

Ciências Biológicas - Noturno

NATÁLIA SOZZA BERNARDI

**PRODUÇÃO DA ENZIMA CICLODEXTRINA
GLICOSILTRANSFERASE POR *Bacillus
circulans***



Rio Claro
2013

NATALIA SOZZA BERNARDI

PRODUÇÃO DA ENZIMA CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE
POR *Bacillus circulans*

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

Co-orientador: Kate Cristina Blanco

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio
Claro, para obtenção do grau de bacharela em
Ciências Biológicas.

Rio Claro
2013

576 Bernardi, Natália Sozza
B521p Produção da enzima Ciclodextrina Glicosiltransferase por
Bacillus circulans / Natália Sozza Bernardi. - Rio Claro, 2013
59 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Bióciências de Rio Claro

Orientador: Jonas Contiero

Coorientador: Kate Cristina Blanco

1. Microorganismos. 2. Microbiologia aplicada. 3. Sorgo.
4. Atividade enzimática. I. Título.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Elizabete, que criou a mim e meus irmãos com muita luta e amor incondicional.

Aos meus irmãos Marina e Danilo, pela parceria e cumplicidade. São a minha vida.

A Priscilla e Dayane, obrigada pela amizade e pelos divertidos anos de faculdade. Tenho cada uma em meu coração e sei que mesmo de longe, serão lembrados todos os momentos, que mesmo com tempo e a distância, não deixarão de ser inesquecíveis.

A Kate, por me ajudar a construir e me ensinar a gostar ainda mais da escolha que fiz. Se mostrou muito mais que apenas uma co-orientadora, mas sim uma grande amiga que vou levar pra sempre no coração com muito carinho.

Ao professor Jonas Contiero pela oportunidade de trabalhar e descobrir a minha identidade profissional.

*“ Hoje eu acordei pra um sonho a mais
É pra eu evoluir, seguir em frente
E enfrentar a vida
Deixar acontecer o que de mais está por vir
Deixar fluir naturalmente...”*

Charlie Brown Jr.

RESUMO

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos que solubilizam e modificam moléculas por possuir uma cavidade interna hidrofílica e região externa hidrofóbica, com uma estrutura tronco-cônica, conferindo a estes açúcares cíclicos propriedades físico-químicas para complexação de uma grande variedade de moléculas. A enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) catalisa reações de conversão de amido em diferentes tipos de CDs, a sua produção é influenciada por vários fatores. As pesquisas dirigidas para a produção de CGTases de menor custo são importantes para viabilizar economicamente o uso das CDs em escala industrial. No presente estudo, as CDs foram produzidas a partir de diferentes fontes de carbono pelo micro-organismo *Bacillus circulans* ATCC 21783, estudou-se seu crescimento celular assim como sua produção enzimática, utilizando a ferramenta estatística de planejamento experimental. O micro-organismo *Bacillus circulans* ATCC 21783 mostrou-se ser eficiente na produção da enzima CGTase, os resultados indicaram a potencialidade do grão de sorgo como o melhor substrato para fermentação na produção de CGTase. Quanto maior o tamanho do grão de sorgo, maiores concentrações de glicose e amido estarão presentes, o que influencia diretamente a produção enzimática. Por meio do planejamento experimental foram proposto modelos matemáticos que expressam tanto a produção enzimática quanto a concentração das variáveis das concentrações da fonte de carbono, pH e a temperatura. A importância de desenvolver o modelo é demonstrar a sua aplicação bem-sucedida para determinação das condições ideais que representam o processo de alta produtividade enzimática da CGTase. A otimização das variáveis foram obtidas a partir de quatro planejamentos experimentais composto central (PCC) e seus resultados analisados pelas superfícies de resposta. Os melhores resultados do planejamento encontrados no ponto central, corresponderam a 0,160 g/L da fonte de carbono, 8,06 de pH e 34,78 °C para a temperatura com a maior produtividade obtida de CGTase de 216,94 U.mL⁻¹ no tempo de 48 horas. O valor experimental da atividade enzimática do ponto ótimo apresentou um erro de 0,008% em relação ao valor teórico, mostrando grande confiabilidade do resultado. Este valor também está próximo aos obtidos no ponto central. Assim, o projeto experimental mostrou-se eficaz para a otimização da concentração de substrato e das condições experimentais para a produção de CGTase máxima.

PALAVRAS-CHAVE : sorgo, ciclodextrina, atividade enzimática

SUMÁRIO

RESUMO	6
1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Objetivos.....	10
1.1.2 Objetivo geral.....	10
1.1.3 Objetivos específicos.....	10
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
2.1 Micro-organismo.....	11
2.2 Meio seletivo do micro-organismo	11
2.3 Meio de estoque do micro-organismo	11
2.4 Preparação do inoculo e ativação do micro-organismo	12
2.5 Produção de CGTase.....	12
2.6 Determinação da atividade enzimática pelo método colorimétrico do complexo fenolftaleína-ciclodextrina.....	12
2.7 Confeção da curva padrão de β -CD	13
2.8 Confeção da curva padrão de massa seca	14
2.9 Planejamento experimental composto central	14
2.9.1 Primeiro planejamento experimental composto central	15
2.9.2 Segundo planejamento experimental composto central	17
2.9.3 Terceiro planejamento experimental composto central.....	18
2.9.4 Quarto planejamento experimental composto central	19
2.10 Cálculo do ponto ótimo	21
2.11 Análise de amido em sorgo.....	21
2.12 Análise de glicose em sorgo	22
3 RESULTADOS	22
3.1 Calibração do método.....	22
3.2 Análise de amido e glicose em relação ao tamanho do sorgo	27
3.3 Análise estatística das respostas.....	30
3.3.1 Primeiro planejamento experimental composto central	30
3.3.2 Segundo planejamento experimental composto central	35
3.3.3 Terceiro planejamento experimental composto central.....	42
3.3.4 Quarto planejamento experimental composto central	48
3.4 Cálculo do ponto ótimo	55
4 CONCLUSÃO	56
REFERENCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

Ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) é uma enzima produzida predominantemente por bactérias do gênero *Bacillus* (BLANCO et al., 2012); a CGTase catalisa a reação da formação de ciclodextrinas (CDs) a partir do amido (CUCOLO et al., 2006). As CDs são oligossacarídeos cíclicos, formados por um número variável de unidades de glicose unidas entre si por ligações α -1,4, as mais comuns apresentam 6, 7 e 8 unidades de glicose e são chamadas de α -ciclodextrina, β -ciclodextrina e γ -ciclodextrina (SZEJTLI, 1998). Dependendo do micro-organismo utilizado para a sua produção, diferentes tipos de CGTases são produzidas, levando à produção de diferentes tipos de CDs (MATIOLI et al., 2000) aumentando a área de interesse para a produção desta enzima.

As CDs possuem uma cavidade interna hidrofílica e a região externa hidrofóbica. A estrutura espacial cônica e a orientação dos grupos hidrofílicos para o exterior conferem a estes açúcares cíclicos propriedades físico-químicas, sendo capazes de solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular no interior da sua cavidade moléculas hidrofóbicas (CUNHA-FILHO et al., 2007). Normalmente, as substâncias encapsuladas apresentam maior estabilidade térmica e química e, assim, maior resistência frente a fatores ambientais como oxigênio, luz e calor (HAIYEE et al., 2009; GORNÁS et al., 2009).

As CDs têm despertado interesses industriais de diversas aplicações como na indústria química, de alimentos, farmacêutica, de laticínios, de cosméticos, de produtos agroquímicos, entre outros. Na indústria de alimentos, a microencapsulação de compostos hidrofóbicos em β -CD vem sendo reconhecida, nos últimos anos, como um método eficiente para proteção de aromas e sabores contra a oxidação, degradação ao calor e evaporação na indústria de alimentos. Os produtos de inclusão nestas moléculas costumam apresentar maior vida de prateleira em comparação aos agentes encapsulantes utilizados pelo método de atomização, como por exemplo, os amidos modificados (SZENTE; SZEJTLI, 2004).

Na área farmacêutica, este excipiente tem sido explorado principalmente no incremento da solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de medicamentos. Também se pode destacar sua utilização para mascarar odores e sabores desagradáveis de certos fármacos, para reduzir ou eliminar irritações oculares ou gastrointestinais e na prevenção de interações e incompatibilidades (LOFTSSON & BREWSTER, 1996;

RAJEWSKII & STELLA, 1996; UEKAMA, 2004). No campo biomédico as CDs ajudam na ruptura de bolsas de lipídeos em células, melhorando o quadro de doenças vasculares (RODAL et al., 1999; MATTERN et al, 2009). A incorporação das CDs em sistemas farmacêuticos constitui uma realidade consolidada. Segundo estatística recente, as associações com CDs já foram estudadas com 515 princípios ativos, melhorando sua biodisponibilidade, estabilidade e segurança através da formação de complexos de inclusão reversíveis em água (SZEJTLI, 2005). Mais de 30 medicamentos comercializados no mercado mundial contam com a presença deste excipiente em suas fórmulas (DAVIS & BREWSTER, 2004; LOFTSSON & DUCHENE, 2007).

Na indústria química as CDs são utilizadas como catalisadores em reações químicas (SASIKALA et al., 2009). Na despoluição ambiental, as CDs são utilizadas para prevenir o efeito de substâncias tóxicas contidas no ambiente por meio da formação de complexos não tóxicos como dos resíduos industriais (OONNITTAN et al., 2009, SALIPIRA et al., 2006).

O interesse em novas técnicas visando o aumento da produção de ciclodextrinas e o aperfeiçoamento das já existentes vem ganhando importância, uma vez que existe uma comercialização crescente de produtos empregando ciclodextrinas no mercado mundial. As pesquisas buscam constante inovação diante das grandes possibilidades de aplicação do principal produto obtido da enzima CGTase. Assim, pesquisas dirigidas para diminuir custos, usando fontes alternativas de nutrientes para a produção de CGTases são importantes para viabilizar economicamente o uso das CDs em escala industrial.

O sorgo é um grão rico em amido amplamente cultivado no Brasil. O aumento das culturas de sorgo é devido à capacidade da planta se adaptar às condições de deficiência de água e, além disso, reciclar nutrientes do solo. A fixação de nitrogênio em culturas de sorgo foi abordada em estudos recentes (PEDERSEN et al., 1978). De acordo com os produtores nacionais, o grão de sorgo tem um baixo custo de produção - pelo menos 20% menos do que outras culturas de grãos de amido. Assim, o uso de sorgo como uma fonte de carbono para produção tem benefícios econômicos. O sorgo tem sido usado como uma fonte de carbono para os produtos como o etanol (SHEN et al., 2012) e ácido láctico (YADAV et al., 2011), mas para a produção da enzima CGTase ainda não foi descrito. O amido de sorgo pode ser a melhor fonte de carbono para a produção de CGTase, pois o sorgo (variando em tamanho desde 6 a 30 mm)

exibe 100% de amilopectina, e a CGTase quebra ligações da amilopectina α -1, 4 para produzir CDs (WOLFGANG, 2007) .

Foram poucas as iniciativas para aplicação industrial das CDs até a década de 70, devido à baixa disponibilidade e preços inacessíveis. Contudo, o consumo anual de CDs no mundo está crescendo em altas proporções como consequência da intensa pesquisa neste campo no sentido de melhorar a produção, recuperação e purificação deste oligossacarídeo cíclico. O interesse em novas técnicas visando o aumento da produção de ciclodextrinas e o aperfeiçoamento das já existentes vem ganhando importância, uma vez que há comercialização crescente de produtos empregando ciclodextrinas no mercado mundial. Existe uma grande motivação no Brasil para o desenvolvimento de métodos de produção de CGTase devido à utilização de fontes alternativas de nutrientes, associados à otimização das variáveis de produção.

1.1 Objetivos

1.1.2 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho é verificar a capacidade de diversas fontes de carbono como substrato para produção da enzima CGTase, utilizando o micro-organismo *Bacillus circulans* ATCC 21783 e otimizar as condições de produção da enzima CGTase mediante ao planejamento experimental, estabelecendo uma relação entre as variáveis de fermentação envolvidas.

1.1.3 Objetivos específicos

- Analisar o crescimento do micro-organismo em placas de *Petri* contendo meio seletivo;
- Verificar a capacidade de diversas fontes de carbono como substrato para produção de enzima, utilizando o micro-organismo *Bacillus circulans* ATCC 21783;
- Determinar o crescimento celular do micro-organismo durante a produção da enzima CGTase;
- Otimizar fatores do meio de cultura para a produção de CGTase por meio do planejamento experimental;
- Otimizar as condições de cultivo mediante planejamento experimental para concentrações dos substratos da fonte de carbono; pH e temperatura.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo

A linhagem *Bacillus circulans* ATCC 21783 utilizada no presente trabalho foi adquirida junto à *American Type Culture Collection* e encontra-se mantida no Laboratório de Microbiologia Industrial do Instituto de Biociências de Rio Claro.

2.2 Meio seletivo do micro-organismo

Para verificar a produção de CGTase pela bactéria foi utilizado o meio proposto por Nakamura e Horikoshi (1976), cuja composição é apresentada na tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Composição do meio de cultura utilizado para o cultivo do micro-organismo *Bacillus circulans* ATCC 21783

Componentes	Concentração (g/L)
Amido solúvel	20
Triptona	5
Extrato de Levedura	5
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
Na ₂ CO ₃	10
Ágar bacteriológico	20
Fenolftaleína	0,3
Metilorange	0,1

2.3 Meio de estoque do micro-organismo

A bactéria foi mantida em criotubo contendo 50 % de meio de cultura de produção da enzima e 50 % de glicerol a 40 %. As culturas foram mantidas sob refrigeração para criopreservação a – 80° C.

2.4 Preparação do inoculo e ativação do micro-organismo

Para a ativação do micro-organismo foi realizado repiques da cultura estoque. Um mL do meio contendo o inoculo foi transferido para um *Erlenmeyer* de 100 mL contendo 20 mL do meio de crescimento. O repique dos tubos foi realizado sete vezes a cada 8 h e amostras foram inoculadas superficialmente em placa de Petri contendo aproximadamente 20 mL do meio seletivo de isolamento. Em seguida, foram colocados em estufa incubadora microprocessada B.O.D a 35°C por um período de 48 h. As colônias que formaram halo amarelo contrastante com o meio vermelho da fenolftaleína determinam CGTase positivas.

2.5 Produção de CGTase

A linhagem selecionada foi cultivada em frascos de 300 mL contendo 100 mL do meio de cultura, incubados a 35° C durante 12 h a 150 rpm em *shaker*. Desta cultura foram transferidos 10 % (v/v) para *Erlenmeyer* de capacidade de 300 mL contendo 100 mL do meio de cultura. Ao final de tempos de 24; 48 e 72 h de fermentação foram retirados amostras de cada *Erlenmeyer* e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min. O sobrenadante livre de células foi utilizado para determinação da atividade enzimática (AE). Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

O meio de produção foi modificado em diferentes experimentos. Nos primeiros testes modificou-se a fonte de carbono, utilizando polvilho azedo (fécula de mandioca), polvilho doce (fécula de mandioca, difere na acidez comparada com o polvilho azedo) e sorgo *in natura*. Nos testes relacionados ao planejamento experimental modificou-se a concentração das fontes de carbono, das fontes de nitrogênio e o pH do meio original Nakamura e Horikoshi (1976).

2.6 Determinação da atividade enzimática pelo método colorimétrico do complexo fenolftaleína-ciclodextrina

A AE é determinada acompanhando a intensidade da cor da solução contendo o corante que é inversamente proporcional a concentração de β -CD (MAKELA et al., 1988). A determinação da AE foi realizada pelo método colorimétrico do complexo ciclodextrina-fenolftaleína, que consiste em: 0,5 mL de solução alcoólica de

fenolftaleína (3 mM); 5,0 mL de tampão carbonato de sódio 0,6 M (pH 10,5), sendo o volume completado a 25 mL com água destilada em balão volumétrico.

Em reator termostatizado foram colocados 5,0 mL do caldo bruto e, adicionado igual volume de solução de amido 1% [0,1 g de amido solúvel; 1,0 mL de solução de CaCl_2 (0,05 M); 1,0 mL de solução tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) e o volume completado a 10 mL com água destilada]. A temperatura no reator foi mantida a 55°C. Amostras foram retiradas do reator em tempos pré-determinados de 0, 3, 6, 9 e 12 min, em seguida inativadas a 100°C em água fervente durante cinco minutos e depois colocadas em banho à temperatura ambiente. A quantidade de ciclodextrina foi dosada em função do tempo, adicionando-se 2,5 mL da solução de fenolftaleína a 0,5 mL das amostras inativadas. A absorvância da solução final foi analisada em espectrofotômetro a 550 nm. Neste comprimento de onda a coloração rosa da fenolftaleína em meio básico, possui uma maior absorvância. A AE foi encontrada por meio da equação:

$$A = \alpha \cdot \beta \cdot F_{dil} \cdot 1000 \cdot \frac{V_{reator}}{V_{enz}}$$

Onde: A= Atividade enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mL}$); α = Coeficiente angular da curva padrão ($\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}/\text{ABS}$); β = Coeficiente angular da curva obtida experimentalmente (ABS/min .); V =Volume enzimático do reator ($V_{amostra}(\text{mL})/V(\text{mL})$); F_{dil} = Fator de diluição

2.7 Confeção da curva padrão de β -CD

Para traçar a curva padrão de β -CD, foi preparada uma solução estoque de β -CD 0,5 mM, pesando-se 0,01419 g de β -CD, 5,0 mL de tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) e completando o volume a 25 mL com água destilada. A partir da solução estoque foram realizadas sucessivas diluições e as amostras foram submetidas ao método colorimétrico de complexação da fenolftaleína-ciclodextrina. A leitura da absorvância ocorreu a 550 nm.

2.8 Confeção da curva padrão de massa seca

Durante o processo de fermentação, foram retiradas alíquotas e centrifugadas por 10 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante foi guardado sob refrigeração para posterior análise da atividade enzimática. As células foram lavadas com NaCl (0,9%) e centrifugadas novamente, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas ao volume inicial e posteriormente foram agitadas.

Em seguida foi realizada a leitura da absorbância dessa suspensão em espectrofotômetro a 600 nm. A determinação do crescimento celular foi realizado por meio da curva de massa seca (mg de massa seca/mL) versus ABS. Para a leitura de absorbância (600nm) a suspensão das células foi diluída como mostrado na tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Valores de diluição das células em suspensão

Experimentos	NaCl (mL)	Micro- organismo (mL)
1	10	0
2	9	1
3	8	2
4	7	3
5	6	4
6	5	5
7	4	6
8	3	7
9	2	8
10	1	9
11	0	10

2.9 Planejamento experimental composto central

A realização de experimentos significativos e confiáveis é obtida por meio do planejamento experimental e análise estatística dos dados, garantindo vantagens como a redução do tempo e custos de experimentação, pois permite a otimização do número de experimentos.

A atividade enzimática envolve diversas variáveis. Assim, o planejamento e a análise dos ensaios são mais confiáveis quando são utilizadas técnicas estatísticas. A técnica de superfície de resposta, que tem como base o planejamento experimental,

permite selecionar a combinação de níveis ótimos na obtenção da melhor resposta.

Os experimentos foram realizados com base no planejamento estatístico fatorial de 1ª ordem aumentado por pontos adicionais para se estimar os parâmetros de uma superfície de 2ª ordem utilizando-se o delineamento composto central (DCC), com o auxílio do software *STATISTICA 7*. Portanto, um DCC composto por um planejamento fatorial com duas variáveis em dois níveis acrescido de seis réplicas no ponto central e ainda quatro experimentos nos pontos axiais (α), quatro experimentos nos pontos dos níveis -1 e +1. Os valores das variáveis estudadas são codificados utilizando a seguinte equação de codificação:

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

onde:

X_n : é o valor da variável no experimento na forma codificada;

X : é o valor real da variável a ser calculado;

X_0 : é o valor real da variável no ponto central;

X^{+1} : é o valor da variável no nível superior;

X^{-1} : é o valor real da variável no nível inferior.

2.9.1 Primeiro planejamento experimental composto central

Para avaliar a tendência de algumas variáveis do processo na produção de CGTase, realizou-se o planejamento fatorial a dois níveis com duas variáveis, sendo 2² no ponto fatorial, seis réplicas no ponto central, quatro experimentos nos pontos axiais (α), totalizando 14 experimentos.

Na tabela 3.2 são apresentados os valores das variáveis do meio de cultivo (ponto central, níveis -1 e +1 e pontos axiais) usados no planejamento composto central do primeiro planejamento experimental.

Tabela 2.2 - Valores reais e codificados das variáveis do processo do primeiro planejamento

Variáveis	Níveis				
	- α	-1	0	1	+ α
X ₁	0,39	0,5	0,75	1	1,1
X ₂	0,647	0,75	1	1,25	1,35

Neste planejamento experimental foram realizados ensaios para verificar a influência de duas variáveis no processo de produção enzimática. As variáveis foram:

X₁ - Concentração de sorgo, como fonte de carbono (%);

X₂ - Concentração de duas fontes de nitrogênio: Extrato de levedura e Triptona (%).

A substituição dos valores codificados encontrados foi realizada na matriz do planejamento, obtendo-se a tabela 2.3, onde apresenta os valores codificados e reais das concentrações empregadas em cada um dos 14 experimentos do planejamento do composto central.

Tabela 2.3 - Matriz das condições dos ensaios no planejamento experimental

Experimentos	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais	
1	-1	-1	0,5	0,75
2	-1	1	0,5	1,25
3	1	-1	1	0,75
4	1	1	1	1,25
5	-1,4142	0	0,39	1
6	1,41421	0	0,75	0,64
7	0	-1,4142	1,1	1
8	0	1,41421	0,75	1,35
9	0	0	0,75	1
10	0	0	0,75	1
11	0	0	0,75	1
12	0	0	0,75	1
13	0	0	0,75	1
14	0	0	0,75	1

2.9.2 Segundo planejamento experimental composto central

O resultado do primeiro planejamento experimental mostrou as tendências das variáveis estudadas, contudo não foi possível encontrar um ponto ótimo das variáveis independentes. Assim, visando otimizar o processo fez-se necessário realizar um segundo planejamento composto central com três variáveis, usando o melhor resultado obtido na concentração de sorgo através do primeiro planejamento experimental, a fim de se obter resultados mais específicos, estas variáveis foram :

X_1 : Concentração da fonte de carbono - Sorgo (%);

X_2 : pH inicial;

X_3 : Temperatura ($^{\circ}$ C).

Neste planejamento usou-se 2^3 experimentos no ponto fatorial, com cinco réplicas no ponto central e seis experimentos nos pontos axiais (α), resultando em 19 experimentos. Na tabela 2.4 são apresentados os valores reais e codificados das variáveis de processo no segundo planejamento.

Tabela 2.4 - Valores reais e codificados das variáveis do processo

Variáveis	Níveis				
	- α	-1	0	1	+ α
X_1	0,33	0,5	0,75	1	1,17
X_2	6,32	7	8	9	9,68
X_3	33,32	34	35	36	36,68

A substituição dos valores codificados encontrados foi feita na matriz do planejamento, obtendo-se a tabela 2.5, onde apresenta os valores codificados e reais das concentrações empregadas em cada um dos 19 experimentos do segundo planejamento composto central.

Tabela 2.5 - Matriz das condições dos ensaios no segundo planejamento experimental

Experimentos	Variáveis Codificadas			Variáveis Reais		
1	-1	-1	-1	0,5	7	34
2	-1	-1	1	0,5	7	36
3	-1	1	-1	0,5	9	34
4	-1	1	1	0,5	9	36
5	1	-1	-1	1	7	34
6	1	-1	1	1	7	36
7	1	1	-1	1	9	34
8	1	1	1	1	9	36
9	-1,68	0	0	0,33	8	35
10	1,68	0	0	1,17	8	35
11	0	-1,68	0	0,75	6,32	35
12	0	1,68	0	0,75	9,68	35
13	0	0	-1,68	0,75	8	33,32
14	0	0	1,68	0,75	8	36,68
15	0	0	0	0,75	8	35
16	0	0	0	0,75	8	35
17	0	0	0	0,75	8	35
18	0	0	0	0,75	8	35
19	0	0	0	0,75	8	35

2.9.3 Terceiro planejamento experimental composto central

O resultado do segundo planejamento experimental mostrou as tendências das variáveis estudadas, contudo não foi possível encontrar um ponto ótimo das variáveis independentes. Assim, visando otimizar o processo fez-se necessário realizar um terceiro planejamento composto central com três variáveis, usando o melhor resultado obtido na concentração de sorgo através do segundo planejamento experimental, a fim de se obter resultados mais específicos, estas variáveis foram:

X₁: Concentração da fonte de carbono - Sorgo (%);

X₂: pH inicial;

X₃: Temperatura (°C).

Neste planejamento usou-se 2³ experimentos no ponto fatorial, com seis réplicas no ponto central e seis experimentos nos pontos axiais (α), resultando em 20 experimentos. Na tabela 2.6 são apresentados os valores reais e codificados das variáveis do processo.

Tabela 2.6 - Valores reais e codificados das variáveis do processo

Variáveis	Níveis				
	- α	-1	0	1	+ α
X ₁	0,162	0,23	0,333	0,43	0,498
X ₂	6,32	7	8	9	9,68
X ₃	33,32	34	35	36	36,68

A substituição dos valores codificados encontrados foi feita na matriz do planejamento, obtendo-se a tabela 2.7, onde apresenta os valores codificados e reais das concentrações empregadas em cada um dos experimentos.

Tabela 2.7 - Matriz das condições dos ensaios no terceiro planejamento experimental

Experimentos	Variáveis Codificadas			Variáveis Reais		
1	-1	-1	-1	0,23	7	34
2	-1	-1	1	0,23	7	36
3	-1	1	-1	0,23	9	34
4	-1	1	1	0,23	9	36
5	1	-1	-1	0,43	7	34
6	1	-1	1	0,43	7	36
7	1	1	-1	0,43	9	34
8	1	1	1	0,43	9	36
9	-1,68	0	0	0,162	8	35
10	1,68	0	0	0,498	8	35
11	0	-1,68	0	0,33	6,32	35
12	0	1,68	0	0,33	9,68	35
13	0	0	-1,68	0,33	8	33,32
14	0	0	1,68	0,33	8	36,68
15	0	0	0	0,33	8	35
16	0	0	0	0,33	8	35
17	0	0	0	0,33	8	35
18	0	0	0	0,33	8	35
19	0	0	0	0,33	8	35
20	0	0	0	0,33	8	35

2.9.4 Quarto planejamento experimental composto central

Com os resultados do terceiro planejamento experimental ainda não foi possível encontrar um ponto ótimo de todas as variáveis independentes, pois apenas as

variáveis X_2 e X_3 encontraram-se no ponto central. Por conta disso, a fim de otimizar o processo, foi realizado um quarto planejamento composto central com três variáveis, usando o melhor resultado obtido na concentração de sorgo através do terceiro planejamento experimental, a fim de se obter resultados mais específicos, estas variáveis foram:

X_1 : Concentração da fonte de carbono - Sorgo (%);

X_2 : pH inicial;

X_3 : Temperatura ($^{\circ}$ C).

Neste planejamento usou-se 2^3 experimentos no ponto fatorial, com seis réplicas no ponto central e seis experimentos nos pontos axiais (α), resultando em 20 experimentos. Na tabela 2.8 são apresentados os valores reais e codificados das variáveis do processo.

Tabela 2.8 - Valores reais e codificados das variáveis do processo

Variáveis	Níveis				
	- α	-1	0	1	+ α
X_1	0,142	0,152	0,162	0,172	0,18
X_2	6,32	7	8	9	9,68
X_3	33,32	34	35	36	36,68

A substituição dos valores codificados encontrados foi feita na matriz do planejamento, obtendo-se a tabela 2.9, onde apresenta os valores codificados e reais das concentrações empregadas em cada um dos experimentos.

Tabela 2.9 - Matriz das condições dos ensaios no quarto planejamento experimental

Experimentos	Variáveis Codificadas			Variáveis Reais		
1	-1	-1	-1	0,152	7	34
2	-1	-1	1	0,152	7	36
3	-1	1	-1	0,152	9	34
4	-1	1	1	0,152	9	36
5	1	-1	-1	0,172	7	34
6	1	-1	1	0,172	7	36
7	1	1	-1	0,172	9	34
8	1	1	1	0,172	9	36
9	-1,68	0	0	0,145	8	35
10	1,68	0	0	0,18	8	35
11	0	-1,68	0	0,162	6,32	35
12	0	1,68	0	0,162	9,68	35
13	0	0	-1,68	0,162	8	33,32
14	0	0	1,68	0,162	8	36,68
15	0	0	0	0,162	8	35
16	0	0	0	0,162	8	35
17	0	0	0	0,162	8	35
18	0	0	0	0,162	8	35
19	0	0	0	0,162	8	35
20	0	0	0	0,162	8	35

2.10 Cálculo do ponto ótimo

Utilizando a equação de codificação obteve-se os valores reais das concentrações das variáveis no ponto de maximização da AE:

$$\text{Concentração da fonte de carbono: } X_1 (\%) = [(\text{sorgo} - 0,162) / 0,01] \quad (2.1)$$

$$\text{Concentração de pH: } X_2 (\%) = [\text{Na}_2\text{CO}_3 - 8] \quad (2.2)$$

$$\text{Variação da temperatura: } X_3 (^\circ\text{C}) [\text{temperatura} - 35] \quad (2.3)$$

2.11 Análise de amido em sorgo

Para análise de amido pesou-se 2 g da amostra de sorgo, a qual foi transferida para um *Erlenmeyer* de 500 mL e adicionada 1mL de hidróxido de sódio (10 %); em seguida a solução foi autoclavada a 120° C durante 1 hora. Em temperatura ambiente, 10 mL de ácido clorídrico foi adicionado a solução e autoclavado (1atm) por 30 minutos. Em 25° C a solução foi neutralizada com hidróxido de sódio (40 %) e adicionada a um balão volumétrico de 500 mL sendo o volume completado com água

destilada. A solução foi agitada e depois colocada em descanso para sedimentar, sendo filtrada a vácuo com papel filtro seco logo em seguida. Portanto, 50 % do volume da solução foram adicionados a 50 % de DNS. A solução foi fervida por 5 minutos e depois de resfriada foi homogeneizada, sendo acrescentados 1,5 mL de água destilada à solução final. Posteriormente foi medida a absorvância em espectrofotômetro a 540 nm.

2.12 Análise de glicose em sorgo

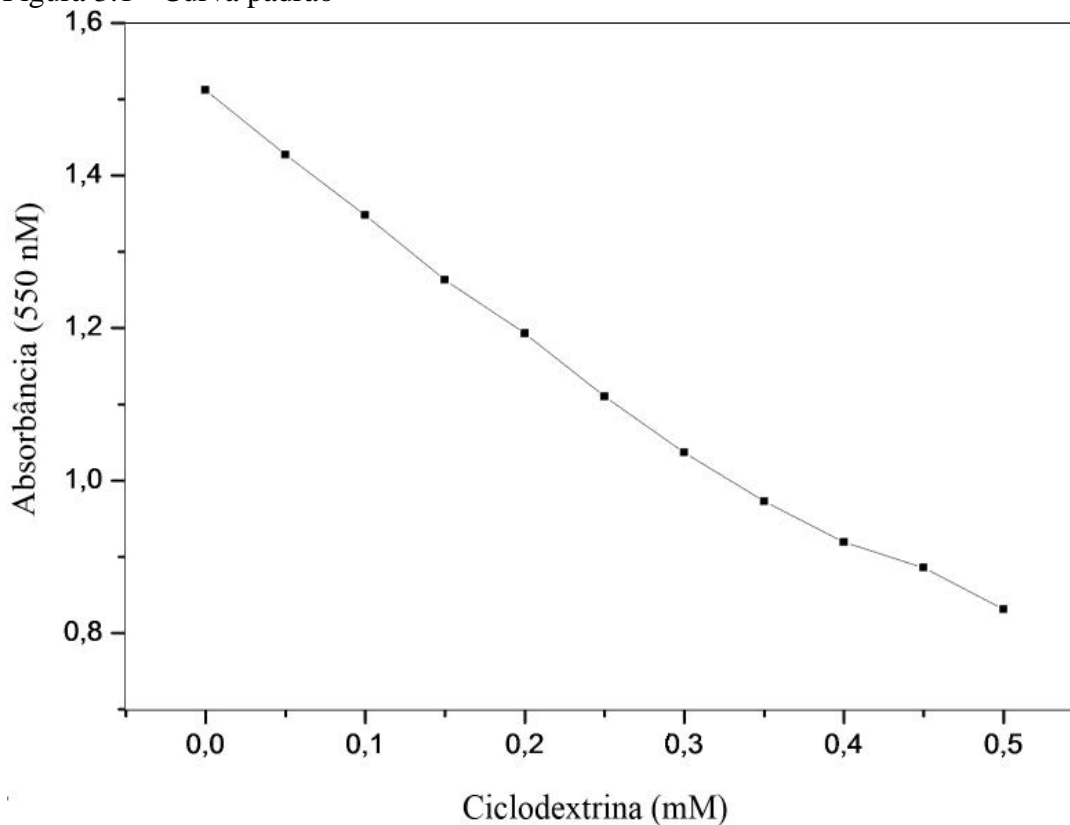
Para análise de açúcares redutores pesou-se 2 g da amostra de sorgo, a qual foi transferida para um balão volumétrico de 500 mL, onde o volume foi completado com água destilada. A solução foi agitada e em seguida colocada em descanso até sedimentar, sendo posteriormente filtrada a vácuo com papel filtro seco. 50 % do volume da solução foram adicionados a 50 % de DNS, onde a solução foi fervida por 5 minutos; sendo depois resfriada e homogeneizada acrescentando 1,5 mL de água destilada. A absorvância da solução final foi analisada em espectrofotômetro a 540 nm.

3 RESULTADOS

3.1 Calibração do método

A calibração do método foi estabelecida por meio da curva padrão (Figura 3.1) que promoveu o grau de correlação entre o resultado de uma medição e o valor convencional do mensurando.

Figura 3.1 - Curva padrão



A curva padrão é realmente eficiente devido aos resultados mostrarem um bom ajuste linear. Experimentalmente obteve-se um coeficiente angular $\alpha = - 2,4133$ e, um coeficiente de correlação igual a 0,99706 o que comprova a boa linearidade da curva padrão.

A pesquisa de cepas produtoras de CGTase é mais rápida se a AE é detectada em nível de placa de Petri, por meio da formação de halos. A detecção dos halos no meio plaqueado é uma técnica que tem o objetivo de isolar e selecionar micro-organismos que produzem com maior seletividade altas concentrações de ciclodextrinas (MATIOLI, 2000). Na Figura 3.2 a formação de halos refere-se a observação após 48 h da inoculação do *Bacillus circulans* ATCC 21783.

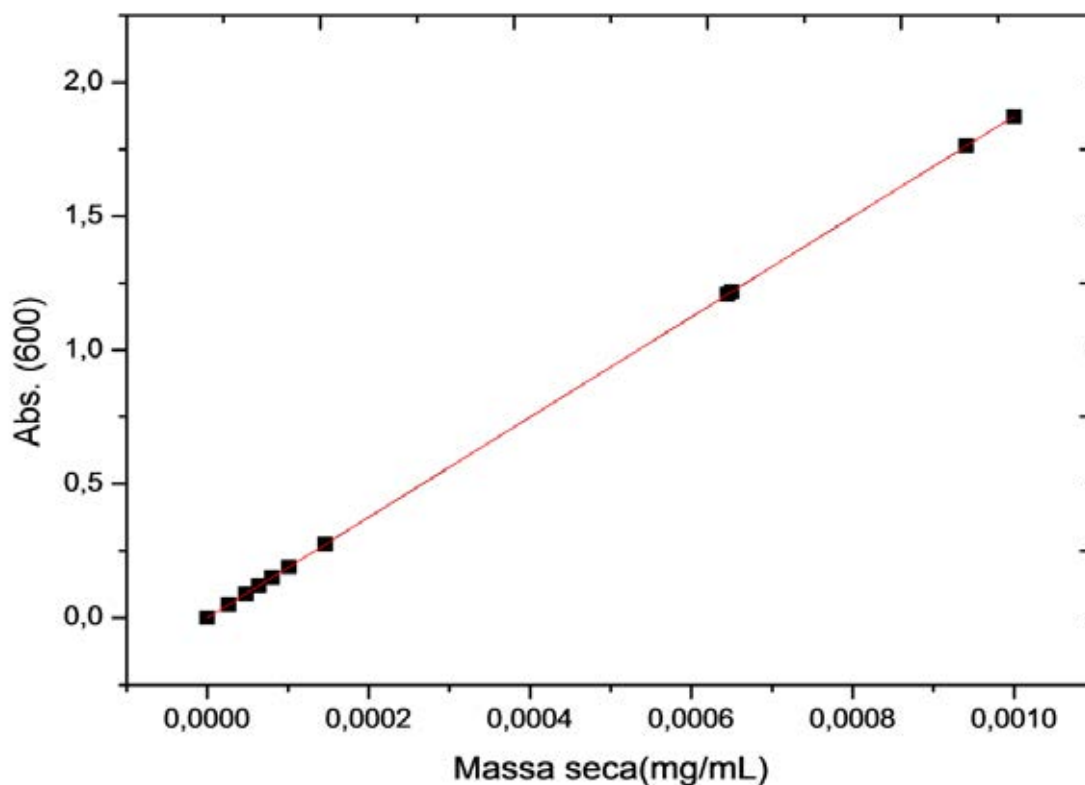
Figura 3.2 – Halos formados evidenciando a atividade enzimática do micro-organismo



Este experimento teve como objetivo observar se a cultura microbiana estocada apresentava a capacidade de produzir halo em meio de cultura contido em placa de Petri, indicando a capacidade de produção de CGTase. A ciclodextrina formada pela enzima produzida pelo cultivo de cepas microbianas deste gênero é capaz de formar compostos de inclusão com a fenolftaleína, mudando a coloração do meio de cultura ao redor das colônias, formando halos de coloração amarela (MATIOLI, 2000).

Na figura 3.3 observa-se a calibração do método para a massa seca e absorvância (600 nm) que foi estabelecido por meio da curva padrão (Figura 3.1), promovendo o grau de correlação entre o resultado de uma medida de absorvância e o valor convencional do mensurado da concentração (mg/mL). O gênero *Bacillus* inclui espécies caracterizadas como alcalófilos, muitas das quais têm sido estudadas com vista a encontrar aplicações industriais (Horikoshi et al. 1991) como a produção de CGTase.

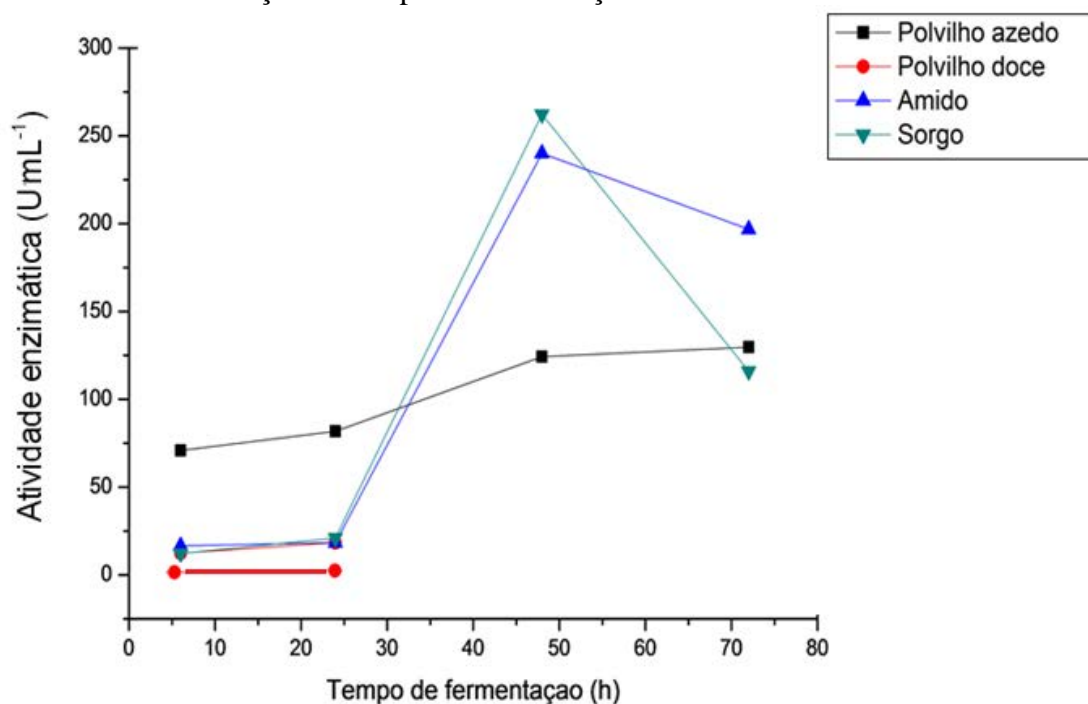
Figura 3.3 - Curva padrão para a correlação entre massa seca e absorvância para o micro-organismo *Bacillus circulans* ATCC 21783



Experimentalmente obteve-se um coeficiente de correlação igual a 0,99706 para a curva da figura 3.1 e 1 para a curva da figura 3.3, o que comprova a boa linearidade da curva padrão. A equação $y = 0,000374 + 1.872x$ obtida da figura 3.1 foi utilizada para análise de CGTase durante a fermentação para a produção da enzima.

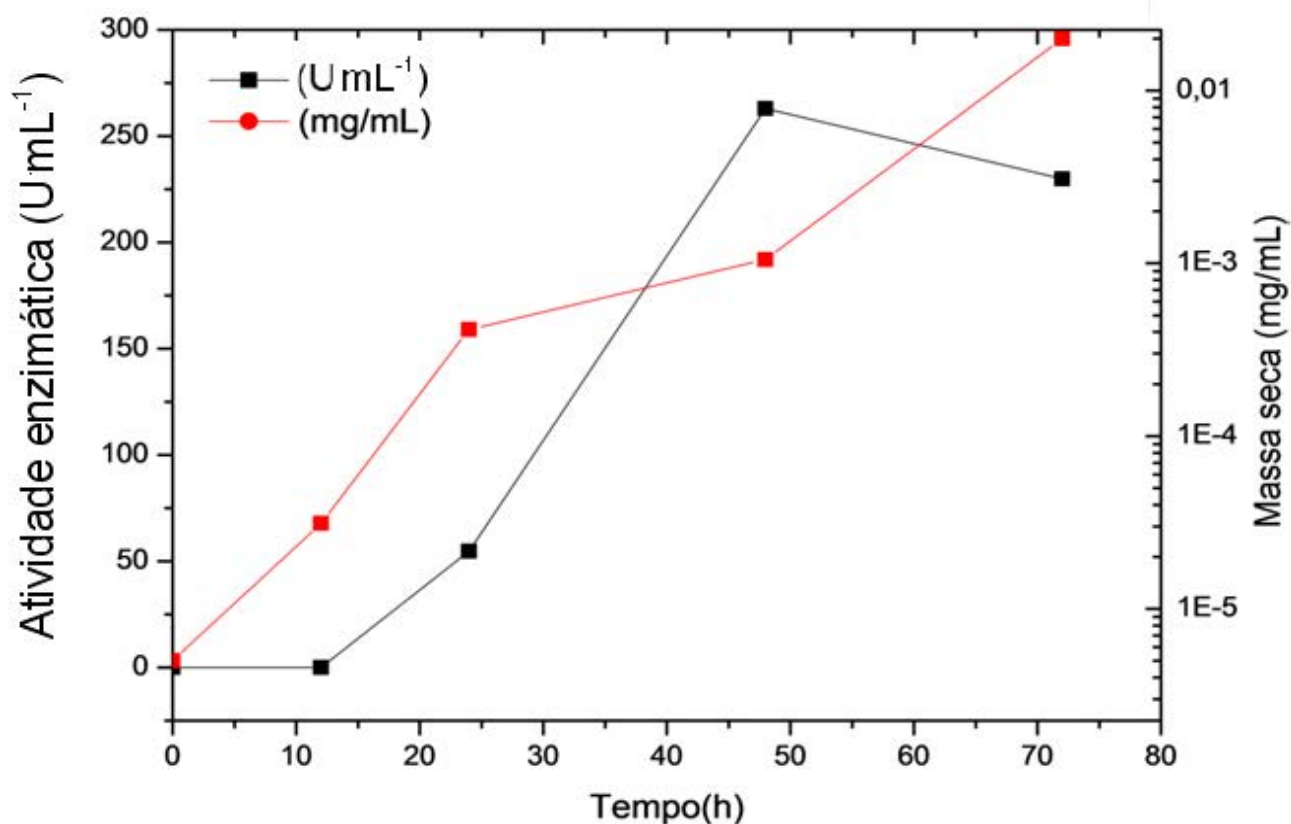
Na figura 3.4 a AE foi obtida por comparação de quatro fontes de carbono: polvilho azedo, polvilho doce, amido e sorgo.

Figura 3.4 – Atividade enzimática do micro-organismo em diferentes fontes de amido em função do tempo de fermentação



Através da figura 3.4 observam-se dois estágios distintos para as quatro fontes de carbono. Até 48 h a produção aumentou consideravelmente para o amido e o sorgo, chegando a aumentar mais de cinco vezes a AE, o polvilho azedo teve aumento superior a 2 vezes, já o polvilho doce apresentou atividade enzimática até 24h de fermentação, após este período a produção enzimática foi cessada. A fécula de mandioca (polvilho) foi utilizada para a produção de CGTase de *Bacillus* sp.subgrupo *alcalophilus* como uma fonte de carbono (BLANCO et al. 2009), onde bons resultados foram obtidos. O segundo estágio, após 48h de fermentação apresentou um decréscimo na AE para o amido e o sorgo enquanto que o polvilho azedo continuou a aumentar chegando a ter três vezes o valor inicial de AE. A produção da enzima em sorgo e amido solúvel diminuiu após 72 h, provavelmente devido ao fato da quantidade de substrato presente nesse tempo de fermentação ser insuficiente para produção da enzima, já a produção da CGTase por polvilho azedo tende a aumentar podendo ser realizados novos testes em 96 h para observar qual o melhor tempo de fermentação. A produção máxima de CGTase de *Bacillus alcalophilus* foi 97,38 U. mL⁻¹ e aumentou para 134,05 U. mL⁻¹ na fermentador em 72 horas (de FREITAS et al. 2004). Kulpreecha et al. (2009) usaram várias fontes de carbono, tais como arroz, milho e amido solúvel para a síntese de CGTase. No presente estudo, relatamos o uso de sorgo, pela primeira vez em estudos de fermentação para a síntese de CGTase como fonte de carbono no meio.

Figura 3.5 – Atividade enzimática e massa seca em nas seguintes condições: tempo de fermentação = 24 h, 48 h, 72 h, agitação = 150 rpm, temperatura = 35° C, fonte de carbono = amido solúvel



Observa-se na figura 3.5 dois estágios distintos para a produção da enzima CGTase. Em 48 h a produção de CGTase aumentou até 263 U. mL⁻¹ e no segundo estágio de fermentação (72 h), houve um decréscimo de 13 % na AE. Isso pode ser explicado pelo fato da quantidade de substrato não ser mais suficiente para a produção de enzima, já que a relação substrato/micro-organismo diminui conforme o tempo. Para o comportamento do crescimento celular, verificou-se um aumento da massa seca (mg/mL) de 4,99.10⁻⁶ (0 h), 3,12.10⁻⁵ (12 h), 4,14.10⁻⁴ (24 h), 0,00105 (48 h) até 0,02 (72 h) durante a fermentação. Portanto observa-se o crescimento exponencial dos dados de massa seca em função do tempo de fermentação, visto que a massa seca aumentou 10 vezes em função do tempo de análise da mesma.

3.2 Análise de amido e glicose em relação ao tamanho do sorgo

Após a análise com as melhores fontes de carbono, onde o sorgo foi a que se obteve a maior AE, foi proposto uma análise em relação ao amido e a glicose presente

em diferentes tamanhos do grão de sorgo. O sistema proposto foi aplicado à produção da enzima e foram codificadas da seguinte forma: 1A e 1B (semente de sorgo quebrada ao meio, SQ), 1,19 *mesh* (2A e 2B); 0,71 *mesh* (3A e 3B); 0,5 *mesh* (4A e 4B) e 0,064 *mesh* (5A e 5B).

A cada 24 horas foram testadas açúcares totais, açúcares redutores, quantidade de amido e atividade enzimática até 72 horas. A tabela 3.1 mostra a glicose calculada através da absorbância (540 nm), presente em açúcares totais, açúcares redutores e o amido, para os diferentes tamanhos do grão de sorgo.

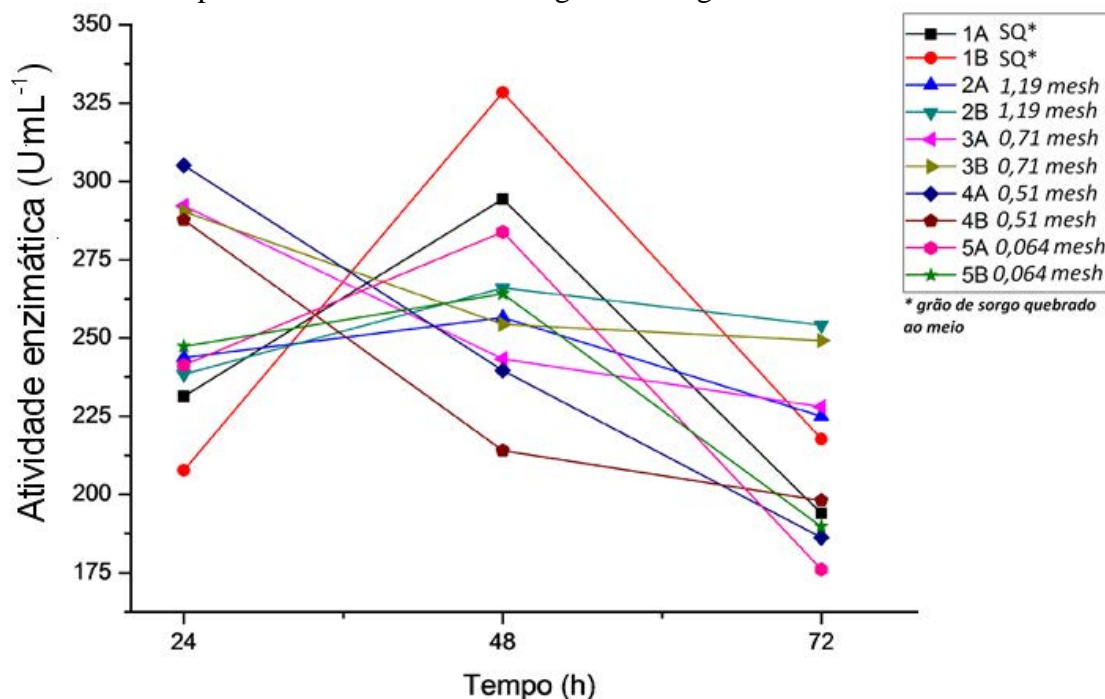
Tabela 3.1 – Resultados dos ensaios de açúcares totais, açúcares redutores e concentração de amido para diferentes tamanhos do grão de sorgo

Amostra (mesh)	Açúcares Totais		Açúcares Redutores		Amido	
	ABS (540 nm)	Glicose (g/L)	ABS (540 nm)	Glicose (g/L)	Glicose (g/L)	Amido (%)
0,064	0,254	1,19	0,041	0,213	0,977	24,4
0,5	0,272	1,272	0,063	0,314	0,958	24
0,71	0,286	1,337	0,075	0,369	0,967	24,2
1,19	0,311	1,451	0,081	0,397	1,004	26,4
*SQ	0,324	1,511	0,089	0,479	1,032	26,9

* grão de sorgo quebrado ao meio

Observou-se através da tabela 3.1 que quanto maior o tamanho do grão de sorgo, maior será a concentração de glicose e a concentração de amido. Isso se deve ao tamanho do grão do sorgo, por ter maior concentração de amido, influenciando significativamente no aumento de sua atividade residual. Os resultados da AE em relação aos diferentes tamanho de sorgo são apresentados na figura 3.6.

Figura 3.6 – Efeito do tempo de fermentação para AE em diferentes condições experimentais do tamanho do grão de sorgo



Observa-se na figura 3.6 que a enzima CGTase tem seu pico de produção em diferentes tempos de fermentação, sendo que o teste 1A (SQ) e 1B (SQ), que apresenta maior AE, tem seu pico de produção em 48 h (328,4 U. mL⁻¹).

Os resultados presentes na tabela 3.1 e na figura 3.6 demonstram a correlação diretamente proporcional do tamanho do grão de sorgo com a concentração de amido; quanto maior essa concentração, maior a AE. Isso ocorre devido ao sistema de fermentação onde a bactéria *Bacillus circulans* ATCC 21783, utilizada na produção, usa o sorgo como principal fonte de carbono, além das fontes de nitrogênio, os sais, e fatores externos como temperatura (°C) e agitação (rpm) do meio. A AE aumenta em relação ao pré-inóculo porque aumenta o número de células de *Bacillus circulans* ATCC 21783 durante a fermentação, a qual utiliza a fonte de carbono para produzir a enzima CGTase. As AEs caem após 48h devido ao fato de diminuir a concentração da fonte de amido consumido pelo *Bacillus circulans* ATCC 21783.

Foi encontrada uma correlação direta entre tamanho do grão de sorgo e da atividade da enzima. A concentração mais elevada de amido de sorgo corresponde à maior facilidade, devido à possibilidade do tamanho da molécula do amido e / ou a sua posição sobre o grão.

3.3 Análise estatística das respostas

3.3.1 Primeiro planejamento experimental composto central

Os resultados obtidos das respostas analisadas no tempo de maior AE foram analisados em uma regressão múltipla, tendo como fatores, os termos isolados, as interações e os quadráticos das variáveis estudadas. A tabela 3.2 mostra a atividade enzimática de cada experimento com relação ao planejamento experimental nos valores observados e preditos.

Tabela 3.2 - Planejamento experimental e resultados experimentais (com AE) do planejamento composto central

Experimentos	Sorgo (%)	Fontes de Nitrogênio (%)	CGTase U. mL⁻¹
1	0,5	0,75	17,3
2	0,5	1,25	69,2
3	1	0,75	27,68
4	1	1,25	17,3
5	0,39	1	33,73
6	0,75	0,64	112,45
7	1,1	1	3,46
8	0,75	1,35	10,38
9	0,75	1	6,92
10	0,75	1	20,76
11	0,75	1	21,1
12	0,75	1	20,76
13	0,75	1	20,72
14	0,75	1	21,1

Os resultados das AE destes experimentos nos tempos de 24, 48 e 72 horas são mostrados nas figuras a seguir:

Figura 3.7 - Atividade enzimática dos experimentos: 1, 2, 3, 4, 5 (em duplicata) nas seguintes condições experimentais: tempo de fermentação = 24 h, 48 h, 72 h, agitação = 150 rpm e temperatura = 35° C

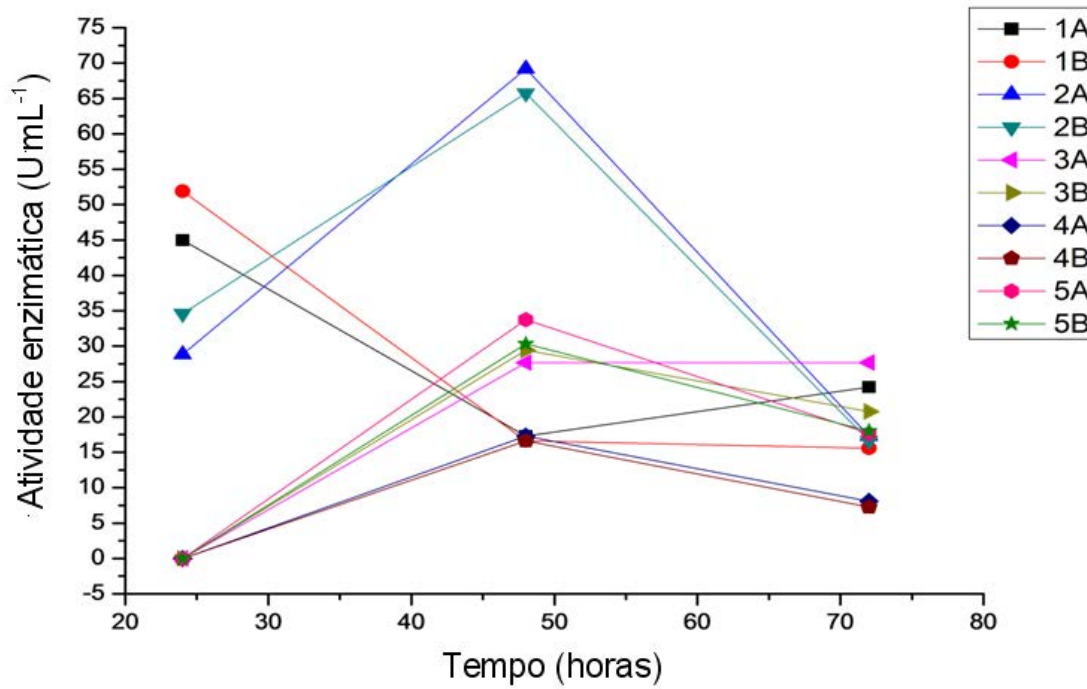
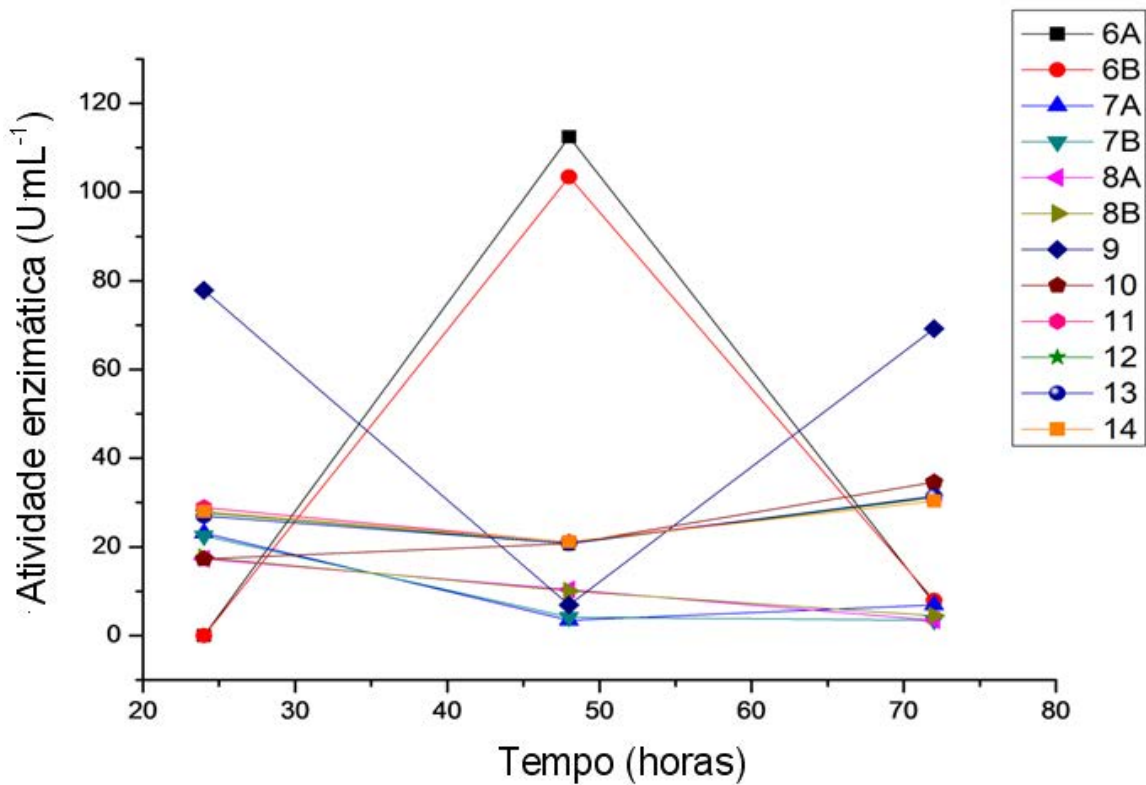


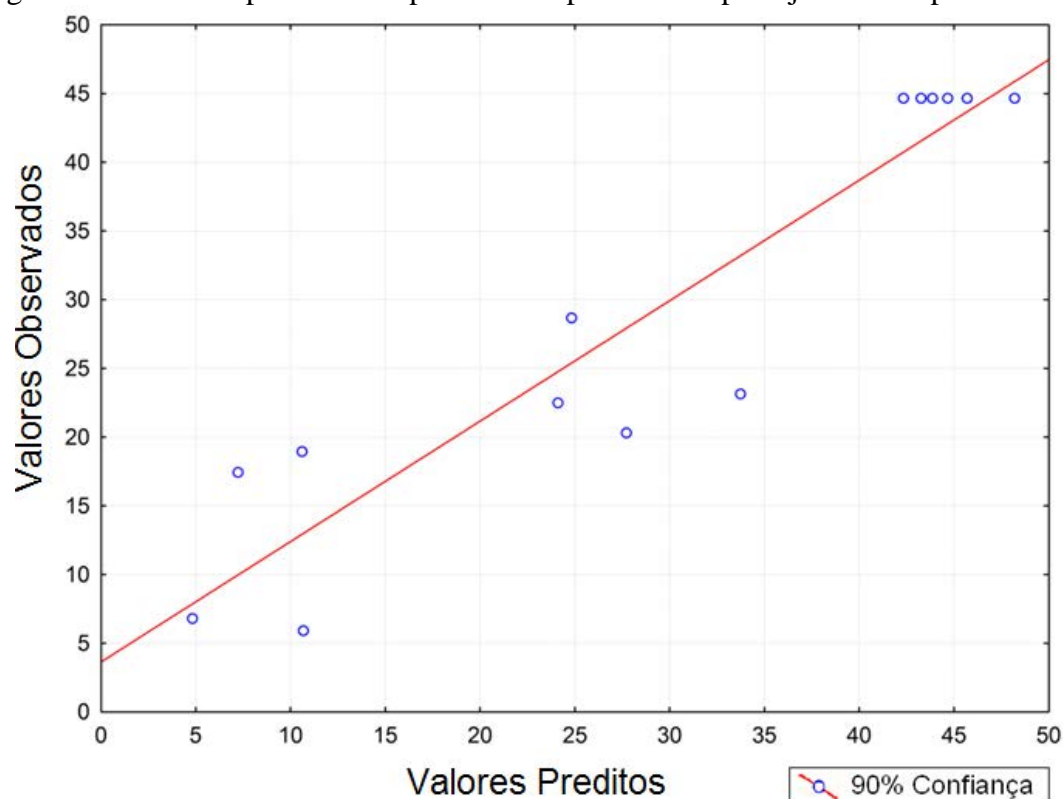
Figura 3.8 - Atividade enzimática dos experimentos: 6, 7, 8, 9 (em duplicata) e 9, 10, 11, 12, 13, 14 nas seguintes condições experimentais: tempo de fermentação = 24 h, 48 h, 72 h, agitação = 150 rpm e temperatura = 35° C



Observa-se pela Tabela 3.2 que a variação de X_1 e X_2 resultou em uma diferença de 3,46 a 112,45 U. mL⁻¹ de AE. Comparando os resultados verifica-se que o aumento na concentração de X_1 de 0,39 para 1,1 % (experimentos 5 e 7), para valores fixos de X_2 resulta no aumento da AE em 10,25 %. Com o aumento na concentração de X_2 de 0,64 para 1,35 g/L (experimentos 6 e 8), para valores fixos de X_1 ocorre uma redução na AE em 9,23 %. O ensaio 6 apresenta a melhor AE de 112,45 U. mL⁻¹ sendo que entre os valores das variáveis estudadas com maior atividade enzimática, apenas a variável X_1 encontra-se no ponto central, $X_1 = 0,75$ enquanto que a variável $X_2 = 0,6464$ possui outro valor. Esses resultados evidenciam a importância da otimização destas variáveis para tornar mais intensa a AE, fazendo com que seja necessário realizar um segundo planejamento experimental, como podemos observar mais adiante. Comprovado pelas Figuras 3.7 e 3.8 Metodologia de superfície de resposta (RSM) é um modelo estatístico geral utilizado para estudar o efeito combinado de variáveis e otimizar as condições de um sistema multivariável como a produção enzimática (BLANCO et al., 2012).

A Figura 3.8 mostra a AE encontrada em relação com a AE esperada para os experimentos.

Figura 3.8 - Valores preditos e experimentais para AE do planejamento experimental



Na Figura 3.8, os valores experimentais estão próximos aos valores preditos, dentro de uma margem de erro muito pequena, mostrando confiança nos resultados obtidos.

Com a execução da regressão múltipla no programa *Statistica 7*, foi possível obter a seguinte equação 3.1 que descreve os dados experimentais:

$$AE = 19,81 - 4,53X_1 + 6,41X_2 - 15,57X_1X_2 + 37,51X_1^2 - 12,45X_2^2 \quad (3.1)$$

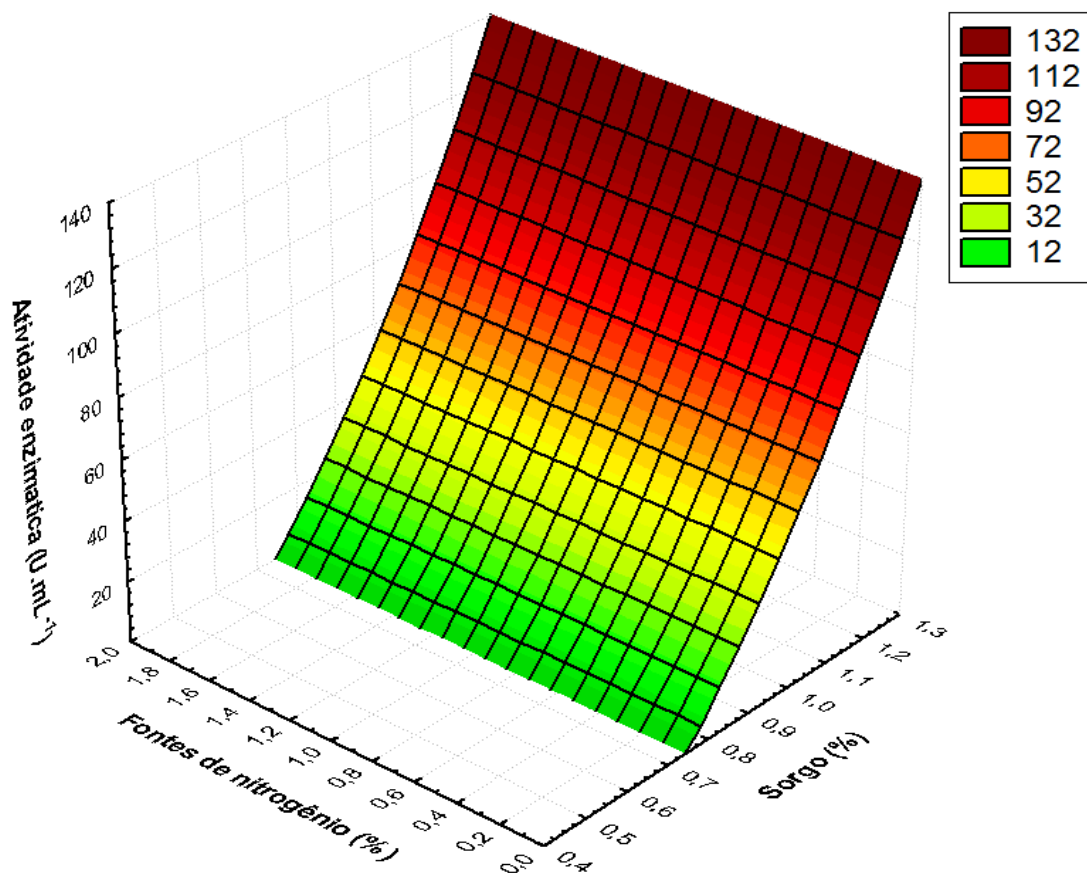
O coeficiente de correlação (R^2) de 0,8191 indica um ajuste adequado dos dados experimentais na resposta da atividade enzimática, mostrando que 81,91 % da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica proposta.

De acordo com os parâmetros com nível de significância de teste t acima de $\alpha = 0,1$, como mostra a equação 4.1, excluiu-se os termos X_1 e X_2 isolados. Após a eliminação dos parâmetros não significativos montou-se a seguinte equação:

$$AE = 20,37 - 15,57X_1X_2 + 35,13X_1^2 - 12,27X_2^2 \quad (3.2)$$

Analisando a equação 3.2 o que pode se concluir sobre o peso matemático das variáveis X_1X_2 e X_2^2 é que elas aparecem reduzindo a AE, já o X_1^2 aparece aumentando a AE. Para analisar os efeitos das variáveis na atividade enzimática é apresentado na figura 3.9 o gráfico de superfície de resposta, sendo que com este será possível prever a influência das variáveis X_1 e X_2 e também as suas formas quadráticas, na AE.

Figura 3.9 - Atividade enzimática em função de X_1 e X_2 nas seguintes condições experimentais: tempo de fermentação = 72 h, agitação = 150 rpm e temperatura = 35° C



Analisando a Figura 3.9, onde há uma relação de concentração de sorgo e fontes de nitrogênio com a atividade enzimática, pode-se notar que onde a concentração de sorgo é maior que 0,75 (%), para quaisquer valores da fonte de nitrogênio maior que zero, a tendência da atividade enzimática é somente aumentar. Para valores de sorgo menores que 0,75 (%), independente da concentração da fonte de nitrogênio, a tendência da atividade é diminuir. Ou seja, se mantivermos a concentração de nitrogênio e aumentarmos a da fonte de carbono, a tendência da atividade enzimática é sempre crescer. No presente estudo, RSM suportado no desenho central rotacional composto (RCCD) foi utilizado para a otimização da produção de CGTase por uma estirpe previamente isolada e identificada de *Bacillus lehensis* CGII, utilizadas no estudo de Blanco et.al (2012).

3.3.2 Segundo planejamento experimental composto central

Para o segundo planejamento experimental foi usado como ponto central, o melhor experimento obtido no primeiro planejamento, experimento 6 ($X_1= 0,75$). Os efeitos da concentração de sorgo, pH inicial e temperatura foram inicialmente classificados usando fatorial 2^k , com seis pontos axiais e seis repetições no planejamento experimental e os resultados (valores observados e preditos) juntamente com as atividades enzimáticas de cada experimento, foram relatados na tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Planejamento experimental e resultados experimentais (com atividade enzimática) do planejamento composto central

Experimentos	Sorgo (%)	pH (%)	Temperatura (°C)	Atividade Enzimática (U. mL⁻¹)
1	0,5	7	34	150,75
2	0,5	7	36	149,47
3	0,5	9	34	127,08
4	0,5	9	36	154,14
5	1	7	34	98,85
6	1	7	36	44,18
7	1	9	34	158,91
8	1	9	36	126,63
9	0,33	8	35	200,33
10	1,17	8	35	43,25
11	0,75	6,32	35	47,57
12	0,75	9,68	35	176,01
13	0,75	8	33,32	75,42
14	0,75	8	36,68	150,85
15	0,75	8	35	152,34
16	0,75	8	35	183,62
17	0,75	8	35	155,8
18	0,75	8	35	150,16
19	0,75	8	35	157,98
20	0,75	8	35	149,28

Os resultados das AE destes experimentos nos tempos de 24, 48 e 72 horas são mostrados nas figuras a seguir:

Figura 3.10 - Atividade enzimática dos experimentos: 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 nas seguintes condições experimentais: tempo de fermentação: 24 h, 48 h, 72 h e agitação: 150 rpm

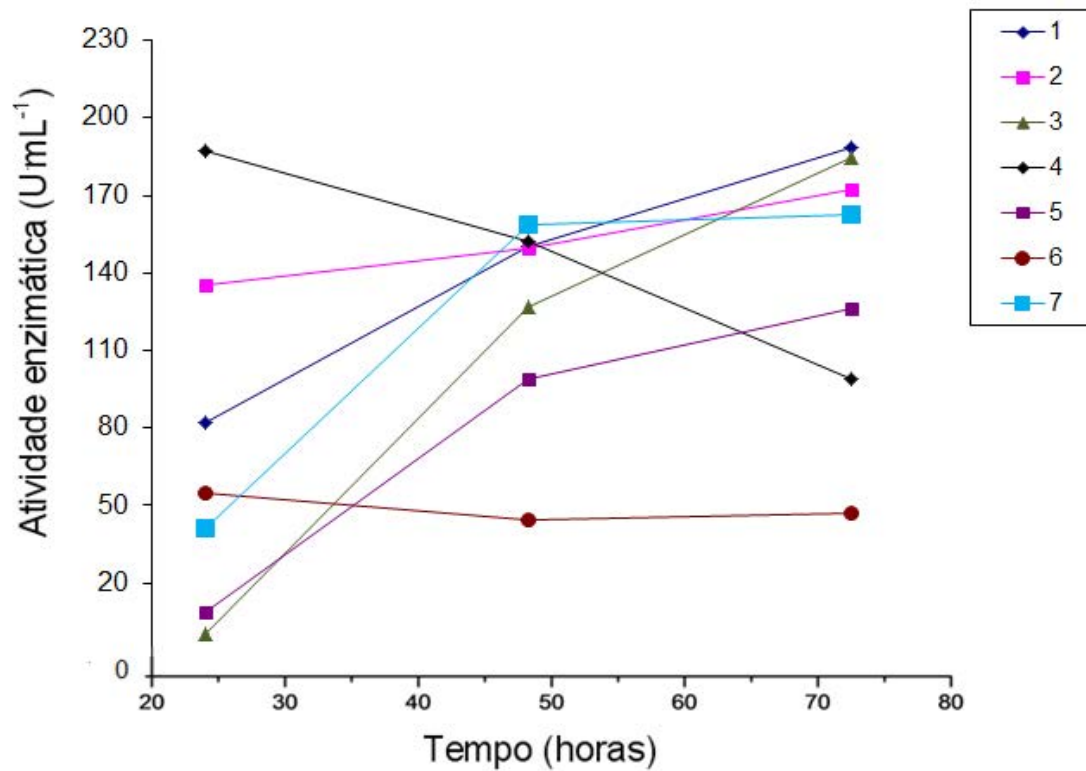


Figura 3.11 - Atividade enzimática dos experimentos: 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 nas seguintes condições experimentais: tempo de fermentação: 24 h, 48 h, 72 h e agitação: 150 rpm

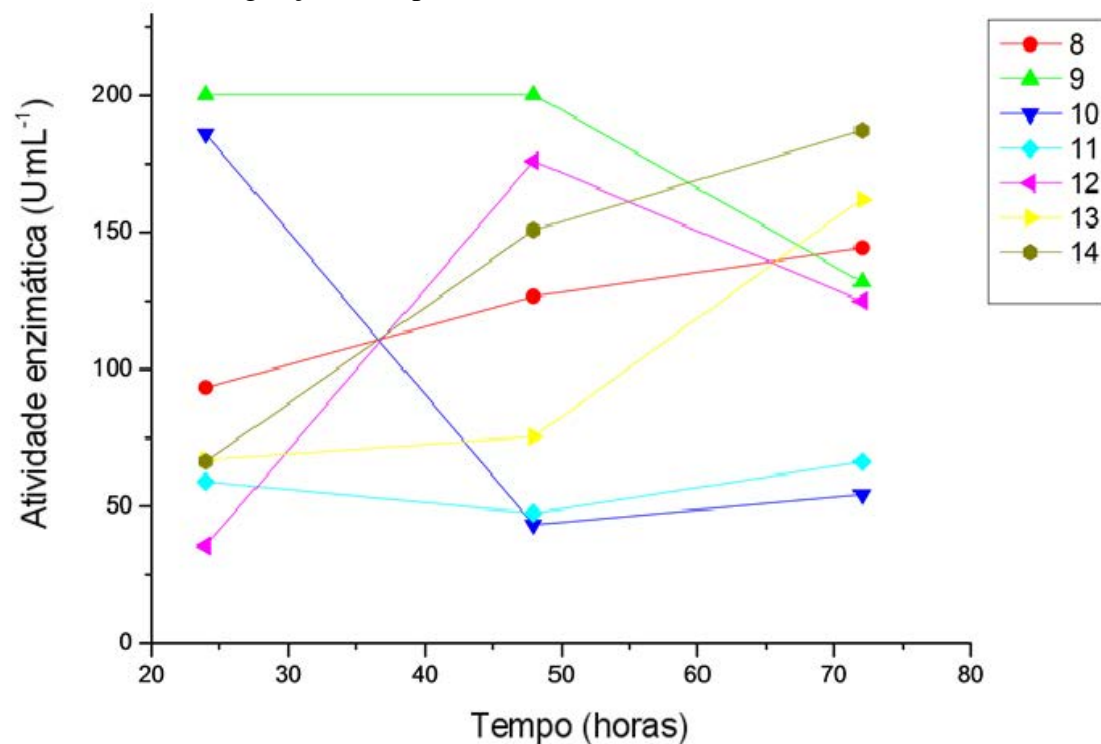
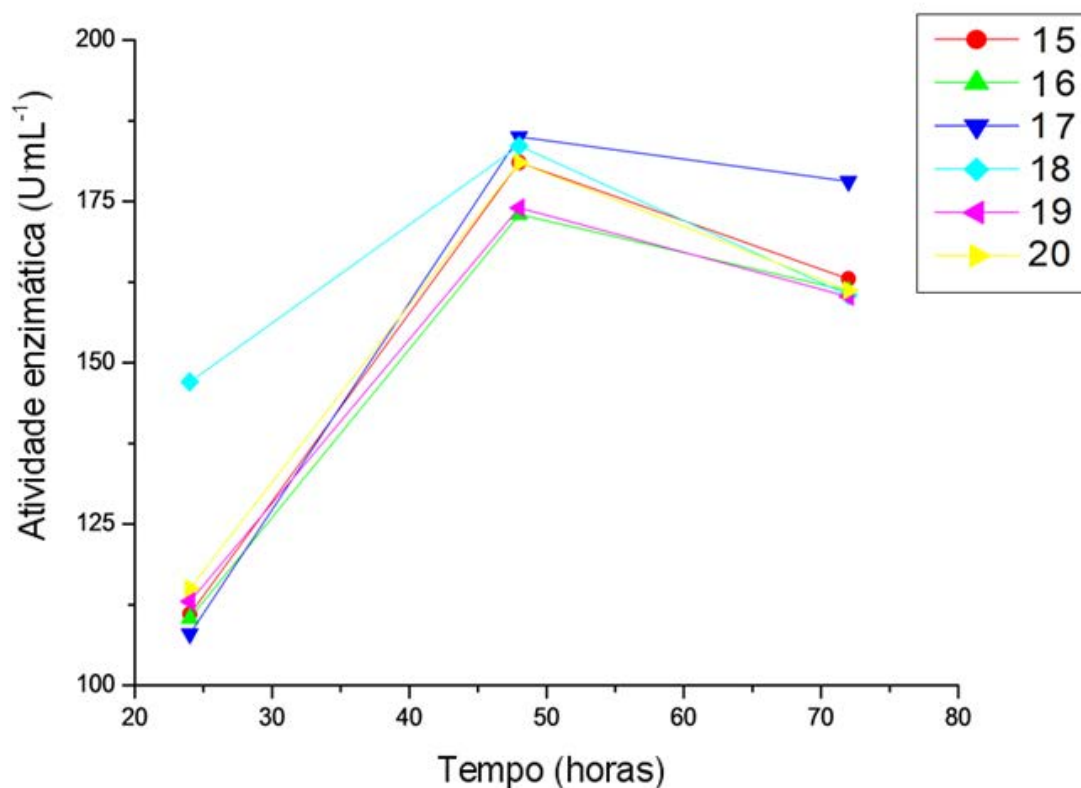


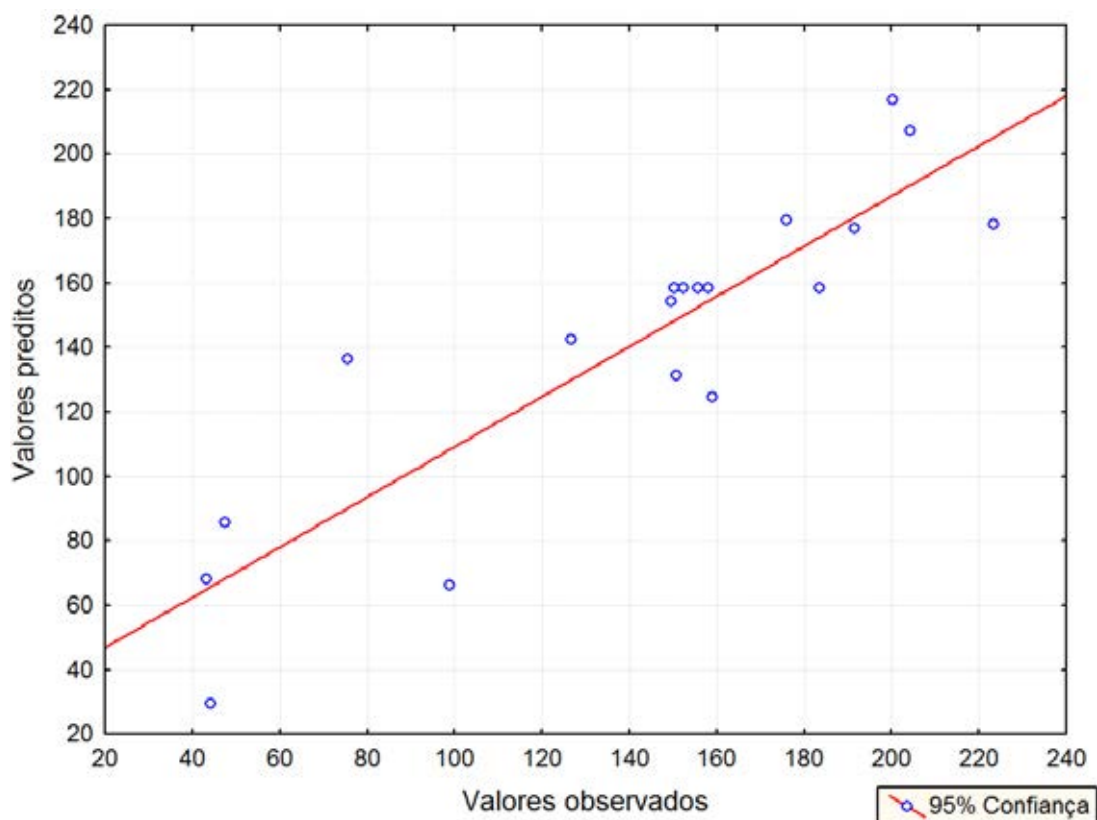
Figura 3.12 - Atividade enzimática dos experimentos: 15, 16, 17, 18, 19 e 20 nas seguintes condições experimentais: tempo de fermentação: 24 h, 48 h, 72 h e agitação: 150 rpm



Observou-se na tabela 3.3 que a variação de X_1 , X_2 e X_3 resultou em uma diferença de 43,25 a 200,33 U. mL⁻¹ de AE. Comparando os resultados verifica-se que o aumento na concentração de X_1 de 0,33 para 1,17 % (experimentos 9 e 10, respectivamente), para valores fixos de X_2 e X_3 resulta na diminuição da AE em 21,5%. Com o aumento na concentração de X_2 de 6,32 para 9,68 % (experimentos 11 e 12, respectivamente), para valores fixos de X_1 e X_3 ocorre um aumento na AE em 27 %. E com o aumento da concentração de X_3 de 33,32 para 36,68 % (experimentos 13 e 14, respectivamente), com valores fixos de X_1 e X_2 ocorre um aumento da AE em 50 %. O ensaio 9 apresenta a melhor AE (200,33 U. mL⁻¹) sendo que os valores das variáveis estudadas, com maior atividade enzimática não se encontram no ponto central ($X_1 = 0,33$, $X_2 = 8$ e $X_3 = 35$). Esses resultados evidenciam a importância da otimização destas variáveis para tornar mais intensa a AE

A Figura 3.12 mostra a AE encontrada em relação com a AE esperada para os experimentos.

Figura 3.12 - Valores preditos e experimentais para AE do planejamento experimental



Na figura 3.12 os valores experimentais estão próximos aos valores preditos, dentro de uma margem de erro muito pequena, mostrando confiança nos resultados obtidos.

Com a execução da regressão múltipla no programa *Statistica 7*, foi possível obter a seguinte Equação 3.3 que descreve os dados experimentais:

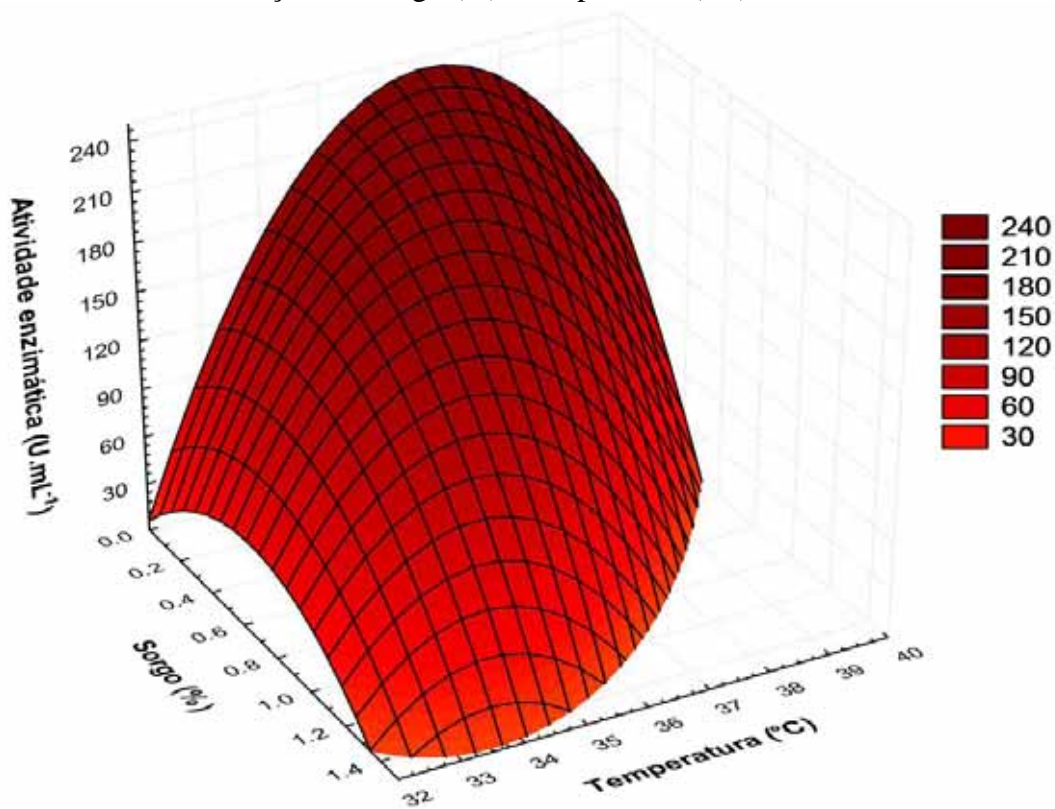
$$AE = 158,87 - 39,50X_1 + 23,21X_2 + 3,16X_3 + 23X_1X_2 - 11,27X_1X_3 + 21,65X_2X_3 - 7,38X_1^2 - 10,92X_2^2 - 10,44X_3^2 \quad (3.3)$$

O coeficiente de correlação (R^2) de 0,77 indica um ajuste adequado dos dados experimentais na resposta da atividade enzimática, mostrando que 77 % da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica proposta. Da equação 3.3 os parâmetros com nível de significância do teste t acima de $\alpha = 0,01$, os termos X_3 , X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3 , X_1^2 , X_2^2 , e X_3^2 foram excluídos por serem considerados parâmetros não significativos resultando na seguinte equação:

$$AE = 138,2 - 39,5X_1 + 23,21X_2 \quad (3.4)$$

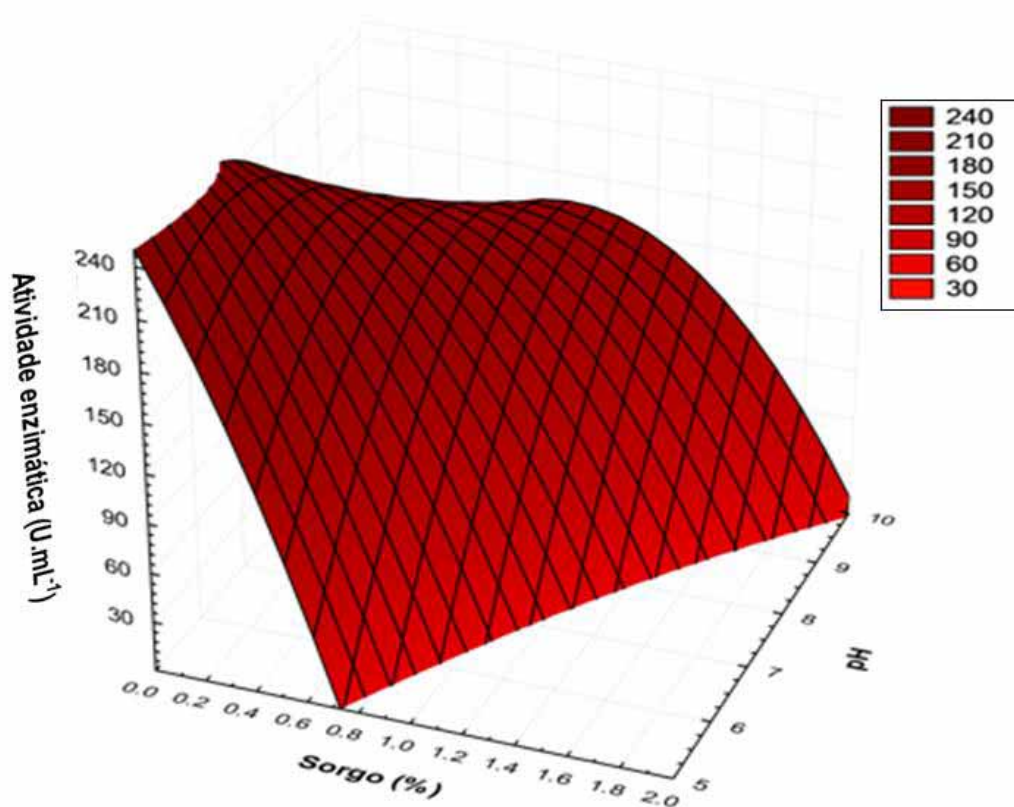
Analisando a equação 3.4 é possível concluir o peso matemático da variável X_1 , pois ela aparece diminuindo a AE, já a variável X_2 aumenta a AE. Para analisar os efeitos das variáveis na atividade enzimática é apresentado abaixo o gráfico de superfície de resposta, sendo que com este será possível prever a influência das variáveis X_1 e X_2 na AE.

Figura 3.13 – Superfície de resposta para atividade enzimática em função das concentrações de sorgo (%) e temperatura ($^{\circ}$ C)



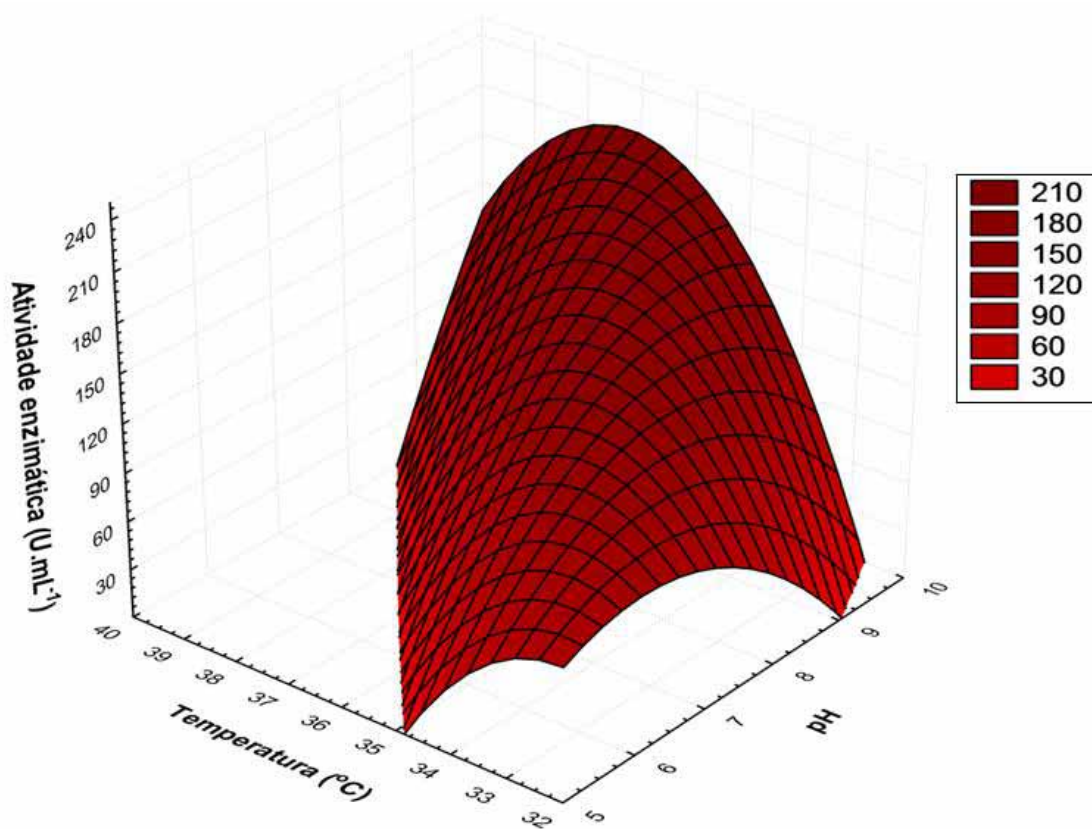
Analisando a figura 3.13, onde há uma relação entre a concentração de sorgo e temperatura com a atividade enzimática, pode-se notar que quanto menor for a concentração de sorgo maior será a AE alcançada. Pode-se notar também que existe uma região ótima com relação à temperatura que é entre 35 e 37 $^{\circ}$ C, quando aumentada, esta temperatura em qualquer concentração de sorgo a tendência da AE é somente diminuir. Nos valores menores de 36 $^{\circ}$ C, no qual consideramos ser esta uma região ótima de temperatura, nota-se pelo gráfico de superfície de resposta que a produção enzimática ocorre com menor intensidade, diferentemente quando comparada a temperaturas maiores do que aquela apresentada pela região ótima, nas quais a atividade enzimática aumenta, mas não significativamente.

Figura 3.14 - Superfície de resposta para atividade enzimática em função das concentrações de sorgo (%) e pH



Analisando a figura 3.14, na qual existe uma relação da concentração de sorgo e pH com a atividade enzimática, pode-se notar que existe uma região mínima da concentração de sorgo entre 0,6 e 1,0 %, na qual a AE tende a zero; quando analisa-se valores menores e maiores que essa região nota-se que AE tende a aumentar significativamente. Já em relação ao pH, conforme aumenta a sua concentração diminui-se a atividade, dessa forma pode-se supor que existe uma tendência, como mostra o gráfico de superfície de resposta, onde em valores menores de pH, aumenta a atividade enzimática.

Figura 3.15 - Superfície de resposta para atividade enzimática em função da temperatura (°C) e pH



Analisando a figura 3.15, que relaciona a temperatura e pH com a atividade enzimática, podemos notar que existe uma região ótima de temperatura que se encontra entre 35 e 37 °C onde a AE tende a aumentar, como pode-se notar pela concavidade do gráfico. Já em relação ao pH, conforme aumenta seu valor, a AE também aumenta, isso pode ser melhor evidenciado quando o pH está entre 9 e 10 é apresentado uma alta atividade enzimática.

No primeiro planejamento foi observado que com a diminuição da concentração de sorgo diminuiria também a AE representada pelo gráfico de superfície de resposta (Figura 3.9), mas isso é contrariado quando analisado os resultados do segundo planejamento, onde foi observado que com a diminuição da concentração de sorgo, de 0,75 % para 0,5 % aumenta-se a AE, podemos explicar esse fato devido a influência do pH e da temperatura na concentração de sorgo. Sendo esta discordância de resultados um dos principais objetivos para a aplicação de novos planejamentos experimentais, com a finalidade de uma melhor otimização na produção da enzima CGTase

3.3.3 Terceiro planejamento experimental composto central

Para o terceiro planejamento experimental foi usado como ponto central, o melhor experimento obtido no primeiro planejamento, experimento 1 ($X_1= 0,33$, $X_2= 8$ e $X_3= 35$), sendo que as variáveis X_2 e X_3 já se encontram no ponto central. Os efeitos da concentração de sorgo, pH inicial e temperatura foram inicialmente classificados usando fatorial 2^k , com seis pontos axiais e seis repetições no planejamento experimental e os resultados (valores observados e preditos) juntamente com as atividades enzimáticas de cada experimento, foram relatados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Planejamento experimental e resultados experimentais (com atividade enzimática) do planejamento composto central

Experimentos	Sorgo (%)	pH (%)	Temperatura (°C)	Atividade Enzimática (U. mL⁻¹)
1	0,23	7	34	86,39
2	0,23	7	36	174,03
3	0,23	9	34	167,81
4	0,23	9	36	111,16
5	0,43	7	34	64,45
6	0,43	7	36	163,76
7	0,43	9	34	125,84
8	0,43	9	36	183,48
9	0,162	8	35	216,52
10	0,498	8	35	177,04
11	0,33	6,32	35	208,98
12	0,33	9,68	35	177,74
13	0,33	8	33,32	60,99
14	0,33	8	36,68	150,85
15	0,33	8	35	169,436
16	0,33	8	35	214,86
17	0,33	8	35	215,1
18	0,33	8	35	212,79
19	0,33	8	35	212,89
20	0,33	8	35	199,29

Os resultados das AE destes experimentos nos tempos de 24, 48 e 72 horas são mostrados nas figuras a seguir:

Figura 3.16 - Atividade enzimática dos experimentos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 no tempo de fermentação: 24 h, 48 h, 72 h e agitação: 150 rpm

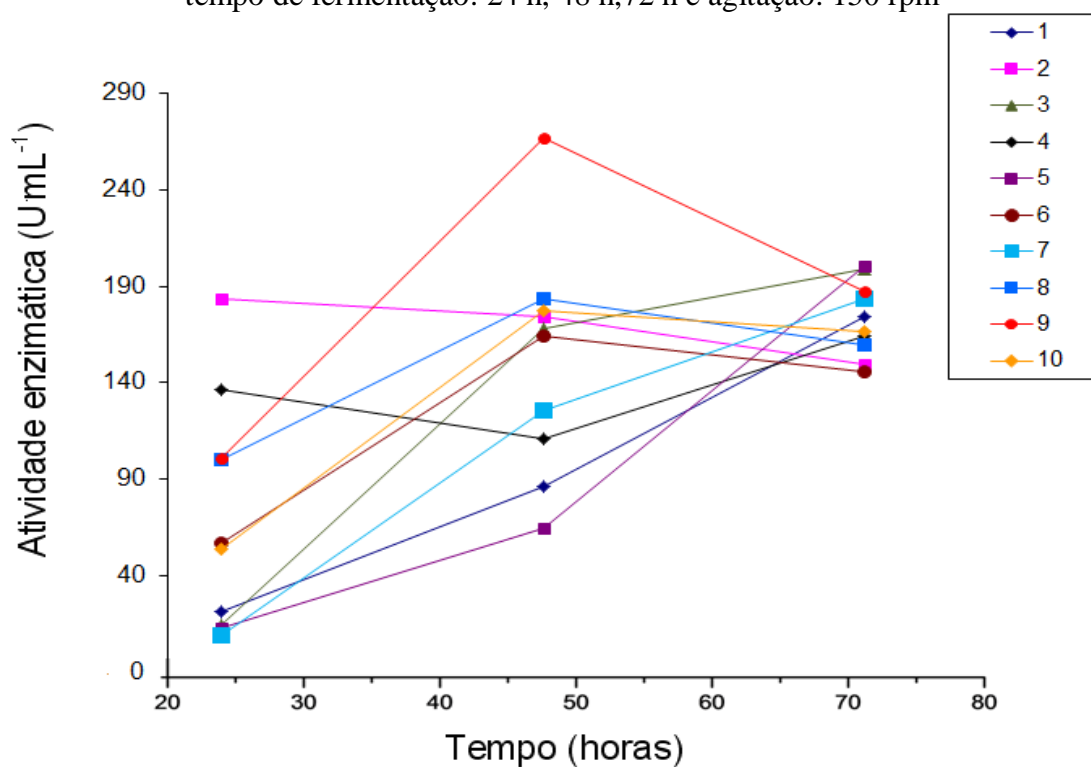
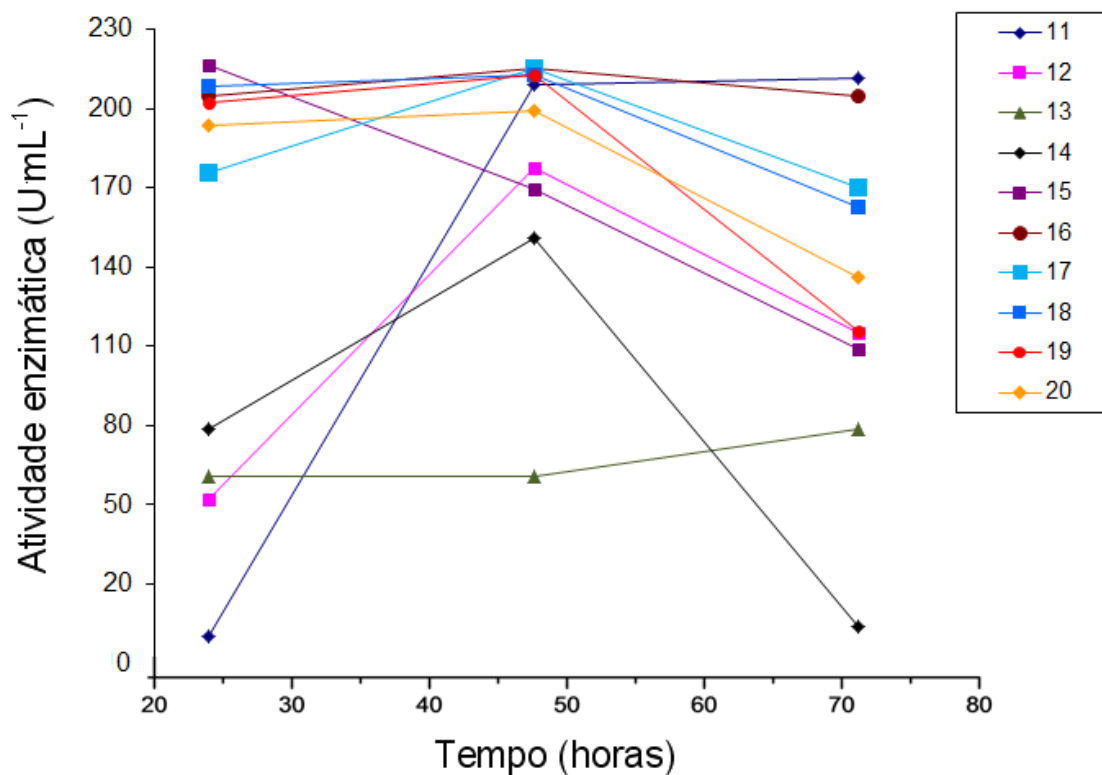


Figura 3.17 - Atividade enzimática dos experimentos: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20 no tempo de fermentação: 24 h, 48 h, 72 h e agitação: 150 rpm, temperatura = 35° C

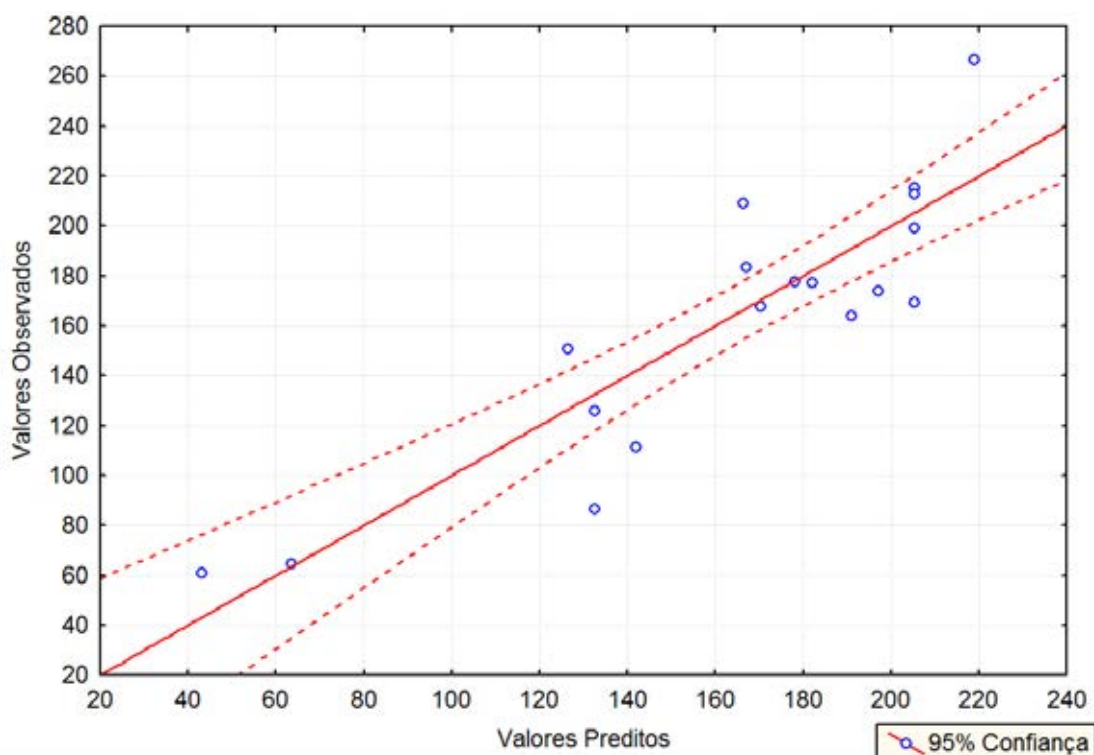


Observou-se na tabela 3.4 que a variação de X_1 , X_2 e X_3 resultou em uma diferença de 60,99 a 266,52 U. mL⁻¹ de AE. Comparando os resultados verifica-se que o aumento na concentração de X_1 de 0,162 para 0,498% (experimentos 9 e 10, respectivamente), para valores fixos de X_2 e X_3 resulta na diminuição da AE em 33,57%. Com o aumento na concentração de X_2 de 6,32 para 9,68 % (experimentos 11 e 12, respectivamente), para valores fixos de X_1 e X_3 ocorre uma diminuição da AE de 43,65%. E com o aumento da concentração de X_3 de 33,32 para 36,68 % (experimentos 13 e 14, respectivamente), com valores fixos de X_1 e X_2 ocorre um aumento 40,43% na AE. Evidenciando que as variáveis X_2 e X_3 tende a maiores AEs quando próximo do ponto central.

O ensaio 9 apresenta a maior AE (216,52 U. mL⁻¹), sendo que somente a variável X_1 não se encontra no ponto central. Isso mostra a importância de se fazer um novo planejamento experimental visando a otimização do meio de cultivo para a concentração ideal da fonte de carbono representada pela variável X_1 .

A Figura 4.8 mostra a AE encontrada em relação com a AE esperada para os experimentos.

Figura 3.18 - Valores preditos e experimentais para AE do planejamento experimental



Com a execução da regressão múltipla no programa *Statistica 7*, foi possível obter a seguinte equação 3.5 que descreve os dados experimentais:

$$AE=205,2671-11,1554X_1+3,449X_2+24,8276X_3+7,8196X_1X_2+15,743X_1X_3-23,2426X_2X_3-1,591X_1^2-11,6404X_2^2-42,5531X_3^2 \quad (3.5)$$

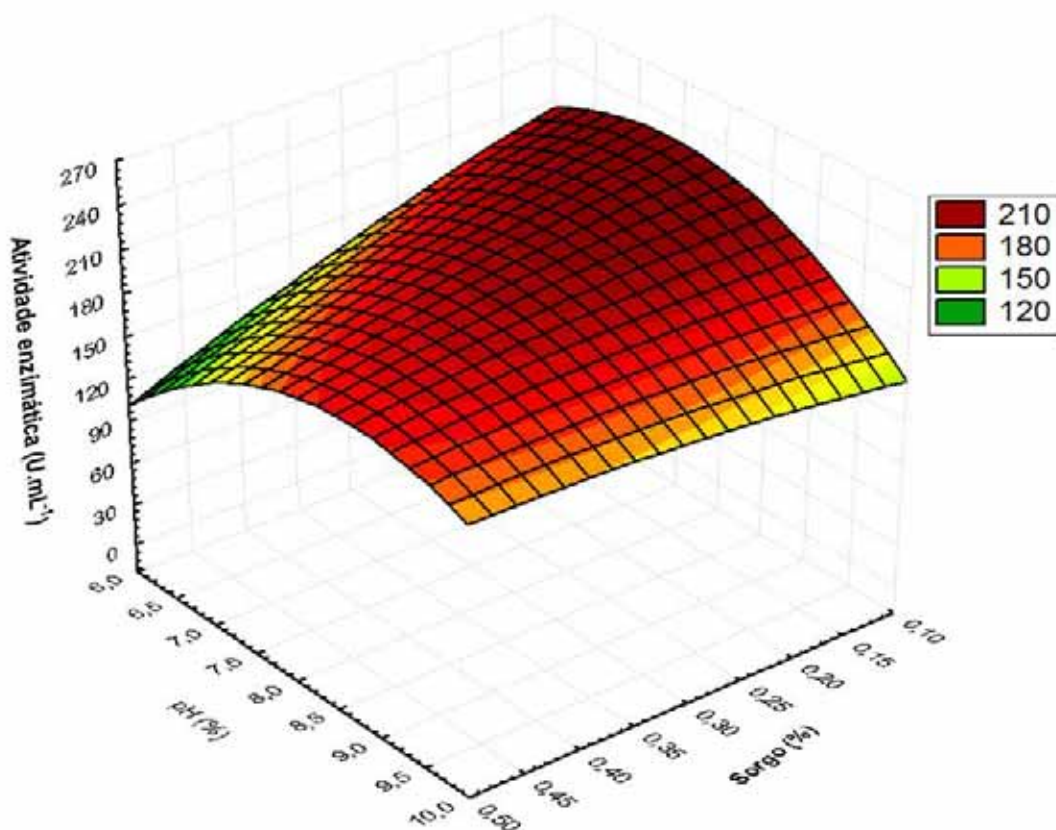
O coeficiente de correlação (R^2) de 0,7966 indica um ajuste adequado dos dados experimentais na resposta da atividade enzimática, mostrando que 79,66 % da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica proposta.

De acordo com os parâmetros com nível de significância de teste t acima de $\alpha = 0,1$, como mostra a equação 3.5, excluiu-se os termos X_1 , X_2 , X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3 , X_1^2 e X_2^2 isolados. Após a eliminação dos parâmetros não significativos montou-se a seguinte equação:

$$AE= 195,416+24,8276x_3-41,3579x_3^2 \quad (3.6)$$

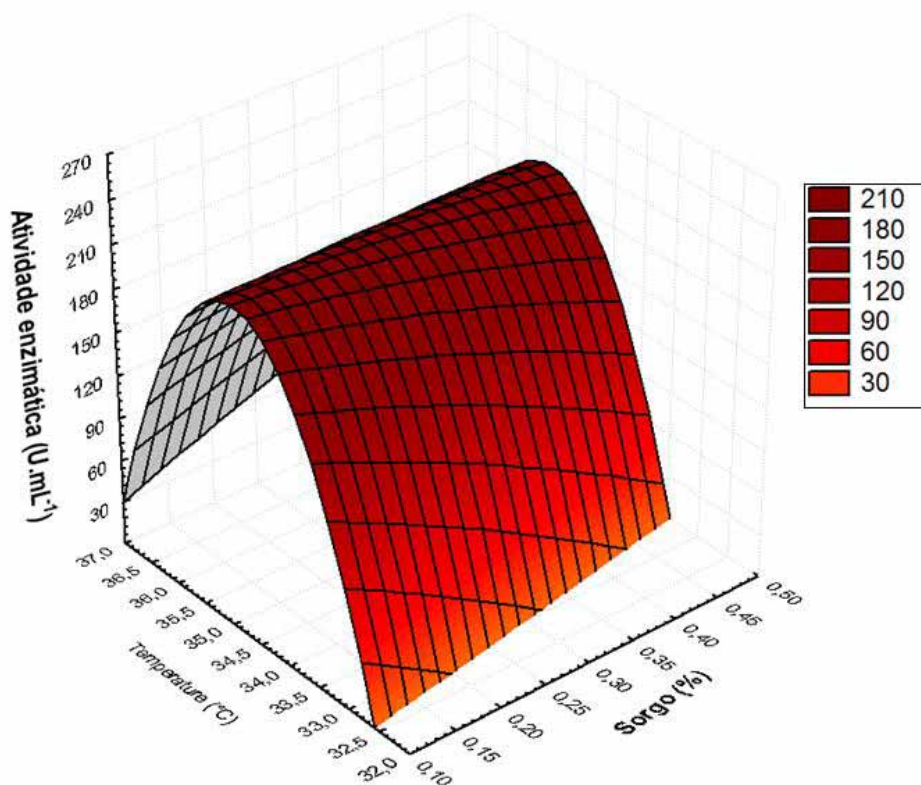
Analisando a equação 3.5 pode se concluir sobre o peso matemático das variáveis X_1 , X_2X_3 , X_1^2 , X_2^2 e X_3^2 é que elas aparecem reduzindo a AE, já X_2 , X_3 e X_1X_2 aparece aumentando a AE. Para analisar os efeitos das variáveis na atividade enzimática é apresentado abaixo os gráficos de superfície de resposta, sendo que com estes será possível prever a influência das variáveis X_1 e $X_2 X_3$ e também as suas formas quadráticas, na AE.

Figura 3.19 – Superfície de resposta para a AE em relação a concentração de sorgo (%) e pH (%)



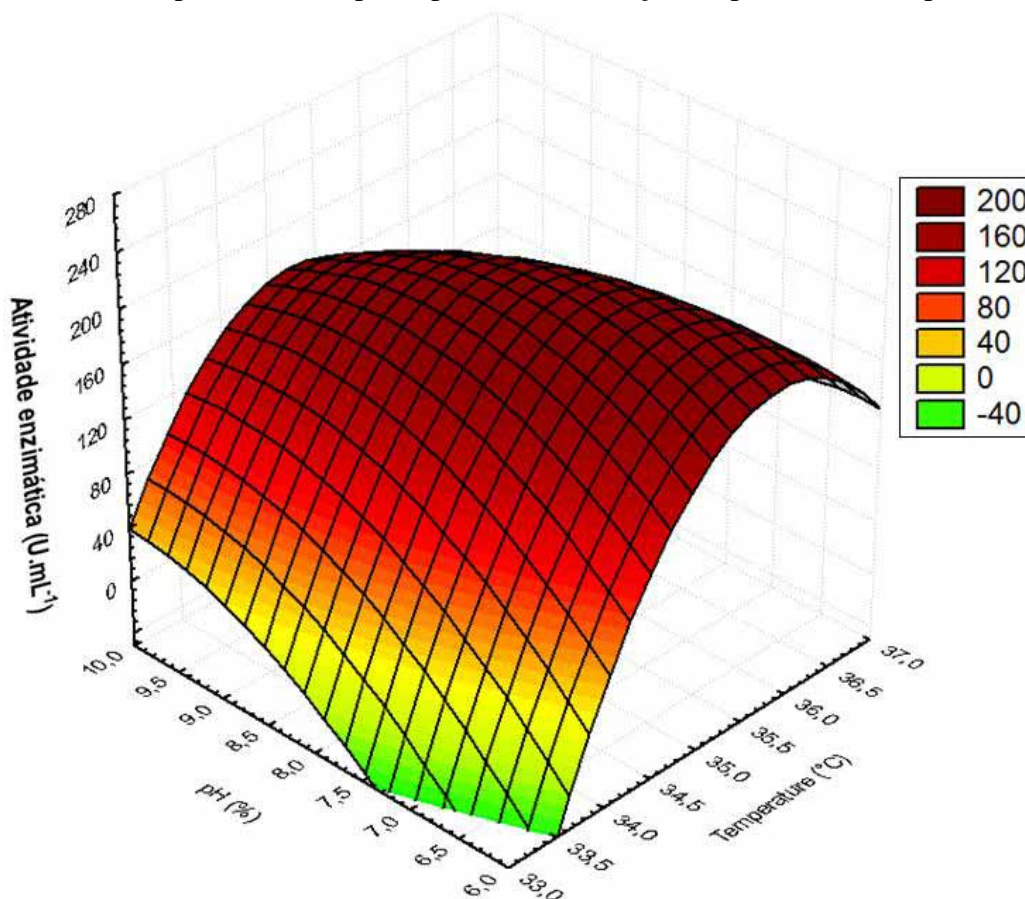
Analisando a figura 3.19, onde há uma relação entre a concentração de sorgo e o pH com a AE, pode-se notar que há uma tendência para maiores AE quando a concentração sorgo vai de 0,3 a 0,1 (%), representada pela faixa mais escura na figura. Esta faixa ótima está relacionada quando o pH está em torno de 7 e 8 (%), que corresponde ao ponto central. Quando diminuído os valores do pH e aumentando a concentração do sorgo a AE diminui. Dessa forma pode-se supor que existe uma tendência, como mostra o gráfico de superfície de resposta, na diminuição da AE quando o pH for menor que 6,5 e maior 9. O mesmo ocorre quando a concentração de sorgo for maior que 0,2 %.

Figura 3.20 – Superfície de resposta pra a AE em relação a concentração do sorgo (%) com temperatura (°C)



A figura 3.20 mostra variações da temperatura com a concentração do sorgo (%) em relação a AE. Pode-se notar que existe uma tendência para a otimização do meio quando a temperatura for de 35° C, que é o ponto central do planejamento experimental, obtendo as maiores AE. Esta temperatura se mantém como melhor opção para quaisquer valores da concentração de sorgo, pois nota-se que para valores maiores ou menores que 35°C, independente da concentração de sorgo, a AE tende a diminuir.

Figura 3.21 – Superfície de resposta para AE em relação ao pH (%) e a temperatura (°C)



A figura 3.21 corresponde a relação da AE com variáveis valores de pH (%) e temperatura (° C) após a observação deste gráfico pode-se concluir que existe uma tendência para a otimização com relação ao pH e temperatura de 8 (%) e 35 (°C) respectivamente, que coincidem com o ponto central, onde nota-se as maiores AE. Quando relacionado apenas estas duas variáveis pode-se perceber que para valores menores de 7,5 (%) para o pH e valores menores que 34,5 °C, a AE tende a zero, evidenciando os pontos centrais do planejamentos como as melhores variáveis encontradas.

3.3.4 Quarto planejamento experimental composto central

Para o quarto planejamento experimental foi usado como ponto central, o melhor experimento obtido no terceiro planejamento, o experimento 9 ($X_1= 0,162$; $X_2= 8$ e $X_3= 35$)

Os efeitos da concentração de sorgo, pH inicial e temperatura foram inicialmente classificados usando fatorial 2^k , com quatro pontos axiais e cinco repetições no planejamento experimental e os resultados (valores observados e preditos) juntamente com as atividades enzimáticas de cada experimento, foram relatados na tabela 3.5

Tabela 3.5 - Planejamento experimental e resultados experimentais (com AE) do planejamento composto central

Experimentos	Sorgo (%)	pH (%)	Temperatura (°C)	Atividade Enzimática (U.mL ⁻¹)
1	0,152	7	34	135,63
2	0,152	7	36	70,58
3	0,152	9	34	115,21
4	0,152	9	36	76,46
5	0,172	7	34	157,77
6	0,172	7	36	90,99
7	0,172	9	34	118,33
8	0,172	9	36	94,11
9	0,145	8	35	130,44
10	0,180	8	35	140,13
11	0,162	6,32	35	85,11
12	0,162	9,68	35	45,32
13	0,162	8	33,32	194,45
14	0,162	8	36,68	114,87
15	0,162	8	35	266,94
16	0,162	8	35	201,71
17	0,162	8	35	205,87
18	0,162	8	35	208,98
19	0,162	8	35	211,4

Os resultados das AE destes experimentos nos tempos de 24, 48 e 72 horas são mostrados nas figuras a seguir:

Figura 3.22 - Atividade enzimática dos experimentos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 no tempo de fermentação: 24 h, 48 h, 72 h e agitação: 150 rpm

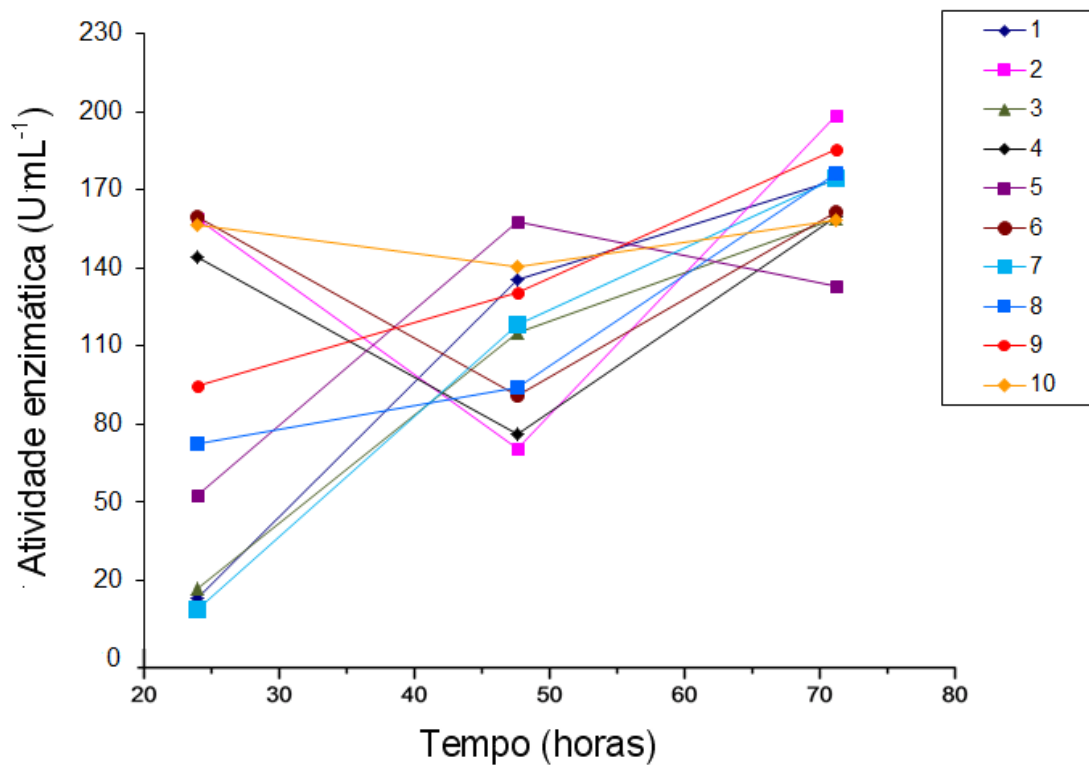
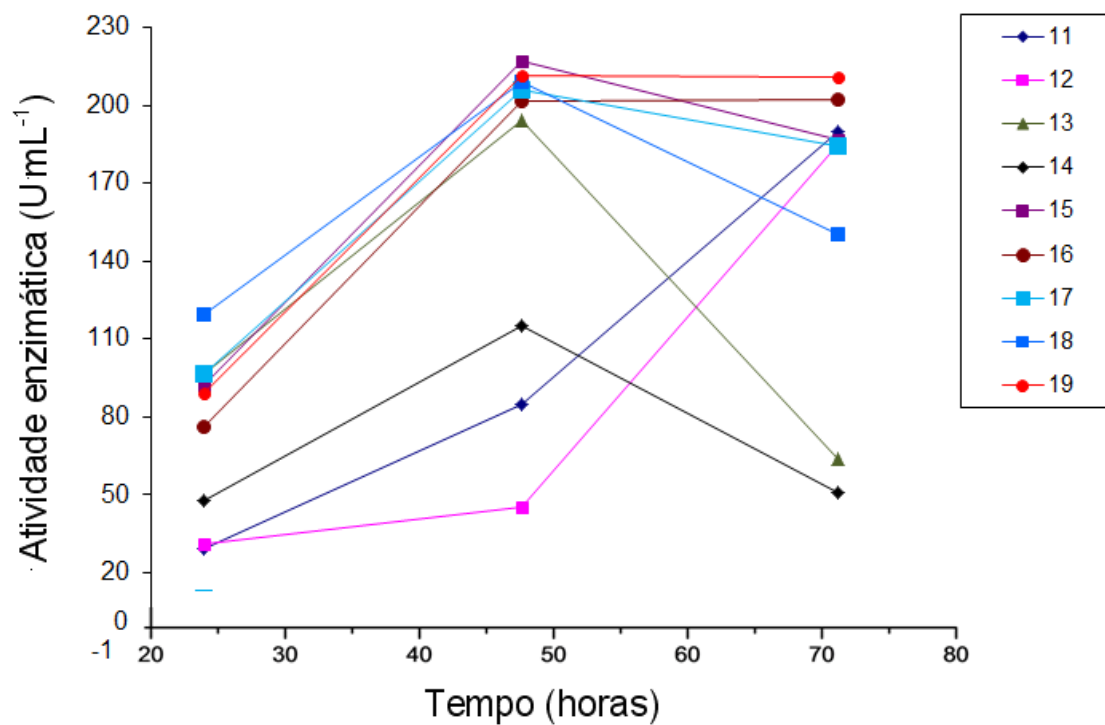


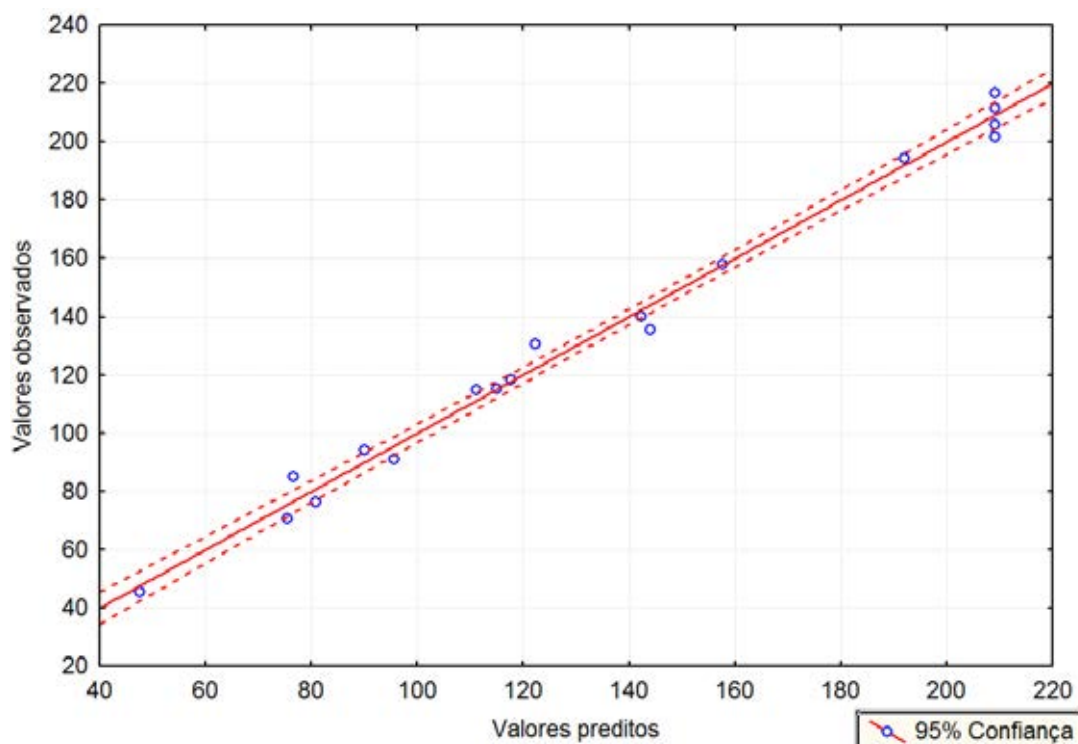
Figura 3.23 - Atividade enzimática dos experimentos: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19 no tempo de fermentação: 24 h, 48 h, 72 h e agitação



Observando-se as figuras 3.22 e 3.23 pode-se notar que os valores de carbono 0,162 (%), pH 8 (%) e temperatura 35 (°C) são os melhores valores das variáveis, encontradas no ponto central, com as maiores AE variando entre 201,71 e 216,94 (U. mL⁻¹). Comparando os resultados com as diferentes variedades estudadas verifica-se que o aumento na concentração de X₁ de 0,18 para 0,145 (%) (experimentos 9 e 10, respectivamente) para valores fixos de X₂ e X₃ resulta em um aumento de aproximadamente 7%. Com o aumento na concentração de X₂ de 6,32 para 9,68 % (experimentos 11 e 12, respectivamente), para valores fixos de X₁ e X₃ ocorre uma diminuição de 46,74 %. E com o aumento da concentração de X₃ de 33,32 para 36,68 % (experimentos 13 e 14, respectivamente), com valores fixos de X₁ e X₂ ocorre uma diminuição de aproximadamente 59%.

Os resultados apresentados na Tabela 3.5 mostram que a síntese de CGTase foi máxima no ensaio 15 em que as concentrações das variáveis estudadas estão no ponto central. Isto indica que o ponto de máximo na otimização dessa variável foi próximo às condições centrais do planejamento, comprovando assim a sua otimização. A figura 3.24 mostra a distribuição dos valores preditos em função dos experimentais. Os valores experimentais ficaram próximos dos preditos (R= 0,99), a confiabilidade dos dados.

Figura 3.24 – Valores preditos em função dos experimentais de atividade enzimática referentes à equação geral 6.3 do segundo planejamento experimental.



Com a execução da regressão múltipla no programa *Statistica 7*, foi possível obter a seguinte equação 3.7 que descreve os dados experimentais:

$$AE=209,1972+5,833X_1-8,6267X_2-24,0745X_3+2,7248X_1X_2+1,6X_1X_3+8,6067X_2X_3-27,22X_1^2-52,0016X_2^2-20,3794X_3^2 \quad (3.7)$$

O coeficiente de correlação (R^2) de 0,9917 indica um bom ajuste adequado dos dados experimentais na resposta da atividade enzimática, mostrando que 99,17 % da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica proposta.

De acordo com os parâmetros com nível de significância de teste t acima de $\alpha = 0,1$, como mostra a equação 3.7, excluiu-se os termos X_1X_2 , X_1X_3 isolados. Após a eliminação dos parâmetros não significativos montou-se a seguinte equação:

$$AE=209,1972+5,833X_1-8,6267X_2-24,0745X_3+8,6067X_2X_3-27,2299X_1^2-52,0016X_2^2-20,37X_3^2 \quad (3.8)$$

Os resultados mostram o efeito significativo de variáveis X_1 (sorgo), X_2 (pH inicial) e X_3 (temperatura). O isolado de variáveis X_2 e X_3 e variáveis quadráticas X_1^2 , X_2^2 e X_3^2 têm coeficientes negativos, o que significa uma diminuição nos resultados de valores em uma redução no rendimento da enzima. A variável X_1 isolado e a interação X_2X_3 têm coeficientes positivos, o que significa que um aumento nos seus valores resulta em um aumento na produção da enzima.

Com o intuito de obter uma melhor visualização do efeito das variáveis independentes sobre a AE foram construídas superfícies de resposta, mostradas nos gráficos a seguir.

Figura 3.25 - Superfície de resposta para a AE em relação ao sorgo (%) e o pH(%)

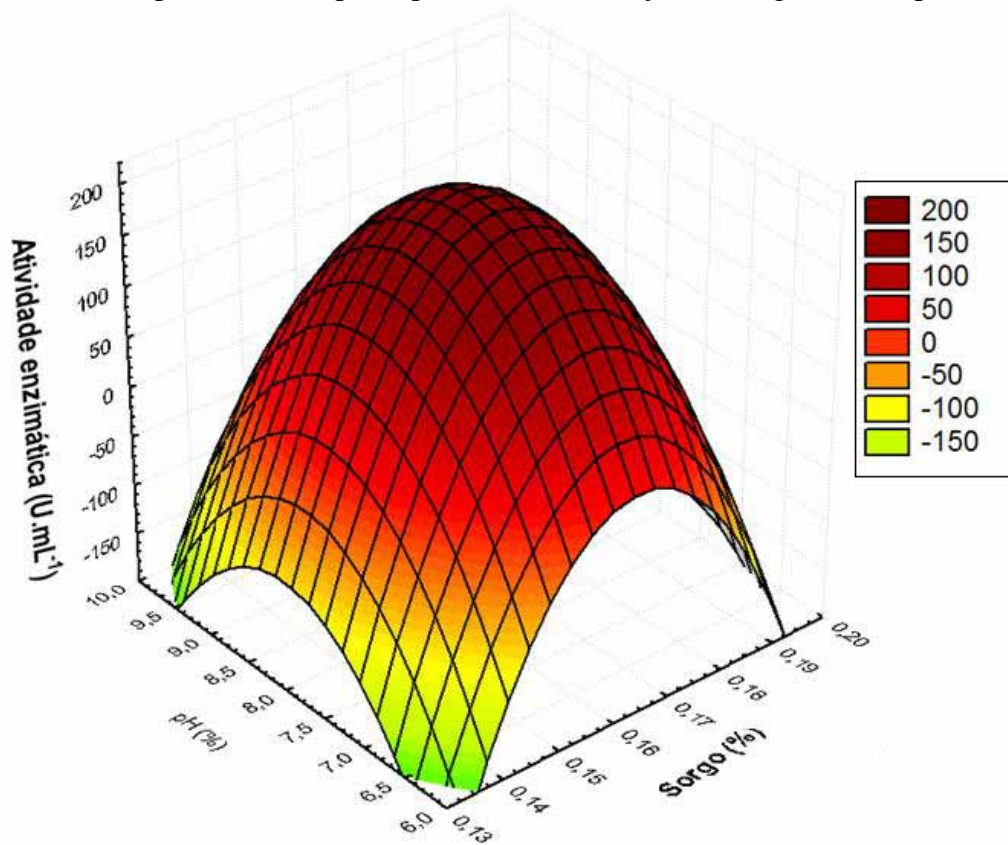


Figura 3.26 - Superfície de resposta para a AE em relação a temperatura (° C) e concentração de sorgo (%)

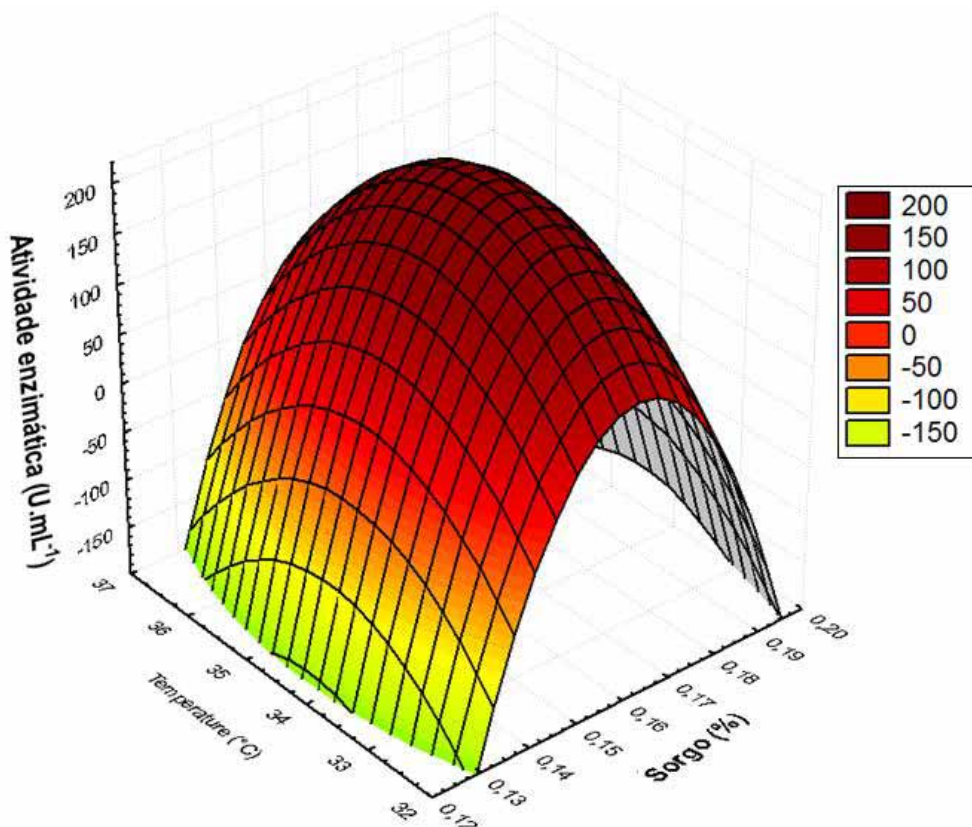
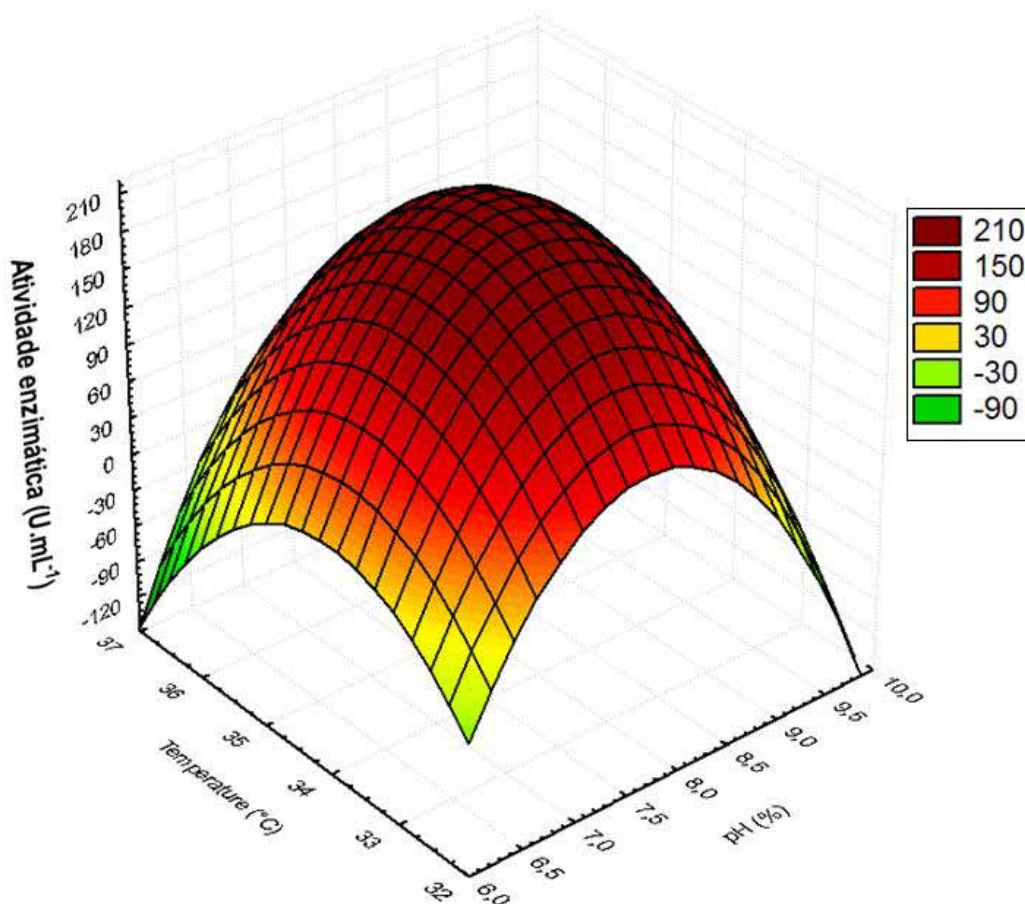


Figura 3.27 – Superfície de resposta para a AE em relação a temperatura (°C) e pH(%)



As superfícies de resposta propõem variáveis ideais. A superfície de resposta para a produção de CGTase representa diferentes combinações de duas variáveis, mantendo a outra variável no nível zero. As três variáveis X_1 , X_2 e X_3 , teve um efeito significativo sobre a produção de CGTase a um nível de confiança de 95 %.

Constata-se nas figuras 3.25, 3.26 e 3.27 que a região de maior de produção de CGTase está localizada próxima ao ponto central do planejamento, sendo que os pontos ótimos encontrados para a produção de CGTase encontra-se entre 0,16 a 0,18 g/L para concentração de sorgo, 8 a 9 e para o pH e 34 a 35 °C para a temperatura.

Sorgo, pH e temperatura inicial são as variáveis relevantes que controlam a produção de CGTase e possuem forte interação, o que é esperado para a produção de CGTase. Uma vez que diferentes bactérias CGTase requerem diferentes concentrações de carbono para o crescimento, sorgo em maiores concentrações pode inibir a produção de CGTase pelo *Bacillus circulans* ATCC 21783, devido à repressão catabólica, ou uma falta de nutrientes celulares.

3.4 Cálculo do ponto ótimo

Calculou-se os valores de X_1 , X_2 X_3 correspondentes à maximização da resposta para a produção de CGTase, empregando o software *Maple Reader 15*.

Determinado o ponto ótimo em variáveis codificadas $X_1 = -0,1112$, $X_2 = 0,05942$ e $X_3 = -0,2142$, utilizou-se a equação de codificação. Obtendo-se os valores reais para as variáveis: $X_1 = 0,160$ % (sorgo), $X_2 = 8,05$ % (pH) e $X_3 = 34,78$ °C (temperatura).

4 CONCLUSÃO

Os dados obtidos permitem sugerir:

- A figura 3.2 mostrou a formação de halos, confirmando que o micro-organismo *Bacillus circulans* ATCC 21783 pode ser utilizado na produção da enzima CGTase.
- Os resultados indicaram a potencialidade do emprego do grão de sorgo como substrato para fermentação na produção de CGTase. Foi apresentada relação na tabela 3.1 onde quanto maior o tamanho do grão de sorgo, maior será a concentração de glicose e a concentração de amido. Desta forma, foi visto também através da figura 3.6 a influência do tamanho do grão de sorgo com as maiores AE encontradas.
- No primeiro planejamento experimental não se determinou o ponto ótimo mediante as superfícies de respostas, na qual haveria a relação duas a duas das variáveis da atividade enzimática máxima, mas foi determinado uma região otimizada observando a tendência do aumento na atividade enzimática com a diminuição das variáveis independentes de sorgo. Posteriormente foi realizado um segundo planejamento experimental com o estudo das variações das concentrações de sorgo, pH e temperatura, no qual se mostraram significativas na produção da enzima. Com este planejamento obteve-se os pontos ótimos das variáveis X_2 e X_3 . A variável X_1 , que correspondente a concentração de sorgo, não foi otimizada neste planejamento, desta forma, foram realizados dois outros planejamentos experimentais. No terceiro planejamento experimental a variável X_1 mostrou tendências a otimização com concentrações menores que 0,33% realizando-se assim um quarto planejamento experimental; onde obteve-se a concentração ótima de sorgo, pH inicial e temperatura que foram: 0,160 g/L , 8,06 e 34,78 °C, respectivamente de acordo com o item 3.4.
- O valor experimental da atividade enzimática do ponto ótimo apresentou um erro de 0,008% em relação ao valor teórico, mostrando grande confiabilidade do resultado. Este valor também está próximo aos obtidos no ponto central,

pois as variáveis do ponto do ótimo estão próximas ao ponto central. Assim, o projeto experimental mostrou-se eficaz para a otimização da concentração de substrato e das condições experimentais para a produção de CGTase máxima (MAHAT et al 2004 ; ZAIN et al 2007) .

- A maior atividade da enzima para a produção de CGTase foi $266,94 \text{ U.mL}^{-1}$ sob condições otimizadas obtidas após 48 horas de cultura com 0,162 % de sorgo, Triptona 0,5% , extrato de levedura 0,5% , carbonato de sódio a 1 % , 0,1% e 0,02% de K_2HPO_4 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ a um pH inicial de 8 e a temperatura de 35°C . Assim, a utilização de sorgo para fermentação *Bacillus circulans* ATCC 21783 é viável e produz uma quantidade considerável de CGTase.

REFERENCIAS

- BLANCO K.C., LIMA C.J.B, OLIVEIRA P.A.P.L.V, PIÃO A.C.S., CONTIERO J. Cyclodextrin glicosiltransferase production by *Bacillus sp. subgroup alcalophilus* using a central composite design. **Res. J. Microbiol.**, 4 (11): 450-459, 2009.
- BLANCO K.C.; BERNARDI, N.S.; LIMA C.J.B.; MONTI R.; MARTINS J.R.; CONTIERO J. *Bacillus lehensis*—an alkali-tolerant bacterium isolated from cassava starch wastewater: optimization of parameters for cyclodextrin glycosyltransferase production. **Ann Microbiol.**, v.62, p. 329–337, 2012.
- CUCOLO, G. R.; ALVES-PRADO, H. F.; GOMES, E; SILVA, R. Otimização da produção de CGTase de *Bacillus* spp subgrupo alcalophilus E16 em polvilho doce em fermentação submersa. **Braz. J. Food Technol.**, v.9, p. 201-208, 2006.
- CUNHA-FILHO, M.S.S.; SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de ciências farmacêuticas básicas e aplicada**, v. 28, n.1, p.1-9, 2007.
- DAVIS, M.E.; BREWSTER, M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nat.Rev. Drug.Discov.**; 3(12):1023-35, 2004.
- DE FREITAS, T.L., MONTI R., CONTIERO J. Production of CGTase by a *Bacillus alkalophilic* strain isolated from wastewater of a manioc flour industry. **Braz. J. Microbiol.**35:255-260, 2004.
- HAIYEE, Z. A.; SAIM, O.; SAID, M. ILLIAS, R. M.; MUSTAPHA, W. A. W.; HASSAN, O. Characterization of cyclodextrin complexes with turmeric oleoresin. **Food Chem.**, v. 114, p. 459 – 465, 2009.
- HORIKOSHI, S.; MCCUNE, B.K.; RAY, P.E.; KOPP, J.B.; SPORN, M.B.; KLOTMAN, P.E. Water-deprivation stimulates transforming growth-factor-beta-2 accumulation in the juxtaglomerular apparatus of mouse kidney. **J Clin Investigation**, 88: 2117-2122, 1991.
- GORNÁS, P.; NEUNERT, G.; BACZYNSKI, K.; POLEWSKI, K. Beta-cyclodextrin complexes with chlorogenic and caffeic acids from coffee brew: Spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling study. **Food Chem.**, v. 114, p. 190-196, 2009.
- KULPREECHA,S.; BOONRUANGTHAVORN, A.; MEKSIRIPORN, B.; THONGCHUL, N. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. **J. Biosci. Bioeng.**,v.107:240-245, 2009.
- LOFTSSON. T.; BREWSTER,M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilization. **JPharm Sci**; 85(10):1017-25, 1996.

- LOFTSSON, T.; DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **Int. J. Pharm.**, v. 329, p.1–11, 2007.
- MAKELA, M.; KORPELA, T.K. Determination of the catalytic activity of cyclomaltodextringlucanotransferase by maltotriose-methylorange assay. **J. Biochem. Bioph.**, v.15, p. 307-318, 1988.
- MATIOLI, M.; ZANIN, G.; MORAES, F. F. **Ciclodextrinas e suas aplicações em:** alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais. 5° ed. New York,. 124 p, 2000.
- MATTERN, H. M.; RAIKAR, L. S.; HARDIN. C. D. The effect of caveolin-1 (Cav-1) on fatty acid uptake and CD36 localization and lipotoxicity in vascular smooth muscle (VSM) cells. **Int. J. PhysioPathophysioPharmacol.**, v. 1, p. 1-14, 2009.
- MAHAT, M. K.; ILLIAS, R. M.; RAHMAN, R. A.; RASHID, N. A. A.; MAHMOOD, N. A. N.; HASSAN, O.; AZIZ, S. A. and KAMARUDDIN, K. Production of cyclodextringlucanotransferase (CGTase) from alkalophilic *Bacillus* sp. TS1-1: media optimization using experimental design. **Enzyme Microb. Tech.**, 35: 467-473, 2004.
- NAKAMURA, N.; HORIKOSHI, K. Characterization and some cultural conditions of a cyclodextringlycosyltransferase-producing alkalophilic *Bacillus* sp. **Agr. Biol. Chem.**, v.40, p. 753-757, 1976.
- OONNITTAN, A.; SHRESTHA, R. A.; SILLANPAA. M. Removal of hexachlorobenzene from soil by electrokinetically enhanced chemical oxidation. **J. Haz. Mat.**, v.162, p. 989–993, 2009.
- SALIPIRA, K. L.; MAMBA, B. B.; KRAUSE, R. W.; MALEFETSE, T. J.; DURBACH, S.
H. Carbon nanotubes and cyclodextrin polymers for removing organic pollutants from water. **Earth Envir. Sci.**, v. 5, p.13-17, 2006.
- SASIKALA, K.; ARUNACHALAM, S. Studies on outer-sphere electron transfer between iron(II) and some surfactant–cobalt (III) complexes in micelles as well as in β -cyclodextrin **Colloid Surface A**, v. 335, p. 98–102, 2009.
- SHEN, F., HU, J., ZHONG, Y., LIU, M. L. Y., SADDLER, J. N. and LIU, R. Ethanol production from steam-pretreated sweet sorghum bagasse with high substrate consistency enzymatic hydrolysis. **Biomass Bioenerg.**, 41: 157-164, 2012.
- SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients, **Trends Food Sci. Technol.** v.15, p.137-142, 2004.
- SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chem.**, v. 98, p. 1743-1753, 1998
- SZEJTLI J. Cyclodextrincomplexed generic drugs are generally not bio-equivalent with the reference products: therefore the increase in number of marketed drug/cyclodextrin formulations is so slow. **J. Incl. Phenom. Macroc. Chem.**; 52(1-2):1-11, 2005.

RAJEWSKI, R.A.; STELLA, V.J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins.. In vivo drug delivery. **J. Pharm. Sci.**, 85(11):1142-69, 1996.

RODAL, S. K.; SKRETTING, G.; GARRED, O.; VILARDT, F.; DEURS B.; SANDVIG, K. Extraction of cholesterol with methyl- β -cyclodextrin perturbs formation of clathrincoatedendocytic vesicles. **Mol. Biol. Cell**, v. 10, p. 961-974, 1999.

PEDERSEN, W. L.; CHAKRABARTY, K.; KLUCAS R. V. and VIDAVER, A. K. Nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with roots of winter wheat and sorghum in Nebraska. **Appl. Environ. Microb.**, 35: 129-35, 1978.

UEKAMA, K. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. **Chem. Pharm. Bull.**; 52(8):900-15, 2004.

YADAV, A. K.; BIPINRAJ, N. K.; CHAUDHARI, A. B. and KOTHARI, R. M. Production of L (+) lactic acid from sweet sorghum, date palm, and golden syrup as alternative carbon sources. **Storch/Stärke**, 63: 632-636, 2011.

WOLFGANG, E.A. Enzymes in Industry: Production and Applications, Weinheim: **Wiley-VCH.**, 2007.

ZAIN, W.S.W.M.; ILLIAS, R. M.; SALLEH, M. M.; HASSAN, O.; RAHMAN, R. A. and. HAMID, A. A. Production of cyclodextrinlucanotransferase 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, 2007.