiam após poucas semanas no álcool no qual as dextrinas foram precipitadas... tendo à composição representada pela fórmula  $(C_6H_{10}O_6).3H_2O$  [...]” (VILLIERS, 1891).

Na época, atribuiu-se à *Bacillus amylobacter* esta capacidade de conversão. Porém, diversos autores concordam que provavelmente Villiers havia utilizado uma cultura contaminada com *Bacillus macerans*, o que teria possibilitado a conversão do amido em ‘celulosina’, como havia sido chamadas as ciclodextrinas por Villiers (VILLIERS, 1981). Embora tenham sido apontadas no trabalho pioneiro de Villiers, as ciclodextrinas foram descritas primeiramente pelo microbiologista austríaco Franz Schardinger, em 1903, que descreveu detalhadamente o processo de separação e isolamento (SCHARDINGER, 1903).

Em 1911, Schardinger descreveu uma cepa nomeada *Bacillus macerans* isolada por ele em 1904, com capacidade de produzir acetona e álcool etílico a partir de açúcar e amido contidos em material de origem vegetal. A cepa em questão produzia altas quantidades de dextrinas cristalinas a partir da digestão do amido, cerca de 25-30%. Através de reações com iodo, Schardinger observou que o material cristalino formado possuía diferenças, embora fossem estruturalmente semelhantes, denominando-as de “ $\alpha$ -dextrina cristalizada” e “ $\beta$ -dextrina cristalizada”. Em 1935, uma terceira classe de dextrinas havia sido

isolada, denominada “ $\gamma$ -dextrina cristalizada” (EASTBURN; TAO, 1994; BREWSTER; LOFTSSON, 2007; VENTURINI et al., 2008).

O período áureo para o estudo das ciclodextrinas, considerado por French (1957) como o período de maturação, ocorreu entre os anos de 1935 e 1950, destacando-se os trabalhos de Freudenberg apoiado por seu grupo de pesquisa. Em 1942, as estruturas cíclicas das  $\alpha$ -ciclodextrina e  $\beta$ -ciclodextrina foram determinadas por cristalografia de raios-X. Em 1948, a estrutura da  $\gamma$ -ciclodextrina foi determinada e houve a descoberta de que ciclodextrinas possuem a capacidade de formar complexos de inclusão com uma infinidade de substâncias. Segundo Venturini et al. (2008), ao final da década de 60 a produção de ciclodextrinas foi ampliada em escala laboratorial graças ao domínio do método de separação, estudos mais aprofundados a respeito de sua estrutura, propriedades físico-químicas e mecanismo de formação de complexos de inclusão. Somente a partir do acúmulo destas informações é que suas possíveis aplicabilidades industriais foram elucidadas.

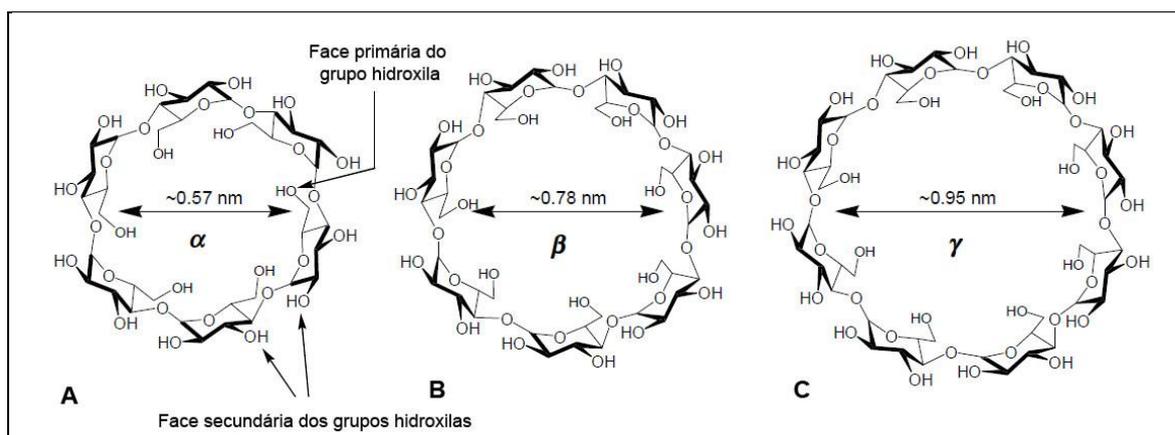
Até a década de 90, o custo de produção das ciclodextrinas era relativamente alto e dispendioso em escala industrial, principalmente em relação à  $\alpha$ -ciclodextrina e  $\gamma$ -ciclodextrina que exigem um método de purificação complicado que torna o processo mais caro do que o empregado na purificação da  $\beta$ -ciclodextrina (LEE et al., 1992). Atualmente, o custo de produção tornou-se mais acessível após estudos toxicológicos adequados terem desmentido a pretensa toxicidade das ciclodextrinas a seres humanos o que motivou um aumento maciço das investigações neste campo de pesquisa (VENTURINI et al., 2008). Este fato impulsionou à exploração de novos ambientes, à busca pela descoberta de novos micro-organismos produtores da enzima, novas rotas de produção de CGTase através da Engenharia Genética e sua otimização a partir da seleção de substratos que ampliam a produção preferencialmente a baixo custo.

#### 2.4.2 Características gerais

As ciclodextrinas são maltooligossacarídeos não-redutores, cujo arranjo estrutural é composto de 6, 7 e 8 unidades de glicopiranosil unidas por ligações do tipo  $\alpha$ -1,4 formando estruturas cíclicas denominadas  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -ciclodextrina

(Figura 10), respectivamente, havendo a possibilidade rara de formar complexos estruturais com até 13 unidades de glicose (TERADA et al., 1997; COSTA et al., 2007; LEEMHUIS et al., 2010). Quantidades vestigiais de glicanas cíclicas maiores já foram detectadas em misturas reacionais durante a conversão do amido em ciclodextrinas (TERADA et al., 1997). Em condições normais de temperatura, pH e fonte nutrientes, a  $\beta$ -ciclodextrina é geralmente produzida em quantidade superior ao tipo alfa e, em quantidade ainda maior do que a espécie gama, raramente produzida com altos rendimentos (MATIOLI et al., 2000; GAWANDE e PATKAR, 2001).

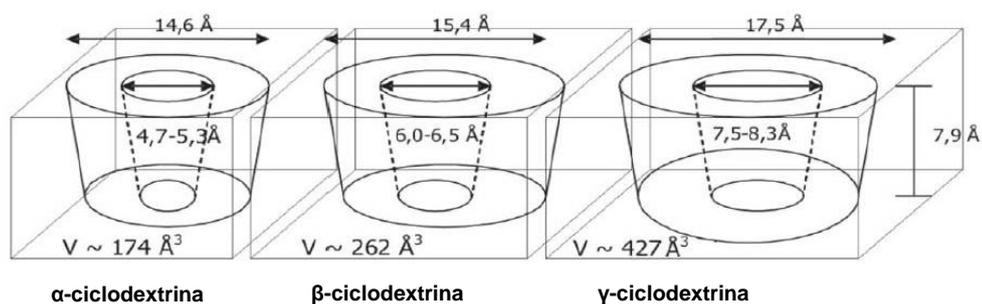
A produção de ciclodextrinas a partir da hidrólise do amido por algumas linhagens de bactérias e arqueas é uma das estratégias de sobrevivência do micro-organismo frente às adversidades do ambiente. Parece ser uma maneira eficiente de estocar energia na forma de unidades de glicose para ser eventualmente utilizada em fases de escassez de nutrientes. Presumivelmente excretam CGTase para monopolizar o amido do meio a partir da sua conversão em ciclodextrinas, uma vez que não podem ser utilizadas posteriormente por outros micro-organismos já que não possuem mecanismos bioquímicos adequados para a degradação da molécula cíclica, assim, reduzindo a competição entre estes micro-organismos (HASHIMOTO et al., 2001).



**Figura 10.** Estruturas das ciclodextrinas. (A)  $\alpha$ -ciclodextrina contendo seis unidades de glicose. (B)  $\beta$ -ciclodextrina contendo sete unidades de glicose. (C)  $\gamma$ -ciclodextrina contendo oito unidades de glicose. Fonte: Van Der Veen et al. (2000b).

As estruturas das ciclodextrinas foram reveladas com base em cristalografia de raios-X no estado sólido e por estudos de ressonância magnética nuclear (RMN) em solução. Sua forma cíclica assemelha-se a um cone truncado com cavidade de 7,9 Å de profundidade. Medidas dos diâmetros superior e inferior dependem do tipo de ciclodextrina formada. O tipo  $\alpha$ - possui diâmetros de 4,7 e 5,3 Å, o tipo  $\beta$ - possui diâmetros de 6,0 e 6,5 Å e diâmetros de 7,5 e 8,3 Å foram observados na  $\gamma$ -ciclodextrina demonstrados na Figura 11 (VENTURINI et al., 2008). O número de unidades de glicose que compõe a estrutura das ciclodextrinas determina o tamanho da cavidade interior apolar e quanto maior for esta cavidade hidrofóbica maior será a sua capacidade de permitir a complexação de componentes orgânicos hidrofóbicos maiores de interesse industrial, modificando as características químicas e físicas das mesmas (DEL VALLE, 2004). Portanto, a maior extensão da cavidade contendo unidades de glicose confere à  $\gamma$ -ciclodextrina a vantagem de permitir maiores complexos de inclusão superior à capacidade da  $\alpha$ - e da  $\beta$ -ciclodextrina. Esta parece ser a característica industrialmente mais atrativa das ciclodextrinas do tipo gama.

Ciclodextrinas encontradas naturalmente na natureza são a base para aquelas que são modificadas com a finalidade de atenderem as exigências dos diversos setores da indústria (KHAN et al., 1998). Sofrem modificações induzidas a fim de se obter características melhoradas como potencial de carreamento de fármacos, solubilidade em água, amenização dos possíveis efeitos tóxicos, aumento da fixação permanente da ciclodextrina sobre superfícies poliméricas como fibras de algodão, papel ou outros polímeros naturais e sintéticos e, principalmente, possibilitar uma maior complexação de moléculas hóspedes. As modificações diminuem as interações entre as moléculas de ciclodextrinas aumentando a solubilidade em água e em diferentes solventes orgânicos, característica amplamente desejada em diversos setores industriais (ANDREAUS et al., 2010). Ciclodextrinas metiladas e hidroxipropiladas são os exemplos mais recorrentes na literatura.



**Figura 11.** Dimensões das ciclodextrinas naturais  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Fonte: Astray et al. (2009).

### 2.4.3 Aplicações das ciclodextrinas

Moléculas orgânicas apolares ou que tenham extremidade apolar tendem a ser incorporadas como moléculas hóspedes na cavidade das ciclodextrinas, resultando em um complexo cuja característica principal é a alta solubilidade em água. Porém, o requisito fundamental para que haja a formação do complexo de inclusão relativamente não específico entre a ciclodextrina e uma molécula hóspede é a compatibilidade entre o tamanho da cavidade e da dimensão da molécula a ser complexada ou de parte da mesma (VENTURINI et al., 2008; ANDREAUS et al., 2010). Portanto, o ajuste espacial é o princípio que rege a complexação.

O reconhecimento molecular envolve interações não covalentes, relacionado a pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals, interações eletrostáticas, efeito hidrofóbico, interações dipolo-dipolo e transferências de cargas (REKHARSKY et al., 1998). Quanto ao fenômeno de complexação, o tamanho da cavidade da ciclodextrina define o tipo de molécula a ser hospedada em seu interior. Segundo Venturini et al. (2008) a  $\alpha$ -ciclodextrina exige que a molécula hóspede seja tão pequena quanto à sua cavidade para que a mesma se ajuste perfeitamente. Já a  $\beta$ -ciclodextrina exige moléculas de tamanhos um pouco maiores. No caso da  $\gamma$ -ciclodextrina, composta por oito unidades de glicose, podem formar complexos de inclusão com mais de uma molécula hóspede.

Diversos estudos sistemáticos têm sido realizados com vários compostos que são capazes de formar complexos de inclusão com as ciclodextrinas naturais como alcoóis alifáticos (GARCÍA-RÍO et al., 2005; CABALEIRO-LAGO et al,

2006), ácidos (GADOSY et al., 2000), aminoácidos (TEE et al., 1997), cetonas (IGLESIAS, 2003) e surfactantes (DORREGO et al., 2000; FERNÁNDEZ et al., 2000; GARCÍA-RÍO et al., 2004). Estes são apenas alguns destaques da vasta gama de moléculas de interesse industrial que são capazes de interagir com ciclodextrinas.

A propriedade destes maltooligossacarídeos cíclicos de encapsular moléculas hóspedes hidrofóbicas tende a promover mudanças físicas e químicas na estrutura das mesmas, capacidade que confere a estas moléculas características vantajosas como: (i) estabilização da sensibilidade das substâncias à luz ou ao oxigênio; (ii) modificação da reatividade química de moléculas hóspedes; (iii) fixação de muitas substâncias voláteis; (iv) aumento da solubilidade e, (v) capacidade de mascarar cheiros e sabores indesejáveis em alimentos (DEL VALLE, 2004). Devido às características citadas, as ciclodextrinas podem ter inúmeras aplicações biotecnológicas.

Na indústria alimentícia diversos estudos têm sido realizados focando o emprego de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão com uma infinidade de substâncias como lipídios, moléculas ligadas ao sabor, aroma e pigmento, além de atuarem como aditivos alimentares (SZENTE e SZEJTLI, 2004; CRAVOTTO et al., 2006; BLANCH et al., 2007; ASTRAY et al., 2010). Sua aplicação é recomendada em processamento de alimentos com finalidades diversas: (i) confere proteção aos componentes lipofílicos contra o oxigênio, luz, calor e volatilidade; (ii) redução de odores e sabores indesejáveis; (iii) aceleração e estabilização do processo de emulsão; (iv) promoção de dissolução de corantes e vitaminas; (v) estabilização de vitaminas e óleos essenciais contra alterações (ASTRAY et al., 2009). Países como Bélgica, França, Alemanha, Japão, Holanda, Espanha, África do Sul, Coréia do Sul e Hungria utilizam legalmente ciclodextrinas na indústria alimentícia. Nos Estados Unidos, produtos como gelatinas, pudins, cafés, chás e cereais matinais levam ciclodextrinas em sua composição como transportadoras de moléculas ligadas ao sabor e seu uso é considerado seguro pelo Generally Recognized as Safe (GRAS) (CYCLOLAB, 2012).

Na indústria farmacêutica, estudos recentes de Rosa dos Santos et al. (2009) e Macedo et al. (2012) indicam que ciclodextrinas têm demonstrado enorme capacidade de solubilizar os componentes de drogas, aumentando o

carreamento de fármacos através da membrana celular. Inúmeros agentes ativos farmacêuticos não possuem eficiente solubilidade em água, sendo necessária a formulação de drogas insolúveis que envolve uma combinação de solventes orgânicos, surfactantes, pH e condições extremas que podem causar, entre outras reações adversas, irritação. A complexação com ciclodextrinas promove a estabilização de compostos ativos, redução da volatilidade de moléculas da droga e mascaramento de cheiros e gostos desagradáveis (DEL VALLE, 2004). Portanto, apresentam-se como candidatas em potencial a contornar problemas relacionados à ineficiente solubilização em água comum aos fármacos.

Mura et al. (1992) realizaram estudos com complexos de inclusão de fármacos com a  $\beta$ -ciclodextrina e comprovaram que o complexo de inclusão com o piroxicam aumentou o fluxo do fármaco em três vezes através da pele de rato. Já o complexo similar do clonazepam com a metil- $\beta$ -ciclodextrina melhorou o seu perfil de liberação a partir do hidrogel de carbopol através de uma membrana de nitrato de celulose. Este estudo demonstra que a formação de complexos de inclusão de ciclodextrinas com fármacos é tanto eficaz no processo de solubilização de drogas.

Sem dúvida, a aplicação das ciclodextrinas na indústria farmacêutica tem tido sucesso devido à grande vantagem desses oligossacarídeos de apresentarem toxicidade relativamente baixa. De acordo com Bekers et al. (1991), o único meio da  $\beta$ -ciclodextrina provocar danos à saúde do paciente é através da administração por via parenteral. Estudos apontam que somente quando administradas em quantidades negligenciáveis que ciclodextrinas e seus derivados são capazes de permear membranas lipofílicas, tal como mucosa gastrintestinal e pele causando danos à saúde (DEL VALLE, 2004; DUCHÊNE; LOFTSSONA, 2007).

Na química analítica, devido à capacidade de se diferenciar entre isômeros posicionais, grupos funcionais, homólogos e enantiômeros, as ciclodextrinas são utilizadas em uma ampla gama de processos de separação (HAN, 1997). De acordo com Singh et al. (2002), a separação de grupos químicos é influenciada pelo tamanho, forma e seletividade de ciclodextrinas. As hidroxilas primárias e secundárias que formam as bordas tanto das ciclodextrinas nativas como de seus derivados são associados tanto com grupos hidrofóbicos (metil,

propil), quanto com grupos hidrofílicos como sulfatos, fosfatos e aminas secundárias (EASTBURN; TAO, 1994; SZETJLI, 1998).

Lu e Chen (2002) e Sohajda et al. (2012) estudaram separação e reconhecimento de grupos quirais, respectivamente, sendo atualmente uma das áreas mais importantes de aplicação das ciclodextrinas nativas e modificadas. Ciclodextrinas também têm sido utilizadas em cromatografia líquida (HPLC) como fase estacionária ou como aditivos em fase móvel (ZARZYCKI et al., 2002), eletroforese em gel (STALCUP et al., 1998), eletroforese capilar (FANALI, 2000; IWATA et al., 2002), eletroforese capilar de zona (QIN et al., 2002; FOULON et al., 2002), cromatografia gasosa capilar (NIE et al., 2001; ANDERSON et al., 2002), cromatografia eletrocínética (MA et al., 2002), microdiálise (BOWSER; KENNEDY, 2001), cromatografia de troca iônica (UEKAMA et al., 1977), cromatografia de afinidade (HAYDEN; ENGEL, 2001), cromatografia em camada delgada (MOMOSE et al., 1998) e cromatografia de separação por membranas (ROUX et al., 2002).

Na agricultura, ciclodextrinas têm sido utilizadas em uma variedade de produtos químicos agrícolas como herbicidas, inseticidas, fungicidas, repelentes e reguladores de crescimento (DEL VALLE, 2004). Estudos realizados com germinação de sementes comprovaram que as ciclodextrinas podem inibir algumas fontes de amilases responsáveis pela degradação do amido presente na semente. Inicialmente, a planta cresce mais lentamente, posteriormente isso é largamente compensado por um crescimento melhorado, rendendo uma colheita de 20 a 45% acima (SZETJLI, 1998).

Apesar da extensa aplicabilidade das ciclodextrinas, o total de conversão do amido nestes maltooligossacarídeos cíclicos limita-se a 50% aproximadamente, raramente atingindo à margem próxima aos 100% (VAN DER MAAREL et al., 2002). A baixa eficiência pode ser explicada pela baixa especificidade que a CGTase possui para catalisar reações que envolvem as ligações do tipo  $\alpha$ -1,6 da cadeia ramificada da amilopectina, dificultando o processo de conversão (BUCHHOLZ; SEIBEL, 2008). Uma das estratégias encontradas para se obter alto poder de conversão é lançar mão de enzimas amilolíticas, como isoamilases e pulalanases, com o objetivo de induzir a hidrólise

das ligações  $\alpha$ -1,6 e permitir a acessibilidade da CGTase à fração de amilopectina (RENDLEMAN, 1997).

## 2.5 Perspectivas futuras

Diante da grande e variada aplicabilidade das ciclodextrinas em diferentes campos do conhecimento, sua produção vem se tornando cada vez maior, razão pela qual diversas estratégias estão sendo criadas para aumentar a capacidade de reação enzimática da CGTase. Têm sido desenvolvidos estudos ligados à tecnologia do DNA recombinante e proteínas vêm sendo projetadas por engenheiros por meio de modificações químicas de aminoácidos com o objetivo de se aumentar a especificidade da enzima. Um dos principais objetivos da engenharia genética é a construção de CGTases que tenham a capacidade de produzir um único tipo de ciclodextrinas, assim, diminuindo o alto custo que as indústrias dispensam durante o processo de separação das mesmas (LEEMHUIS et al., 2010). Aliada às estratégias citadas acima, a busca por novos substratos de baixo custo também tendem a baratear o processo de produção de ciclodextrinas, viabilizando ainda mais o seu uso em escala comercial.

## 3 REFERÊNCIAS

ABELYAN, V. A., AFYAN, K. B., AVAKYAN, Z. G., MELKUMYAN, A. G., AFRIKYAN, E. G. Cyclomaltodextrin glucotransferases from thermophilic actinomycetes. **Biochemistry**, Moscow, v. 60, n. 10, p.1223-1229, 1995.

AEHLE, W. **Enzymes in Industry**. 3 ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 489p., 2007.

AI-NOI, S.; ABD-AZIZ, S.; ALITHEEN, N.; HASSAN, O.; KARIM, M.I.A. Optimization of Cyclodextrin Glycosyltransferase production by response surface methodology approach. **Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 10 – 18, 2008.

AKHMETZJANOV et al. Protein database accession P31747. NCBI, Washington, D. C., 1992.

ALVES-PRADO, H.F.; GOMES, E.; SILVA, R. Evaluation of Solid and Submerged Fermentations for the Production of Cyclodextrin Glycosyltransferase by *Paenibacillus campinasensis* H69-3: Characterization of Crude Enzyme. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129, p.234-246, 2006.

ANDERSON, J. L., DING, J., MCCULLA, R. D., JENKS, W. S., ARMSTRONG, D. W. Separation of racemic sulfoxides and sulfonate esters on four derivatized cyclodextrin chiral stationary phases using capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 946, p.197-208, 2002.

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

APLEVICZ, K. S. **Caracterização de produtos panificados à base de mandiocas nativas e modificadas**. Ponta Grossa: UEPG, 2006. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS ENTIDADES ESTADUAIS DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL – ASBRAER. Disponível em: <http://www.asbraer.org.br/noticias,polvilho-de-araruta-pode-ser-feito-com-tecnologia-da-fecula-de-mandioca,47568,154>>. Acesso em: 09 jul 2013.

ASGHER, M., BHATTI, H.N., ASHRAF, M., LEGGE, R.L. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, v. 19, p. 771-783, 2008.

ASTRAY, G., GONZALEZ-BARREIRO, C., MEJUTO, J. C., RIAL-OTERO, R., SIMAL-GÁNDARA, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1631-1640, 2009.

ASTRAY, G., MEJUNTO, 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.

ATANASOVA, N., PETROVA, P., IVANOVA, V., YANKOV, D., VASSILEVA, A., TONKOVA, A. Isolation of novel alkaliphilic *Bacillus* strains for cyclodextrin glucanotransferase production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.149, p.155–67, 2008.

ATANASOVA, N., KITAYSKA, T., BOJADJIEVA, I., YANKOV, D., TONKOVA, A. A novel cyclodextrin glucanotransferase from alkaliphilic *Bacillus pseudocaliphilus* 2ORF: Purification and properties. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 116-122, 2011.

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

BAR, R. Cyclodextrin aided bioconversions and fermentations. **Trends in Biotechnology**, v. 7, p. 2-4, 1989.

BEKERS, O.; BEIJNEN, J. H.; TANK, M. J.; BULT, A.; UNDERBERG, W. J. Effect of cyclodextrins on the chemical stability of mitomycins in alkaline solution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 9, p.1055– 60, 1991.

BENDER, H. Production, characterization, and application of cyclodextrins. **Advances in Biotechnological Processes**, v. 6, p. 31-71, 1986.

BINDER, F.; HUBER, O.; BOCK, A. Cyclodextrin-glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M5a1: cloning, nucleotide sequence and expression. **Gene** v. 47, p. 269-277, 1986.

BLANCH, G. P.; DEL CASTILHO, M. L. R.; DEL MAR CAJA, M.; PÉREZ-MÉNDEZ, M.; SÁNCHEZ-CÓRTEZ, S. Satbilization of *all-trans*-lycopene from tomato by encapsulation cyclodextrins. **Food Chemistry**, v.105, p.1335-1341, 2007.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos: Enzimas**. 3.ed. São Paulo: Varela, 2001. Cap.3, p.143-167.

BOWSER, M. T., KENNEDY, R. T. In vivo monitoring of amine neurotransmitters using microdialysis with on-line capillary electrophoresis. **Electrophoresis**. v. 22, p. 3668-3676, 2001.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, p.645-666, 2007.

BUCHHOLZ, K.; SEIBEL, J. Industrial carbohydrate biotransformations. **Carbohydrate Research**, v. 343, p.1966–1979, 2008.

CABALEIRO-LAGO, C., GARCÍA-RÍO, L., HERVÉS, P., MEJUTO, J.C., PÉREZ-JUSTE, J. Characterization of alkane diol-CD complexes. Acid denitrosation of N-methyl-N-nitroso-p-toluenesulphonamide as a chemical probe. **Journal of Inclusion Phenomena**, v. 54, n. 3-4, p.209-216, 2006.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O. Influência da fermentação na qualidade da farinha de mandioca do grupo d'água. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 2, p.279-284, 2011.

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

CRAVOTTO, G., BINELLO, A., BARANELLI, E., CARRARO, P., TROTTA, F. Cyclodextrins as food additives and in food processing. **Current Nutrition & Food Science**, v. 2, p. 343–350, 2006.

CYCLOLAB. **What's are cyclodextrins.** Disponível em: <<http://www.cyclolab.hu/cyclo2010.html>>. Acesso em: 06 jun. 2013.

DA SILVA, A. C. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, p. 459-463, 2002.

DELANO, W.L. The PyMOL molecular graphics system. 2002. Disponível em: <<http://www.pymol.org>>. Acesso: 04 de jun. 2013.

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

DIAS, L. T.; LEONEL, M. Caracterização físico-química de farinha de mandioca de diferentes localidades do Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 692-700, 2006.

DORREGO, A. B., GARCÍA-RÍO, L., HERVÉS, P., LEIS, J. R., MEJUTO, J. C., PÉREZ-JUSTE, J. Micellization versus cyclodextrin–surfactant complexation. **Angewandte Chemie**, v. 39, n. 16, p.2945–2948, 2000.

DUCHÊNE, D.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 320, p. 1-11, 2007.

EASTBURN, S. D., TAO, B. Y. Applications of modified cyclodextrins. **Biotechnology Advances**, v. 12, n. 2, p. 325-339, 1994.

EMPRESA BAIANA DE DESENVOLVIMENTO AGRÍCOLA (EBDA). EBDA resgata a cultura da araruta em Cruz das Almas. 2013. Disponível em: <<http://www.ebda.ba.gov.br/ebda-resgata-a-cultura-da-araruta-em-cruz-das-almas/>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

ENGLBRECHT, A.; HARRER, G.; LEBERT, M. Biochemical and genetic characterization of a CGTase from an alkalophilic bacterium forming primarily  $\gamma$ -cyclodextrin. In: HUBER, O.; SZEJTLI (eds) Proceedings of the fourth international symposium on cyclodextrins. Kluwer, Dordrecht, p. 87-92, 1988.

FANALI, S. Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrin as chiral selectors. **Journal of Chromatography**, v. 875, p. 89-122, 2000.

FERNÁNDEZ, I., GARCÍA-RÍO, L., HERVÉS, P., MEJUTO, J. C., PÉREZ-JUSTE, J., RODRÍGUEZ-DAFONTE, P. J.  $\beta$ -Cyclodextrin-micelle mixed systems as a reaction medium. Denitrosation of N-methyl-N-nitroso-ptoluenesulfonamide. **Physical Organic Chemistry**, v.13, p.664-669, 2000.

FERRARI, T. B.; LEONEL, M.; SARMENTO, S. B. S. Características dos rizomas e do amido de araruta (*Maranta arundinacea*) em diferentes estádios de desenvolvimento da planta. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 2, p. 93-98, abr./jun., 2005.

FERRAROTTI, S.; ROSSO, A.; MARECHAL, M.; KRYMKIEWICZ, N.; MARECHAL, L. Isolation of two strain (S-R Type) of *Bacillus circulans* and purification of a cyclomaltodextrin-glucanotransferase. **Cellular and Molecular Biology**, v. 42, p.653-657, 1996.

FERRETTI et al. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 4658-4663, 2001.

FOULON, C., GOOSSENS, J. F., FOURMAINTRAUX, E., BONTE, J. P., VACCHER, C. Chiral capillary electrophoretic determination of the enantiomeric purity of tetrahydronaphthalenic derivatives, melatonergic ligands, using highly sulfated beta-cyclodextrins. **Electrophoresis**, v. 23, p. 1121-1128, 2002.

FRENCH, D. The Schardinger dextrans. **Advance in Carbohydrate Chemistry**. v. 12, p.189-260, 1957.

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

FUJIWARA, S., KAKIHARA, H., SAKAGICHI, K., IMANAKA, T. Analysis of mutations in cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus stearothermophilus* which affect cyclization characteristics and thermostability. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 7478–7481, 1992.

GARCIA-RIO, L., LEIS, J. R., MEJUTO, J. C., NAVARRO-VAZQUEZ, A., PEREZ-JUSTE, J., RODRIGUEZ-DAFONTE, P. Basic hydrolysis of crystal violet in cyclodextrin/surfactant mixed systems. **Langmuir**, v. 20, p. 606-613, 2004.

GARCÍA-RÍO, L., MEJUTO, J. C., NIETO, M., PÉREZ-JUSTE, J., PÉREZ-LORENZO, M., RODRÍGUEZ-DAFONTE, P. Denitrosation of N-nitrososulfonamide as chemical probe for determination of binding constants to cyclodextrins. **Supramolecular Chemistry**, v. 17, n.8, p.649-653, 2005.

GASTÓN et al. Maltooligosaccharides production catalysed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R in batch and continuous operation. **Process Biochemistry**, p. 1-4, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.08.008>>. Acesso em: 12 de out. 2012.

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

GAWANDE, B.N.; SONAWANE, A.M.; JOGDAND, V.V.; PATKAR, A.Y. Optimization of cyclodextrin glycosyltransferase production from *Klebsiella pneumoniae* AS-22 in batch, fed-batch, and continuous cultures. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 6, p.1697-1702, 2003.

GADOSY, T. A., BOYD, M. J., TEE, O. S. Catalysis of ester aminolysis by cyclodextrins. The reaction of alkylamines with p-nitrophenyl alkanoates. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, n. 21, p.6879-6889, 2000.

GÜBITZ, G. M.; CAVACO-PAULO, A. New substrates for reliable enzymes: enzymatic modification of polymers. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, p.577–582, 2003.

GÜBITZ, G. M.; CAVACO-PAULO, A. Enzymes go big: surface hydrolysis and fonctionnalisation of synthetic polymers. **Trends in Biotechnology**, v.26, n.1, p.32-38, 2007.

HAMAMOTO, T.; KANEKO, T.; HORIKOSHI, K. Nucleotide sequence of the cyclomaltodextrin glucanotransferase (CGTase) gene from alkalophilic *Bacillus* sp. strain n<sup>o</sup>. 38-2. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, p. 2019–2022, 1987.

HAN, S. M. Direct enantiomeric separations by high performance liquid chromatography using cyclodextrins. **Biomedical Chromatography**, v. 11, p. 259-271, 1997.

HASHIMOTO, Y.; YAMAMOTO, T.; FUJIWARA, S.; TAKAGI, M.; IMANAKA, T. Extracellular synthesis, specific recognition, and intracellular degradation of cyclomaltodextrins by the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. strain B1001. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5050-5057, 2001.

HASUNUMA, T.; OKAZAKI, F.; OKAI, N.; HARA, K. Y.; ISHII, J.; KONDO, A.A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. **Bioresource Technology**, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.047>>. Acesso em: 02 abr. 2013.

HAYDEN, B. M., ENGEL, P. C. Construction, separation and properties of hybrid hexamers of glutamate dehydrogenase in which five of the six subunits are contributed by the catalytically inert D165S. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p.1173-1180, 2001.

HILL, D. E.; ALDAPE, R.; ROZZELL, J. D. Nucleotide sequence of a cyclodextrin glucosyltransferase gene, *cgtA*, from *Bacillus licheniformis*. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 199-200, 1990.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, p. 253-267, 2001.

IBRAHIM, H.M.; YUSOFF, W.M.W.; HAMID, A.A.; ILLIAS, R.M.; HASSAN, O.; OMAR, O. Optimization of medium for the production of  $\beta$ -cyclodextrin glucanotransferase using Central Composite Design (CCD). **Process Biochemistry**, v. 40, p. 753–758, 2005.

IGLESIAS, E. Nitrosation of 2-acetylcyclohexanone. 2. Reaction in water in the absence and presence of cyclodextrins. *Journal Organic Chemistry*, v. 68, p.2689-2697, 2003.

ITKOR, P.; TSUKAGOSHI, N.; UDAKA, S. Nucleotide sequence of the raw-starch-digesting amylase gene from *Bacillus* sp. B1018 and its strong homology to the cyclodextrin glucanotransferase genes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 166, p. 630-636, 1990.

IWATA, Y. T., GARCIA, A., KANAMORI, T., INOUE, H., KISHI, T., LURIE, I. S. The use of a highly sulfated cyclodextrin for the simultaneous chiral separation of amphetamine-type stimulants by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 23, p.1328-1334, 2002.

JANECEK, S.; SVENSSON, B.; HENRISSAT, B. Domain evolution in the  $\alpha$ -amylase family. **Journal of Molecular Evolution**. v. 45, p. 322-331, 1997.

JANECEK, S.  $\alpha$ -amylase family: molecular biology and evolution. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* v.67, n.1, p.67 – 97, 1997.

JANECEK, S. How many conserved sequence regions are there in the  $\alpha$ -amylase family? **Biologia, Bratislava**. v. 57, suppl. 11, p. 29-41, 2002.

JEMLI, S, MESSAOUD, B., ZOUARI DA, NAILI, B., KHEMAKHEM, B., BEJAR, S. A  $\beta$ -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.

JOBLING, S. Improving starch for food and industrial applications. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 7, p. 210-218, 2004.

JOERGENSEN, S. T.; TANGNEY, M.; STARNES, R. L.; AMEMIYA, K.; JORGENSEN, P. L. Cloning and nucleotide sequence of a thermostable cyclodextrin glycosyltransferase gene from *Thermoanaerobacter* sp. ATCC 53627 and its expression in *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 19, p. 1027-1031, 1997.

JORGENSEN, P. L.; FULGSANG, C. Patent: WO 0206508-A, 2002.

KHAIRIZAL, M. **Cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. TS1 bacterium**. Master thesis, Universiti Teknologi Malaysia, 2002.

KHAN, A.R.; FORGO, F.; STINE, K.J.; D'SOUZA, V.T. Methods for selective modifications of cyclodextrins. **Chemistry Review**, v. 98, n. 5, p. 1977-1996, 1998.

KIM, T.J.; KIM, B.C.; LEE, H.S. Production of cyclodextrin using raw corn starch without a pretreatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 506 – 509, 1997.

KIM, M. H.; SOHN, C. B.; OH, T. K. Cloning and sequencing of a cyclodextrin glycosyltransferase gene from *Brevibacillus brevis* CD162 and its expression in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 164, p. 411-418, 1998.

KIMURA, K.; KATAOKA, S.; ISHII, Y.; TAKANO, T.; YAMANE, K. Nucleotide sequence of the beta-cyclodextrin glucanotransferase gene of alkalophilic *Bacillus* sp. strain 1011 and similarity of its amino acid sequence to those of alpha-amylases. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 4399–4402, 1987.

KITAMOTO, N.; KIMURA, T.; KITO, Y.; OHMIYA, K. Cloning and sequencing of the gene encoding cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. KC201. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 74, p. 345–351, 1992.

KLEIN, C.; SCHULZ, G.E. Structure of cyclodextrin glycosyltransferase refined at 2.0 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 217, p.737–750, 1991.

LARSEN, K. L., DUEDAHLOESEN, L., CHRISTENSEN, H. J. S., MATHIESEN, F., PEDERSEN, L. H., ZIMMERMANN, W. Purification and characterisation of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus* sp. F8. **Carbohydrate Research**, v. 310, n. 3, p. 211-219, 1998.

LAWSON, C. L.; MONTFORT, R. V.; STROKOPYTOV, B.; ROZEBOOM, H. J.; KALK, K. H.; VRIES GE, D. E.; PENNINGA, D.; DIJKHUIZEN, L.; DIJKSTRA, B. W. Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form. **Journal of Molecular Biology**, v. 236, p. 590-600, 1994.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. S.; Processamento de Araruta (*Maranta arundinacea*) para extração e caracterização da fração amilácea. *Brazilian Journal Food Technology*, v. 5, p.151-155, 2002.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n.1, p. 65-69, 2007.

LEE, J. H., CHOI, K. H., LEE, Y. S., KWON, I. B., YU, J. H. Enzymatic production of  $\alpha$ -cyclodextrin with the cyclomalto-dextrin glicosiltransferase of *Klebsiella axytoca* 19-1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 12, p.1017-1020, 1992.

LEEMHUIS, H., BAUKE, W. DIJKSTRA, B. W., DIJKHUIZEN, L. *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* cyclodextrin glycosyltransferase. **European Journal of Biochemistry**. v. 270, p. 155-162, 2003.

LEEMHUIS, H., KELLY, R., DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 823-835, 2010.

LU, X., CHEN, Y. Chiral separation of amino acids derivatized with fluoresceine-5-isothiocyanate by capillary electrophoresis and laserinduced fluorescence detection using mixed selectors of beta-cyclodextrin and sodium taurocholate. **Journal of Chromatography A**, v. 955, p. 133-40, 2002.

MA, H. M., WANG, Z. H., SU, M. H. New triazine spectroscopic reagent for the separation of DL-amino acids by micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 955, p. 125-131, 2002.

MACEDO, O.F.L.; ANDRADE, G.R.S.; CONEGERO, L.S.; BARRETO, L.S.; COSTA JUNIOR, N.B.; GINEMEZ, I.F.; ALMEIDA, L.E.; KUBOTA, D. Physicochemical study and characterization of the trimethoprim/2-hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin inclusion complex. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy**, 86, 101 – 106, 2012.

MACGREGOR, E. A.; JANECEK, S.; SVENSSON, B. Relationship of sequence and structure to specificity in the  $\alpha$ -amylase family of enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1546, p. 1-20, 2001.

MADIHAH, M.S.; ARIFF, A.B.; SAHAID, K.M.; SURAINI, A.A.; KARIM, M.I.A. Direct fermentation of gelatinized sago starch to acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 567–576, 2001.

MAHAT, M. K.; ILLIAS, R.M.; RAHMAN, R. A.; RASHID, N. A. A.; MAHMOOD, N. A. N.; HASSAN, O.; AZIZ, S. A.; KAMARUDDIN, K. Production of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) from alkalophilic *Bacillus* sp. TS1-1: media optimization using experimental design. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 467–473, 2004.

MARTINS, R. F.; DELGADO, O.; HATTI-KAUL, R. Sequence analysis of cyclodextrin glycosyltransferase from the alkalophilic *Bacillus agarahaerens*. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1555–1562, 2003.

MATIOLI, G., ZANIN, G. M., GUIMARÃES, M. F., DE MORAES, F. F. Production and purification of CGTase of alkalophilic bacillus isolated from Brazilian soil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 70, n. 2, p. 267-275, 1998.

MATIOLI, G. et al. Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais. Maringá: Eduem, p. 3-5, 2000.

MAURER, K. H.; BREVES, R.; POLANYI, L. Patent WO 0244350-A, 2002.

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.

MOMOSE, T., MURE, M., IIDA, T., GOTO, J., NAMBARA, T. Method for the separation of the unconjugates and conjugates of chenodeoxycholic acid and deoxycholic acid by two-dimensional reversed-phase thin layer chromatography with methyl beta-cyclodextrin. **Journal of Chromatography A**, v. 811, p. 171-180, 1998.

MONTEIRO, D. A.; PERESSIN, V. A. Cultura da araruta. In: CEREDA, M. P. Agricultura: tuberosas amiláceas latino-americanas. São Paulo: Fundação Cargill. p. 440-447, 2002.

MORI, S., HIROSE, S., OYA, T., KITAHATA, S. Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase from *Brevibacterium* sp n° 9605. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 58, n. 11, p.1968-1972, 1994.

MORI, S., GOTO, M., MA, S. E. T., MATSUURA, A., OYA, T., KITAHATA, S. Reaction conditions for the production of  $\alpha$ -cyclodextrin by cyclodextrin glycosyltransferase from *Brevibacterium* sp n° 9605. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 59, n. 6, p.1012-1015, 1995.

MORIWAKI, C.; COSTA, G.L.; PAZZETTO, R.; ZANIN, G.M.; MORAES, F.F.; PORTILHO, M.; MATIOLI, G.. Production and characterization of a new cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* isolated from Brazilian soil. **Process Biochemistry**, v.42, p.1384-1390, 2007.

MÓTYÀNA. Computer-aided subsite mapping of  $\alpha$ -amylases. **Carbohydrate Research**. v. 346, p. 410-415, 2011.

MURA, P., BETTINETTI, G. P., LIGUORI, A., BRAMANTI, G. Improvement of clonazepam release from carbopol hidrogel. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, Zurich, v. 67, p. 282-288, 1992.

NAKAMURA, N.; HORIKOSHI, K. Purification and properties of neutral-cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1785-1791, 1976.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (2011). Structure Summary MMDB: Thermostable Cgtase From Thermoanaerobacterium Thermosulfurigenes EM1 at PH 8.0. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=55774>>. Acesso em: 27 de ago. 2012.

NITSCHKE, L.; HEEGER, K.; BENDER, H. AND SCHULZ, G. E. Molecular cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the  $\beta$ -cyclodextrin glycosyltransferase gene from *Bacillus circulans* strain n° 8. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 33, p. 542-546, 1990.

NIE, M. Y., ZHOU, L. M., WANG, Q. H., ZHU, D. Q. Enantiomer separation of mandelates and their analogs on cyclodextrin derivative chiral stationary phases by capillary GC. **Anal Science**, v. 17, p. 1183-1187, 2001.

OHDAN, K.; KURIKI, T.; TAKATA, H.; OKADA, S.; OKADA, S. Cloning of the cyclodextrin glucanotransferase gene from alkaliphilic *Bacillus* sp. A2-5a and analysis of the raw starch-binding domain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.430-434, 2000.

PENNINGA, D.; VAN DER VEEN, B. A.; KNEGTEL, R. M.; VAN HIJUM, S. A.; ROZEBOOM, H. J.; KALK, K. H.; DIJKSTRA, B. W.; DIJKHUIZEN, L. The raw starch binding domain of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* 251. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 271, p.32777–32784, 1996.

PERONI, F. H. G.; ROCHA, T. S.; FRANCO, C. M. L. Some structural and physicochemical characteristics of tuber and root starches. **Food Science and Technology International**, v. 12, p. 505-513, 2006.

PINTO, F. S. T.; FLÔRES, S. H.; AYUB, M. A. Z.; HERTZ, P. F. Production of cyclodextrin glycosyltransferase by alkaliphilic *Bacillus circulans* in submerged and solid-state cultivation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 30, p. 377-382, 2007.

QI, Q.; SHE, X.; ENDO, T.; ZIMMERMANN, W. Effect of the reaction temperature on the transglycosylation reactions catalyzed by the cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus macerans* for the synthesis of large-ring cyclodextrins. **Tetrahedron**, v. 60, p. 799-806, 2004.

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

QIN, W., WEI, H., LI, S. F. Separation of ionic liquid cations and related imidazole derivatives by alpha-cyclodextrin modified capillary zone electrophoresis. **Analyst**, v. 127, p. 490-493, 2002.

RASHID, N., CORNISTA, J., EZAKI, S., FUKUI, T., ATOMI, H., IMANAKA, T. Characterization of an archaeal cyclodextrin glycosyltransferase with a novel C-terminal domain. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 777-784, 2002.

REGULY, J.C. **Biotecnologia dos processos fermentativos: matérias-primas agrícolas, processos e produtos**. Pelotas: Universitária/UFPEL, 1996. 1v. 330p.

REKHARSKY, M.V.; INOUE, Y. Complexation thermodynamics of cyclodextrins. **Chemistry Review**, v. 98, p. 1875, 1998.

RENDLEMAN, J. A. Enhancement of cyclodextrin production through use of debranching enzymes. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 26, Pt 1, p.51–61, 1997.

RIMPHANITCHAYAKIT, V.; TONOZUKAT; SAKANO, Y. Protein database accession AAG31622. NCBI, Washington, D. C., 2000.

ROSA DOS SANTOS, J. F.; ALVAREZ-LORENZO, C.; SILVA, M.; BALSA, L.; COUCEIRO, J.; TORRES-LABANDEIRA, J. J.; CONCHEIRO, A. Soft contact lenses functionalized with pendant cyclodextrins for controlled drug delivery. **Biomaterials**, v. 30, p. 1348-1355, 2009.

ROUX, M., AUZELY-VELTY, R., DJEDAINI-PILARD, F., PERLY, B. Cyclodextrin-induced lipid lateral separation in DMPC membranes: nuclear magnetic resonance study. **Biophysical Journal**, v. 82, p. 813–822, 2002.

SABIONI, J. G., PARK, Y. K. Production and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus lentus*. **Starch/Stärke**, v. 44, n. 6, p. 225-229, 1992.

SALVA, T. J. G., LIMA, V. B., PAGAN, A. P. Screening of alkalophilic bacteria for cyclodextrin glycosyltransferase production. **Revista de Microbiologia**, v. 28, p.157-164, 1997.

SCHARDINGER, F. Über Thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch, sowie über einige Umsetzungsprodukte derselben in kohlenhydrathaltigen Nährlösungen, darunter krystallisierte Polysaccharide (Dextrine) aus Stärke. **Z. Untersuch Nahr. Genussm.**, v. 6, p. 865–880, 1903.

SCHMID, G.; ENGLBRECHT A., SCHMID D. Cloning and nucleotide sequence of a cyclodextrin glycosyltransferase gene from the alkalophilic *Bacillus* sp.1.1. In: HUBER O., SZEJTLI (eds) Proceedings of the fourth international symposium on cyclodextrins. Kluwer, Dordrecht, p. 77–81, 1988.

SEHNEM, N.T., SOUZA-CRUZ, P., PERALBA, M.C.R., AYUB, M.A.Z. Biodegradation of tebuconazole by bacteria isolated from contaminated soils. *Journal Environmental. Science Health Part B*, v. 45, p. 67-72, 2010.

SILVA, F. I.; CABELLO, C. Caracterização das estruturas moleculares de amido de mandioca utilizando a metodologia de permeação em gel. **Energia na Agricultura**, v.21, p. 50-68, 2006.

SINGH, M., SHARMA, R., BANERJEE, U. C. Biotechnological applications of cyclodextrins. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 341–359, 2002.

SOHAJDA, T.; SZAKÁCS, Z.; SZENTE, L.; NOSZÁL, B.; BÉNI, S.Z. Chiral recognition of imperanene enantiomers by various cyclodextrins: a capillary electrophoresis and NMR spectroscopy study. **Electrophoresis**, v. 33, p. 1458-1464, 2012.

SOUZA, J. M. L.; NEGREIROS, J. R. S.; ÁLVARES, V. S.; LEITE, F. M. N.; SOUZA, M. L.; REIS, F. S.; FELISBERTO, F. A. V.; Variabilidade físico-química da farinha de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n.4, p. 907-912, out.-dez., 2008.

STALCUP, A. M., GAHM, K. H., GRATZ, S. R., SUTTON, R. M. Application of classical gel electrophoresis to the chiral separation of milligram quantities of terbutaline. **Anal Chemistry**, v. 70, 144-148, 1998.

STAM, M. R., DANCHIN E. G. J., RANCUREL C., COUTINHO, P. M., HENRISSAT, B. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotation of  $\alpha$ -amylase-related proteins. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 1, n. 12, p. 555–62, 2006.

SZENTE, L., SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, p. 137-142, 2004.

SZERMAN, N.; SCHROH, L.; ROSSO, A. M.; KRYMKIEWICZ, S. A. Cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circullans* DF 9R. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2886-2891, 2007.

SZETJLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemistry Reviews**, v. 98, p. 1743-1753, 1998.

TAKADA, M.; NAKAGAWA, Y.; YAMAMOTO, M. Biochemical and genetic analyses of a novel gamma-cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus clarkii* 7364. **Journal of Biochemistry**, v. 133, p. 317–324, 2003.

TAKANO, T.; FUKUDA, M.; MONMA, M.; KOBAYASHI, S.; KAINUMA, K.; YAMANE, K. Molecular cloning, DNA nucleotide sequencing, and expression in *Bacillus subtilis* cells of the *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase gene. **Journal of Bacteriology**, v.166, p.1118-1122, 1986.

TEE, O. S., GADOSY, T. A., GIORGI, J. B. Effect of b-cyclodextrin on the reaction of a-amino acid anions with p-nitrophenyl acetate and p-nitrophenyl hexanoate. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 75, n.1, p.83-91, 1997.

TERADA, Y. et. al. Cyclodextrins Are Not the Major Cyclic a-1,4-Glucans Produced by the Initial Action of Cyclodextrin Glicosyltransferase on Amylose. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 272, p. 15729-15733, jan. 1997.

TIEN, S.F. **Production of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. G1**. Master's thesis, University Technology of Malaysia, 2001.

TONKOVA, A. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 678-686, 1998.

THIEMANN, V., DÖNGES, C., PROWE, S. G., STERNER, R., ATRANIKIAN, G. Characterisation of a thermoalkali-stable cyclodextrin glycosyltransferase from the anaerobic thermoalkaliphilic acterium *Anaerobranca gottschalkii*. **Archives of Microbiology**, v.182, p. 226-35, 2004.

UEKAMA, K., HIRAYAMA, F., IKEDA, K., INABA, K. Utilization of cyclodextrin complexation for separation of E, A, and B prostaglandins by ion-exchange liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, p. 706-710, 1977.

VAN DER MAAREL, M.J.E.C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J.C.M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. **Journal of Biotechnology**. v. 94, p. 137-155, 2002.

VAN DER VEEN, B.A., VAN ALEBEEK, G.J.W.M., UIDEHAAGE, J.C.M., DIJKSTRA, B.W., DIJKHUIZEN, L. The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* (strain 521)

proceed via different kinetic mechanisms. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 658-665, 2000a.

VAN DER VEEN, B.A.; UITDEHAAG, J.C.M.; DIJKSTRA, B.W.; DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, p. 336-360, 2000b.

VENTURINI, C. G., NICOLINI, J., MACHADO, C., MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p.360-368, 2008.

VILLIERS, M.A. Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 112, p. 536-538, 1891.

ZAIN, W.S.W.M.; ILLIAS, R.M.; SALLEH, M.M.; HASSAN, O.; RAHMAN, R.A.; HAMID, A.A. Production of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. TS1-1: Optimization of carbon and nitrogen concentration in the feed medium using central composite design. **Biochemical Engineering Journal**, v.33, p. 26-33, 2007.

ZARZYCKI, P. K., KULHANEK, K. M., SMITH, R. Chromatographic behaviour of selected steroids and their inclusion complexes with betacyclodextrin on octadecylsilica stationary phases with different carbon loads. **Journal of Chromatography A**, v. 955, p.125–131, 2002.

WIND, R. D., LIBL, W., BUITELAAR, R. M., PENNINGA, D., SPREINAT, A., DIJKHUIZEN, L., BAHL, H. Cyclodextrin formation by the thermostable  $\alpha$ -amylase of *Thermanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 and reclassification of the enzyme as a cyclodextrin glycosyltransferase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1257-1265, 1995.

WOUTERS, J.; BERGMAN, B.; JANSON, S. Cloning and expression of a putative cyclodextrin glycosyltransferase from the symbiotically competent cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 9229. **FEMS Microbiology Letters**, v. 219, p. 181-185, 2003.

## **CAPITULO I**

# **AMIDO DE ARARUTA E MILHOCINA COMO SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

Artigo a ser submetido, formatado de acordo com as normas da revista *Journal of  
Biotechnology*

## Amido de araruta e milhocina como substratos para produção de ciclodextrina glicosiltransferase por fermentação submersa

### Resumo

O presente estudo teve como objetivo otimizar a produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase; EC 2.4.1.19) da cepa SM-02, isolada de solo de lagoa de descarte de manipueira da região de Cruz das Almas, Bahia, Brasil. A cepa selecionada para estudos de fermentação foi testada nas fontes de carbono e nitrogênio, amido de araruta (*Maranta arundinacea* L.) e milhocina, respectivamente. Por meio da metodologia experimental de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), uma matriz de planejamento fatorial  $2^2$  foi aplicada. A melhor condição para a produção da enzima foi de 30,0 g.L<sup>-1</sup> de amido de araruta e 3,5 g.L<sup>-1</sup> de milhocina, com máxima produção de 989,53 U.mL<sup>-1</sup>. A enzima apresentou maior atividade de ciclização em pH 5,0, temperatura ótima de 55 °C e manteve a estabilidade térmica a 55 °C, durante 4 h. A atividade da enzima foi estimulada na presença de Mg<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>, EDTA, K<sup>+</sup>, Ba<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>, Na<sup>+</sup> e Cu<sup>+2</sup>, enquanto Hg<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup> e Zn<sup>+2</sup> inibiram a sua produção. A produtividade máxima de CGTase obtida foi de 12,34 U.mL<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Os resultados de otimização indicaram que a cepa SM-02, bem como amido de araruta e milhocina são promissores para a produção de  $\beta$ -CGTase.

Palavras-chave:  $\beta$ -ciclodextrina, CGTase, DCCR, otimização.

### 1. Introdução

A riqueza gerada pela microbiologia de solos tropicais brasileiros é, em grande parte, desconhecida, sendo que diversos ambientes inexplorados revelam uma gama de micro-organismos com potencial biotecnológico para a produção enzimática (Nascimento et al., 2009; Souza et al., 2008; De Azevedo et al., 2006; Nascimento et al., 2003). Estudos demonstram que várias linhagens de bactérias produtoras de ciclodextrina glicosiltransferase já foram isoladas de diversos ambientes diferenciados (Nakamura e Horikoshi, 1997; Ferrarotti et al., 1996; Tien, 2001; Khairizal, 2002; Alves-Prado et al., 2006; Moriwaki et. al., 2007;

Menocci et al., 2008; Atanasova et al., 2008; Sehnem et al., 2010). Porém, solos do Estado da Bahia, Brasil, ainda carecem de estudos voltados para o isolamento de micro-organismos com potencial biotecnológico direcionado à produção dessa enzima.

Ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase; EC 2.4.1.19) pertence à família 13, também conhecida como a família das  $\alpha$ -amilases (Stam et al., 2006). É a única enzima responsável por converter o amido em açúcares cíclicos denominados  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -ciclodextrina, cujo arranjo estrutural é composto de 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente, unidas por ligações do tipo  $\alpha$ -1,4. A formação desses maltooligossacarídeos cíclicos ocorre por meio da hidrólise das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 e a subsequente reação de transglicosilação intramolecular (ciclização) e intermolecular (desproporcionamento e acoplamento) de  $\alpha$ -1,4-glicanas (Terada et al., 1997; Tonkova, 1998). Desde que foram acidentalmente descobertas em 1981 por Villiers, as ciclodextrinas vêm sendo frequentemente estudadas para fins biotecnológicos. A formação de complexos de inclusão não específicos com uma infinidade de substâncias faz das ciclodextrinas excelentes candidatas a diversas aplicações industriais como uma alternativa de melhorar as características físico-químicas das moléculas-hóspedes complexadas (Denter et al., 1997; Biber et al., 2002; Li et al., 2007; Astray et al., 2009; Del Valle, 2009).

Novas fontes alternativas de carbono para a produção de CGTase vêm sendo constantemente investigadas com o objetivo de se obter substratos amiláceos de baixo custo. Originária da América Latina, encontrada em sua forma nativa em matas venezuelanas, a araruta (*Maranta arundinacea* L.) tem sido reconhecida como uma importante cultura produtora de amido de excelente qualidade. Analisando seus rizomas, Leonel et al. (2002) concluíram que estes apresentam considerável teor de amido, cerca de 84,3%. A composição físico-química, aliada às características viscoamilográficas do amido de araruta o enquadra nos parâmetros de qualidade exigidos pelas indústrias de processamento, tornando-o apropriado para a produção em escala comercial (Leonel et al., 2002; Ferrari et al., 2005). Características como alta viscosidade de quebra, tornam o amido da araruta pouco resistente à temperatura e ao atrito mecânico e mais propenso ao rompimento. Além disso, a alta viscosidade de pico

aumenta a capacidade de retenção de água antes do rompimento dos grânulos (Ferrari et al., 2005). São características que podem facilitar o acesso de enzimas amilolíticas às cadeias de amilose e amilopectina, tornando interessante o uso do amido extraído dos rizomas da araruta em processos fermentativos. O presente trabalho teve como objetivo otimizar a produção de CGTase pela cepa SM-02 por meio da metodologia experimental de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), utilizando-se os substratos agroindustriais amido de araruta e milhocina como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente.

## **2. Material e métodos**

### *2.1. Screening*

Amostras de solo e manipueira foram coletadas em cinco diferentes propriedades localizadas em 3 municípios do Recôncavo da Bahia: Cruz das Almas, Governador Mangabeira e Muritiba. A triagem foi realizada a partir de cinco amostras de solo e três amostras de água de manipueira, utilizando-se a técnica de diluição seriada. De cada diluição, 100  $\mu$ L foram transferidos para placas de Petri contendo meio proposto por Nakamura e Horikoshi (1976), contendo ( $\text{g.L}^{-1}$ ): amido solúvel, 10; peptona, 5; extrato de levedura, 5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1; ágar bacteriológico, 15; fenolftaleína, 0,3;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 10 (esterilizado separadamente e adicionado ao meio de cultivo após a temperatura atingir 60°C), pH 9,8. As placas foram incubadas a 37 °C por até 5 dias. As colônias que formaram halos em contraste com o corante do meio de cultivo foram consideradas CGTase-positivas. Em seguida, 50  $\mu$ L com aproximadamente  $3 \times 10^8$  células (escala MacFarland), foram plaqueados em orifícios com 0,5 cm de diâmetro aplicados no centro de cada placa de Petri. As placas foram incubadas a 37 °C e os halos das colônias medidos após 72 h de crescimento. A colônia que produziu o maior halo foi considerada a melhor produtora da enzima e utilizada nos testes de fermentação. As cepas foram conservadas em criotubos contendo 2 mL de glicerol a 20% e estocadas a -40 °C.

## 2.2. Ensaio fermentativos

Para reativar o micro-organismo foram realizadas subculturas da cultura estoque em meio basal de Nakamura e Horikoshi (1976). Após 72 h de crescimento, o inóculo foi preparado com uma alçada da subcultura em um Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido enriquecido com amido de araruta e milhocina para adaptação das células ao meio de fermentação, pH 9.8. Após 24 h de incubação, uma alíquota de 1 mL do inóculo foi padronizada a partir de uma OD<sub>600</sub> fixada em 0,1 e o volume final de cada ensaio foi ajustado para 30 mL de meio de cultivo, substituindo-se o amido solúvel do meio basal por amido de araruta e peptona e extrato de levedura por milhocina (Sigma®). A temperatura foi mantida em 35 °C e a rotação foi fixada em 150 rpm. Após 72 h de fermentação, 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 na determinação de biomassa.

A melhor condição de temperatura de crescimento do micro-organismo foi definida a partir de fermentações realizadas em uma faixa de 25 °C a 40 °C, em fermentação líquida, em meio Nakamura e Horikoshi (1976).

## 2.3. Otimização usando Delineamento Composto Central Rotacional

A otimização das concentrações de amido de araruta e milhocina foi realizada empregando a metodologia de superfície de resposta. A atividade de CGTase (U.mL<sup>-1</sup>) foi considerada como variável dependente e concentrações dos substratos como variáveis independentes. Uma matriz de planejamento fatorial 2<sup>2</sup> foi construída por meio de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), resultando em 11 ensaios (Rodrigues e lemma, 2009). 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 com três repetições para determinação do rigor da metodologia, e dois pontos axiais (+1,41 e -1,41). 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 (amido de araruta 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.

#### 2.4. 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. 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  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  600 mM, pH 10,5. A leitura espectrofotométrica foi realizada em 550 nm ( $\text{OD}_{550}$ ).

#### 2.5. Crescimento celular

Após fermentações, a biomassa foi separada do sobrenadante por centrifugação a 5.000 rpm por 30 minutos, a 4 °C. Após ter sido ressuspendida no volume final de 30 mL, volume equivalente às fermentações, a leitura foi feita a

600 nm ( $OD_{600}$ ). A biomassa foi expressa em  $g.L^{-1}$ , baseada na comparação com a curva padrão em função da massa seca *versus* densidade ótica.

### 2.6. Determinação de açúcares redutores totais

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), utilizado para determinar a atividade de amilase sacarificante, através da quantificação do açúcar redutor liberado pela enzima (Miller, 1959). Previamente à aplicação da metodologia, as amostras foram submetidas a uma hidrólise ácida adicionando 1 mL de HCl 2 M a 1 mL do extrato enzimático bruto. Após fervura durante 20 minutos, as amostras foram neutralizadas com a adição de 1 mL de NaOH 2 M. O controle foi preparado conforme o processo descrito, substituindo-se o extrato enzimático pelo volume equivalente a água destilada. A absorbância foi determinada a  $\lambda = 540$  nm.

### 2.7. Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada por meio do método de Bradford (1976), adicionando-se 0,2 mL do extrato bruto enzimático a 2,0 mL do reagente de Bradford, preparado com o corante *Coomassie Brilliant Blue* BG-250. O controle foi preparado substituindo-se a amostra pelo volume equivalente a água destilada. A leitura foi realizada em  $\lambda = 595$  nm.

### 2.8. Efeito da temperatura, pH, íons metálicos e estabilidade térmica

A temperatura ótima de reação da atividade de CGTase foi determinada realizando-se ensaios enzimáticos na faixas de temperatura de 50 – 70 °C, em pH 8,0. A estabilidade térmica foi determinada incubando-se o extrato bruto na faixa de temperatura de 45 – 60 °C, durante 5 horas. O efeito do pH foi medido 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 na atividade de CGTase foi avaliada

por meio das seguintes soluções preparadas a 50 mM: CaCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>, NaCl, ZnSO<sub>4</sub>, EDTA, KCl, MnCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, BaCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> e MgCl<sub>2</sub>.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Screening

A partir do *screening* realizado, 15 cepas produtoras de  $\beta$ -CGTase foram isoladas (Tabela 1). De acordo com Qi e Zimmermann (2005), em meio alcalino, a  $\beta$ -ciclodextrina formada a partir da digestão do amido pela CGTase forma complexos de inclusão com a fenolftaleína que retorna à sua forma lactonada ou incolor durante a fase de complexação. O resultado do encapsulamento é a formação de um halo translúcido em torno da colônia (Fig. 1). Dentre as cepas isoladas, SM-02 apresentou o maior diâmetro do halo (50 mm), após 72 h de crescimento. Comparado ao tamanho do halo de todas as cepas selecionadas, o diâmetro do halo da SM-02 foi o único que apresentou significância a 5% de probabilidade, através do teste de Tukey.



**Fig. 1.** Halo indicando produção de CGTase pela cepa SM-02, após 72 h de crescimento em meio Nakamura e Horikoshi (1976) contendo o corante fenolftaleína.

**Tabela 1**

*Screening* realizado em meio Nakamura e Horikoshi (1976) para seleção de bactérias produtoras de  $\beta$ -CGTase.

Localização	Amostras	Caracterização das amostras	Cepas Isoladas	Diâmetro do halo (mm)
Propriedade I, Sapucaia, Cruz das Almas-BA	1	Solo coletado em plântio de mandioca.	AM1	20,0 <sup>c</sup>
			AM2	18,0 <sup>c</sup>
			TSM4	47,0 <sup>c</sup>
	2	Solo coletado em lagoa de descarte de água residuária (manipueira)	SM-01	20,0 <sup>c</sup>
			SM-02	50,0 <sup>b</sup>
			SM-03	11,0 <sup>c</sup>
	3	Água residuária (manipueira) descartada em reservatório	MP-04	>10,0 <sup>c</sup>
			MP-05	9,0 <sup>c</sup>
			MP-06	32,0 <sup>c</sup>
			MP-07	>10,0 <sup>c</sup>
	4	Água residuária (manipueira) descartada em reservatório	a	a
	Propriedade II, Governador Mangabeira-BA	5	Solo coletado em plântio de mandioca.	SR-01
SR-03				36,0 <sup>c</sup>
SR-04				17,0 <sup>c</sup>
SR-05				28,0 <sup>c</sup>
Propriedade III, Muritiba-BA	6	Solo coletado em plântio de mandioca.	a	a
Casa de Farinha Comunitária de Queimadas Nova, Governador Mangabeira-BA	7	Solo coletado em lagoa de descarte de água residuária (manipueira)	SM-04	30,0 <sup>c</sup>
	8	Água residuária (manipueira) descartada em reservatório	a	a

<sup>a</sup> Sem halo de produção.

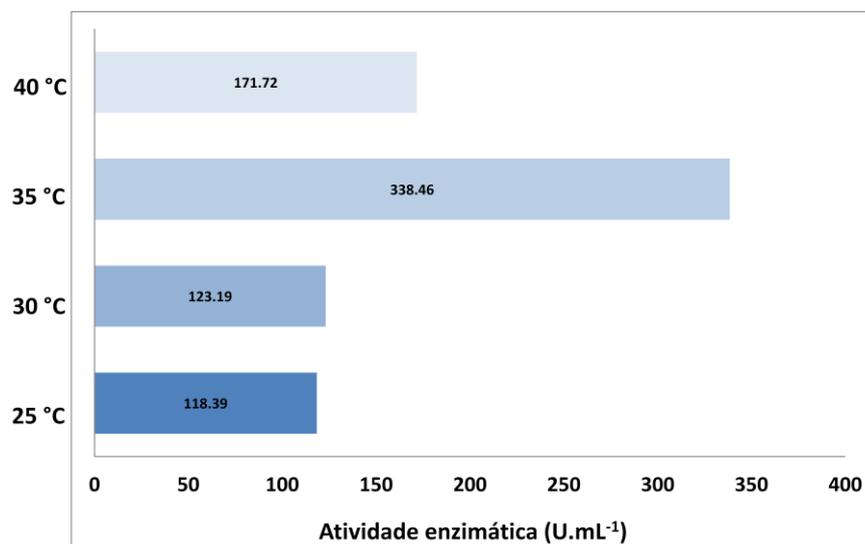
<sup>b</sup> Significativo a 5% de probabilidade.

<sup>c</sup> Não significativo a 5% de probabilidade.

### 3.2 Temperatura ótima de fermentação

A Fig. 2 apresenta o perfil de temperatura ótima de fermentação da cepa SM-02, cultivada em meio basal Nakamura e Horikoshi (1976). A cepa demonstrou ser potencialmente capaz de produzir a enzima em grandes quantidades (338,46 U.mL<sup>-1</sup>), a 35 °C. Cucolo et al. (2006) encontraram

resultados semelhantes para a linhagem de *Bacillus* sp. subgrupo *alcalophilus* E16, cultivada em meio contendo 30 g.L<sup>-1</sup> de polvilho doce extraído da mandioca.



**Fig. 2.** Temperatura ótima de fermentação da cepa SM-02, em meio Nakamura e Horikoshi (1976).

### 3.3. Otimização usando Delineamento Composto Central Rotacional

O planejamento experimental através da metodologia DCCR apresentou boa reprodutibilidade com valores dos pontos centrais próximos entre si. A produção máxima de CGTase foi de 989,5 U.mL<sup>-1</sup> (média dos pontos centrais), utilizando-se meio otimizado contendo 30,0 g.L<sup>-1</sup> de amido de araruta e 3,5 g.L<sup>-1</sup> de milhocina. A Tabela 2 apresenta os valores observados e preditos pelo modelo experimental aplicado. A partir das diferentes concentrações da fonte de carbono (X<sub>1</sub>) e nitrogênio (X<sub>2</sub>) utilizadas, ocorreu uma variação de 515,2 U.mL<sup>-1</sup> para 989,5 U.mL<sup>-1</sup>. Pinto et al. (2007) obtiveram resultados semelhantes otimizando os parâmetros de pH e temperatura de β-CGTase de *Bacillus circulans*, em condições similares à deste trabalho, atingindo a produção de 1155 U.mL<sup>-1</sup>, utilizando resíduo fibroso de soja. A literatura tem demonstrado que bactérias produtoras de CGTase desempenham um perfil de produção enzimática em tipos variados de substratos, principalmente fontes de carbono obtidas a custo baixo. Esta é uma característica interessante para a indústria que deseja a aplicação de substratos que estimulam de forma eficiente a produção da enzima a baixo custo,

ao mesmo tempo em que mantém a qualidade do produto, competitividade no mercado e lucro.

**Tabela 2**

Matriz do planejamento experimental e valores das variáveis independentes ( $X_1$ : amido de araruta e  $X_2$ : milhocina) usados no DCCR.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais (g.L <sup>-1</sup> )		Atividade enzimática (U.mL <sup>-1</sup> )		Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	
	$X_1$	$X_2$	$X_1$	$X_2$	Valores observados	Valores preditos	Valores observados	Valores preditos
1	-1	-1	25,0	2,5	765,3	697,4	0,9	0,9
2	+1	-1	35,0	2,5	797,3	776,8	1,2	1,4
3	-1	+1	25,0	4,5	783,9	749,9	1,3	1,1
4	+1	+1	35,0	4,5	515,2	528,6	0,9	1,0
5	-1,41	0	22,9	3,5	683,0	743,7	0,9	1,1
6	+1,41	0	37,1	3,5	649,7	643,4	1,5	1,4
7	0	-1,41	30,0	2,1	700,7	751,9	1,1	1,1
8	0	+1,41	30,0	4,9	610,4	613,7	0,9	0,9
9	0	0	30,0	3,5	991,9	989,5	2,0	2,0
10	0	0	30,0	3,5	999,0	989,5	2,0	2,0
11	0	0	30,0	3,5	977,7	989,5	2,0	2,0

A Tabela 3 apresenta os efeitos estimados para a produção de CGTase, onde a letra *L* representa os termos lineares e a letra *Q* representa os termos quadráticos. De todas as variáveis testadas, a única que não apresentou p-valor significativo ao nível de 5% de probabilidade foi amido de araruta ( $X_1$ ) no termo linear. De um modo geral, a concentração de milhocina abaixo e acima dos valores do ponto central resultaram em um efeito negativo sobre a produção da enzima, que diminuiu em 97,79 U.mL<sup>-1</sup> no termo linear e no termo quadrático em 306,73 U.mL<sup>-1</sup>. Semelhante comportamento ocorreu para a fonte de carbono, que levou à queda da produção no termo quadrático de 295,98 U.mL<sup>-1</sup>. A interação entre as variáveis independentes testadas ( $X_1$  e  $X_2$ ) apresentou um efeito negativo de 150,38 U.mL<sup>-1</sup>.

**Tabela 3**

Efeitos estimados para a produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) utilizando amido de araruta como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio.

Fatores	Efeitos	Erro padrão	t (5)	p-valor
Média	989,53 <sup>a</sup>	29,40	33,65	0,000000
(X <sub>1</sub> ) Amido de Araruta (g.L <sup>-1</sup> ) (L)	-70,95	36,01	-1,97	0,105905
Amido de Araruta (g.L <sup>-1</sup> ) (Q)	-295,98 <sup>a</sup>	42,86	-6,91	0,000976
(X <sub>2</sub> ) Milhocina (g.L <sup>-1</sup> ) (L)	-97,79 <sup>a</sup>	36,01	-2,72	0,042003
Milhocina (g.L <sup>-1</sup> ) (Q)	-306,73 <sup>a</sup>	42,86	-7,16	0,000828
1L x 2L	-150,38 <sup>a</sup>	50,93	-2,95	0,031781

Análoga à anterior, a Tabela 4 descreve os coeficientes de regressão do modelo. O modelo matemático ajustado que descreve a atividade de CGTase dentro da faixa estudada pode ser expresso pela Eq. (3):

$$y = 989,53 - 35,47X_1 - 48,90X_2 - 75,19X_1X_2 - 147,99X_1^2 - 153,37X_2^2 \quad (3)$$

**Tabela 4**

Coefficientes de regressão para a produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) utilizando amido de araruta como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio.

Fatores	Coefficientes de regressão	Erro padrão	t (5)	p-valor
Média	989,53 <sup>a</sup>	29,40	33,65	0,000000
(X <sub>1</sub> ) Amido de Araruta (g.L <sup>-1</sup> ) (L)	-35,47	18,01	-1,97	0,105901
Amido de Araruta (g.L <sup>-1</sup> ) (Q)	-147,99 <sup>a</sup>	21,43	-6,91	0,000976
(X <sub>2</sub> ) Milhocina (g.L <sup>-1</sup> ) (L)	-48,90 <sup>a</sup>	18,01	-2,72	0,041999
Milhocina (g.L <sup>-1</sup> ) (Q)	-153,37 <sup>a</sup>	21,43	-7,16	0,000828
1L x 2L	-75,19 <sup>a</sup>	25,46	-2,95	0,031776

<sup>a</sup> Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

L: termos lineares.

Q: termos quadráticos.

Os resultados foram avaliados pela ANOVA (Tabela 5). O alto valor do F calculado, equivalente a 45,0, indica que o modelo foi significativo ao nível de confiança aplicado (95%). Considerando o F-tabelado (4,35), o valor do F-calculado foi 10,34 vezes maior. Para Silva et al. (1999) quando o F calculado é de 3 a 5 vezes maior que o F tabelado o modelo estatístico pode ser considerado muito significativo. Os valores de *p* indicam que milhocina no termo quadrático foi a variável que mais influenciou na atividade de CGTase, uma vez que, quanto menor for o valor de *p* maior é o efeito da variável independente sobre a resposta analisada (Ai-Noi et al., 2008). O coeficiente de variação (*R*<sup>2</sup>) equivalente a 0,9507 indica que 95,07% da variabilidade da resposta podem ser explicados pelo

modelo, representada pela distribuição comportamental dos valores experimentais em função dos valores preditos (Fig. 3).

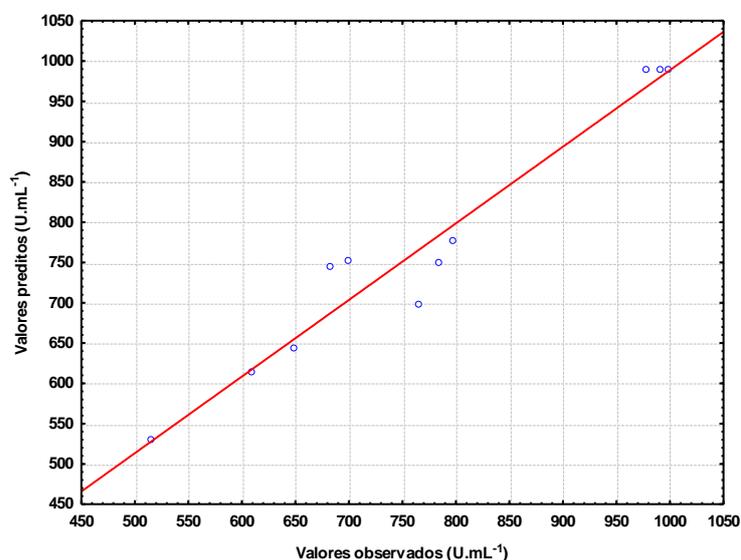
**Tabela 5**

Análise de variância (ANOVA) para a produção de ciclodextrina glicosiltransferase utilizando amido de araruta como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio.

Fatores	GL	SQ	QM	Fc
Regressão	3	250064,1	83354,7	45,0 <sup>a</sup>
Resíduo	7	12967,5	1852,5	
Total	10	263031,6		

<sup>a</sup> Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

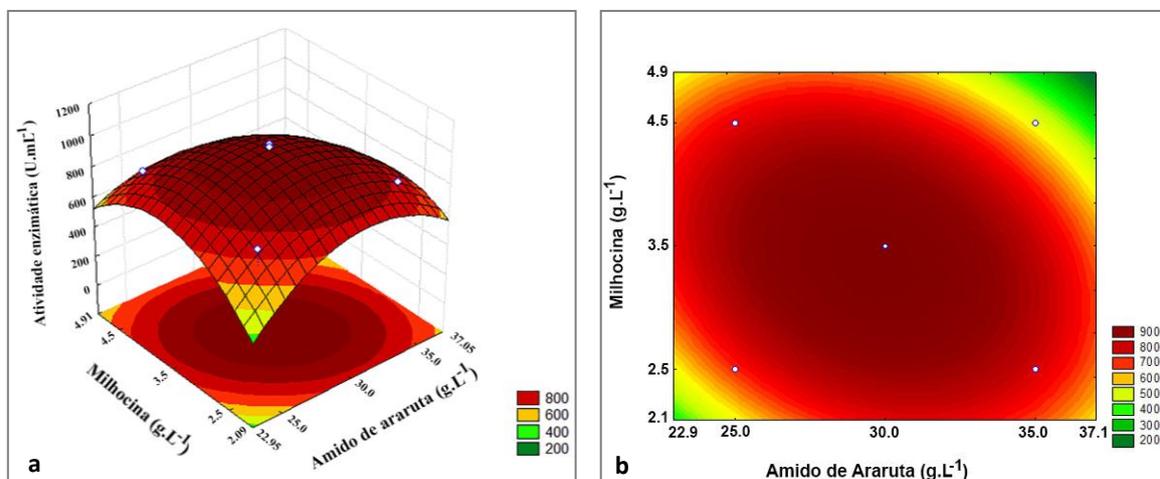
$R^2 = 0,95$ .



**Fig. 3.** Valores observados e preditos pelo sistema para otimização da produção de CGTase ( $\text{U.mL}^{-1}$ ) pela cepa SM-02.

A partir desta análise, os resultados foram adequados à construção de gráficos de superfície de resposta (Fig. 4a) e curva de contorno (Fig. 4b) os quais exibem o comportamento da produção de CGTase em função das concentrações de amido de araruta e milhocina. Os gráficos confirmam que a melhor resposta para a produção enzimática encontra-se na zona de otimização, onde está localizado o ponto central (região em vermelho escuro). A enzima apresentou menor produção nos níveis inferiores (-1,41 e -1) e superiores (+1 e +1,41) onde são encontradas as concentrações mais baixas e mais altas, respectivamente.

Analisando as curvas de contorno, verifica-se que em torno do ponto de otimização encontra-se uma faixa ótima das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas. Os resultados indicam que qualquer concentração que se encontra dentro desta faixa pode ser utilizada na produção da enzima, ainda assim, mantendo o processo na condição otimizada. A fonte de carbono apresentou concentrações ótimas entre 27,5 g.L<sup>-1</sup> e 32,5 g.L<sup>-1</sup>. Para a fonte de nitrogênio, as concentrações ótimas encontram-se entre 3 g.L<sup>-1</sup> e 4,0 g.L<sup>-1</sup>. A análise da superfície de resposta e curva de contorno têm esta vantagem de mostrar uma faixa de concentrações para a produção máxima, ao invés de uma única concentração específica (Treichel et al. 2009). Evidências como estas são fundamentais, oferecendo às indústrias de aplicação maior liberdade para utilizar uma faixa de concentração de substrato, ao invés de um ponto fixo único. Assim, permite uma maior variabilidade na quantidade da matéria-prima sem interferir na produção, principalmente no que se refere a substratos complexos, nos quais uma considerável variação na composição pode ocorrer.



**Fig. 4.** (a) Superfície de resposta da produção de CGTase pela cepa SM-02. (b) Curvas de contorno destacando a zona de otimização (vermelho escuro).

Ai-Noi et al. (2008) encontraram resultados semelhantes aos do presente estudo com a CGTase de *Bacillus* sp. otimizando o meio de produção com 3,34% de amido de sorgo. Zain et al. (2007) concluíram que amido de tapioca utilizado acima de 3% provoca uma queda acentuada na produção de CGTase. Park et al. (1995) explicam que o excesso de substrato aumenta a viscosidade do meio de

cultura possibilitando interferências no processo de absorção do oxigênio pelo micro-organismo. Ibrahim et al. (2005) otimizaram o meio de produção de *Bacillus* cepa G1 aplicando o planejamento experimental DCCR, com 4% de amido de tapioca, 2% de peptona, 0,04% de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e 1% de  $Na_2CO_3$  e concluíram que a produção enzimática com meio otimizado ( $54,90 \text{ U.mL}^{-1}$ ) foi 53% superior a alcançada por meio do meio basal proposto por Nakamura e Horikoshi (1976), sugerindo que a metodologia aplicada é viável quando o objetivo é alcançar o rendimento máximo. Zain et al. (2007) realizaram estudos de otimização do meio de produção da CGTase produzida por *Bacillus* sp. TS1-1 através de DCCR. O meio otimizado com 3,3% de amido de tapioca e 0,13% de extrato de levedura atingiu a produção máxima de  $78,05 \text{ U.mL}^{-1}$ . A partir da otimização dos parâmetros envolvidos no experimento, a metodologia experimental DCCR permitiu aos autores concluir que para a produção de CGTase atingir valores máximos pelo sistema de fermentação em batelada é preciso aumentar a fonte de carbono até um certo limite e diminuir ao máximo a fonte de nitrogênio.

Os resultados de pesquisas como estas corroboram o fato de que bactérias produtoras de CGTase adaptam-se muito bem a variados meios de cultura enriquecidos com substratos de baixo custo, obtendo-se alta produtividade.

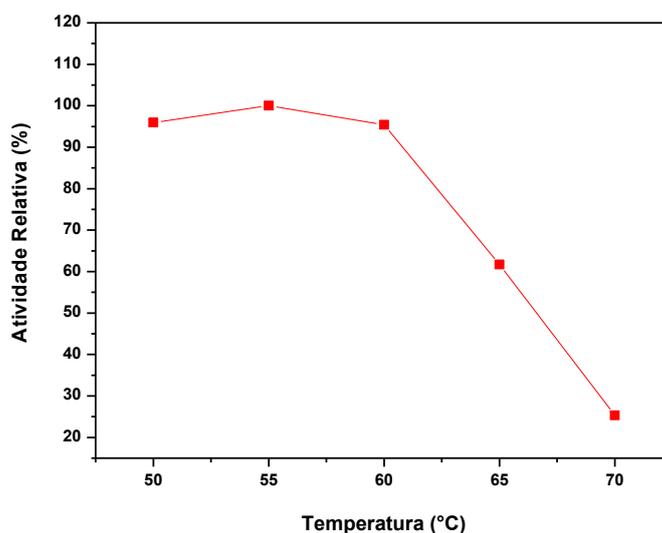
Desenvolvido por Box e Wilson (1951) com o objetivo de se obter respostas otimizadas na indústria, o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) é considerado um delineamento muito útil, ideal a ser aplicado em ocasiões onde o erro experimental é pequeno e, em geral, variáveis externas podem ser facilmente controladas. Além disso, reduz o número de ensaios, conseqüentemente, reduzindo o tempo e os custos com reagentes, energia e mão de obra. Além disso, oferece um suporte estatístico para os resultados (Rodrigues e lemma, 2009), o que confere maior confiabilidade ao processo.

### 3.4. Caracterização parcial

#### 3.4.1. Perfil de temperatura

A atividade de ciclização da enzima da cepa SM-02 apresentou-se elevada na faixa de 50 – 60 °C, exibindo temperatura ótima de reação a 55 °C (Fig. 5). Os

resultados são corroborados por Sin et al. (1991), Martins e Hatti-Kaul (2002), Cao et al. (2005), Sian et al. (2005), Hirano et al. (2006), Atanasova et al. (2011) e Mora et al. (2012) que reportam esta faixa de temperatura para CGTases de bactérias alcalofílicas. Ai-Noi et al. (2008) descreveram uma faixa um pouco mais ampla, de 45 °C a 60 °C, embora também tenha sido reportada a temperatura de 65 °C para algumas linhagens como *Bacillus firmus* NCIM 5119 (Gawande et al., 1999) e *Paenibacillus campinasensis* H69-3 (Alves-Prado et al., 2007). Há raras exceções como *Thermoanaerobacter kivui* (Avci e Dönmez, 2009), que apresenta temperatura ótima de reação de 80 °C. No campo industrial, esta ampla faixa de temperatura é uma característica interessante por permitir uma variação durante a reação enzimática, sem interferir na produtividade.



**Fig. 5.** Efeito da temperatura na atividade de ciclização da CGTase da cepa SM-02. A atividade da enzima foi mensurada sob condições padrões de ensaio em diferentes temperaturas, em pH 8.0, na presença de  $\text{Ca}^{+2}$ . A atividade da enzima correspondente a 100% foi  $1102,82 \text{ U.mL}^{-1}$ .

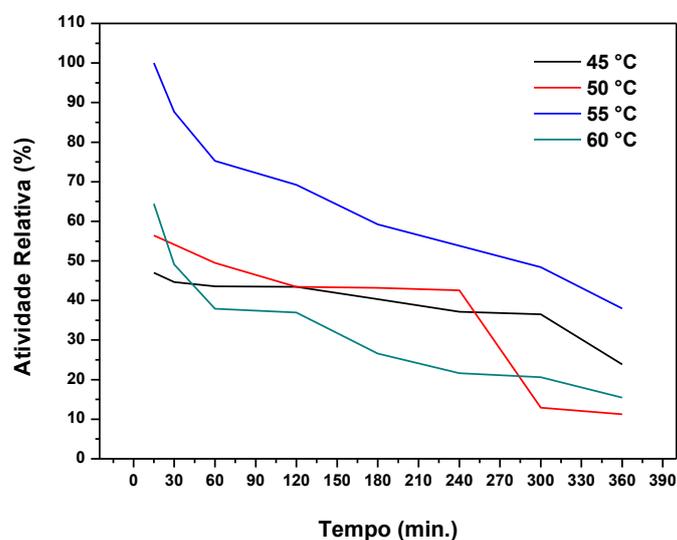
#### 3.4.2. Efeito da temperatura na estabilidade térmica

Geralmente, a propriedade de estabilidade térmica de CGTases sofre uma variação considerável, especialmente devido ao habitat no qual o micro-organismo está inserido. Esta é uma das mais importantes propriedades a serem consideradas em processos biotecnológicos, sendo até mesmo um fator limitante durante a seleção de enzimas de interesse industrial (Atanasova et al., 2011). O conhecimento em relação à estabilidade de enzimas oferece informações a

respeito do limite de temperatura durante o processo de reação, considerando uma faixa de tempo, sem que a mesma sofra desnaturação térmica, minimizando perdas. Além disso, conhecer as condições de termoestabilidade é útil durante o armazenamento de enzimas e produtos formulados à base das mesmas.

No presente estudo, a atividade de ciclização da CGTase da cepa SM-02 foi mantida acima de 50% a 45°C e 55°C após 4 h de incubação (Fig. 6). A 60 °C a enzima apresentou rápida desativação térmica após 1 h de incubação. Estudos realizados por Moriwaki et al. (2007) demonstraram que a CGTase de *Bacillus firmus* manteve-se estável nesta mesma faixa de tempo.

Sendo a atividade máxima da CGTase da cepa SM-02 atingida a 55 °C e temperatura ótima de reação também a 55 °C, esta pode ser considerada excelente para aplicações industriais, sem que haja rápida perda da atividade. A mesma termoestabilidade foi citada nos estudos de Sabioni e Park (1992) e Alves-Prado et al. (2007). Em geral, a faixa de temperatura estável reportada na literatura varia entre 40 °C e 60 °C para micro-organismos alcalofílicos.



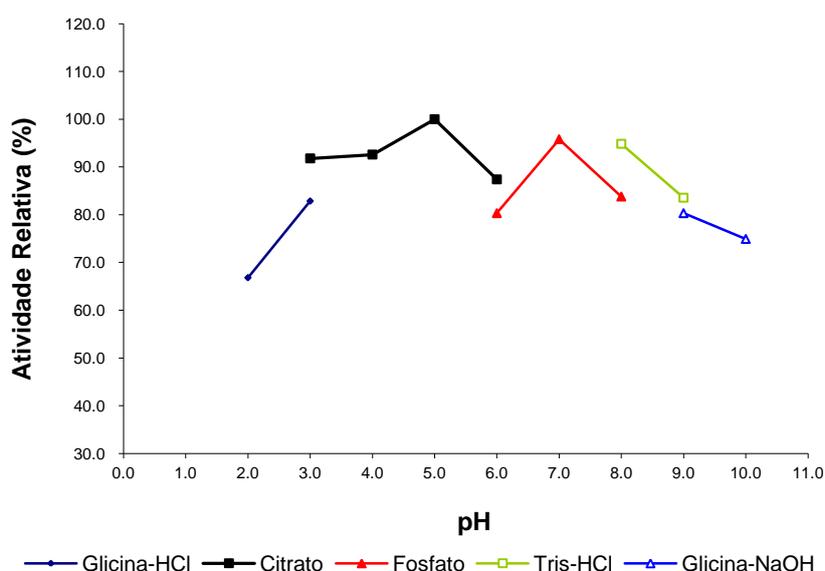
**Fig. 6.** Efeito da temperatura na estabilidade da CGTase da cepa SM-02. A atividade da enzima foi mensurada sob condições de ensaio a 55 °C, pH 5,0, na presença de  $Mg^{+2}$ . A atividade da enzima correspondente a 100% foi 1154,02 U.mL<sup>-1</sup>.

### 3.4.3. Perfil de pH

A enzima exibiu atividade acima de 90% na faixa de pH de 3,0 – 8,0, apresentando máxima atividade de ciclização em pH 5,0 (Fig. 7). Nas faixas de

pH de 2,0 a 3,0, a atividade foi mantida acima de 65%. Em geral, pH muito ácidos raramente são reportados para as CGTases da maioria dos micro-organismos produtores. Porém, Mora et al. (2012) observaram que a faixa de 3,0 – 4,5 manteve a atividade da enzima de *Bacillus* sp. acima de 70%. Estes resultados são interessantes, uma vez que amplia a faixa de aplicação desta enzima em diferentes processos, diminuindo a necessidade de um controle muito rígido do pH. Além disso, o fato desta enzima apresentar elevada atividade em pH ácidos e alcalinos diminui o risco de contaminação por outras bactérias contaminantes, potencialmente competidoras, presentes nos processos fermentativos (Schneider, 1998).

Assim, pode-se considerar, de acordo com os dados obtidos, que as características bioquímicas da enzima em estudo são adequadas para uso industrial. Segundo Vandamme e Derycke (1983), altas temperaturas (em torno de 50°C) e baixos valores de pH (em torno de 4,0), são condições operacionais de grande interesse industrial, uma vez que diminuem os riscos de contaminação microbiana e melhoram a solubilidade de alguns substratos. A Tabela 6 faz um breve resumo das características das CGTases de alguns micro-organismos reportados na literatura, além do isolado SM-02.



**Fig. 7.** Efeito do pH na atividade de ciclização da CGTase da cepa SM-02. A atividade da enzima foi mensurada sob condições de ensaio em diferentes valores de pH a 50 mM, na temperatura de 55 °C, na presença de  $\text{Ca}^{+2}$ . A atividade da enzima correspondente a 100% foi 1085,88  $\text{U.mL}^{-1}$ .

**Tabela 6**

Caracterização de algumas CGTases produzidas por diferentes isolados.

Bactérias produtoras	pH ótimo	Temperatura ótima	pH estável	Temperatura estável	Massa molecular (kDa)	Referências
<i>B. coagulans</i>	6,5	nd <sup>a</sup>	5,0-10,0	Acima de 65 °C	36	Akimura et al. (1991)
<i>Bacillus lentus</i>	6,5-7,5	45-50 °C	6,5-8,5	55 °C/-Ca <sup>+2</sup>	33	Sabione e Park (1992)
<i>B. ohbensis</i> C-1400	5,0	55 °C	6,5-10,0	Acima de 45 °C	80	Sin et al. (1991)
<i>Bacillus firmus</i> NCIM 5119	5,5 e 8,5	65 °C	7,0-11,0	Acima de 30 °C, termolábil	78	Gawande et. Al. (1999)
<i>B. agaradhaerens</i> LS-3C	9,0	55 °C	5,0-11,4	Acima de 40 °C	110	Martins e Hatti-Kaul (2002)
<i>Bacillus</i> sp. 7-12	5,0 e 8,5	60 °C	6,0-10,0	Abaixo de 70 °C	69	Cao et al. (2005)
<i>Bacillus</i> sp. G1	6,0	60 °C	7,0-9,0	Acima de 70 °C/Ca <sup>2+</sup> 20 mM	75	Sian et al. (2005)
<i>Bacillus</i> sp. G-825-6 CGTase recombinante	8,0-10,0	50-55 °C	7,0-12,0	Acima de 50 °C	78,2	Hirano et al. (2006)
<i>Paenibacillus campinasensis</i> H69-3	6,5	65 °C	6,0-11,0	55 °C	70	Alves-Prado et al. (2007)
<i>Thermoanaerobacter kivui</i>	7,0 a 8,0	80 °C	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	Avci e Dönmez (2009)
<i>B. pseudocaliphilus</i> 20RF	6,0 e 9,0	60 °C	5,0-11,0	70 °C	70	Atanasova et al. (2011)
<b>Cepa SM-02</b>	<b>5,0</b>	<b>55 °C</b>	<b>nd<sup>a</sup></b>	<b>55 °C/Mg<sup>+2</sup> 50 mM</b>	<b>nd<sup>a</sup></b>	<b>Presente estudo</b>

<sup>a</sup> nd: não determinado.

#### 3.4.4. Efeito de íons metálicos

Foi observada baixa atividade de ciclização da CGTase da cepa SM-02 na presença de Hg<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup> e Zn<sup>+2</sup> (Tabela 7). Estes resultados são corroborados pela literatura, que descreve estes sais como potentes inibidores da atividade de CGTase de várias espécies de *Bacillus* como *Bacillus* sp. G1 (Sian et al. 2005), *B. pseudocaliphilus* 20R (Atanasova et al., 2011) e *B. agaradhaerens* LS-3C (Martins e Hatti-Kaul, 2002).

Por outro lado, a atividade da enzima foi estimulada na presença de Mg<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>, EDTA, K<sup>+</sup>, Ba<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>, Na<sup>+</sup> e Cu<sup>+2</sup>. Dentre os íons avaliados, foi observado que Mg<sup>+2</sup> foi quem mais influenciou na atividade da CGTase do isolado SM-02. Estudos anteriores já demonstraram que Mg<sup>+2</sup> a 15 mM estimulou fortemente a atividade da enzima de *Bacillus pseudocaliphilus* 20R (Atanasova et al., 2011).

Tem sido reportado que  $\text{Cu}^{+2}$  é um importante inibidor das CGTases de *Bacillus* sp. G1 (Sian et al., 2005), *Bacillus agaradhaerens* LS-3C (Martins e Hatti-Kaul, 2002) e *Paenibacillus campinasensis* H69-3 (Alves-Prado et al., 2007). Porém, a CGTase do isolado SM-02 manteve sua atividade de ciclização próxima a 100%, assemelhando-se à CGTase de *Bacillus pseudocaliphilus* 20R (Atanasova et al., 2011).

A capacidade de modificar as taxas de uma reação enzimática torna interessante o estudo da influência de Íons metálicos ativadores ou inibidores de enzimas, bem como substâncias de outra natureza como alcoóis (Martins e Hatti-Kaul, 2003), que são capazes de interferir no desempenho de muitas enzimas. Por esta razão, alguns pesquisadores adicionam ao meio de cultura substâncias ativadoras durante a biocatálise (Vieira, 2006), com o objetivo de aumentar as taxas de reação enzimática. Por outro lado, conhecer as substâncias que inibem o desempenho de determinadas enzimas é essencial para que o seu uso seja evitado durante os processos fermentativos.

**Tabela 7**

Efeito de íons metálicos e agentes químicos na atividade de ciclização da CGTase da cepa SM-02.

Íons metálicos	Atividade residual (%)
Controle (sem adição)	100.0
MgCl <sub>2</sub>	118.5
EDTA	101.1
CaCl <sub>2</sub>	107.9
FeCl <sub>3</sub>	88.9
NaCl	104.6
ZnSO <sub>4</sub>	82.2
KCl	105.4
MnCl <sub>2</sub>	106.7
CuSO <sub>4</sub>	98.4
BaCl <sub>2</sub>	106.5
HgCl <sub>2</sub>	84.2

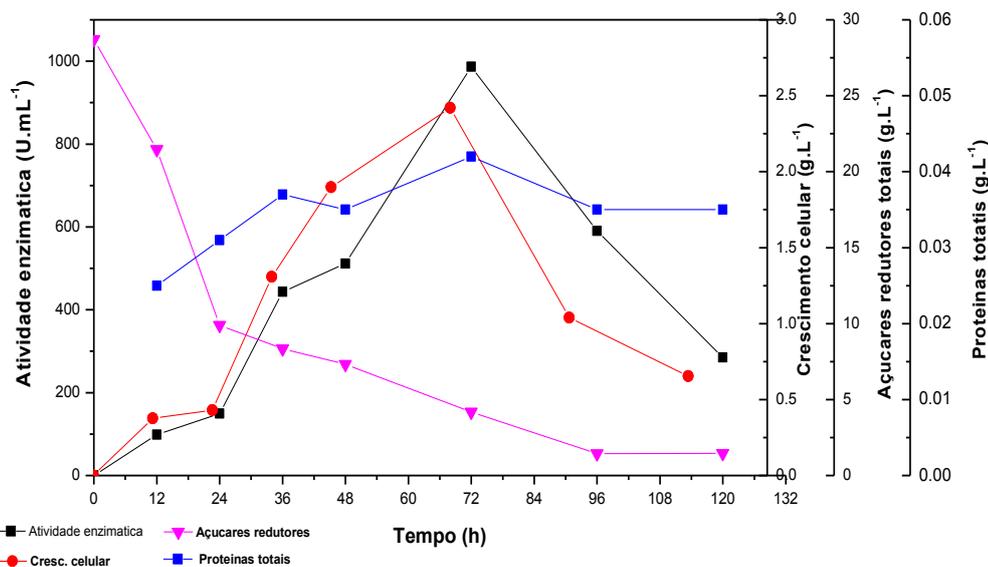
#### 4. Cinética da produção de CGTase em amido de araruta e milhocina

Para verificar a cinética de produção da enzima, foram realizados ensaios em triplicata, na condição otimizada, durante 120 horas (Fig. 8). Foram acompanhados, também, o crescimento celular, o consumo do substrato e a produção de proteínas totais. Observa-se que a síntese da enzima foi maior na fase exponencial de crescimento do micro-organismo, alcançando um pico após 72 horas de fermentação. Sob estas condições, a velocidade de crescimento específica ( $\mu$ ) foi de  $0,17 \text{ h}^{-1}$ . Os rendimentos da biomassa ( $Y_{x/s}$ ) e da enzima ( $Y_{p/s}$ ) em função do substrato foram de  $0,12 \text{ g.g}^{-1}$  e de  $51,44 \text{ U.mL}^{-1}.\text{g}^{-1}$ , respectivamente. O rendimento da enzima em função da biomassa ( $Y_{p/x}$ ) foi de  $434,47 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e a produtividade foi de  $12,34 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . A atividade específica foi de  $23,49 \text{ U.mg}^{-1}$  (Tabela 8). Em condições otimizadas, altas taxas de produção de CGTase foram obtidas e a elevada produtividade corroborou a premissa de que substratos agroindustriais de fácil obtenção e baixo custo podem ser aplicados na produção de ciclodextrinas. Além disso, a cepa SM-02 demonstrou ser detentora de um excelente potencial biotecnológico para a produção de CGTase.

**Tabela 8**

Produção, rendimento e produtividade de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) pela cepa SM-02 em amido de araruta e milhocina

Parâmetros	Resultados
Velocidade de crescimento específica ( $\text{h}^{-1}$ )	0,17
$Y_{x/s}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	0,12
$Y_{p/s}$ ( $\text{U.mL}^{-1}.\text{g}^{-1}$ )	51,44
$Y_{p/x}$ ( $\text{U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	434,47
$Q_p$ ( $\text{U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	12,34
Atividade específica ( $\text{U.mg}^{-1}$ )	23,49



**Fig. 8.** Cinética de produção enzimática, crescimento celular, açúcares redutores e proteínas totais em condições otimizadas durante 120 horas, a 35 °C e 150 rpm.

## Agradecimentos

Os autores são gratos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelos recursos financeiros disponibilizados para realização deste trabalho.

## Referências

- 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. *Biotechnol.* 7, 10–18.
- Akimura, K., Yagi, T., Yamamoto, S., 1991. Purification and properties of *Bacillus coagulans* cyclomalto-dextrin glucanotransferase. *J. Ferment. Bioeng.* 71, 322–328.
- Alves-Prado, H.F., Gomes, E., Da Silva, R., 2006. Evaluation of solid and submerged fermentations for the production of cyclodextrin glycosyltransferase by *Paenibacillus campinasensis* H69-3: characterization of crude enzyme. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129, 1–3, 234–246.

- Alves-Prado, H.F., Gomes, E., Da Silva, R., 2007. Purification and characterization of a cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus campinasensis* H69-3. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 136–140, 41–55.
- Atanasova, N., Petrova, P., Ivanova, V., Yankov, D., Vassileva, A., Tonkova, A., 2008. Isolation of novel alkaliphilic *Bacillus* strains for cyclodextrin glucanotransferase production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 149, 155–67.
- Atanasova, N., Kitayska, T., Bojadjieva, I., Yankov, D., Tonkova, A., 2011. A novel cyclodextrin glucanotransferase from alkaliphilic *Bacillus pseudocaliphilus* 20RF: Purification and properties. *Process. Biochem.* 46, 116–122.
- Avci, A., Dönmez, S., 2009. A novel thermophilic anaerobic bacteria producing cyclodextrin glycosyltransferase. *Process Biochem.* 44, 36–42.
- Biwer, A., Antranikian, G., Heinzle, E., 2002. Enzymatic production of cyclodextrins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 609–617.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248–54.
- Cao, X., Jin, Z., Wang, X., Chen, F., 2005. A novel cyclodextrin glycosyl transferase from an alkalophilic *Bacillus* species: purification and characterization. *Food Res. Int.* 38, 309–314.
- De Azeredo, L.A.I., Lima, M.B., Coelho, R.R.R., Freire, D.M.G., 2006. A low-cost fermentation medium for thermophilic protease production by *Streptomyces* sp 594 using feather meal and corn steep liquor. *Curr. Microbiol.* 53, 335–339.
- Denter, U., Buschmann, H.J., Knittel, D., Schollmeyer, E., 1997. Modifizierung von Faseroberflächen durch die permanente Fixierung supramolekularer Komponenten, Teil 2: Cyclodextrin. *Angew. Makromol. Chem.* 248, 165.
- Ferrarotti, S., Rosso, A., Marechal, M., Krymkiewicz, N., Marechal, L., 1996. Isolation of two strain (S-R Type) of *Bacillus circulans* and purification of a cyclomaltodextrin-glucanotransferase. *Cell. Mol. Biol.* 42, 653-657.
- Gawande, B.N., Goel, A., Patkar, A.Y., Nene, S.N., 1999. Purification and properties of a novel raw starch degrading cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus*. *Appl. Microbiol. Biot.* 51, 504–9.
- 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.
- Hirano, K., Ishihara, T., Ogasawara, S., Maeda, H., Abe, K., Kakajima, T., Yamagata, Y., 2006. Molecular cloning and characterization of a novel  $\gamma$ -CGTase from alkalophilic *Bacillus* sp. *Appl. Microbiol. Biot.* 70, 193–201.

- Khairizal, M., 2002. Cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. TS1 bacterium. Master thesis, Universiti Teknologi Malaysia.
- Li, Z., Wang, M., Wang, F., Gu, Z., Du, G., Wu, J., Chen, J., 2007.  $\gamma$ -Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 245–255.
- Leonel, M., Cereda, M.P., Sarmiento, S.B.S., 2002. Processamento de Araruta (*Maranta arundinacea*) para extração e caracterização da fração amilácea. *Braz. J. Food Technol.* 5, 151 – 155.
- Martins, R.F., Hatti-Kaul, R., 2002. A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkalophilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterization. *Enzyme Microbiol. Technol.* 30, 116-24.
- Martins, R.F., Hatti-Kaul, R., 2003. *Bacillus agaradhaerens* LS-3C cyclodextrin glycosyltransferase: activity and stability features. *Enzyme Microbiol. Technol.* 33, 819-827.
- Menocci, V., Goulart, A.J., Adalberto, P.R., Tavano, O.L., Marques, D.P., Contiero, J., Monti, R., 2008. Cyclodextrin glycosyltransferase production by new *Bacillus* sp. strains isolated from Brazilian soil. *Braz. J. Microbiol.* 39, 682 – 688.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
- Mora, M.M.M, Sánchez, K.H., Santana, R.V., Rojas, A.P., Ramírez, H.L., Torres-Labandeira, J.J., 2012. Partial purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from alkalophilic *Bacillus* species. Disponível em: < <http://www.springerplus.com/content/1/1/61> >. Acesso em: 22 jun. 2013.
- Moriwaki, C., Costa, G.L., Pazzetto, R., Zanin, G.M., Moraes, F.F., Portilho, M., Matioli, G., 2007. Production and characterization of a new cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* isolated from Brazilian soil. *Process Biochem.* 42, 1384 – 1390.
- Nakamura, N., Horikoshi, K., 1976. Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *B. sp.* *Agric. Biol. Chem.* 40, 935–941.
- Nascimento, R.P., Alves, N., Jr., Pereira, N., Jr., Bon, E.P.S., Coelho, R.R.R., 2009. Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 529–535.
- Nascimento, R.P., Marques, S., Alves, L., Gírio, F.M., Amaral-Collaco, M.T., Sacramento, D.R., Bon E.P.S., Coelho, R.R.R., 2003. A novel strain of

*Streptomyces malaysiensis* isolated from Brazilian soil produces high endo- $\beta$ -1,4-xylanase titres. *World J. Microbiol. Biotech.* 19, 879–881.

- Park, Y.S., Dohijima, T., Okabe, M., 1995. Enhanced  $\alpha$ -amylase production in recombinant *Bacillus brevis* by fed-batch culture with amino-acid control. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 36–44.
- Pinto, F.S.T.; Flôres, S.H.; Ayub, M.A.Z.; Hertz, P.F., 2007. Production of cyclodextrin glycosyltransferase by alkaliphilic *Bacillus circulans* in submerged and solid-state cultivation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 30, 377–382.
- Rodrigues, M.I., Iemma, A.F., 2009. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos, second ed., Cárita Editora, Brasil.
- Sabioni, J.G., Park, Y.K., 1992. Cyclodextrin glycosyltransferase production by alkaliphilic *Bacillus lentus*. *Rev. Microbiol.* 23, 128–32.
- Schneider, A.L.S., 1998. Estudo da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Sian, H.K, Said, M., Hassan, O., Kamaruddin, K., Ismail, A.F., Rahman, R.A., Mahmood, N.A.N., Illias, R.M., 2005. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. G1. *Process Biochem.* 40, 1101–1111.
- Silva, F.H., Stam, C.J., Pijn, J.P.M., Suffczynski, P., 1999. Dynamics of the human alpha rhythm: Evidence for non-linearity? *Clin. Neurophysiol.* 110, 10, 1001–1013.
- Sin, K., Nakamura, A., Kobayashi, K., Matsuura, Y., Uozumi, T., 1991. Cloning and sequencing of a cyclodextrin glucanotransferase gene from *Bacillus ohbensis* and its expression in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biot.* 35, 600–605.
- Sehnem, N.T., Souza-Cruz, P., Peralba, M.C.R., Ayub, M.A.Z., 2010. Biodegradation of tebuconazole by bacteria isolated from contaminated soils. *J. Environ. Sci. Health Part B.* 45, 67-72.
- Souza, R.F., Coelho, R.R.R., Macrae, A., Soares, R.M.A., Nery, D.C.M., Semêdo, L.T.A. S., Alvino, C.S., Gomes, R.C., 2008. *Streptomyces lunalinharesii* sp. nov., a novel chitinolytic streptomycete isolated from cerrado soil, Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 58, 2774–2778.
- Stam, M.R., Danchin, E.G.J., Rancurel, C., Coutinho, P.M., Henrissat, B., 2006. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotation of  $\alpha$ -amylase-related proteins. *Protein. Eng. Des. Select.* 1, 555–62.

- Terada, Y., Yanase, M., Takata, H., Takaha, T., Okada, S., 1997. Cyclodextrins are not the major cyclic  $\alpha$ -1,4-glucans produced by the initial action of cyclodextrin glycosyltransferase on amylose. *J. Biol. Chem.* 272, 15729–15733.
- Tien, S.F., 2001. Production of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. G1. Master's thesis, University Technology of Malaysia.
- Tonkova, A., 1998. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme Microb. Tech.* 22, 678–686.
- Treichel, H., Mazutti, M.A., Maugeri, F., Rodrigues, M.I., 2009. Use of a sequential strategy of experimental design to optimize the inulinases production in a batch bioreactor, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 895-900.
- Vieira, M.R. Estudo da biorredução de compostos carbonílicos por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* sp. Dissertação de Mestrado, Universidade Regional de Blumenau.
- Vandamme, E.J., Derycke, D.G., 1983. Microbial inulinases: Fermentation process, properties, and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* 29, 139-176.

## **CAPÍTULO II**

# **OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO MICROBIANA DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE UTILIZANDO FARINHA DE MANDIOCA E MILHOCINA COMO SUBSTRATOS**

Artigo a ser submetido, formatado de acordo com as normas da revista *Applied  
Microbiology and Biotechnology*

## **Otimização da produção microbiana de ciclodextrina glicosiltransferase utilizando farinha de mandioca e milhocina como substratos**

**Resumo** Ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase; EC 2.4.1.19) é uma enzima de interesse industrial com capacidade de converter o amido em açúcares cíclicos não redutores denominados ciclodextrinas. A formação de complexos de inclusão com uma infinidade de substâncias faz desses compostos excelentes candidatos a diversas aplicações biotecnológicas, principalmente nas indústrias alimentícia e farmacêutica. O presente estudo teve como objetivo estabelecer as melhores condições de cultivo para a produção de CGTase da cepa SM-02, isolado de solo de lagoa de descarte de manipueira da região de Cruz das Almas, Bahia, Brasil. A otimização foi realizada por meio da metodologia experimental Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), de acordo com a matriz do planejamento fatorial  $2^2$ , utilizando-se como fontes de carbono e nitrogênio farinha de mandioca e milhocina, respectivamente. A produção máxima de  $1087,89 \text{ U.mL}^{-1}$  foi obtida com  $25,0 \text{ g.L}^{-1}$  de farinha de mandioca e  $3,5 \text{ g.L}^{-1}$  de milhocina, após 72 horas de fermentação submersa, a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  e 150 rpm. A enzima apresentou maior atividade de ciclização em pH 5,0, temperatura ótima de  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  e manteve a estabilidade térmica a  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 3 h. Na presença dos íons metálicos  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ , EDTA,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ba}^{+2}$  e  $\text{Na}^+$  a atividade da enzima foi estimulada e parcialmente inibida na presença de  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$ . A produtividade máxima de CGTase obtida foi de  $8,56 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Os resultados de otimização indicaram que farinha de mandioca e milhocina são promissores para a produção da  $\beta$ -CGTase da cepa SM-02.

**Palavras-chave** CGTase, otimização, planejamento fatorial, substratos agroindustriais

## Introdução

O mercado mundial de enzimas de interesse industrial e ambiental de origem microbiana tem se desenvolvido largamente nos últimos anos, fato que vem incentivando a busca por novos micro-organismos com potencial biotecnológico para a produção enzimática. Solos tropicais brasileiros são dotados de uma microbiota que exhibe capacidade excepcional para a produção de enzimas de diversas naturezas, embora, em sua maioria, apresente uma comunidade microbiológica ainda desconhecida (Nascimento et al. 2009; Souza et al. 2008; De Azeredo et al. 2006; Nascimento et al. 2003). De acordo com a literatura, diversas linhagens de bactérias produtoras de ciclodextrina glicosiltransferase já foram isoladas de ambientes diferenciados em várias partes do mundo, inclusive no Brasil (Ferrarotti et al. 1996; Tien 2001; Khairizal 2002; Alves-Prado et al. 2006; Moriwaki et al. 2007; Menocci et al. 2008; Atanasova et al. 2008). Ainda assim, há carência de estudos com solos do Estado da Bahia, Brasil, direcionados para o isolamento de micro-organismos com potencial biotecnológico relacionado à produção dessa enzima.

Ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase; E.C. 2.4.1.19) é uma enzima extracelular que catalisa a hidrólise das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 e a subsequente reação de transglicosilação intramolecular (ciclização) e intermolecular (desproporcionamento e acoplamento) de  $\alpha$ -1,4-glicanas (Terada et al. 1997; Tonkova 1998). Obtida de diversas linhagens de bactérias, esta enzima de natureza amilolítica é a única que tem a capacidade de converter o amido em uma mistura de açúcares não redutores denominados ciclodextrinas, além de açúcares lineares e dextrinas (Gastón et al. 2012). As ciclodextrinas, principal produto da reação de catálise da CGTase, são oligossacarídeos cíclicos compostos de unidades de D-(+)-glicopiranosose unidas por ligações do tipo  $\alpha$ -1,4. Com ampla aplicabilidade industrial, são capazes de formar complexos de inclusão hidrossolúveis com uma infinidade de substâncias promovendo modificações das propriedades físico-químicas das moléculas-hóspedes encapsuladas (Denter et al. 1997; Astray et al. 2009).

A composição dos meios de cultura para a produção de enzimas geralmente envolve fontes de carbono e nitrogênio obtidas a partir de processos

que demandam elevados custos de produção. Pesquisas direcionadas à busca por substratos de baixo custo de origem agroindustrial têm sido focadas com o objetivo de baratear o custo de produção da CGTase em escala comercial (Kim et al. 1997; Mahat et al. 2004; Ibrahim et al. 2005; Zain et al. 2007; Ai-Noi et al. 2008). Neste contexto, sendo a farinha derivada da raiz da mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz) um produto agroindustrial rico em amido, torna-se bastante viável o seu uso em processos fermentativos como substrato para a produção de CGTase. Denominada farinha de mandioca, este é um produto hortícola amplamente apreciado no Brasil, com destaque para as regiões Norte e Nordeste do país (Dias e Leonel 2006; Chisté e Cohen, 2011). Sua qualidade está diretamente ligada às características físico-químicas das raízes da mandioca, características associadas ao genótipo, às condições ambientais favoráveis, idade da planta, ponto de colheita, solo, variabilidade genética, matéria-prima e método de processamento das raízes (Lorenzi 2003; Souza et al. 2008). A composição da farinha de mandioca rica em amido, variável entre 60 – 80%, é um dos motivos que torna este alimento um componente nutricional bastante atrativo (Bobbio e Bobbio 2001).

O presente estudo teve como objetivo estabelecer condições ideais para a produção da CGTase do isolado SM-02, por meio da metodologia experimental Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), utilizando-se os substratos agroindustriais farinha de mandioca e milhocina como fontes alternativas de carbono e nitrogênio, respectivamente.

## **Material e Métodos**

### Micro-organismo

A cepa SM-02 utilizada nos testes de fermentação foi isolada a partir de amostras de solo contendo água de manipueira descartada por uma casa de farinha localizada na região de Cruz das Almas-BA, Brasil. A conservação foi realizada em criotubos contendo 2 mL de glicerol a 20% e estocados a -40 °C.

## Testes preliminares para avaliar a capacidade de produção de CGTase

A capacidade de produção de CGTase pelo isolado SM-02 foi avaliada em meio sólido contendo o corante fenolftaleína (Park et al. 1989), através da formação do halo representando a zona de degradação do amido. No centro de cada placa de Petri contendo meio sólido foi aplicado um orifício com 0,5 cm de diâmetro. Em seguida, 50 µL com aproximadamente  $3 \times 10^8$  células foram plaqueados nos orifícios. As placas foram incubadas a 37 °C e os halos das colônias medidos após 72 h de crescimento.

## Ensaio fermentativos

Para reativar o micro-organismo foram realizadas subculturas da cultura estoque em meio sólido Nakamura e Horikoshi (1976), contendo ( $\text{g.L}^{-1}$ ): amido solúvel, 10; peptona, 5; extrato de levedura, 5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1; ágar bacteriológico, 15;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 10 (esterilizado separadamente e adicionado ao meio de cultivo após a temperatura atingir 60°C), pH 9,8. Após 72 h de crescimento, o inóculo foi preparado com uma alçada da subcultura em um Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido enriquecido com farinha de mandioca e milhocina para adaptação das células ao meio de fermentação, pH 9.8. Após 24 h de incubação, uma alíquota de 1 mL do inóculo foi padronizada a partir de uma  $\text{OD}_{600}$  fixada em 0,1 e o volume final de cada ensaio foi ajustado para 30 mL de meio de cultivo, substituindo-se o amido solúvel do meio basal por farinha de mandioca e peptona e extrato de levedura por milhocina (Sigma®). A rotação foi fixada em 150 rpm e temperatura de 35 °C. Após 72 h de fermentação, amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm, à 4 °C, durante 30 minutos. O sobrenadante livre de células foi utilizado na determinação das atividades enzimáticas e o precipitado na determinação de biomassa.

## Otimização usando Delineamento Composto Central Rotacional

A otimização das concentrações de farinha de mandioca como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio foi estudada empregando a

metodologia de superfície de resposta. A atividade de CGTase ( $\text{U.mL}^{-1}$ ) foi considerada como variável dependente e concentrações dos substratos como variáveis independentes. Uma matriz de planejamento fatorial  $2^2$  foi realizada por meio de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), resultando em 11 ensaios (Rodrigues e lemma, 2009). 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 com três repetições para determinação do rigor da metodologia e, dois pontos axiais (+1,41 e -1,41). Este modelo é representado por uma regressão polinomial de segunda ordem para gerar curvas de níveis, 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 (amido de araruta 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 equação geral, 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) (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. 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 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 600 mM, pH 10,5. A leitura espectrofotométrica foi realizada em  $\lambda = 550$  nm.

#### Crescimento celular

Após fermentações, a biomassa foi separada do sobrenadante por centrifugação a 5.000 rpm por 30 minutos, a 4 °C. Em seguida, foi ressuspensa em 5 mL de água destilada e novamente centrifugada para lavagem das células. Após descarte do sobrenadante, 30 mL de água destilada foram adicionados e o precipitado ressuspenso. Em seguida, a leitura da densidade ótica em espectrofotômetro a 600 nm foi realizada e a biomassa quantificada através de comparação com a curva padrão baseada na massa seca x densidade ótica.

#### Determinação de açúcares redutores totais

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), utilizado para determinar a atividade de amilase sacarificante, através da quantificação do açúcar redutor liberado pela enzima (Miller, 1959). Previamente à aplicação da metodologia, as amostras foram submetidas a uma hidrólise ácida adicionando 1 mL de HCl 2 M a 1 mL do extrato enzimático bruto. Após fervura durante 20 minutos, as amostras foram neutralizadas com a adição de 1 mL de NaOH 2 M. O controle foi preparado conforme o processo descrito, substituindo-se o extrato enzimático pelo volume equivalente a água destilada. A absorbância foi determinada a  $\lambda = 540$  nm.

#### Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada por meio do método de Bradford (1976), adicionando-se 0,2 mL do extrato bruto enzimático a 2,0 mL do reagente de Bradford, preparado com o corante *Coomassie Brilliant Blue* BG-250.

O controle foi preparado substituindo-se a amostra pelo volume equivalente a água destilada. A leitura foi realizada em  $\lambda = 595$  nm.

#### Efeito do pH, temperatura, ions metálicos e estabilidade térmica

O efeito do pH na atividade de CGTase foi realizado testando-se os seguintes 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 na atividade de CGTase foi medida através das seguintes soluções preparadas a 50 mM:  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$ , NaCl,  $\text{ZnSO}_4$ , EDTA, KCl,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$  e  $\text{MgCl}_2$ .

A temperatura ótima de reação foi determinada incubando-se a enzima na faixa de temperatura de 50 – 70 °C, em pH 8,0. A estabilidade térmica foi determinada incubando-se a enzima na faixa de temperatura de 50 – 65 °C, durante 5 horas. Os ensaios foram conduzidos de acordo com os padrões de atividade enzimática através do método de complexação CD-PHE (Hamon e Morais 1990).

## Resultados

### Otimização por Delineamento Composto Central Rotacional

Através dos resultados obtidos no planejamento fatorial  $2^2$ , foram observadas influências dos parâmetros escolhidos ( $X_1$ : fonte de carbono e  $X_2$ : fonte de nitrogênio) e um modelo matemático adequado foi construído. Os valores observados e preditos pelo modelo experimental estão demonstrados na Tabela 1.

**Tabela 1** Matriz do planejamento experimental e valores das variáveis independentes ( $X_1$ : farinha de mandioca e  $X_2$ : milhocina) usados no DCCR

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais (g.L <sup>-1</sup> )		Atividade enzimática (U.mL <sup>-1</sup> )		Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	
	$X_1$	$X_2$	$X_1$	$X_2$	Valores observados	Valores preditos	Valores observados	Valores preditos
1	-1	-1	20,0	2,5	797,3	741,7	1,6	1,6
2	+1	-1	30,0	2,5	930,8	862,6	2,0	1,9
3	-1	+1	20,0	4,5	743,9	680,0	2,2	2,1
4	+1	+1	30,0	4,5	947,1	870,6	2,6	2,4
5	-1,41	0	17,9	3,5	670,9	728,0	1,6	1,6
6	+1,41	0	32,0	3,5	873,3	948,3	1,9	2,1
7	0	-1,41	25,0	2,1	698,1	758,2	1,8	1,8
8	0	+1,41	25,0	4,9	648,5	720,4	2,0	2,0
9	0	0	25,0	3,5	1045,2	1087,9	2,0	2,0
10	0	0	25,0	3,5	1141,2	1087,9	2,0	2,0
11	0	0	25,0	3,5	1077,2	1087,9	2,0	2,0

Observa-se que ocorreu um aumento gradual de 648,5 U.mL<sup>-1</sup> (ensaio 8) para 1.087,9 U.mL<sup>-1</sup> (média dos pontos centrais), sendo esta a produção máxima de CGTase alcançada, utilizando-se 25,0 g.L<sup>-1</sup> de farinha de mandioca e 3,5 g.L<sup>-1</sup> de milhocina. É possível observar que, nas mesmas concentrações da fonte de carbono, houve uma expressiva influência negativa da milhocina sobre a produção da enzima equivalente a 59,6%, quando se compara os valores no nível axial superior (ensaio 8) com os ensaios representados pelos pontos centrais (ensaios 9, 10 e 11).

Os efeitos estimados para a produção de CGTase estão apresentados na Tabela 2, onde a letra *L* representa os termos lineares e a letra *Q* representa os termos quadráticos. De todas as variáveis estudadas, farinha de mandioca e milhocina nos termos lineares e a interação não apresentaram p-valor significativo ao nível de 5% de probabilidade. Para a fonte de carbono no termo quadrático, ocorreu uma queda na produção da enzima de 249,75 U.mL<sup>-1</sup>. As concentrações de milhocina no termo quadrático apresentaram comportamento semelhante,

resultando em um efeito negativo sobre a produção da enzima que diminuiu em 348,59 U.mL<sup>-1</sup>.

**Tabela 2** Efeitos estimados para a produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) utilizando farinha de mandioca como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio

Fatores	Efeitos	Erro padrão	t (5)	p-valor
Média	1087,89 <sup>a</sup>	51,72	21,04	0,000004
(X <sub>1</sub> ) Farinha de mandioca (g.L <sup>-1</sup> ) (L)	155,75	63,34	2,46	0,057300
Farinha de mandioca (g.L <sup>-1</sup> ) (Q)	-249,75 <sup>a</sup>	75,39	-3,31	0,021175
(X <sub>2</sub> ) Milhocina (g.L <sup>-1</sup> ) (L)	-26,78	63,34	-0,42	0,690033
Milhocina (g.L <sup>-1</sup> ) (Q)	-348,59 <sup>a</sup>	75,39	-4,62	0,005716
1L x 2L	34,84	89,58	0,39	0,713325

De forma análoga, a Tabela 3 apresenta os coeficientes de regressão. O modelo matemático ajustado que descreve a produção de CGTase dentro da faixa estudada pode ser expresso pela equação Eq. (3):

$$y = 1087,89 + 77,88X_1 - 13,39X_2 + 17,42X_1X_2 - 124,88X_1^2 - 174,30X_2^2 \quad (3)$$

**Tabela 3** Coeficientes de regressão para a produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) utilizando farinha de mandioca como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro padrão	t (2)	p-valor
Média	1087,89 <sup>a</sup>	28,22	38.55238	0.000672
(X <sub>1</sub> ) Farinha de Mandioca (g.L <sup>-1</sup> ) (L)	77,88 <sup>a</sup>	17,28	4.50667	0.045875
Farinha de Mandioca (g.L <sup>-1</sup> ) (Q)	-124,88 <sup>a</sup>	20,57	-6.07151	0.026071
(X <sub>2</sub> ) Milhocina (g.L <sup>-1</sup> ) (L)	-13,39	17,28	-0.77482	0.519511
Milhocina (g.L <sup>-1</sup> ) (Q)	-174,30 <sup>a</sup>	20,57	-8.47418	0.013641
1L x 2L	17,42	24,44	0.71285	0.549890

<sup>a</sup> Significativo ao nível de 5% de probabilidade. L: termos lineares. Q: termos quadráticos

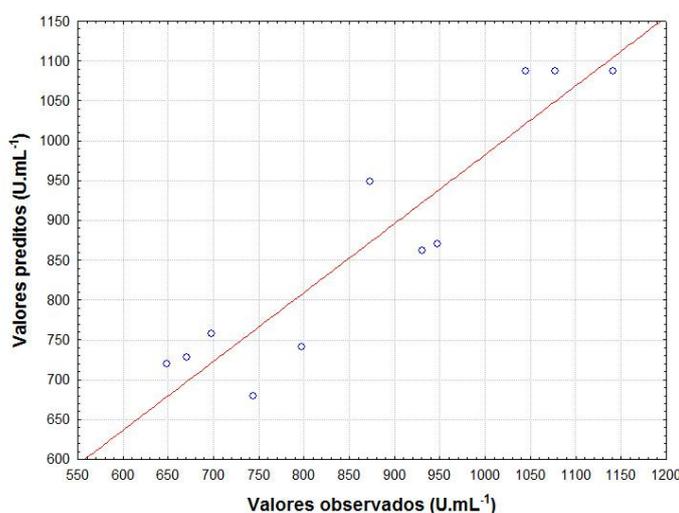
A Tabela 4 apresenta os resultados avaliados pela análise de variância (ANOVA). O F calculado equivalente a 14,9 indica que o modelo foi significativo ao nível de confiança aplicado (5% de probabilidade), havendo boa correlação entre os valores experimentados e os valores preditos, representados pela Fig. 1. Neste caso, o valor do F calculado foi 3,42 vezes maior que o F tabelado (4,35). Portanto, a considerar os valores de p calculados pela ANOVA, a variável mais

significativa foi milhocina no termo linear, seguida da farinha de mandioca no termo quadrático e linear, respectivamente.

**Tabela 4** Análise de variância (ANOVA) para a produção de ciclodextrina glicosiltransferase utilizando farinha de mandioca como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio

Fatores	GL	SQ	QM	Fc
Regressão	3	256.212,8	85.404,3	14,9*
Resíduo	7	40.120,0	5.731,4	
Total	10	296.332,8		

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.  $R^2 = 0,86$

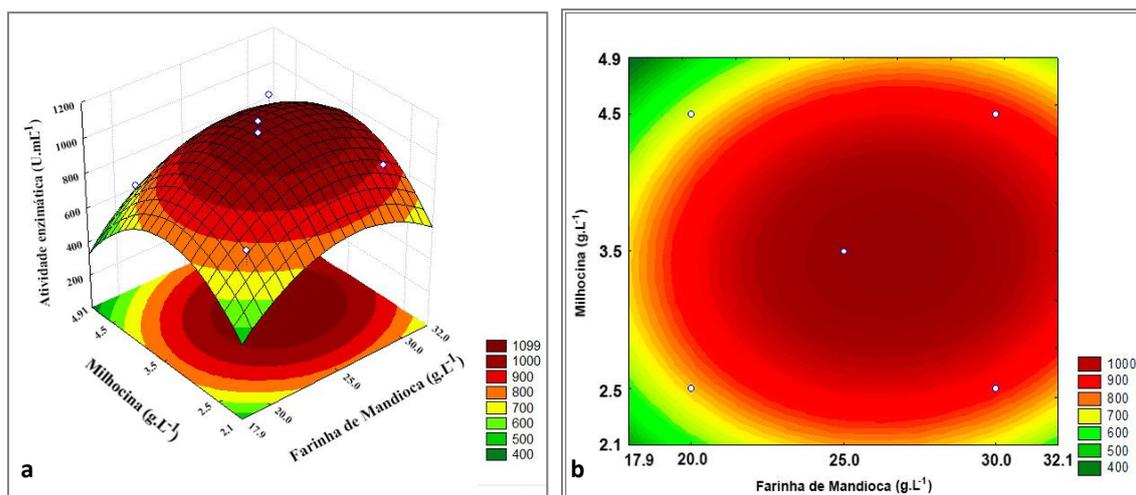


**Fig. 1** Valores observados e preditos pelo sistema para otimização da produção de CGTase ( $U.mL^{-1}$ ) pela cepa SM-02

Segundo a ANOVA, o coeficiente de variação ( $R^2$ ) equivalente a 0,8646 indica que 86,46% da variabilidade da resposta podem ser explicados pelo modelo e 13,54% não puderam ser explicados. Considerando os resultados apresentados, o efeito das variáveis independentes sobre a resposta de produção enzimática foi avaliado a partir de uma superfície de resposta (Fig. 2a) e curva de contorno (Fig. 2b). A zona de otimização representa a melhor resposta para a produção da enzima, onde está localizado o ponto central (região em vermelho escuro). A menor produção de CGTase foi observada nos níveis inferiores (-1,41 e -1) e superiores (+1 e +1,41), onde são encontradas as concentrações mais baixas e mais altas, respectivamente, das fontes de carbono e milhocina.

Por outro lado, a curva de contorno demonstra que em torno do ponto de otimização há uma faixa de combinação das concentrações das fontes de

carbono e nitrogênio utilizadas. Assim, qualquer concentração que se encontra dentro desta faixa ótima pode ser utilizada na produção da enzima, sem influenciar o processo na condição otimizada. A fonte de carbono apresentou concentrações ótimas entre 22,5 g.L<sup>-1</sup> e 27,5 g.L<sup>-1</sup> para a fonte de nitrogênio, encontram-se entre 3,0 g.L<sup>-1</sup> e 4,0 g.L<sup>-1</sup>.



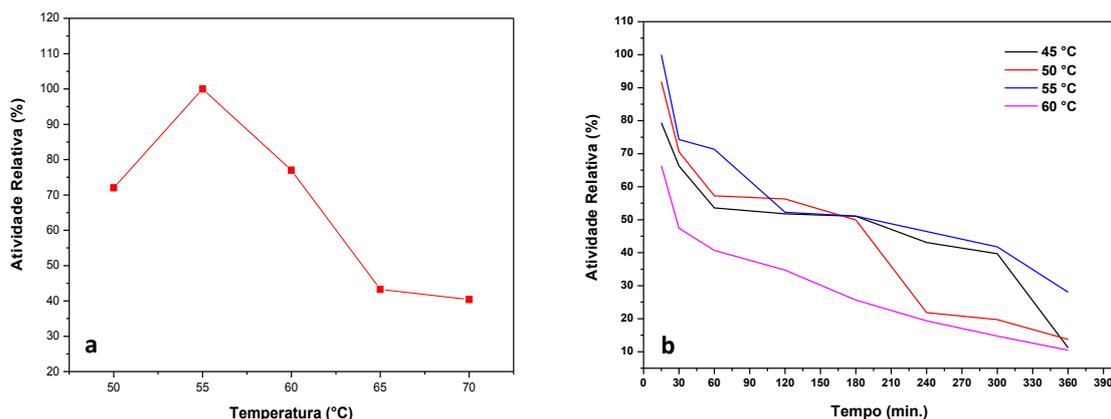
**Fig. 2** **a** Superfície de resposta da produção de CGTase pela cepa SM-02. **b** Curva de contorno destacando a zona de otimização

### Caracterização parcial

#### Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade térmica da enzima

A atividade catalítica de enzimas é altamente dependente do efeito da temperatura. Na maioria das reações bioquímicas, observa-se que a taxa de reação é diretamente proporcional ao aumento da temperatura, enquanto que, em um determinado limite, a estabilidade da enzima decresce devido à desnaturação térmica. A Fig. 3a apresenta o efeito da temperatura sobre a atividade de ciclização da CGTase da cepa SM-02. O extrato enzimático bruto demonstrou alta atividade acima de 70% na faixa de temperatura de 50 – 60 °C, exibindo máxima atividade na temperatura de 55 °C. As atividades relativas em 50 e 70 °C foram 72 e 40%, respectivamente. A enzima perdeu sua atividade de ciclização rapidamente após incubação a 60 °C.

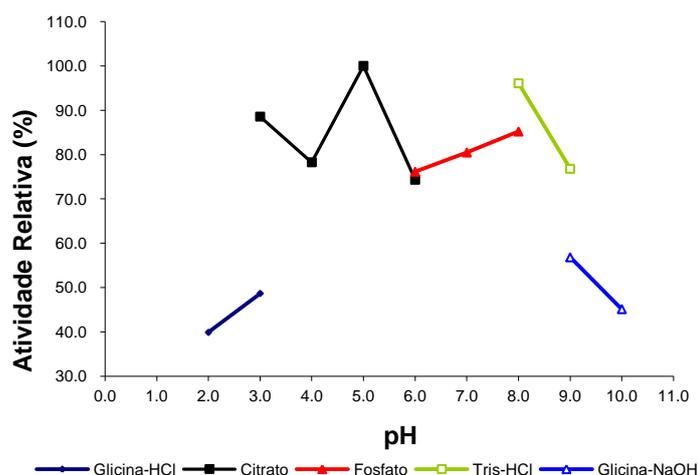
O efeito da temperatura sobre a estabilidade térmica da enzima foi avaliado na faixa de 45 – 60°C, em pH 5,0, na presença de  $Mg^{+2}$ . A enzima manteve a sua atividade de ciclização acima de 50%, após incubação durante 3 horas, a 45°C, 50 °C e 55 °C (Fig. 3b). A enzima perdeu rapidamente sua estabilidade térmica após incubação a 60 °C.



**Fig. 3 a** Efeito da temperatura na atividade de ciclização da CGTase da cepa SM-02. A atividade da enzima correspondente a 100% foi 1085,91 U.mL<sup>-1</sup>. **b** Efeito da temperatura na estabilidade térmica. A atividade da enzima correspondente a 100% foi 1433,19 U.mL<sup>-1</sup>.

#### Efeito do pH na atividade da enzima

O efeito do pH na atividade de CGTase foi avaliado na faixa de 2,0 – 10,0. A Fig. 4 apresenta o seu efeito sobre a atividade da CGTase da cepa SM-02. A enzima demonstrou atividade acima de 70% na faixa de 3,0 – 9,0, exibindo 100% de atividade em pH 5,0. Em pH 8,0 a enzima apresentou 96% de atividade de ciclização, sendo também considerado um bom pH para aplicações industriais.



**Fig. 4** Efeito do pH na atividade de ciclização da CGTase da cepa SM-02. A atividade da enzima foi mensurada sob condições de ensaio em diferentes valores de pH a 50 mM, na temperatura de 55 °C, na presença de  $\text{Ca}^{+2}$ . A atividade da enzima correspondente a 100% foi 1235,61 U.mL<sup>-1</sup>

#### Efeito de íons metálicos sobre a atividade da enzima

A Tabela 5 apresenta os resultados da atividade relativa para a CGTase da cepa SM-02. A atividade da enzima foi estimulada na presença de  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ , EDTA,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ba}^{+2}$  e  $\text{Na}^+$ , sendo que  $\text{Mg}^{+2}$  foi quem mais estimulou a atividade. Na presença de  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$  a enzima foi parcialmente inibida, mantendo a sua atividade acima de 83%.  $\text{Mn}^{+2}$  não demonstrou ser significativamente inibitório da atividade de ciclização da enzima.

**Tabela 5** Efeito de íons metálicos na atividade de ciclização da CGTase da cepa SM-02

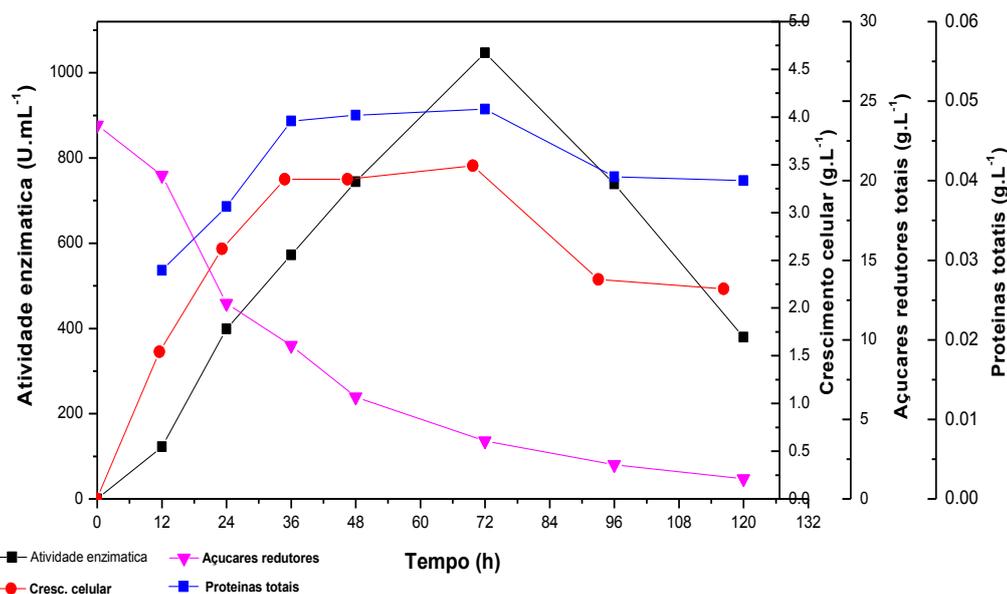
Íons Metálicos	Atividade Residual (%)
Controle (sem adição)	100.00
$\text{CaCl}_2$	114.86
$\text{BaCl}_2$	112.76
$\text{CuSO}_4$	94.26
$\text{FeCl}_3$	90.87
$\text{ZnSO}_4$	88.86
$\text{HgCl}_2$	83.24
$\text{NaCl}$	112.99
EDTA	107.71
KCl	114.07
$\text{MgCl}_2$	130.39
$\text{MnCl}_2$	99.03

### Cinética de produção da CGTase em farinha de mandioca e milhocina

O comportamento da cepa SM-02 foi avaliado em fermentação submersa, utilizando-se  $25,0 \text{ g.L}^{-1}$  de farinha de mandioca, a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $150 \text{ rpm}$ , durante 120 horas. A Fig. 5 mostra que o perfil de atividade enzimática foi semelhante ao crescimento celular e a síntese da enzima foi maior na fase exponencial de crescimento do micro-organismo, alcançando um pico de atividade enzimática 72 horas após início da fermentação. Em seguida, observa-se uma queda brusca na produção da enzima acompanhada da entrada na fase de declínio do crescimento celular. O substrato só foi quase completamente consumido após 120 h de fermentação. A velocidade de crescimento específico do micro-organismo ( $\mu$ ) foi de  $0,03 \text{ h}^{-1}$  e o rendimento da biomassa em função do substrato foi de  $0,14 \text{ g.g}^{-1}$ . O rendimento enzimático em função do substrato ( $Y_{p/s}$ ) foi de  $67,07 \text{ U.mL}^{-1}.\text{g}^{-1}$  e a produtividade foi de  $8,56 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , com uma atividade específica de  $21,37 \text{ U.mg}^{-1}$  (Tabela 6).

**Tabela 6** Produção, rendimento e produtividade de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) pela cepa SM-02 em farinha de mandioca e milhocina

Parâmetros	Resultados
Velocidade de crescimento específico ( $\text{h}^{-1}$ )	0,03
$Y_{x/s} (\text{g.g}_{(\text{FMand})}^{-1})$	0,14
$Y_{p/s} (\text{U.mL}^{-1}.\text{g}_{(\text{FMand})}^{-1})$	67,07
$Y_{p/x} (\text{U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1})$	474,67
$Q_p (\text{U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1})$	8,56
Atividade específica ( $\text{U.mg}^{-1}$ )	21,37



**Fig. 5** Cinética de produção enzimática, crescimento celular, açúcares redutores e proteínas totais em condições otimizadas durante 120 horas, a 35 °C e 150 rpm

## Discussão

Fundamentada na teoria estatística, a metodologia de planejamento fatorial aliada à análise de superfície de respostas tem sido indicada para estudos de otimização de parâmetros envolvidos em processos industriais com o objetivo de minimizar custos e tempo, maximizando rendimentos, produtividade e qualidade de produtos (Box et al. 1978; Rodrigues e lemma 2009). No presente estudo, a aplicação do planejamento fatorial indicou que a cepa SM-02 é uma promissora produtora de CGTase, exibindo picos de atividade de ciclização raramente encontrados em outras linhagens de bactérias reportadas na literatura. Em Pinto et al. (2007) alta produtividade enzimática pode ser verificada a partir do extrato bruto produzido por *Bacillus circulans* ATCC 21783, em cultivo submerso enriquecido com resíduo industrial fibroso de soja (SIFR). Utilizando parâmetros otimizados de pH, temperatura e aeração, os autores alcançaram 1155 U.mL<sup>-1</sup>, com rendimento máximo de 32,78 U.mL<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup><sub>(SIFR)</sub>, aproximadamente ½ da produtividade obtida no presente estudo.

A análise de variância (ANOVA) indicou que houve influência das concentrações tanto da fonte de carbono quanto da fonte de nitrogênio aplicadas

na produção da CGTase do isolado SM-02. Vários estudos têm reportado que diferentes tipos de substratos utilizados em concentrações variadas influenciam na produção dessa enzima. Rosso et al. (2002) otimizaram o meio de produção da CGTase de *Bacillus circulans* DF 9R testando diferentes fontes de carbono e verificaram que 1,5% de amido de mandioca em substituição ao amido solúvel do meio basal aumentou a atividade da enzima. Zain et al. (2007) realizaram estudos de otimização do meio de produção da CGTase produzida por *Bacillus* sp. TS1-1 com 3,3% de amido de tapioca e 0,13% de extrato de levedura atingindo a produção máxima de 78,05 U.mL<sup>-1</sup>. Gawande et al. (1999) otimizaram o meio de produção de CGTase produzida por *Klebsiella pneumoniae* cepa AS-22 com 4,93% de dextrina, 2,06% de peptona e 1,83% de extrato de levedura, alcançando máxima produção de 21,4 U.mL<sup>-1</sup>, após 28 horas de fermentação. Pinto et. al. (2007) estudaram a produtividade da enzima de *Bacillus circulans* ATCC utilizando as mesmas condições de cultivo empregadas por Mäkëla et. al. (1990), exceto a concentração de amido solúvel que foi 5 vezes menor e obtiveram uma produtividade enzimática 21 vezes maior do que no estudo anterior. Os resultados sugerem que o aumento da quantidade de substrato influencia negativamente na produtividade da enzima. Park et al. (1995) explicam que o excesso de substrato aumenta a viscosidade do meio de cultura possibilitando interferências no processo de absorção do oxigênio pelo micro-organismo. No estudo apresentado por Gawande e Patkar (2001), foi afirmado que glicose e maltose podem se acumular no meio de cultivo devido a altas concentrações de amido e, por exercerem efeito catabólico repressor, influenciam na síntese de CGTase.

Os resultados apresentados na literatura sugerem que o tipo e a concentração das fontes de carbono e nitrogênio utilizados e a linhagem do micro-organismo estudada interferem diretamente na produtividade da CGTase. Gawande et al. (2003) afirmam que a concentração da fonte de carbono é importante durante o processo de produção enzimática por muitos organismos, principalmente quando esta fonte se torna essencial na indução da enzima. Baseada nesta premissa, a metodologia estatística DCCR aplicada no presente estudo buscou uma resposta máxima de atividade enzimática e,

consequentemente conduziu o experimento à otimização dos parâmetros envolvidos.

Diferentes propriedades são apresentadas por CGTases obtidas a partir de diferentes linhagens de bactérias. A gama de pesquisas que traçam o perfil comportamental das produtoras de CGTase revelam diferentes características bioquímicas como temperatura ótima de reação, estabilidade térmica, pH ótimo, massa molar e capacidade de formação de ciclodextrinas que varia a depender do micro-organismo.

Em determinadas situações, a estabilidade de catalisadores biológicos é um fator limitante durante a escolha de enzimas de interesse industrial, devido à influência de temperaturas elevadas e variações extremas de pH (Atanasova et al. 2011). Na biotecnologia, o caráter de termoestabilidade de enzimas microbianas tem fundamental importância em bioprocessos (Gomes et al. 2007). Informações a respeito do limite de temperatura durante o processo de reação enzimática, considerando uma faixa de tempo, evita grandes perdas em consequência da desnaturação térmica de enzimas. Sobretudo, o armazenamento de enzimas e produtos formulados à base das mesmas exige condições adequadas de temperatura e, por esta razão, o conhecimento sobre termoestabilidade torna-se bastante útil.

A maioria dos micro-organismos produtores de CGTase citados na literatura apresentam estabilidade entre 40 – 60 °C (Fujita et al. 1990; Sin et al. 1991; Matins e Hatti-Kaul 2002; Sian et al. 2005; Hirano et al. 2006; Alves-Prado et al. 2007). Porém, algumas linhagens de bactérias apresentam formas termoestáveis da enzima com ótima atuação entre 75 e 85 °C (Legin et al. 1997; Alves-Prado et al. 2002). Tachibana et al. (1999) reportaram CGTases de espécies de *Thermococcus* com atuação a 90 e 100 °C e estabilidade térmica a 105 °C. A cepa SM-02 apresentou boa estabilidade a 55 °C durante 3 horas de incubação, temperatura reportada anteriormente para algumas espécies de *Bacillus* como *Bacillus* spp. (Kaneko et al. 1990), *B. stearothermophilus* (Fujiwara et al. 1992), *B. lentus* (Sabioni e Park 1992), *B. firmus* (Yim et al. 1997), além da espécie *Paenibacillus campinasensis* H69-3 (Alves-Prado et al. 2007).

Assim como a atividade máxima da CGTase da cepa SM-02 foi atingida a 55 °C, a mesma temperatura foi encontrada para a reação de ciclização. Portanto,

esta pode ser considerada excelente para aplicações industriais, sem que haja rápida perda da atividade enzimática. A mesma temperatura já foi reportada para *Bacillus* sp. G1 (Sin et al. 1991), *B. agaradhaerens* LS-3C (Matins e Hatti-Kaul 2002), *Bacillus* sp. G-825-6 (Hirano et al. 2006) e *Paenibacillus campinasensis* H69-3 (Alves-Prado et al. 2007). Em geral, a temperatura ótima de reação da CGTase de micro-organismos alcalofílicos é mantida na faixa de 45 a 60 °C (Ai-Noi et al. 2008). Raras linhagens como *Thermoanaerobacter kivui* (Avci e Dönmez 2009) apresentam temperaturas extremas em torno de 80 °C.

Durante a reação de ciclização da CGTase da cepa SM-02, dois pH podem ser considerados ótimos. Certamente, o modo de ligação da enzima ao substrato provavelmente tenha sido diferente entre pH 5,0 e 8,0, como também foi observado por Atanasova et al. (2011). Os resultados se assemelham aos encontrados para *Bacillus ohbensis* C-1400 (Sin et al. 1991), *Bacillus firmus* NCIM 5119 (Gawande et al. 1999), *Bacillus* sp. 7-12 (Cao et al. 2005), *Bacillus* sp. G-825-6 (Hirano et al. 2006) e *Thermoanaerobacter kivui* (Avci e Dönmez 2009). Além disso, a enzima exibiu atividade acima de 70% na faixa de 3,0 – 4,0, raramente citada na literatura. Embora, Mora et al. (2012) também tenham observado que na mesma faixa de pH, a atividade da enzima de *Bacillus* sp. foi mantida acima de 70%.

A CGTase da cepa SM-02 demonstrou ter sido estimulada por uma variada gama de íons metálicos, especialmente na presença de  $Mg^{+2}$ . A atividade de reação da enzima foi estimulada cerca de 30% acima do controle. Atanasova et al. (2011) observaram que a atividade da enzima de *Bacillus pseudocaliphilus* 20R foi fortemente estimulada por  $Mg^{+2}$  a 15 mM. A importância do estudo da influência de íons metálicos sobre o desempenho de biocatalizadores está ligada ao fato de que estas substâncias são capazes de modificar as taxas de reação enzimática, inibindo ou ativando enzimas.

No presente estudo, foi possível estabelecer condições otimizadas e determinar as melhores concentrações de farinha de mandioca e milhocina que levaram a altas taxas de produção de CGTase utilizando-se o planejamento fatorial e superfície de resposta. A alta produtividade observada, aliada ao fato de que se testou um substrato agroindustrial de fácil obtenção e baixo custo torna interessante o uso da farinha de mandioca em bioprocessos ligados à produção

de ciclodextrinas. A cepa SM-02 demonstrou ter um excelente potencial biotecnológico para a produção de CGTase, em condições otimizadas.

**Agradecimentos** Os autores são gratos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelos recursos financeiros disponibilizados para realização deste trabalho.

## Referências

- Ai-Noi S, Abd-Aziz S, Alitheen N, Hassan O, Karim MIA (2008) Optimization of cyclodextrin glycosyltransferase production by response surface methodology approach. *Biotechnol* 7:10-18. doi: 10.3923/biotech.2008.10.18
- Alves-Prado HF, Gomes E, Hilário E, Silva R (2002) Seleção de Microrganismos produtores de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) produção e caracterização da enzima. *Braz J Food Technol* 5:189-196. doi: 10.1590/S1517-83822008000400016
- Alves-Prado HF, Gomes E, Silva R (2006) Evaluation of Solid and Submerged Fermentations for the Production of Cyclodextrin Glycosyltransferase by *Paenibacillus campinasensis* H69-3: Characterization of Crude Enzyme. *Applied Biochem Biotechnol* 129:234-246. doi: 10.1007/978-1-59745-268-7\_18
- Alves-Prado HF, Gomes E, Da Silva R (2007) Purification and characterization of a cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus campinasensis* H69-3. *Appl Biochem Biotechnol* 136-140:41-55. doi: 10.1007/978-1-60327-181-3\_5
- Astray G, Gonzalez-Barreiro C, Mejuto JC, Rial-Otero R, Simal-Gándara J (2009) A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocol* 23:1631-1640. doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.01.001
- Atanasova N, Kitayska T, Bojadjieva I, Yankov D, Tonkova A (2011) A novel cyclodextrin glucanotransferase from alkaliphilic *Bacillus pseudocaliphilus* 20RF: Purification and properties. *Process Biochem* 46:116-122. doi: 10.1016/j.procbio.2010.07.027
- Avci A, Dönmez S (2009) A novel thermophilic anaerobic bacteria producing cyclodextrin glycosyltransferase. *Process Biochem* 44:36-42. doi: 10.1016/j.procbio.2008.09.006
- Bobbio PA, Bobbio FO (2001). *Química do Processamento de Alimentos*. Revista e Ampliada, São Paulo.

- Box GEP, Hunter WG, Hunter JS (1978) Statistics for experimenters: An introduction to designs, data analysis and model building. Wiley, New York.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Cao X, Jin Z, Wang X, Chen F (2005) A novel cyclodextrin glycosyl transferase from an alkalophilic *Bacillus* species: purification and characterization. *Food Res Int* 38:309-314. doi: 10.1016/j.foodres.2004.06.015
- Chisté RC, Cohen KO (2011) Influência da fermentação na qualidade da farinha de mandioca do grupo d'água. *Acta Amazonica* 41:279-284. doi: 10.1590/S0044-59672011000200013
- De Azeredo LAI, Lima MB, Coelho RRR, Freire DMG (2006) A low-cost fermentation medium for thermophilic protease production by *Streptomyces* sp 594 using feather meal and corn steep liquor. *Curr Microbiol* 53:335-339. doi: 10.1007/s00284-006-0163-x
- Denter U, Buschmann HJ, Knittel D, Schollmeyer E (1997) Modifizierung von faseroberflächen durch die permanente fixierung supramolekularer komponenten, Teil 2: Cyclodextrin. *Angew Makromol Chem* 248:165. doi: 10.1002/apmc.1997.052480111
- Dias LT, Leonel M (2006) Caracterização físico-química de farinha de mandioca de diferentes localidades do Brasil. *Ciênc Agrotecnol* 30:692-700. doi: 10.1590/S1413-70542006000400015
- Ferrarotti S, Rosso A, Marechal M, Krymkiewicz N, Marechal L (1996) Isolation of two strain (S-R Type) of *Bacillus circulans* and purification of a cyclomaltodextrin-glucoamyltransferase. *Cell Mol Biol* 42:653-657.
- Fujita Y, Tsubouchi H, Inagi Y, Tomita K, Ozaki A, Nakanishi K (1990) Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus* sp. AL-6. *J Ferment Bioeng* 70:150-154. doi: 10.1016/0922-338X(90)90174-U
- Fujiwara S, Kakihara H, Sakaguchi K, Imanaka T (1992). Analysis of mutation in cyclodextrin glucoamyltransferase from *Bacillus stearothermophilus* which affect cyclization characteristics and thermo stability. *J Bacteriol* 174:7478-81. doi: 0021-9193/92/227478-04
- Gastón JAR, Costa H, Rossi AL, Krymkiewicz N, Ferrarotti SA (2012) Maltooligosaccharides production catalysed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R in batch and continuous operation. *Process Biochem*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.08.008>. Acesso em 12 out 2012

- Gawande BN, Goel A, Patkar AY, Nene SN (1999) Purification and properties of a novel raw starch degrading cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus*. *Appl Microbiol Biot* 51:504-9. doi: 10.1007/s002530051424
- Gawande BN, Patkar AY (2001) Purification and properties of a novel raw starch degrading-cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS-22. *Enzyme Microbiol Technol* 28:735-743. doi: 10.1016/S0141-0229(01)00347-7
- Gawande BN, Sonawane AM, Jogdand VV, Patkar AY (2003) Optimization of cyclodextrin glycosyltransferase production from *Klebsiella pneumoniae* AS-22 in batch, fed-batch, and continuous cultures. *Biotechnol Progress* 19:1697-1702. doi: 10.1021/bp034115t
- Gomes E, Guez MAU, Martin N, Silva R (2007) Enzimas termoestáveis: fonte, produção e aplicação industrial. *Quim Nova* 30:136-145. doi: 10.1590/S0100-40422007000100025
- Hamon V, Moraes FF (1990) Etude preliminaire a L'immobilisation de L'enzyme CGTase WACKER. In: Research Report, Laboratoire de Technologie Enzymatique. Compiègne, France: Universté de Technologie de Compiègne.
- Hirano K, Ishihara T, Ogasawara S, Maeda H, Abe K, Kakajima T, Yamagata Y (2006) Molecular cloning and characterization of a novel  $\gamma$ -CGTase from alkalophilic *Bacillus* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* 70:193-201. doi: 10.1007/s00253-005-0041-7
- Ibrahim HM, Yusoff WMW, Hamid AA, Illias RM, Hassan O, Omar O (2005) Optimization of medium for the production of  $\beta$ -cyclodextrin glucanotransferase using Central Composite Design (CCD). *Process Biochem* 40:753-758. doi: 10.1016/j.procbio.2004.01.042
- Kaneko T, Yoshida M, Yamamoto M, Nakamura N, Horikoshi K (1990) Production of cyclodextrins by simultaneous actions of two CGTases from three strains of *Bacillus*. *Starch* 42:277-281. doi: 10.1002/star.19900420709
- Khairizal M (2002) Cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. TS1 bacterium. Master thesis, Universiti Teknologi Malaysia.
- Kim TJ, Kim BC, Lee HS (1997) Production of cyclodextrin using raw corn starch without a pretreatment. *Enzyme Microbiol Technol* 20:506-509. doi: S0141-0229(96)00186-X
- Legin E, Ladrat C, Godfroy A, Barbier G, Duchiron F (1997) Thermostable amyolytic enzymes of thermophilic microorganisms from deep-sea hydrothermal vents. *C R Acad Sci* 320:893. doi: 10.1016/S0764-4469(97)80874-8
- Lorenzi, JO (2003) Mandioca. Campinas: CATI. 110 p. (Boletim técnico, n. 245)

- Mäkelä MJ, Paavilainen SK, Korpela TK (1990) Growth dynamics of cyclomalto-dextrin glucanotransferase producing *B. circulans* var. *alkalophilus*. *Can J Microbiol* 36:176-182. doi: 10.1139/m90-031
- Mahat MK, Ilias RM, Rahman RA, Rashid NAA, Mahmood NAN, Hassan O, Aziz SA, Kamaruddin K (2004) Production of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) from alkalophilic *Bacillus* sp. TS1-1: media optimization using experimental design. *Enzyme Microbiol Technol* 35:467-473. doi: 10.1016/j.enzmictec.2004.07.008
- Martins RF, Hatti-Kaul R (2002) A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkalophilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterization. *Enzyme Microbiol Technol* 30:116-24. doi: 10.1016/S0141-0229(01)00461-6
- Menocci V, Goulart AJ, Adalberto PR, Tavano OL, Marques DP, Contiero J, Monti R (2008) Cyclodextrin glycosyltransferase production by new *Bacillus* sp. strains isolated from Brazilian soil. *Braz J Microbiol* 39:682-688. doi: 10.1590/S1517-83822008000400016
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem* 31:426-428.
- Nascimento RP, Alves N, Pereira N, Bon EPS, Coelho RRR (2009) Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis*. *Lett Appl Microbiol* 48:529-535. doi: 10.1007/s12010-010-9132-8
- Moriwaki C, Costa GL, Pazzetto R, Zanin GM, Moraes FF, Portilho M, Matioli G (2007) Production and characterization of a new cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* isolated from Brazilian soil. *Process Biochem* 42:1384-1390. doi:10.1016/j.procbio.2007.07.007
- Nakamura N, Horikoshi K (1976) Purification and properties of neutral-cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agr Biol Chem* 40:1785-1791.
- Nascimento RP, Marques S, Alves L, Gírio FM, Amaral-Collaço MT, Sacramento DR, Bon EPS, Coelho RRR (2003) A novel strain of *Streptomyces malaysiensis* isolated from Brazilian soil produces high endo- $\beta$ -1,4-xylanase titres. *World J Microbiol Biotech* 19:879-881. doi: 10.1023/B:WIBI.0000007287.03281.dd
- Park CS, Park KH, Kim SH (1989) A rapid screening method for alkaline  $\beta$ -cyclodextrin glycosyltransferase using phenolftaleinmethyl orange-containing-solid medium. *Agr Biol Chem* 53:1167-1169.
- Park YS, Dohijima, T, Okabe M (1995). Enhanced  $\alpha$ -amylase production in recombinant *Bacillus brevis* by fed-batch culture with amino-acid control.

Biotechnol Bioeng 49:36-44. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:1<36::AID-BIT5>3.0.CO;2-U

- Pinto FST, Flôres SH, Ayub MAZ, Hertz PF (2007) Production of cyclodextrin glycosyltransferase by alkaliphilic *Bacillus circulans* in submerged and solid-state cultivation. *Bioprocess Biosyst Eng* 30:377-382. doi: 10.1007/s00449-007-0134-z
- Rodrigues MI, Iemma AF (2009) Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. Cárita Editora, Brasil.
- Rosso AM, Ferrarotti SA, Krymkiewicz N, Nudel BC (2002) Optimization of batch culture conditions for cyclodextrin glucanotransferase production from *Bacillus circulans* DF 9R. *Microbial Cell Factories* 1:1-9. doi: 10.1186/1475-2859-1-3
- Sabioni JG, Park YK (1992) Cyclodextrin glycosyltransferase production by alkaliphilic *Bacillus lentus*. *Rev Microbiol* 23:128-32.
- Sian HK, Said M, Hassan O, Kamaruddin K, Ismail AF, Rahman RA, Mahmood NAN, Illias RM (2005) Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from alkaliphilic *Bacillus* sp. G1. *Process Biochem* 40: 1101-1111. doi: 10.1016/j.procbio.2004.03.018
- Sin K, Nakamura A, Kobayashi K, Matsuura Y, Uozumi T (1991) Cloning and sequencing of a cyclodextrin glucanotransferase gene from *Bacillus ohbensis* and its expression in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biot* 35:600-605. doi: 10.1007/BF00169623
- Souza JML, Negreiros JRS, Álvares VS, Leite FMN, Souza ML, Reis FS, Felisberto FAV (2008) Variabilidade físico-química da farinha de mandioca. *Ciênc Tecnol Aliment* 28: 907-912. doi: 10.1590/S0101-20612008000400022
- Souza RF, Coelho RRR, Macrae A, Soares RMA, Nery DCM, Semêdo LTAS, Alvino CS, Gomes RC (2008) *Streptomyces lunalinharesii* sp. nov., a novel chitinolytic streptomycete isolated from cerrado soil, Brazil. *Int J Syst Evol Micr* 58:2774-2778. doi: 10.1099/ijs.0.65768-0
- Tachibana Y, Kuramura A, Shirasaka N, Suzuki Y, Yamamoto T, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T (1999) Purification and characterization of an extremely thermostable cyclomaltodextrin glucanotransferase from a newly isolated hyperthermophilic archaeon, a *Thermococcus* sp. *App Envir Microbiol* 65: 1991 - 1997. doi:
- Tien SF (2001) Production of cyclodextrin glucanotransferase from alkaliphilic *Bacillus* sp. G1. Master's thesis, University Technology of Malaysia.
- Terada Y, Yanase M, Takata H, Takaha T, Okada S (1997) Cyclodextrins are not the major cyclic  $\alpha$ -1,4-glucans produced by the initial action of cyclodextrin

glycosyltransferase on amylose. *J Biol Chem* 272:15729–15733. doi: 10.1074/jbc.272.25.15729

Tonkova A (1998) Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme Microb Tech* 22:678–686. doi: 10.1016/S0141-0229(97)00263-9

Zain WSWM, Illias RM, Salleh MM, Hassan O, Rahman RA, Hamid AA (2007) Production of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. TS1-1: Optimization of carbon and nitrogen concentration in the feed medium using central composite design. *Biochem Eng J* 33:26-33. doi: 10.1016/j.bej.2006.09.024

Yim DG, Sato YH, Park YK (1997) Production of cyclodextrin from starch by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* and characterization of purified enzyme. *J Ind Microbiol Biotechnol* 18:402-405. doi: 10.1038/sj.jim.2900400

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

No presente estudo, foi possível estabelecer condições otimizadas tanto para o amido de araruta quanto para a farinha de mandioca e determinar as melhores concentrações destes substratos, que levaram a altas taxas de produção de CGTase, empregando-se o delineamento fatorial para planejamento dos experimentos e a superfície de resposta para análise dos resultados. A alta produtividade observada, aliada ao fato de que se testaram substratos agroindustriais de fácil obtenção e baixo custo, torna bastante viável a utilização destas matérias-primas em bioprocessos fermentativos ligados à produção de ciclodextrinas.

Tanto a farinha de mandioca como o amido de araruta foram substratos que apresentaram pouca variação e ótima reprodutibilidade nos resultados. Além disso, foi atingida a produção máxima da enzima em baixas concentrações, 2,5% para farinha de mandioca e 3,0% para o amido de araruta e ambos em 3,5% de milhocina. Este resultado é bastante desejável uma vez que não é necessária a utilização de grande quantidade de matéria-prima para obtenção de elevada produtividade, o que contribui para a diminuição dos custos do processo.

A CGTase obtida neste trabalho apresentou pH ótimo na faixa de 3,0 a 8,0. Esta ampla faixa de pH faz com que não seja necessário um rígido controle do processo, ampliando o espectro de aplicações desta enzima. Tanto a temperatura ótima quanto a estabilidade térmica foram atingidas a 55°C e estes resultados podem ser considerados muito bons para aplicação industrial desta enzima, sem que haja rápida perda da atividade. Além disso, nestas condições operacionais, é menor o risco de contaminação por microrganismos potencialmente competidores.

O planejamento fatorial do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi muito útil para estabelecer as melhores concentrações no estudo da produção de CGTase da cepa SM-02 em ambos os substratos, tornando possível a otimização do processo com um número menor de experimentos. Além disso, as análises de superfície de resposta tornaram possível a visualização da interação entre as variáveis, fornecendo uma visão mais completa do comportamento do micro-organismo no processo fermentativo.