
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

**Produção de ciclodextrina glicosiltransferase
por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus*:
Otimização por planejamento experimental.**

KATE CRISTINA BLANCO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Microbiologia Aplicada.

Rio Claro
Junho - 2009

**Produção de ciclodextrina glicosiltransferase por
Bacillus sp subgrupo *alcalophilus*: Otimização por
planejamento experimental.**

KATE CRISTINA BLANCO

Orientador: Dr. Antonio Carlos Simões Pião

Coorientador: Dr. Jonas Contiero

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Microbiologia Aplicada.

Rio Claro

Junho - 2009

Por tanto amor
Por tanta emoção
A vida me fez assim
Doce ou atroz
Manso ou feroz
Eu caçador de mim

Preso a canções
Entregue a paixões
Que nunca tiveram fim
Vou me encontrar
Longe do meu lugar
Eu, caçador de mim

Nada a temer senão o correr da luta
Nada a fazer senão esquecer o medo
Abrir o peito a força, numa procura
Fugir às armadilhas da mata escura

Longe se vai
Sonhando demais
Mas onde se chega assim
Vou descobrir
O que me faz sentir
Eu, caçador de mim

Milton Nascimento

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Aparecida por todos os incentivos, por acreditar em meus sonhos, e sem entender nada de microbiologia, passou a compreender a importância dela na minha vida.

Aos meu pai Antonio por ter me guiado no durante o transcorrer da minha vida com responsabilidade e amor.

Ao meu namorado Cleber, por ter sido companheiro e desde sempre ter acreditado em mim. Por todo o amor.

Ao professor Jonas Contiero por ter me ajudado a construir uma nova identidade profissional. Pelo respeito e cuidado com a minha formação e pelos valiosos ensinamentos que, a cada orientação, me tornaram uma pessoa diferente.

Ao professor Antonio Carlos Simões Pião por ter me incentivado, apoiado e me direcionado nessa importante trajetória da minha vida.

Aos meus amigos Roberta, Mary, Mariana, Joyce, Gervasio, Luciana, Tulio, Paulo, Siddharha, Fabricio, Rodrigo e Marcela por me acolherem no laboratório, e se tornarem a minha família Rioclarence.

Ao pós-doutoradando Cristian Bolner de Lima, que sempre esteve presente e por suas importantes contribuições para esta dissertação.

Aos professores Dejanira de Franceschi de Angelis e Francisco José dos Santos que me concederam tão gentilmente informações importantes para esta dissertação durante a participação no exame de qualificação.

Ao CNPq pelo financiamento que viabilizou o desenvolvimento dessa pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Microrganismos produtores da enzima ciclodextrina glicosiltransferase	13
2.2. Fatores que influenciam na produção de CGTase pelo cultivo do microrganismo	14
2.3. A enzima ciclodextrina-glicosiltransferase	18
2.4. Ciclodextrinas	20
2.5. Planejamento Experimental	24
3. JUSTIFICATIVA	27
4. OBJETIVOS	29
5. MATERIAL E MÉTODOS	30
5.1. Microrganismo	30
5.2. Meios de cultura	30
5.2.1. Meio seletivo do microrganismo	30
5.2.2. Meio de manutenção do microrganismo	31
5.2.3. Meio de cultura para o crescimento do microrganismo	31
5.2.4. Meio de cultura utilizado no processo fermentativo	32
5.3. Experimentos	33
5.3.1. Ativação do microrganismo <i>Bacillus</i> sp subgrupo <i>alcalophilus</i>	33
5.3.2. Preparação do inóculo e fermentação em incubadora rotativa e biorreator	34
5.3.3. Determinação da atividade enzimática pelo método colorimétrico do complexo fenolftaleína-ciclodextrina	35
5.3.4. Confeção da curva padrão de β -CD	36
5.4. Planejamento experimental	37
5.4.1. Primeiro planejamento experimental do planejamento composto central	39

5.4.2. Segundo planejamento experimental delineamento composto central ...	41
5.4.3. Planejamento experimental através do planejamento composto central em biorreator	43
5.5. Análise estatística dos dados	45
5.6. Cálculo da atividade enzimática	47
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
6.1. Calibração do método.....	49
6.2. Ativação da cultura microbiana <i>Bacillus</i> sp subgrupo <i>alcalophilus</i> (CGII) para a produção de CGTase	50
6.3. Planejamento experimental	52
6.3.1. Avaliação da produção da enzima ciclodextrina glicosiltransferase para o primeiro planejamento experimental das variáveis do meio de cultivo	52
6.3.2. Avaliação da produção da enzima ciclodextrina glicosiltransferase para o segundo planejamento experimental das variáveis do meio de cultivo.....	61
6.3.3. Avaliação da produção da enzima ciclodextrina glicosiltransferase em biorreator para as variáveis agitação e aeração.....	73
7. CONCLUSÕES:.....	81
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	82
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Resumo das principais vantagens e aplicações das ciclodextrinas.	11
Tabela 2.1 - Características de algumas fontes de amido quanto ao tamanho do grão, o grau de polimerização e a porcentagem de amilose e amilopectina.....	17
Tabela 2.2 - Propriedades das principais ciclodextrinas.....	21
Tabela 5.1 - Composição do meio de cultura utilizado para a ativação do microrganismo <i>Bacillus</i> sp subgrupo <i>alcalophilus</i>	31
Tabela 5.2 - Composição do meio de cultura original utilizado para o crescimento do microrganismo <i>Bacillus</i> sp subgrupo <i>alcalophilus</i>	32
Tabela 5.3 - Composição do meio de cultura utilizado na produção de CGTase para o crescimento do microrganismo <i>Bacillus</i> sp subgrupo <i>alcalophilus</i>	33
Tabela 5.4 - Protocolo experimental da construção da reta de absorbância de diferentes concentrações de β -ciclodextrina.	37
Tabela 5.5 - 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.	40
Tabela 5.6 - Matriz do primeiro planejamento experimental e valores reais utilizados nos experimentos.....	41
Tabela 5.7 - Valores das variáveis do meio de cultivo (ponto central, níveis -1 e +1 e pontos axiais) usados no planejamento composto central do segundo planejamento experimental.	42
Tabela 5.8 - Matriz do primeiro planejamento experimental e valores reais utilizados nos experimentos.....	43
Tabela 5.9 - Valores das variáveis reais (ponto central, níveis -1 e +1 e pontos axiais) usados no planejamento composto central do planejamento experimental realizado em biorreator.	44
Tabela 5.10 - Matriz do planejamento experimental e valores das variáveis reais utilizados nos experimentos realizados em biorreator.....	45
Tabela 6.1- Ativação do microrganismo <i>Bacillus</i> sp subgrupo <i>alcalophilus</i> estocado pela realização de subculturas em diferentes tempos de fermentação.	51

Tabela 6.2 - Ativação do microrganismo <i>Bacillus</i> sp subgrupo <i>alcalophilus</i> em meio Nakamura e Horikoshi modificado.....	52
Tabela 6.3 - Resultados da Atividade enzimática em diferentes tempos de fermentação e condições experimentais das concentrações do meio de cultivo do primeiro planejamento experimental.	53
Tabela 6.4 – Atividade enzimática em 96 h dos ensaios 1, 2 e 3 e seus respectivos desvios padrão realizados no primeiro planejamento experimental.....	54
Tabela 6.5 - Primeiro planejamento experimental e resultados (experimentais e preditos).....	55
Tabela 6.6 - Resultados da regressão múltipla para AE em 72 h fermentação do primeiro planejamento experimental.	56
Tabela 6.7 - Resultados da atividade enzimática em tempos de fermentação diferentes, nas condições de cada experimento.....	62
Tabela 6.8 - Segundo planejamento experimental e resultados (experimentais e preditos).....	64
Tabela 6.9 - Regressão múltipla do segundo planejamento experimental.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Formação de enzimas como produto de células microbianas	13
Figura 2.2 – A hidrólise enzimática de amido e seus derivados (Fonte: Eliasson, 2004).....	16
Figura 5.1 - Biorreator utilizado para fermentação que controla pH, temperatura, aeração.....	35
Figura 5.2 - Equilíbrio de formação do complexo ciclodextrina/feniltaleína.	36
Figura 5.3 - Planejamento experimental do tipo fatorial completo de Planejamento composto central (PCC).....	38
Figura 6.1 - Curva padrão da concentração de β -ciclodextrina em 550 nm de absorvância realizada para calibração do método.	49
Figura 6.2 - Exemplo de cálculo de AE para uma fermentação nas seguintes condições experimentais: $t_f = 72$ h, agitação = 150 rpm, temperatura = 35°C	50
Figura 6.3 - Efeito do tempo de fermentação 24; 48 e 72 h na atividade enzimática nos 16 ensaios realizados em duplicata.....	54
Figura 6.4 - Valores preditos em função dos valores experimentais de atividade enzimática referentes à equação geral 6.1 do primeiro planejamento experimental.	59
Figura 6.5 - Superfície de resposta para atividade enzimática em função das concentrações de polvilho e fontes de nitrogênio do primeiro planejamento à equação $50,93 - 7,98*((x-10)/2,5) + 6,61*((y-10)/2,5)$	60
Figura 6.6 - Superfície de resposta para atividade enzimática em função das concentrações de polvilho e Na_2CO_3 do primeiro planejamento referente à equação $50,93 - 7,98*((x-10)/2,5) + 15,62*((x-10)/2,5)*((y-15)/5)$	60
Figura 6.7 - Superfície de resposta para atividade enzimática em função das concentrações das fontes de nitrogênio e Na_2CO_3 referente à equação $50,93 - 6,61*((x-10)/2,5) + 11,50*((y-15)/5)*((x-10)/2,5)$	61
Figura 6.8 - Efeito do tempo de fermentação no segundo planejamento, nas seguintes condições experimentais: agitação = 150 rpm, temperatura = 35°C	63
Figura 6.9 - Valores preditos em função dos experimentais de atividade enzimática referentes à equação geral 6.3 do segundo planejamento experimental.	67

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo estudar a produção da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) empregando culturas de *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* utilizando como fonte de carbono fécula de mandioca (polvilho) proveniente de uma fecularia de mandioca. Nos ensaios foram empregados *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus*, isolado de água residuária de uma fecularia de mandioca. Para avaliar a produção de CGTase mediante a atividade enzimática pelo *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* foi utilizado um planejamento fatorial a dois (2) níveis, estudando como variáveis as concentrações da fonte de carbono (polvilho), de nitrogênio e de carbonato de sódio. Os experimentos foram realizados em Erlenmeyers de 300 mL de capacidade contendo 100 mL do meio de produção com pH inicial de 9,2, a 150 rpm e temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 72 horas de fermentação. A produção de CGTase foi monitorada pela determinação da atividade enzimática (U/mL). Após os ensaios realizados em frascos foram realizados experimentos em biorreator de 5 L de volume útil, contendo 2 L do meio de produção, pH de 9,20, agitação de 150 rpm e temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 72 h de fermentação, utilizando um planejamento fatorial a dois (2) níveis, estudando como variáveis as taxas de aeração e a velocidade de agitação. A otimização das concentrações da fonte de carbono, nitrogênio e carbonato de sódio foram obtidas a partir de um planejamento experimental composto central (PCC) e seus resultados analisados pelas superfícies de resposta. Os melhores resultados do planejamento encontrados no ponto central, corresponderam a 6,96 g/L da fonte de carbono, 8,07 g/L de nitrogênio e 9,45 g/L de carbonato de sódio. A maior produtividade obtida de CGTase após 72 horas de fermentação, foi 98,86 U/mL com valor teórico de 98,87 U/mL. A partir do melhor resultado obtido no PCC, determinou-se, utilizando um biorreator, as melhores condições de taxa de aeração (vvm) e velocidade de agitação (rpm) empregando um planejamento fatorial completo. Nas condições otimizadas, determinou-se aeração de 2,18 vvm e velocidade de agitação de 157,07 rpm, encontrando-se uma atividade enzimática de 130,36 U/mL, a qual foi muito próxima do valor teórico calculado de 130,33 U/mL.

PALAVRAS-CHAVE: CGTase, ciclodextrina, *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus*.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) enzyme production by *Bacillus* sp subgroup *alcalophilus* using cassava starch (manioc flour) as a carbon source. *Bacillus* sp subgroup *alcalophilus* was isolated from wastewater of cassava flour industry. To evaluate the assays results, two (2) levels of complete factorial experimental design was used, studying the variables: carbon source, nitrogen and sodium carbonate concentrations. The experiments were performed in 300 mL erlenmeyer flasks containing 100 mL of medium production with initial pH of 9.2, at 150 rpm and $35\pm 1^\circ\text{C}$, during 72 hour. CGTase production was monitored by measurements of enzymatic activity (U/mL). After the flasks experiments, assays was running in 5 L containing 2 L of medium production, pH 9.2, $35 \pm 1^\circ\text{C}$ during 72-hours using a factorial design at two (2) levels for aeration and agitation rate. The optimization of carbon source, nitrogen and sodium carbonate concentrations was obtained by a central composite design and their results analyzed by surface response. The best results was located on the central point, 6.96 g/L of carbon source, 8.07 g/L of nitrogen and 9.45 g/L of sodium carbonate. The CGTase activity predicted by model was 98.86 U/mL and the experimental activity obtained was 98,87 U/mL. After the best results obtained by PCC, the conditions of aeration (vvm) and agitation (rpm) rates was determined in bioreactor using a complete factorial experimental design. The best conditions, of 2.18 vvm and agitation of 157.07 rpm gave a experimental predicted CGTase activity of 130.36 U/mL, which was very close to the theoretic CGTase activity of 130.33 U/mL.

KEYWORDS: CGTase, cyclodextrin, *Bacillus* sp subgroup *alcalophilus*

1. INTRODUÇÃO

Diante das grandes possibilidades de aplicação do principal produto obtido da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19), as pesquisas buscam constante inovação.

As ciclodextrinas (CDs) são produtos obtidos pela ação da enzima CGTase, os quais formam compostos de inclusão com um grande espectro de substâncias. Estes compostos apresentam vantagens como a diversidade estrutural (geralmente de 6 a 8 unidades de glicose), baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, produção a partir de substratos de baixo custo, disponibilidade e culminando assim com um grande potencial de uso, que permitem agregar valor comercial.

As possibilidades de aplicação do principal produto obtido da enzima ciclodextrina-glicosiltransferase (CGTase) explicam a evolução na produção em vários setores industriais (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 - Resumo das principais vantagens e aplicações das ciclodextrinas.

Setor	Vantagens	Referências
Alimentos	Proteção contra oxidação de lipídios;	CHO, 2006; MOURTZINOS et al., 2007
	Estabilidade de aromas “flavours”, vitaminas e corantes	SZENTE et al., 2004; PROVENZI et al., 2006
Farmacêutico	Aumento da solubilidade de fármacos	LOFTSSON et al., 2007; PAULA et al., 2007
Cosméticos	Eliminando ou reduzindo odores	NAOFUMI et al., 2004
Despoluição ambiental	Formação de complexos não tóxicos como nos resíduos industriais	SALIPIRA et al. 2006; LI et al., 2008
Químico	Catalisadores em reações químicas;	BHOSALE et al., 2007; ABDEL-SHAFI et al., 2009
	Auxiliando na extração de um componente em uma mistura	MATIOLI, 2000

Todavia, várias das aplicações potenciais só poderão concretizar-se em grande escala caso se consiga diminuir ainda mais o seu custo de produção, a partir das variáveis do processo de fermentação. Existe uma grande motivação no Brasil para o desenvolvimento de métodos de produção de CDs devido à utilização de substratos mais econômicos, associados à otimização das variáveis de produção. O uso de fontes alternativas de nutrientes é uma importante estratégia para facilitar o desenvolvimento industrial da produção da CGTase. Neste estudo a enzima CGTase é produzida a partir do polvilho *in natura*, fonte de amido que pode diminuir os custos de produção. Assim, para que a produção industrial se torne competitiva no mercado globalizado, os processos devem ser aperfeiçoados continuamente, procurando adaptarem-se as pesquisas recentes.

Para que o desenvolvimento de experimentos seja conduzido de forma que possam ser reproduzidos sob condições controladas, obtendo-se resultados confiáveis e promissores que se repitam nessas condições, os ensaios foram realizados por meio da utilização do planejamento experimental. Para tanto, utilizou-se o planejamento experimental para seleção das variáveis que influem no processo com número reduzido de ensaios, bem como minimizar os erros experimentais para viabilizar economicamente a produção da enzima CGTase pelo microrganismo *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* (CGII).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Microrganismos produtores da enzima ciclodextrina glicosiltransferase

A microbiologia industrial corresponde à área que utiliza microrganismos, geralmente cultivados em larga escala, para gerar produtos de valor comercial, ou realizar importantes transformações químicas. Os processos microbianos foram desenvolvidos, visando à síntese de produtos farmacêuticos, aditivos alimentares, compostos químicos, tais como as enzimas (Figura 2.1).

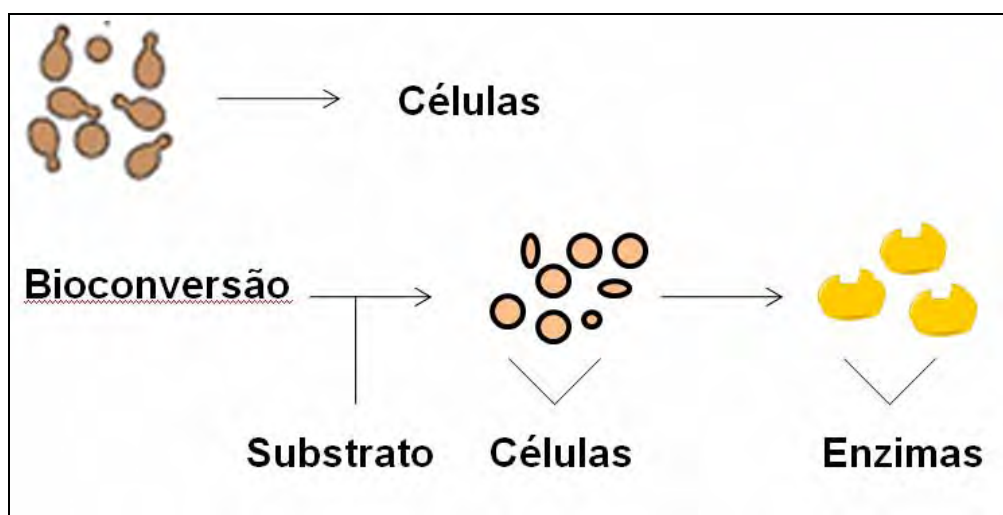


Figura 2.1 – Formação de enzimas como produto de células microbianas

Na figura 2.1, os produtos correspondem às próprias células ou as enzimas produzidas pelas células. No caso da bioconversão, as células são utilizadas para converter quimicamente uma substância específica.

Um microrganismo adequado à utilização industrial deve, obviamente, produzir a substância de interesse; contudo, as exigências não se limitam a esta. O microrganismo deve ser capaz de crescer e originar o produto em cultivos de larga escala.

Outra importante característica de um microrganismo industrial refere-se a sua capacidade de crescer rapidamente, sintetizando o produto desejado em

período de tempo relativamente curto. O microrganismo deve também ser capaz de crescer em meio de cultura líquido, de custo relativamente baixo. Muitos processos microbiológicos industriais utilizam as fontes de carbono oriundas de outras indústrias, como ingredientes principais ou suplementares de meios de cultura de larga escala.

2.2. Fatores que influenciam na produção de CGTase pelo cultivo do microrganismo

Diferentes produtos biológicos utilizados pelas indústrias são obtidos por processos fermentativos. A fermentação como processo industrial apresenta hoje uma importância crescente em setores chave da economia, sendo que mais de trezentas (300) empresas por todo o mundo produzem e comercializam produtos obtidos por esses processos.

Segundo Borzani (2001), a fermentação é realizada de diferentes modos: a) Descontínuo, com um inóculo por tanque ou com recirculação de células; b) Semicontínuo, com ou sem recirculação de células, c) Descontínuo alimentado, com ou sem recirculação de células e d) Contínuo, executado em um ou vários reatores e com ou sem recirculação de células.

Diversos estudos são realizados com a finalidade de aprimorar e otimizar os processos fermentativos objetivando a produção de enzimas (SHENE, et al., 2000; MIGUEL et al. 2003; CORTÉZ et al., 2005; DANESI et al., 2005). Este estudo procurou otimizar as variáveis de produção da enzima CGTase.

Qualquer fermentação microbiana deve ser controlada para garantir que o processo se realize adequadamente, sendo especialmente importante o monitoramento cuidadoso de fermentadores industriais, uma vez que os custos envolvidos são fundamentais (KOGA et al., 1967). Na maioria dos casos, além do crescimento e formação de produtos, é também necessário realizar o controle de parâmetros ambientais como: temperatura, concentração de oxigênio, pH, velocidade de agitação (JOHNS et al., 1994).

Durante o processo de crescimento microbiológico e síntese do produto pode ser necessário para o desenvolvimento alteração de um dos parâmetros

ambientais e/ou adição de nutrientes, impedindo que produtos indesejáveis sejam formados em vez do produto de interesse (HONG, 2004).

Os softwares são também utilizados em processos-modelo de fermentação (BUCKLAND, 1984). Modelos matemáticos testam os efeitos de vários parâmetros sobre o crescimento e geração do produto de maneira rápida e interativa, alterando os mesmos e verificando como estes afetam o processo.

As possibilidades de otimizar a produção da enzima CGTase tem grande importância no aumento de aplicações do seu principal produto obtido, as CDs. Com isso, a melhora na produção de CGTase tem sido o objetivo de muitas pesquisas.

Fatores como: a concentração de nutrientes do meio de cultivo (FREITAS et al., 2001; OLIVEIRA, 2002), a fonte e o pré-tratamento do amido; pH (YIM et al. 1997); temperatura (TACHIBANA et al. 1999); tempo de fermentação (MENDONÇA et al., 2004); agitação (SZERMAN et al., 2007); aeração, e outros por serem variáveis independentes do processo de fermentação influenciam na produção da enzima CGTase.

Freitas et al. (2004) estudaram a influência do pH, fontes de carbono, e diferentes concentrações de nitrogênio no meio de cultura para *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus*, sendo que as melhores condições encontradas proporcionaram uma atividade de CGTase de 88,6 U/mL em 72 h de fermentação.

O crescimento do microrganismo, a qualidade, a quantidade e o rendimento do produto desejado dependem da utilização de nutrientes e das condições físico-químicas do ambiente (MUKHOPADHYAY et al., 2002).

Segundo Uenojo et al., (2007) os componentes do meio de cultivo equivalem 60 a 80% do custo de produção de enzimas por fermentação. Assim, para diminuir custos, há necessidade da seleção das fontes de nutrientes e suas melhores concentrações durante o processo. A utilização de amido e derivados ocorre em muitos processos enzimáticos industriais (Figura 2.2).

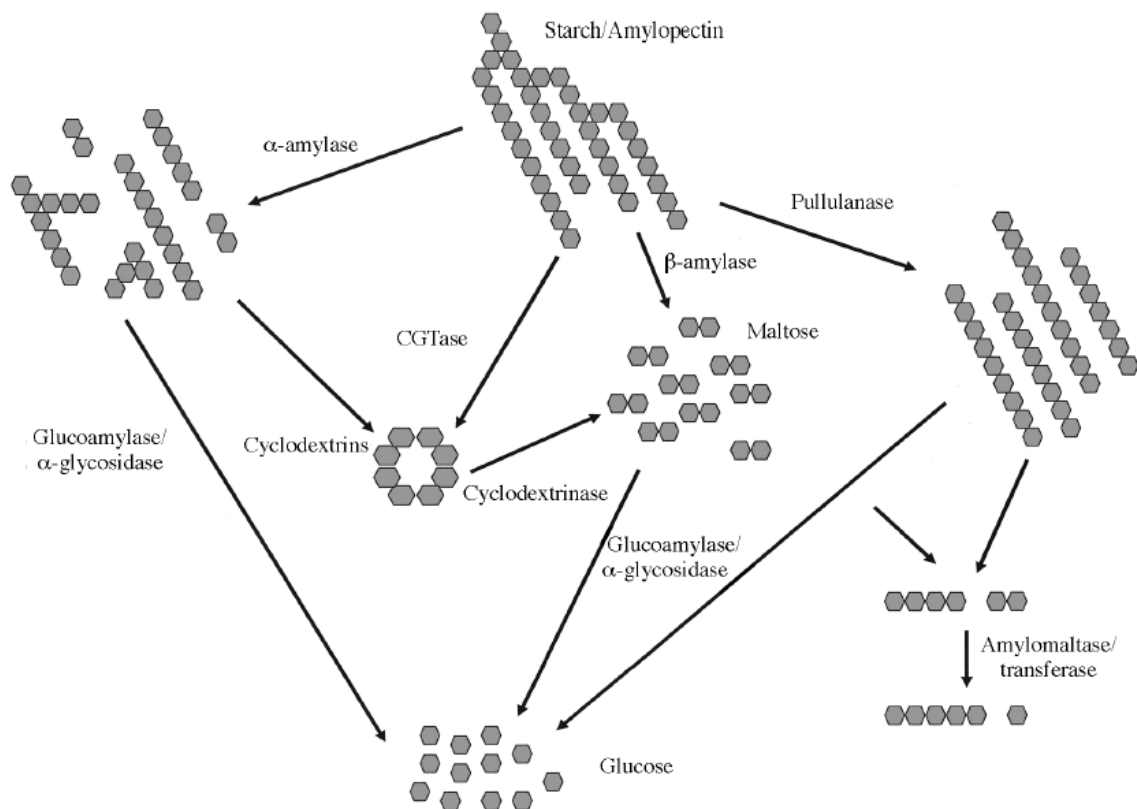


Figura 2.2 – A hidrólise enzimática de amido e seus derivados (Fonte: Eliasson, 2004).

Todos os organismos necessitam de alguma forma de uma fonte de nitrogênio, pois a mesma é parte essencial dos aminoácidos, os quais formam as proteínas.

A seleção das fontes de carbono é um dos fatores críticos do processo fermentativo, pois muitos compostos podem causar repressão catabólica da síntese de várias enzimas, além da redução na velocidade de crescimento de determinados microrganismos (FISH et al., 1984).

Neste trabalho é utilizado a fécula de mandioca (polvilho) como fonte de carbono pelo *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* para a produção da enzima CGTase. Segundo a definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008) a fécula é o produto amiláceo extraído das partes subterrâneas comestíveis dos vegetais (tubérculos, raízes e rizomas). O principal componente das raízes é um carboidrato formado mediante a polimerização da glicose e representado pela fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$, constituído de duas frações: amilose e amilopectina que representam 97 a 99% do peso seco do mesmo (DAIUTO et al., 2002). A amilose

apresenta cadeia linear, com ligações α -1-4 e a amilopectina cadeia ramificada, com ligações α -1-4 e α -1-6.

A mandioca (*Manihot esculenta*) é uma planta da família Euphorbiaceae e segundo DAIUTO et al. (2002) dentre as matérias-primas caracterizadas como amiláceas ou feculentas a mandioca se destaca como excelente opção para fermentações por apresentar alto teor de amido (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Características de algumas fontes de amido quanto ao tamanho do grão, o grau de polimerização e a porcentagem de amilose e amilopectina.

Amido	Tamanho do grão (μm)	Amilose(%)	Amilopectina(%)
Milho	5 – 15	28	72
Batata	15 -100	21	79
Trigo	2 – 35	28	72
Mandioca	5 – 35	17	83
Arroz	2 – 10	17	83
Banana	5 – 90	20	80
Sorgo	6 – 30	0	100

Fonte: Sanabria (2005)

O amido de mandioca é chamado de fécula seguido do nome do vegetal de origem, portanto fécula de mandioca (ANVISA, 2008) e segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária é também conhecida como polvilho, assim como é denominado neste trabalho (EMBRAPA, 2008)

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de mandioca, possui aproximadamente dois milhões de hectares para o plantio com capacidade de expansão em solos menos férteis. Segundo a associação brasileira dos produtores de amido de mandioca, a secretaria de agricultura e abastecimento pretende aumentar a produtividade atual de 23 toneladas/hectares/ano para 35 toneladas/hectares/ano em cinco (5) anos (ABAM, 2009).

2.3. A enzima ciclodextrina-glicosiltransferase

Enzimas são moléculas que aceleram reações químicas por meio de ligações aos substratos em posições e circunstâncias que aumentam a probabilidade de ocorrer a reação. O uso de enzimas em processos industriais tem sido amplamente discutido e cerca de 2.500 reações diferentes, catalisadas por enzimas estão listadas no International Union Handbook of Enzyme Nomenclature (AGUIAR, 2001).

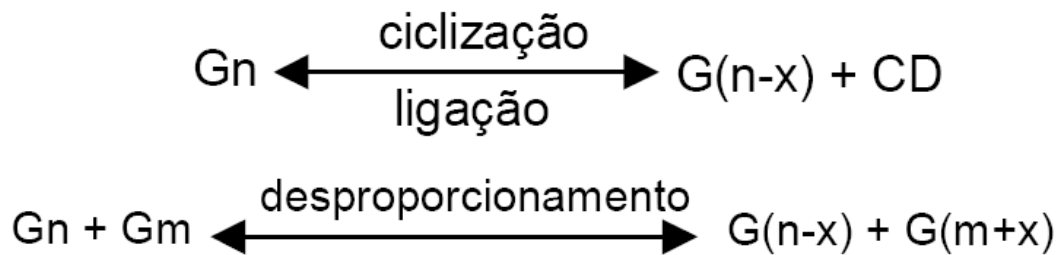
As enzimas possuem um alto grau de especificidade, aceleram a velocidade das reações e atuam em condições amenas. As enzimas substituem catalisadores químicos utilizados em processos industriais permitindo uma produção mais segura além de não propiciar perigo ao meio ambiente.

As enzimas possuem uma região ótima de pH na qual sua atividade é máxima. Esta influência do pH na velocidade de uma reação enzimática está relacionada aos sítios ativos das enzimas. Esses sítios ativos são freqüentemente compostos por grupos ionizáveis que devem se encontrar em uma forma iônica adequada para que mantenham a sua conformação, liguem-se aos substratos e catalisem reações (LEHNINGER et al., 2002). As enzimas, quando submetidas a valores extremos de pH, tanto ácidos como básicos, podem desnaturar, expondo com isso seus grupamentos hidrofóbicos.

A maioria das reações químicas se processa a uma velocidade maior com a elevação da temperatura. Esse aumento na temperatura proporciona uma maior energia cinética das moléculas de reagente, aumentando o número de colisões por unidade de tempo. Porém, com excesso da temperatura a enzima poderá ser desnaturada pelo rompimento de suas estruturas terciária e quaternária perdendo a atividade catalítica (LEHNINGER et al., 2002).

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, E.C. 2.4.1.19) é responsável pela formação de moléculas cíclicas, as ciclodextrinas (CDs), a partir da hidrólise de reações reversíveis do amido (Fig. 2.3) por meio de ciclização, acoplamento e desproporcionamento (transglicosilação intermolecular) (GUNARATNE et al., 2007).

A CGTase pertence a família das amilases, possui massa molar entre 70 a 75 g/mol e seqüências de aproximadamente 650 aminoácidos. (VOLKOVA et al., 2000).



Onde: G_n , G_m ...cadeias de α 1,4-Dglicopiranosil com n e m unidades de Dglicopiranosil.
 x ...parte da cadeia de α 1,4-Dglicopiranosil

Figura 2.3 - Reações catalisadas por CGTase (Fonte: Aguiar, 2001).

As enzimas CGTase são classificadas em três grupos de formação de CDs: α -CGTase, β -CGTase e γ -CGTase com predomínio para a formação de β -CD (GOH et al., 2008). Nesse sentido Nakamura e Horikoshi (1976) realizaram a produção da enzima por microrganismos alcalofílicos isolados do solo e obtiveram β -CD em quantidades superiores às demais citadas. Para aumentar a produção de CDs estudos enfocam melhores linhagens produtoras com destaque para o gênero *Bacillus* (MAHAT et al., 2004) bem como o primeiro microrganismo descrito por Schardinger em 1903 (*Bacillus*) para a produção da enzima. A liberação da CGTase no meio de cultivo estudada por Makela et al. (1988) foi ativa desde o início do crescimento microbiano, alcançando 65% da sua produção na fase log da curva de crescimento, 20% na fase estacionária e 15% foi liberada lentamente durante a fase de declínio microbiana, provavelmente devido à liberação da CGTase intracelular.

Desde a descoberta da CGTase vários microrganismos foram descritos como produtores da mesma, com predomínio do gênero *Bacillus*: *Bacillus* sp. TS1-1 (MAHAT et al., 2004); *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* (FREITAS et al., 2001; OLIVEIRA, 2002); *Bacillus circulans* ATCC 21783 (VASSILEVA et al., 2003); *Bacillus* sp *alcalophilus* E16 (CUCOLO et al., 2006); *Bacillus firmus* (MORIWAKI et al., 2007); *Bacillus macerans* (ARYA et al., 2006); *Bacillus macerans* (WANG et al., 2006); *Bacillus circulans* DF 9R (SZERMAN et al., 2007). Além desses, microrganismos de outros gêneros são citados (AVCI et al., 2009; GAWAND et al., 2001).

2.4. Ciclodextrinas

A primeira referência sobre CDs foi feita por Villers em 1891 (MATIOLI, 2000), que isolou uma pequena amostra de substância cristalina a partir um cultivo de *Bacillus amylobacter* em meio de cultura contendo amido. Schardinger entre 1903 e 1911 (MATIOLI, 2000), trabalhando com *Bacillus macerans* caracterizou esses compostos cristalinos como uma mistura de dois oligossacarídeos cíclicos denominando-as de dextrinas cristalinas α e β . Nos 24 anos seguintes a literatura sobre ciclodextrinas é extensa, mas muito repetitiva, e algumas vezes baseada em conceitos errôneos.

De 1930 a 1970 a estrutura das CDs foi explicada pelo grupo de Freudenberg (MATIOLI, 2000). Entre o período de 1935 a 1950 foi estabelecido a massa molar e o número de unidades de glicose para as CDs (MATIOLI, 2000). No final dos anos 60, a maior refinadora de milho americana abandonou a produção de CDs, devido ao alto custo de produção. Desde então numerosas opções para produção de CDs têm sido propostas por pesquisas. A partir de 1970 a toxicidade das CDs foi desconsiderada. Ao longo do tempo, pela capacidade de formar compostos de inclusão ocorreu aumento de artigos publicados e patentes depositadas durante a década de 70 (LOFTSSON et al., 2007).

Em 1994, foram relatados 3,9 publicações diárias comparadas com 1 publicação diária em 1984 (SZEJTLI, 1998). Estudos como o de Park et al. (1994) e Wieçlaw et al. (2009) relatam que as CDs possibilitam a inclusão de compostos sólidos, líquidos e gasosos, alterando propriedades físicas e/ou químicas. Atualmente, está em ascensão estudos para inovação da produção da CGTase devido a sua extensa aplicação em indústrias.

As CDs são monômeros de glicose (α -D-glucopiranoose) unidos por ligações glicosídicas α -1,4 (HUANG, 2009), maltooligossacarídeos cíclicos que formam complexos de inclusão devido a sua estrutura tronco-cônica (DODZIUK, 2006), que é propício para a formação do complexo receptor-substrato. Nestes complexos, a molécula hóspede é detida no interior da cavidade hidrofóbica (LU et al., 2008). As CDs mais utilizadas industrialmente são as α -, β -, γ -CDs (SEON, et al., 2009), constituídas por 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente, com diferentes diâmetros internos para acomodar moléculas de diferentes tamanhos (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Propriedades das principais ciclodextrinas.

Ciclodextrina	Diâmetro externo (nm)	Diâmetro da cavidade (nm)		Solubilidade, g/kg H ₂ O	Hidratado (H ₂ O)	
		Interno	Externo		cavidade	externo
α	1,52	0,45	0,53	129,5	2,00	4,40
β	1,66	0,60	0,65	18,40	6,00	3,60
γ	1,77	0,75	0,85	249,2	8,80	5,40

Fonte: Sabadini et al. (2006)

Nestas cavidades, o volume presente em 1g de α-CD é de 0,1 mL (MATIOLI, 2000). Assim, a β-CD (8 Å) pode incluir uma molécula de naftaleno, enquanto que a γ-CD (10 Å), duas moléculas de naftaleno (PROVENZI et al., 2006). A formação do complexo de inclusão pode ser afetada pelo tamanho e geometria da molécula hóspede (TIAN et al., 2009). Entretanto, fatores de encapsulação são relevantes na caracterização da aplicação das CDs em escala industrial (AIME et al., 2009). Foram relatados por alguns autores (RIBEIRO et al., 2007; HAIYEE et al., 2009; GORNÁS et al., 2009) que a inclusão modifica as propriedades indesejáveis das moléculas, aumentando sua estabilidade após sua complexação com a CD, protegendo contra reações, e modificando a mobilidade cromatográfica da molécula hóspede.

A formação de complexos de inclusão pode realizar-se em meio aquoso ou sólido. Em meio aquoso, a cavidade interior das CDs é ocupada por moléculas de água por meio de uma interação fraca, a interação polar - apolar o que facilita a inclusão de moléculas menos polares que a água.

Para a formação do complexo de inclusão primeiramente ocorre a aproximação da molécula hóspede à CD; seguido da eliminação de moléculas de água da cavidade; assimilação destas moléculas de água pela água circundante e a interação da CD e da molécula hóspede (Figura 2.4).

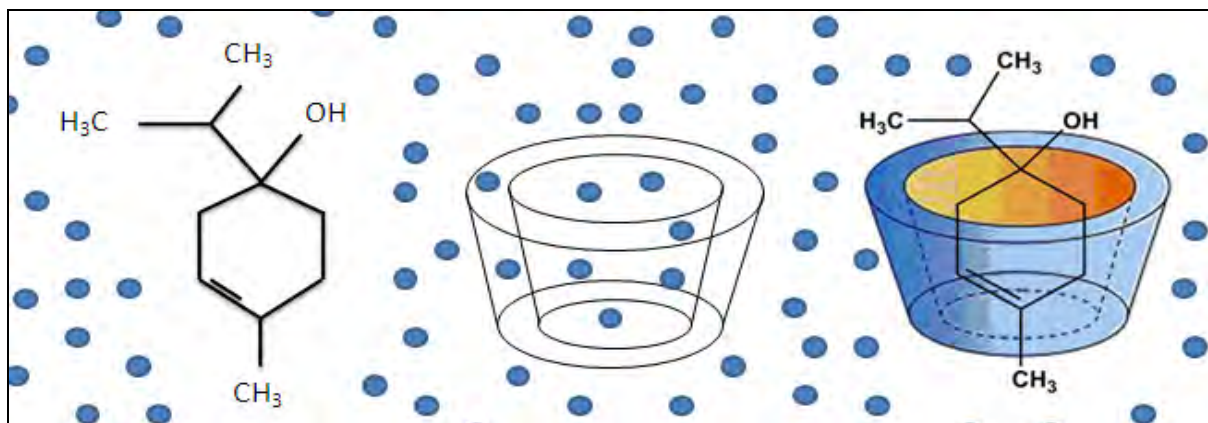


Figura 2.4 - Exemplo da inclusão de uma molécula do fármaco CAVAMAX® na CD em água.

A inclusão na matriz rígida das CDs geralmente proporciona às moléculas inseridas, mudança em suas propriedades físico - químicas, como aumento da estabilidade e biocompatibilidade. Devido à possibilidade de formação dos compostos de inclusão, as CD são muito utilizadas em produtos farmacêuticos, alimentícios e agrícolas. Nesses produtos, as CDs agem como veículos de solubilização, sendo incorporados em seu interior substâncias apolares que utilizam a parte exterior polar do tronco para a solubilização em água (RIBEIRO et al., 2007; RAWAT et al., 2004, UENO, et al., 1981).

As CDs podem ser modificadas pelo método direto, indiscriminadamente, formando uma mistura de produtos que são separados posteriormente por cromatografia, ou por um método mais elaborado, com várias etapas, no qual as modificações ocorrem em posições específicas (CROFT, et al, 1983). Assim os grupos hidroxilas presentes nas CDs, encontrados nas posições dois (2), três (3) ou seis (6) são substituídos. A rotação dos grupos dois (2) e três (3) (hidroxilas secundárias) é muito restrita, enquanto que a rotação das hidroxilas da posição seis (6) (primárias) é livre (RIBEIRO et al., 2007).

As CDs foram modificadas com o objetivo de aumentar a solubilidade de seus complexos; melhorar a associação entre as CDs e as moléculas de inclusão e formar sítios específicos (CAIRA et al., 2007).

No estudo realizado por Britto et al. (2004), CDs foram modificadas visando favorecer a formação de ligações intramoleculares de hidrogênio, com o intuito de conferir um caráter mais rígido às estruturas das CDs, tornando-as assim estáveis, reduzindo a reatividade e a mobilidade molecular.

A grande variedade da formação de complexos de inclusão (ABDEL-SHAFI et al., 2009) promove efeitos benéficos como a proteção contra oxidação de lipídios (HAIYEE et al., 2009), a redução ou a estabilidade de aromas (SEON et al., 2009), a estabilidade cores (PROVENZI et al., 2006) e vitaminas (CHO, 2006) e o aumento da solubilidade de drogas (JEULIN et al., 2009). Por essas razões, as CDs são amplamente utilizadas em indústrias de alimentos, farmacêuticas, de cosméticos e outras.

Na indústria de alimentos são utilizados na encapsulação de substâncias promovendo estabilidade de aromas, vitaminas, corantes, gorduras insaturadas, etc., estendendo o tempo de prateleira dos produtos (SZENTE et al., 2004; ASTRAY et al., 2009; MERJI et al., 2009). O conselho europeu em 2008 autorizou o uso da α -CD como um ingrediente alimentar (COMMISSION DECISION, 2008).

As CDs são utilizadas na indústria de cosméticos e produtos de limpeza encapsulando fragrâncias, promovendo estabilidade físico-química e reduzindo a velocidade da oxidação dos compostos (CENTINI et al., 2007).

O interesse da encapsulação de medicamentos como a penicilina e amoxicilina pela indústria farmacêutica ocorreu a partir da complexação do princípio ativo β -lactama com CDs (RAWAT et al., 2004; NAMAZI et al., 2009), pois este era pouco solúvel em água, quimicamente ou fisicamente instável e apresentava sabor desagradável, o qual era mascarado pelo uso de CDs (LOFTSSON et al., 2007; LU et al., 2009; NAMAZI et al., 2009). 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).

Na indústria química as CDs e seus derivados são utilizados como catalisadores em reações químicas, como ocorre na oxidação de compostos e auxiliando na extração de um componente de uma mistura (ABDEL-SHAFI et al., 2009; SASIKALA et al., 2009).

Na despoluição ambiental, as CDs são utilizadas na tentativa de evitar o efeito de substâncias tóxicas contidas no ambiente por meio da formação de complexos não tóxicos como dos resíduos industriais (OONNITTAN et al., 2009).

Alguns compostos orgânicos são os maiores poluentes em água, podendo ser tóxicos ou carcinogênicos até em baixas concentrações. Com o aumento da tecnologia de remoção de poluentes orgânicos da água, as CDs removem de 47 a 58% de compostos indesejáveis (SALIPIRA et al., 2006).

Segundo Biver et al. (2002) o preço da γ -CD oscilava entre U\$ 80-100 por kg, a α -CD estava cotada entre U\$ 20-25 por kg e a β -CD a U\$ 3-4 por kg.

A habilidade das CDs de seqüestrar componentes específicos de um meio é uma das mais promissoras características para aplicação industrial, e suas aplicações estão sendo ampliadas.

2.5. Planejamento Experimental

O planejamento experimental, ou delineamento experimental, representa um conjunto de ensaios estabelecido com critérios estatísticos, determinando a influência de duas ou mais variáveis nos resultados do processo. O planejamento tem como objetivos: determinar as variáveis mais influentes nos resultados; atribuir valores às variáveis influentes otimizando os resultados, minimizando a variabilidade dos resultados e, minimizando a influência de variáveis incontrolláveis. Destacando assim, benefícios como: a redução do número de ensaios; a possibilidade do estudo simultâneo de diversas variáveis, a determinação da confiabilidade dos resultados; a realização da pesquisa em etapas e a representação do processo por meio de expressões matemáticas. Portanto devido estes benefícios é cada vez mais utilizado como mostrado na Figura 2.6.

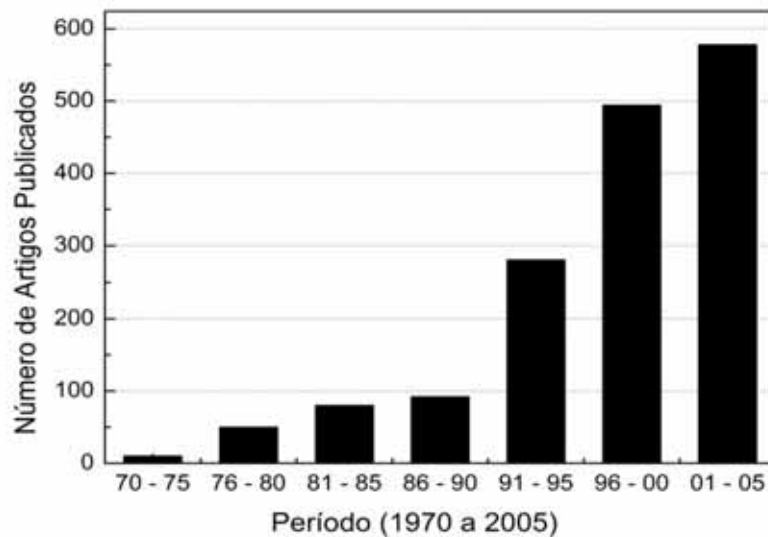


Figura 2.5 - Uso de planejamento experimental em artigos publicados no período de 1970 a 2005 (Fonte: Rodrigues et al., 2005).

Existem diferentes técnicas de planejamento experimental sendo utilizadas atualmente. O tipo de técnica a ser adotada irá depender do objetivo do pesquisador. Planejamento composto central é um planejamento fatorial de primeira ordem aumentado de pontos adicionais e repetições no ponto central, que permite estimar parâmetros de segunda ordem.

Entretanto, quando se torna importante investigar o efeito provocado nas respostas dos experimentos por dois ou mais fatores e, cada um deles com dois ou mais níveis de controle, Montgomery (2001) recomenda o uso de técnicas clássicas de planejamento, como por exemplo: técnicas de planejamento fatorial completo, fatorial fracionado ou experimentos com pontos centrais.

Um experimento fatorial com k variáveis, cada um deles com 2 níveis, é denominado de experimento fatorial 2^k . O processo experimental dessa técnica consiste em realizar testes com cada uma das combinações da matriz experimental, para em seguida, determinar e interpretar os efeitos principais e de interação dos fatores investigados e assim, poder identificar as melhores condições experimentais do processo de fabricação.

Devor et al. (1992) recomendam que para garantir a aplicação efetiva desse método, os experimentos fatoriais 2^k devem ser realizados com mais de 2 fatores.

Os autores citam que com um número menor de parâmetros se torna difícil decidir quais das estimativas pertencem a uma distribuição com média igual à zero.

As principais vantagens da técnica fatorial 2^k é a possibilidade de indicar as principais tendências e determinar uma direção promissora para as próximas experimentações, além de ser possível quantificar o erro experimental (MONTGOMERY, 2001).

A metodologia do planejamento experimental tem sido eficiente na otimização das concentrações de substratos e condições experimentais na otimização da produção de CGTase (MAHAT et al., 2004; ZAIN et al., 2007; SZERMAN et al., 2007).

3. JUSTIFICATIVA

O mercado mundial da tecnologia enzimática movimenta, anualmente, cerca de 2 bilhões de dólares (SOETAERT et al., 2006).

A enzima CGTase é aplicada na formação de produtos como esteviosídeos, glicosil-hesperidinas, glicosil-trealoses, glicosil-ramnose e ciclodextrinas (AGUIAR, 2001).

Assim, diante do aumento do número de patentes sobre o principal produto obtido da CGTase é fundamental melhorar a produção das enzimas mediante a otimização das variáveis do processo de produção.

Para isso, é necessário um sistema de planejamento que estabeleça quais variáveis tem maiores influências nos resultados, de modo a otimizar os mesmos. Assim, torna-se necessário estabelecer ferramentas que ajudem na segurança dos métodos adotados.

A otimização dos parâmetros busca atribuir valores às variáveis influentes minimizando a variabilidade dos resultados. A técnica de planejamento de experimentos é indicada quando se deseja avaliar o efeito de fatores na respostas do processo.

A realização de experimentos consiste essencialmente em melhorar a atividade enzimática (AE), sob condições controladas, obtendo-se resultados confiáveis e que se repitam nessas condições. O planejamento experimental é caracterizado por meio de um conjunto de ensaios estabelecido com critérios científicos e estatísticos, com o objetivo de determinar a influência de diversas variáveis nos resultados de um dado sistema ou processo.

Assim sendo, a metodologia estatística por meio de um planejamento adequado se faz cada vez mais necessária e importante, pois permite a redução da variabilidade de resultados, a redução de tempos de análise e dos custos envolvidos.

Estudar as variáveis de produção enzimática, ponderar seus efeitos e suas inter-relações pelo planejamento experimental a partir de informações que fomentam o processo de produção, confere a este estudo o caráter de originalidade, o que justifica o desenvolvimento deste trabalho de mestrado.

A escolha do setor de produção enzimática para a realização desse trabalho justifica-se pelo crescente número de pesquisas sobre microbiologia aplicada a indústrias.

A opção pelas variáveis, concentração de componentes do meio de cultura, agitação e aeração originou-se pelo fato de que a escolha de parâmetros adequados a uma ampla faixa de produção resultam na otimização desta.

4. OBJETIVOS

- Verificar a potencialidade do polvilho como substrato para produção de CGTase, utilizando o microrganismo *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus*.
- Otimizar as condições de cultivo mediante ao planejamento experimental para concentrações dos substratos polvilho; fontes de nitrogênio e carbonato de sódio;
- Produzir CGTase em biorreator, otimizando parâmetros físico-químicos, como aeração e agitação.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Microrganismo

A linhagem *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* (CGII) é proveniente de Coleção de Cultura do laboratório de microbiologia industrial do Instituto de Biociências de Rio Claro, uma cultura isolada da água residuária de uma fecularia de mandioca. Esse microrganismo foi caracterizado pela Fundação André Tosello.

5.2. Meios de cultura

Os meios de cultura empregados durante a realização do trabalho são descritos a seguir:

5.2.1. Meio seletivo do microrganismo

Para o ativação das culturas bacterianas foi utilizado o meio proposto por Nakamura e Horikoshi (1976), cuja composição é apresentada na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Composição do meio de cultura utilizado para a ativação do microrganismo *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus*.

Componentes	Concentração (g/L)
Amido Solúvel (comercial)	20,0
Polipeptona	5,0
K ₂ HPO ₄	1,0
*Carbonato de sódio (Na ₂ CO ₃)	10,0
Extrato de levedura	5,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
Agar bacteriológico	20,0
Fenolftaleína	0,3
Metilorange	0,1

Esterilização por calor úmido (120°C) à 1 atm/15 min.

pH do meio ajustado em 9,2.

* Esterilizado separadamente.

5.2.2. Meio de manutenção do microrganismo

A bactéria foi mantida em criotubos contendo 50 % de meio de cultura de crescimento do microrganismo (Tabela 5.2) e 50 % de glicerol a 40 %. As culturas foram mantidas sob refrigeração para diminuir o metabolismo celular até futuras necessidades de uso.

5.2.3. Meio de cultura para o crescimento do microrganismo

Para o crescimento das culturas bacterianas como inoculo nos processos fermentativos foi empregado o meio proposto por Nakamura e Horikoshi (1976), conforme descrito na Tabela 5.2, que apresenta simples composição química e custo baixo.

Tabela 5.2 - Composição do meio de cultura original utilizado para o crescimento do microrganismo *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus*.

Componentes	Concentração (g/L)
Amido solúvel (comercial)	20,0
Polipeptona	5,0
K ₂ HPO ₄	1,0
*Na ₂ CO ₃	10,0
Extrato de levedura	5,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2

pH do meio ajustado em 9,2.

Esterilização por calor úmido (120°C) à 1 atm/15 min

*Esterilizado separadamente

5.2.4. Meio de cultura utilizado no processo fermentativo

O meio empregado nos processos fermentativos para a produção de CGTase foi idealizado com base no meio descrito por Nakamura e Horikoshi (1976), sendo usado como substrato um tipo de amido, uma fonte de proteína e sais minerais, cuja composição está apresentada na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Composição do meio de cultura utilizado na produção de CGTase para o crescimento do microrganismo *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus*.

Componentes	Concentração (g/L)
Polvilho	20,0
Triptona	5,0
K ₂ HPO ₄	1,0
*Na ₂ CO ₃	10,0
Extrato de Levedura	5,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2

pH do meio ajustado em 9,2.

Esterilização por calor úmido (120°C) à 1 atm/15 min.

*Esterilizado separadamente

5.2.4.1. Fonte de Carbono

Foi testado polvilho *in natura*, produzido na Fecularia Plaza, situada na região de Santa Maria-SP substituindo a fonte de carbono amido solúvel do meio Nakamura e Horikoshi (1976) durante a realização desse trabalho.

5.3. Experimentos

5.3.1. Ativação do microrganismo *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus*

Inicialmente, para a ativação do microrganismo foram realizadas subculturas da cultura estoque. Um (1) mL do meio contendo o inóculo foi transferido para um Erlenmeyer de 100 mL contendo 20 mL do meio de crescimento descrito na (Tabela 5.2). O repique dos tubos foi realizado sete vezes a cada 8 h e cinco vezes a cada 24 h, 5 alças da cultura microbiana foram inoculadas superficialmente em placa de Petri contendo aproximadamente 20 mL do meio de isolamento (Tabela 5.1). Em seguida, foram colocados na estufa incubadora [MARCONI 415] a 35°C por um período de 24 h.

Ao mudar a fonte de carbono de amido soluvel para polvilho o periodo de incubação foi de 72 h. As colônias, que formaram o halo amarelo contrastante com o meio vermelho da fenolftaleína determinam CGTase positivas.

5.3.2. Preparação do inóculo e fermentação em incubadora rotativa e biorreator

A fermentação foi realizada tendo como base o meio descrito na Tabela 5.3 Um (1) mL do meio contendo a linhagem mantida sob refrigeração foi cultivado em frascos contendo 100 mL do meio de cultura incubados a 35°C durante 18 h a 150 rpm em fermentador tipo shaker. Desta cultura foram transferidos 10 mL (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 retiradas amostras de cada erlenmeyer e centrifugadas a 7826 x g por 10 min. O sobrenadante livre de células foi utilizado para determinação das atividades enzimáticas. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

O processo de fermentação foi também realizado em biorreator (modelo BIO-T MINI) em até 72 h de produção. Para a realização da fermentação foi utilizado as concentrações otimizadas do meio de cultivo. A pré-inoculo foi realizado tendo como base o meio otimizado cultivado em frascos contendo 200 mL do meio de cultura incubados a 35°C durante 18 h a 150 rpm em fermentador tipo shaker, transferidos (10% v/v) para biorreator de capacidade de 5 L contendo 2 L do meio de cultura mantidas a temperatura de 35°C pH de 9,2.

O fermentador (Figura 5.1) do laboratório de microbiologia industrial do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências de Rio Claro - UNESP é destinado ao cultivo de bactérias para produção de enzimas, o qual controla as variáveis do processo como agitação, aeração e pH.



Figura 5.1 - Biorreator utilizado para fermentação que controla pH, temperatura, aeração.

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

A determinação da atividade enzimática foi realizada pelo método colorimétrico do complexo ciclodextrina-fenolftaleína, no qual se prepara uma solução de trabalho constituída por: 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 termostatzado foram colocados 5,0 mL do caldo bruto (no qual supostamente estará presente a enzima) e, adicionado igual volume de solução de amido 1% [0,1 g de amido solúvel; 1,0 mL de solução de CaCl_2 (0,05M); 1,0 mL de solução tampão Tris-HCl 0,05M (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 dos reatores em tempos pré-determinados de 0; 3; 6; 9 e 12 min, em seguida inativadas à 100°C em água fervente durante cinco minutos e depois colocadas em banho em 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 propriedade complexante das CDs no teste colorimétrico é fundamentada na formação de β -CD com a fenolftaleína, complexo que produz uma variação na densidade ótica da solução, a qual pode ser medida espectrofotometricamente. A β -CD forma um complexo incolor estável com a fenolftaleína, portanto, seguindo-se a extinção de absorvância da solução na qual a β -CD é sintetizada pela CGTase (Figura 5.2). A atividade enzimática 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).



Figura 5.2 - Equilíbrio de formação do complexo ciclodextrina/fenolftaleína.

5.3.4. 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 0,05M (pH 8,0) e completando o volume a 25 mL com água destilada. A partir da solução estoque foram feitas sucessivas diluições e as amostras foram submetidas ao método colorimétrico de complexação da fenolftaleína-ciclodextrina. A leitura da absorvância ocorreu a 550 nm.

Os dados do procedimento utilizado e os valores de absorvância obtidos estão representados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Protocolo experimental da construção da reta de absorvância de diferentes concentrações de β -ciclodextrina.

Tubo	Vol.(mL) β -CD	Vol.(mL) Tris HCl pH 8,0	Concentração β -CD mM	Absorvância (550nm)
1	0,00	1,00	0,00	1,527
2	0,10	0,90	0,05	1,438
3	0,20	0,80	0,10	1,372
4	0,30	0,70	0,15	1,286
5	0,40	0,60	0,20	1,236
6	0,50	0,50	0,25	1,25
7	0,60	0,40	0,30	1,083
8	0,70	0,30	0,35	1,029
9	0,80	0,20	0,40	0,968
10	0,90	0,10	0,45	0,921
11	1,00	0,00	0,50	0,903

5.4. Planejamento experimental

A realização de experimentos significativos e confiáveis é obtida por meio do planejamento experimental e da 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 se utiliza de técnicas estatísticas.

A técnica de superfície de resposta que tem como base o planejamento experimental foi utilizada, permitindo selecionar a combinação de níveis ótimos na obtenção da melhor resposta. A determinação da quantidade de experimentos é feita de acordo com a quantidade de variáveis estudadas e com os níveis estipulados para essas variáveis. O planejamento é representado na forma de potência, fornecendo assim o número de experimentos a serem realizados. Portanto, com o auxílio do software *STATISTICA 7* foi realizado um planejamento composto central (PCC) (Fig. 5.3) composto por um planejamento fatorial a dois níveis com três variáveis acrescido de duas réplicas no ponto central e ainda 6 experimentos nos pontos axiais (α), totalizando 16 experimentos..

-1	-1	-1	}	Planejamento Fatorial 2^k
-1	-1	+1		
-1	+1	-1		
-1	+1	+1		
+1	-1	-1		
+1	-1	+1		
+1	+1	-1		
+1	+1	+1		
$-\alpha$	0	0	}	Pontos Axiais 2.K
$+\alpha$	0	0		
0	$-\alpha$	0		
0	$+\alpha$	0		
0	0	$-\alpha$		
0	0	$+\alpha$	}	Pontos Centrais
0	0	0		
0	0	0		

Figura 5.3 - Planejamento experimental do tipo fatorial completo de Planejamento composto central (PCC).

A organização de um planejamento fatorial consiste em selecionar os fatores (variáveis independentes) e os níveis (valores assumidos pelas variáveis) que serão estudados.

Foram realizados experimentos para verificar a influência de cinco variáveis no processo da produção enzimática através de três planejamentos experimentais. As variáveis do primeiro e segundo planejamento realizado em shaker foram:

$Y_1 \equiv$ polvilho (g/L);

$Y_2 \equiv$ Na_2CO_3 (g/L);

$Y_3 \equiv$ duas fontes de nitrogênio (1:1): extrato de levedura e triptona (g/L);

As variáveis do terceiro planejamento realizado em biorreator foram:

$Z_1 \equiv$ vazão de ar (vvm);

$Z_2 \equiv$ velocidade de agitação (rpm).

Os níveis das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada nas Tabelas 5.5, 5.6 e 5.7, utilizando para cada planejamento experimental a seguinte equação de codificação:

$$\text{Equação geral: } X_n = \frac{(X - X_0)}{\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2}} \quad (5.6)$$

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 real da variável no nível superior;

X_{-1} é o valor real da variável no nível inferior.

5.4.1. Primeiro planejamento experimental do planejamento composto central

Para avaliar a tendência de algumas variáveis do processo na produção de CGTase, optou-se por realizar o planejamento fatorial a dois níveis com três variáveis, com duas réplicas no ponto central, 6 experimentos nos pontos axiais (α), totalizando 16 experimentos. Os níveis superiores e inferiores das variáveis: Y_1 , Y_2 , Y_3 foram selecionados através de consultas bibliográficas de forma que os valores apresentados na literatura estivessem entre os dois níveis do planejamento (FREITAS et al. 2004; OLIVEIRA, 2002). Na Tabela 5.5, foram relacionadas as variáveis do processo e seus respectivos valores, de acordo com seus níveis: inferior, central e superior.

Tabela 5.5 - 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.

Variáveis	Níveis				
	- α	-1	0	1	+ α
Y_1	5,8	7,5	10,0	12,5	14,2
Y_2	5,8	7,5	10,0	12,5	14,2
Y_3	6,6	10,0	15,0	20,0	24,4

Definido o planejamento a dois níveis, estabeleceu-se o nível superior, representado pelo sinal +1 das variáveis Y_1 , Y_2 , Y_3 , como sendo, respectivamente concentração de polvilho de 12,5 g/L, concentração das fontes de nitrogênio 12,5 g/L, concentração de carbonato de sódio de 20,0 g/L e o nível inferior representado pelo sinal -1 das variáveis Y_1 , Y_2 e Y_3 , como sendo respectivamente, concentração de polvilho de 7,5 g/L, concentração das fontes de nitrogênio de 7,5 g/L e concentração de carbonato de sódio de 10,0 g/L. Todos os experimentos foram realizados a 35 °C, com pH inicial do meio de 9,20 e o tempo de fermentação de 24; 48 e 72 h.

A Tabela 5.6 apresenta os valores codificados e reais das concentrações empregadas em cada um dos 16 experimentos do PCC.

Tabela 5.6 - Matriz do primeiro planejamento experimental e valores reais utilizados nos experimentos.

Experimentos	Variáveis codificadas			Variáveis reais (g/L)		
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	-1	-1	-1	7,5	7,5	10,0
2	1	-1	-1	12,5	7,5	10,0
3	-1	1	-1	7,5	12,5	10,0
4	1	1	-1	12,5	12,5	10,0
5	-1	-1	1	7,5	7,5	20,0
6	1	-1	1	12,5	7,5	20,0
7	-1	1	1	7,5	12,5	20,0
8	1	1	1	12,5	12,5	20,0
9	-1,68	0	0	5,8	10,0	15,0
10	1,68	0	0	14,2	10,0	15,0
11	0	-1,68	0	10,0	5,8	15,0
12	0	1,68	0	10,0	14,2	15,0
13	0	0	-1,68	10,0	10,0	6,6
14	0	0	1,68	10,0	10,0	23,4
15	0	0	0	10,0	10,0	15,0
16	0	0	0	10,0	10,0	15,0

5.4.2. Segundo planejamento experimental delineamento composto central

Os resultados do planejamento anterior mostraram a tendência das variáveis estudadas, contudo não foi possível encontrar o ponto ótimo das variáveis independentes, uma vez que os melhores resultados foram obtidos nas extremidades do planejamento (níveis inferiores). Assim, visando otimizar o processo em relação as variáveis (concentração de polvilho, extrato de levedura, triptona e Na₂CO₃), fez-se necessário realizar um segundo planejamento composto central com 2³ mais 2 réplicas no ponto central, mais 6 experimentos no ponto axial, com α de ortogonalidade igual a 1,68, resultando em 16 experimentos. Os níveis das variáveis estudadas (Tabela 5.7) foram colocados na forma codificada na matriz de planejamento (Tabela 5.8).

Tabela 5.7 - Valores das variáveis do meio de cultivo (ponto central, níveis -1 e +1 e pontos axiais) usados no planejamento composto central do segundo planejamento experimental.

Variáveis	Níveis				
	- α	-1	0	1	+ α
Y_1	3,3	5,0	7,5	10,0	11,7
Y_2	3,3	5,0	7,5	10,0	11,7
Y_3	5,8	7,5	10,0	12,5	14,2

Na tabela 6.7 estabeleceu-se o nível superior, representado pelo sinal +1 das variáveis Y_1 , Y_2 , Y_3 , como sendo, respectivamente concentração de polvilho de 10,0 g/L, concentração das fontes de nitrogênio 10,0 g/L, concentração de carbonato de sódio de 12,5 g/L e o nível inferior representado pelo sinal -1 das variáveis Y_1 , Y_2 e Y_3 , como sendo respectivamente, concentração de polvilho de 5,0 g/L, concentração das fontes de nitrogênio de 5,0 g/L e concentração de carbonato de sódio de 7,5 g/L.

Tabela 5.8 - Matriz do primeiro planejamento experimental e valores reais utilizados nos experimentos.

Experimentos	Variáveis codificadas			Variáveis reais (g/L)		
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	-1	-1	-1	5,0	5,0	7,5
2	-1	-1	1	5,0	5,0	12,5
3	-1	1	-1	5,0	10,0	7,5
4	-1	1	1	5,0	10,0	12,5
5	1	-1	-1	10,0	5,0	7,5
6	1	-1	1	10,0	5,0	12,5
7	1	1	-1	10,0	10,0	7,5
8	1	1	1	10,0	10,0	12,5
9	-1,68	0	0	3,3	7,5	10,0
10	1,68	0	0	11,7	7,5	10,0
11	0	-1,68	0	7,5	3,3	10,0
12	0	1,68	0	7,5	11,7	10,0
13	0	0	-1,68	7,5	7,5	5,8
14	0	0	1,68	7,5	7,5	14,2
15	0	0	0	7,5	7,5	10,0
16	0	0	0	7,5	7,5	10,0

5.4.3. Planejamento experimental através do planejamento composto central em biorreator

Com o objetivo de estudar a influência da vazão de ar e a velocidade de agitação na fermentação utilizando o *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* na obtenção de maiores rendimentos de CGTase, foi realizado um planejamento composto central com dez experimentos, com 2² fatorial, 2 réplicas no ponto central e 4 experimentos no ponto axial, com α de ortogonalidade igual a 1,41, variando os valores da taxa de aeração em vvm (1,5; 2,0 e 2,5) e da velocidade de agitação em rpm (100; 150 e 200), sendo avaliado como variável resposta a produção de CGTase. Na Tabela 5.9, foi apresentado os valores codificados e reais das variáveis na matriz do planejamento do biorreator.

Tabela 5.9 - Valores das variáveis reais (ponto central, níveis -1 e +1 e pontos axiais) usados no planejamento composto central do planejamento experimental realizado em biorreator.

Variáveis	Níveis				
	- α	-1	0	1	+ α
Z₁ (vvm)	1,29	1,5	2	2,5	2,7
Z₂ (rpm)	79,5	100	150	200	220,5

Definido o planejamento a dois níveis, estabeleceu-se o nível superior, representado pelo sinal +1 das variáveis Z₁, Z₂, como sendo, taxa de aeração de 2,50 vvm e velocidade de agitação de 200 rpm e o nível inferior representado pelo sinal -1 das variáveis Z₁, Z₂, como sendo aeração de 1,50 vvm e velocidade de agitação de 100 rpm, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados a 35 °C, com pH inicial do meio de 9,20 e o tempo de fermentação de 24; 48 e 72 h.

A Tabela 5.10 apresenta as os valores codificados e reais das concentrações empregadas em cada um dos 10 experimentos do PCC.

Tabela 5.10 - Matriz do planejamento experimental e valores das variáveis reais utilizados nos experimentos realizados em biorreator.

Experimentos	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	Z ₁	Z ₂	Z ₁ (vvm)	Z ₂ (rpm)
1	-1	-1	1,50	100
2	-1	1	1,50	200
3	1	-1	2,50	100
4	1	1	2,50	200
5	-1,41	0	1,29	150
6	1,41	0	2,70	150
7	0	-1,41	2,00	79,5
8	0	1,41	2,00	220,5
9	0	0	2,00	150
10	0	0	2,00	150

5.5. Análise estatística dos dados

Determinada a matriz dos planejamentos e as condições de cada experimento, partiu-se para a etapa de realização dos experimentos, buscando a máxima fidelidade nas condições impostas pela matriz do planejamento. Após a coleta das amostras, foram realizados os ensaios de atividade enzimática em duplicata para maior confiabilidade dos resultados.

Realizados todos os ensaios, iniciou-se o tratamento estatístico dos dados. A Equação 5.1 (referente ao primeiro e ao segundo planejamento) e a Equação 5.2. (referente ao terceiro planejamento) apresentam de forma completa as equações empíricas de 2º ordem propostas, que representam cada uma das respostas estudadas.

$$Y_a = \beta_0 + ay_1 + by_2 + cy_3 + dy_1y_2 + fy_1y_3 + gy_2y_3 + hy_2 + iy_2^2 + jy_3^2 \quad (5.1)$$

$$Y_b = \beta_1 + kz_1 + lz_2 + mz_1z_2 + nz_1^2 + oz_2^2 \quad (5.2)$$

Sendo:

- $Y_{a,b}$ = respostas estudadas;
- $\beta_{0,1}$ = constante determinada durante o ajuste do modelo;
- a, b, c, \dots, o = constantes ou parâmetro da equação;
- $y_1 \equiv$ concentração de polvilho;
- $y_2 \equiv$ concentração de $\frac{1}{2}$ de triptona e $\frac{1}{2}$ de extrato de levedura;
- $y_3 \equiv$ concentração de carbonato de sódio;
- $Z_1 \equiv$ vazão de ar;
- $Z_2 \equiv$ velocidade de agitação.

Foi realizado para cada resposta uma análise de regressão múltipla, pelo método dos mínimos quadrados. A partir da equação (5.1) utilizada para o primeiro e segundo planejamento e da equação (5.2) utilizada para o planejamento do biorreator foi executado a estatística da estimativa dos parâmetros por meio dos valores de t de *Student*, onde as variáveis com nível de significância superior a 5% foram eliminados, definindo para cada uma das respostas estudadas uma equação que representa os efeitos das variáveis do processo. Os valores não eliminados foram utilizados no cálculo da significância dos parâmetros, definido como a relação entre o valor do parâmetro estimado e o seu desvio padrão.

O valor de F de Fisher é determinado pela razão entre o quadrado médio da equação ajustada (QME) e o quadrado médio do resíduo (QMR), mostrado na Equação 5.3. Este valor é usado para a realização de um teste de hipótese para a verificação da adequação aos dados experimentais. Quanto maior o valor de F , melhor será o ajuste do modelo em questão.

$$F = \frac{QME}{QMR} \quad (5.3)$$

O quadrado médio da equação (QME) e o quadrado médio do resíduo (QMR) são dados pelas Equações 5.4 e 5.5, respectivamente.

$$QME = \frac{\text{Soma dos quadrados dos valores preditos}}{\text{Numero de graus de liberdade da equação}} \quad (5.4)$$

$$QMR = \frac{\text{Soma dos quadrados do residuo}}{\text{Numero de graus de liberdade do residuo}} \quad (5.5)$$

O coeficiente de correlação quadrático (R^2) e a comparação entre o F de Fisher calculado (F_C) e o F tabelado (F_T) foram utilizados para verificar a significância do modelo.

Os cálculos da otimização para as variáveis: concentração de componentes do meio de cultivo, velocidade de agitação e taxa de aeração foram realizados a partir de um algoritmo realizado no programa *Maple Reader 11*. Utilizando as Equações 5.6; 5.7; 5.8; 5.9 e 5.10 de codificação obtêm-se os valores reais das concentrações das variáveis no ponto de maximização da AE.

$$\text{Concentração de polvilho: } Y_1(g/L) = (\text{polvilho} - 7,5)/2,5 \quad (5.6)$$

$$\text{Concentração de fontes de nitrogênio: } Y_2(g/L) = (\text{nitrogênio} - 7,5)/2,5 \quad (5.7)$$

$$\text{Concentração de carbonato de sódio: } Y_3(g/L) = (\text{Na}_2\text{CO}_3 - 10)/2,5 \quad (5.8)$$

$$\text{Aeração: } Z_1(vvm) = (\text{aeração} - 20)/10 \quad (5.9)$$

$$\text{Velocidade de agitação: } Z_2 = Z_2(rpm) = (\text{agitação} - 150)/100 \quad (5.10)$$

5.6. Cálculo da atividade enzimática

Para os cálculos de atividade enzimática, foi confeccionada uma reta padrão de β -CD e um gráfico com o valor de inclinação para cada ensaio. Os valores de inclinação foram obtidos através do ajuste linear realizado pelo *software Origin Pro 7.5*. A atividade enzimática foi encontrada por meio da equação 5.11.

$$A = \alpha \cdot \beta \cdot F_{dil} \cdot 1000 \cdot \frac{V_{reator}}{V_{enz.}} \quad (5.11)$$

Onde:

A= Atividade enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mL}$)

α = Coeficiente angular da reta padrão ($\text{mmol}.\text{mL}^{-1}/\text{ABS}$)

β = Coeficiente angular da curva obtida experimentalmente ($\text{ABS}/\text{min}.$).

V =Volume enzimático do reator ($V_{\text{amostra}}(\text{mL})/V(\text{mL})$)

F.dil = Fator de diluição

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Calibração do método

A calibração do método foi estabelecida por meio da curva padrão (Figura 6.1) que promoveu o grau de correlação entre o resultado de uma medição e o valor convencional do mensurando.

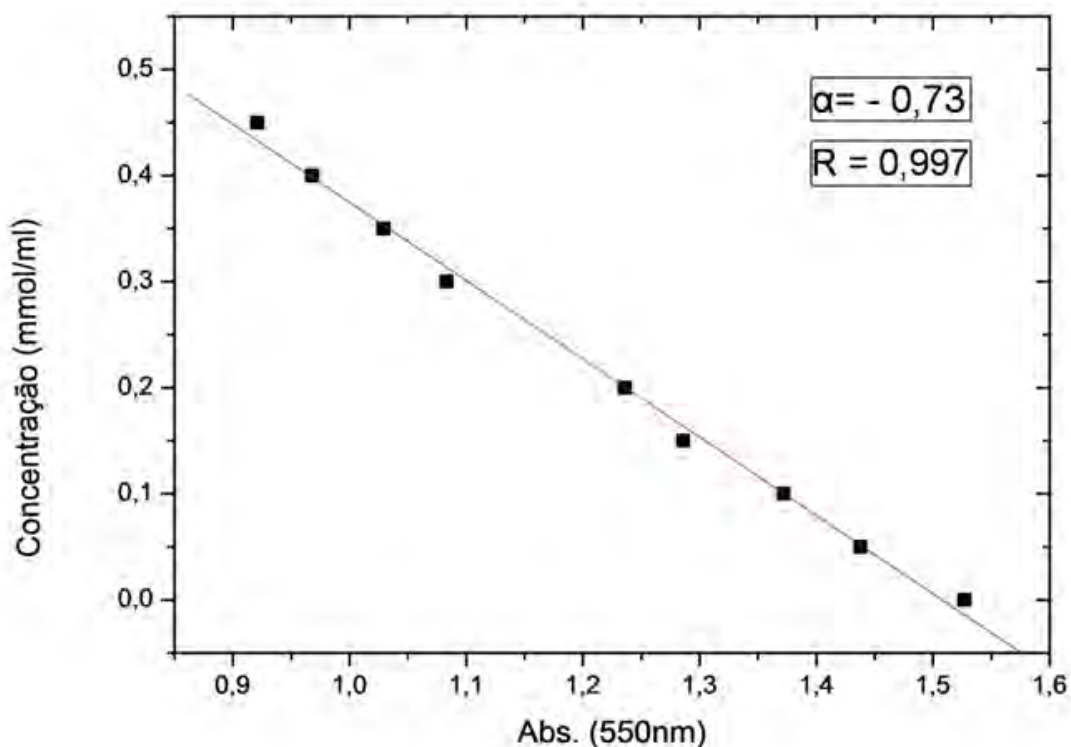


Figura 6.1 - Curva padrão da concentração de β -ciclodextrina em 550 nm de absorbância realizada para calibração do método.

O método mostrou-se eficaz devido aos resultados mostrarem um bom ajuste linear, sendo que o coeficiente angular (α) e o coeficiente de correlação (R) comprovam a boa linearidade da curva padrão. A curva padrão ideal deve apresentar um ângulo aproximado de 45° , esta reta apresenta um ângulo de 38° , com inclinação negativa, comprovando a eficiência do método. O coeficiente angular obtido nesta curva padrão foi utilizado para o cálculo de AE dos experimentos como mostra na Figura 6.2.

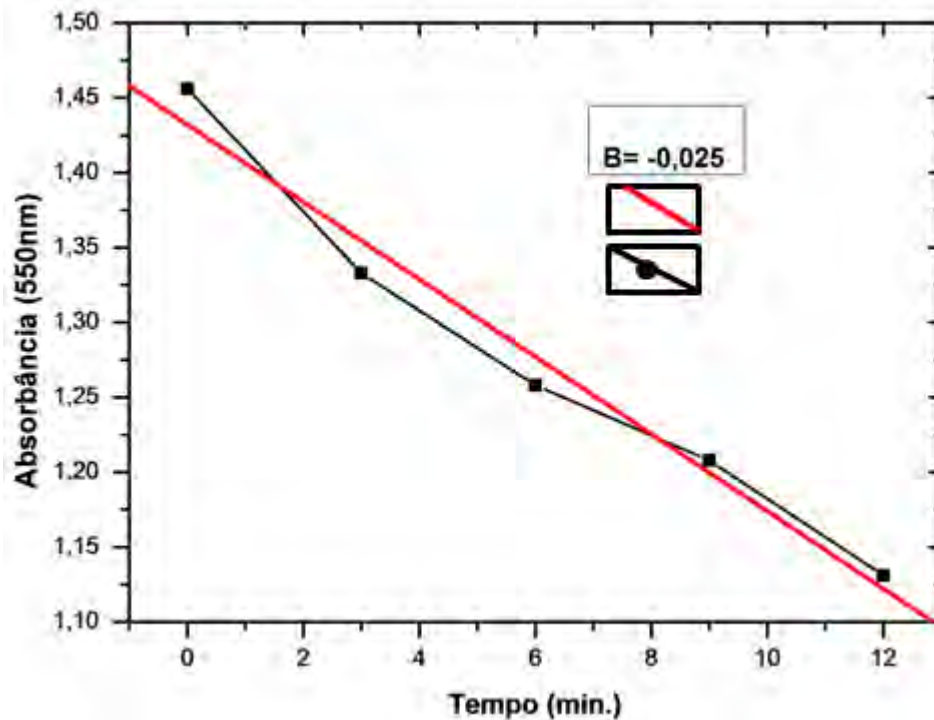


Figura 6.2 - Exemplo de cálculo de AE para uma fermentação nas seguintes condições experimentais: $t_f = 72$ h, agitação = 150 rpm, temperatura = 35⁰C.

Na Fig. 6.2 observa-se um exemplo de curva obtida para cada experimento, onde é obtido um coeficiente angular da curva experimental (β) (ABS/min.) para o cálculo da AE (Equação 6.2). Assim quanto mais inclinada à reta estiver em relação ao eixo das abscissas, para uma mesma escala, maior é a AE.

$$AE = 0,025 * 0,73 * 1.000 * 2 \quad (6.1)$$

Na equação, a AE corresponde a multiplicação de 0,025 (coeficiente angular da curva obtida experimentalmente), 0,73 (coeficiente angular da reta padrão (mmol.mL-1/ABS), 1000 (para transformar mmol para mmol), 2 (1 mL /0,5mL).

6.2. Ativação da cultura microbiana *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* (CGII) para a produção de CGTase

A pesquisa de novas cepas produtoras de CGTase é mais rápida se a atividade da enzima 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 microrganismos que produzem com maior seletividade altas concentrações de ciclodextrinas (MATIOLI, 2000).

Este experimento teve como objetivo observar se a cultura microbiana estocada em 2001 apresentava a capacidade de produzir halo em meio de cultura contido em placa de Petri, indicando a capacidade de produção de CGTase. A Tabela 6.1 mostra os resultados determinados para a cultura estocada.

Tabela 6.1- Ativação do microrganismo *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* estocado pela realização de subculturas em diferentes tempos de fermentação.

Tempo de fermentação (h)	Subculturas	Formação de halos
24	0	- - - -
56	7	+++++
120	5	+++++

Tempo de fermentação: 56 h, as subculturas realizadas de 8 em 8 h.

Tempo de fermentação: 120 h, as subculturas realizadas de 24 em 24 h.

Na Tabela 6.1 a formação de halos refere-se a observação após 24 h, sendo que nos tempos de 56 e 120 h a formação de halos foi de 100% nos cinco pontos onde realizou-se alçadas da cultura microbiana.

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).

Terminada a fase de ativação da cultura, esta foi cultivada em meio Nakamura e Horikoshi (1976) modificado, substituindo a fonte de carbono por polvilho. Observou-se que a cultura continuou produzindo halo com a troca da fonte de carbono, a qual cresceu em concentrações menores do polvilho como fonte de carbono (10 g/L) que a do meio original utilizando amido solúvel (20 g/L), conforme mostra a Tabela 6.2.

Tabela 6.2 - Ativação do microrganismo *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* em meio Nakamura e Horikoshi modificado.

Tempo de fermentação(h)	Subculturas	Formação de halos
24	0	- - - - -
56	7	+++++

Tempo de fermentação: 56 h, as subculturas foram realizadas de 8 em 8 h.

6.3. Planejamento experimental

A otimização dos parâmetros foi desenvolvida segundo um planejamento experimental. A falta deste muitas vezes, é a causa do insucesso de uma investigação, pois assim os resultados experimentais poderão não ser úteis para a elaboração de novos protocolos (ANDRIOLI, 2008). Obteve-se a otimização da AE por meio de valores ótimos de concentração da fonte de carbono (polvilho), das fontes de nitrogênio (extrato de levedura e triptona), do regulador de pH, carbonato de sódio (Na_2CO_3), da aeração e agitação.

6.3.1. Avaliação da produção da enzima ciclodextrina glicosiltransferase para o primeiro planejamento experimental das variáveis do meio de cultivo

Conforme descrito em material e métodos, definida a matriz do planejamento, foram realizados os experimentos e analisadas as respostas da AE. Nesta etapa foi realizada a otimização do processo de produção da enzima CGTase em relação às variáveis do meio de cultura: concentração de polvilho, concentração das fontes de nitrogênio e concentração de Na_2CO_3 .

A Tabela 6.3 apresenta em U/mL a atividade da enzima CGTase de cada experimento do planejamento experimental. Nestes resultados são observados os desvios padrões que mostram a variabilidade estatística dos resultados.

Tabela 6.3 - Resultados da Atividade enzimática em diferentes tempos de fermentação e condições experimentais das concentrações do meio de cultivo do primeiro planejamento experimental.

Exp.	Polvilho (g/L)	Fontes de nitrogênio (g/L)	Na ₂ CO ₃ (g/L)	AE (24 h)	AE (48 h)	AE (72 h)
1	7,5	7,5	10,0	20 ± 0,27	76,2 ± 1,46	96,0 ± 0,02
2	12,5	7,5	10,0	9,4 ± 0,8	30,2 ± 0,52	40,3 ± 0,06
3	7,5	12,5	10,0	10 ± 0,23	38,8 ± 0,41	61 ± 1,03
4	12,5	12,5	10,0	7,4 ± 0,11	10,4 ± 0,17	10,7 ± 0,43
5	7,5	7,5	20,0	13 ± 0,67	27,8 ± 0,08	43,2 ± 1,46
6	12,5	7,5	20,0	4 ± 0,63	15,7 ± 0,1	38,5 ± 0,34
7	7,5	12,5	20,0	8,3 ± 0,35	24,2 ± 1,81	42,8 ± 0,04
8	12,5	12,5	20,0	27 ± 0,08	62,1 ± 0,86	66,3 ± 0,42
9	5,8	10,0	15,0	15 ± 0,29	40,8 ± 1,19	66,1 ± 0,31
10	14,2	10,0	15,0	7,4 ± 0,24	31 ± 0,34	53,1 ± 0,02
11	10,0	5,8	15,0	13 ± 0,22	45,8 ± 0,84	66,9 ± 0,22
12	10,0	14,2	15,0	6 ± 0,18	20,6 ± 1,09	35,3 ± 0,88
13	10,0	10,0	7,0	19 ± 0,49	39,3 ± 0,23	68,4 ± 0,26
14	10,0	10,0	23,0	7,7 ± 0,3	27,8 ± 0,25	38,1 ± 0,78
15	10,0	10,0	15,0	8,5 ± 0,98	32,4 ± 0,74	45,8 ± 0,76
16	10,0	10,0	15,0	12 ± 0,03	34,7 ± 0,34	42,4 ± 0,41

Observou-se que a variação das concentrações de polvilho (Y_1), fontes de nitrogênio (Y_2) e Na₂CO₃ (Y_3) resultou numa variação de 4,0 para 96,1 U/mL [experimento 6 (24h) e 1 (72h)] de AE (Tabela 6.3). Tal comportamento foi observado nas concentrações médias dos ensaios e seus desvios que determinam a variabilidade estatística dos resultados, sendo que dez dos 16 ensaios apresentaram um desvio menor do que 15% (ensaios 1, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 16) nas primeiras 24 h. Para os ensaios realizados após 48 h apenas dois apresentaram um desvio superior a 15% (ensaios 7 e 12). Após 72 h apenas um ensaio apresentou desvio superior a 15% (ensaio 4). Portanto, a realização dos ensaios em duplicata mostra maior confiabilidade dos resultados. A diminuição dos desvios com o aumento do tempo pode ocorrer pelo fato da AE aumentar consideravelmente e as influências externas passarem a ter menor importância.

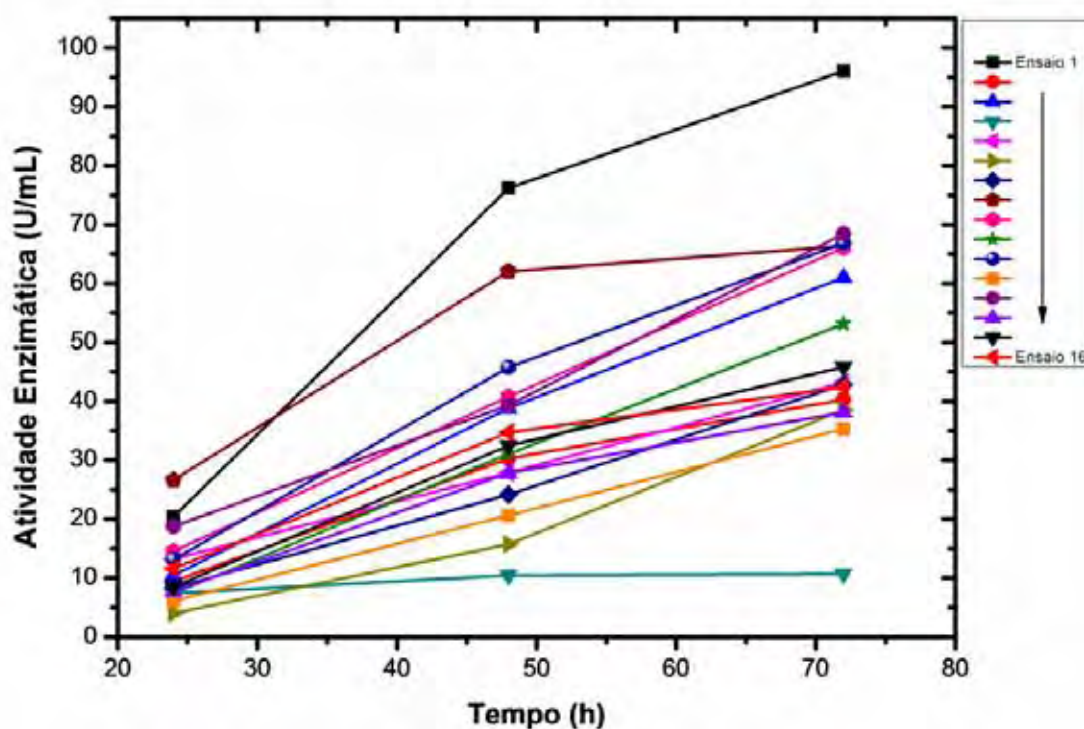


Figura 6.3 - Efeito do tempo de fermentação 24; 48 e 72 h na atividade enzimática nos 16 ensaios realizados em duplicata.

Devido a AE aumentar até 72 h de fermentação como é possível visualizar na Fig. 6.3. Foram realizados os ensaios 1, 2 e 3 em 96 h de fermentação (Tabela 6.4) e concluiu-se que os mesmos não houve aumento significativo com o aumento do tempo de fermentação de 72 para 96 h. Optando-se assim, pela realização das análises até 72 h.

Tabela 6.4 – Atividade enzimática em 96 h dos ensaios 1, 2 e 3 e seus respectivos desvios padrão realizados no primeiro planejamento experimental.

Ensaio	AE (96 h)
1	96,08 ±0,159
2	42,84 ±0,173
3	61,26 ±0,185

Os resultados obtidos das respostas analisadas no tempo de maior AE (72 h) são analisados por uma regressão múltipla, tendo como fatores, os termos isolados; as interações e os quadráticos das variáveis estudadas. Os efeitos de polvilho, fontes de nitrogênio e Na_2CO_3 foram inicialmente classificados usando fatorial 2^k , 6 pontos axiais e duas repetições no primeiro planejamento e os resultados (valores observados e preditos) foram relatados na Tabela 6.5.

Tabela 6.5 - Primeiro planejamento experimental e resultados (experimentais e preditos).

Experimentos	Variáveis			Atividade da CGTase (U/mL) (experimentais)	Atividade da CGTase (U/mL) (preditos)
	Y ₁	Y ₂	Y ₃		
1	0,75	0,75	1,00	96,07	102,96
2	1,25	0,75	1,00	40,26	47,31
3	0,75	1,25	1,00	61,02	58,30
4	1,25	1,25	1,00	10,70	19,50
5	0,75	0,75	2,00	43,18	38,71
6	1,25	0,75	2,00	38,52	45,56
7	0,75	1,25	2,00	42,80	40,08
8	1,25	1,25	2,00	66,34	63,77
9	0,58	1,00	1,50	66,07	69,95
10	1,42	1,00	1,50	53,13	43,11
11	1,00	0,58	1,50	66,86	59,12
12	1,00	1,42	1,50	35,29	36,90
13	1,00	1,00	0,66	68,44	58,61
14	1,00	1,00	2,34	38,13	41,83
15	1,00	1,00	1,50	45,80	44,64
16	1,00	1,00	1,50	42,39	44,64

Observou-se na Tabela 6.5 que a variação de Y₁, Y₂ e Y₃ resultou em uma diferença de 10,70 a 96,07 U/mL de atividade enzimática. Comparando os resultados verifica-se que o aumento na concentração de Y₁ de 5,8 para 14,2 g/L (experimentos 9 e 10), para valores fixos de Y₂ e Y₃ resulta na diminuição na AE em 20%. Com o aumento na concentração de Y₂ de 5,8 para 14,2 g/L (experimentos 11 e 12), para valores fixos de Y₁ e Y₃ ocorre uma redução na AE em 47,22%. Com o aumento na concentração de 5,8 para 23,4 g/L de Y₃ (experimentos 13 e 14), para mesmos valores de Y₁ e Y₂ ocorre a redução na AE em 44,4%.

A partir dos resultados obtidos para as respostas analisadas, efetuou-se, para cada uma das respostas, uma regressão múltipla no programa *Statistica 7.0*, tendo como fatores, os termos isolados, as interações e os quadráticos das três variáveis estudadas.

Após a realização da regressão múltipla, obteve-se a seguinte equação:

$$(6.1) \quad AE = 44,63 - 7,98Y_1 - 6,61Y_2 - 4,99Y_3 + 4,21Y_1Y_2 + 15,62Y_1Y_3 + 11,50Y_2Y_3 + 4,21Y_1^2 + 1,19Y_2^2 + 1,97Y_3^2$$

A Tabela 6.6 apresenta os resultados obtidos para regressão múltipla na AE.

Tabela 6.6 - Resultados da regressão múltipla para AE em 72 h fermentação do primeiro planejamento experimental.

Fatores	Parâmetros	Nível de significância (p)
Constante (β_0)	50,93778	0,000000
Y_1 (polvilho)	-7,98869	0,016934
Y_2 (fontes de nitrogênio)	-6,61202	0,040101
Y_1Y_3	15,62654	0,001460
Y_2Y_3	11,50614	0,010099
$R^2=0,787$	$F_c=10,16$	$F_t(4,11)=3,36$

A Tabela 6.6 mostra as variáveis que influenciam na AE. Analisando esta tabela verifica-se que a combinação de menores concentrações de polvilho e fontes de nitrogênio resultaram numa melhor produção de CGTase.

O coeficiente de correlação (R^2) de 0,80 indica um ajuste adequado dos dados experimentais na resposta da AE, mostrando que 80% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica proposta.

O resultado de F calculado (F_c) foi superior ao F tabelado (F_T) para um nível de significância de 5%. Esta comparação pode ser interpretada através de um teste

de hipótese. A hipótese de nulidade (H_0) diz que o modelo não é significativo, ou seja, todos os parâmetros são iguais a zero. A hipótese alternativa (H_1) afirma que o modelo é significativo. O resultado do teste F mostrou que se pode rejeitar H_0 no nível de significância de 5%, ou seja, tem-se uma confiança de 95% que o modelo é significativo. Esta análise foi extrapolada para as demais respostas obtidas neste planejamento experimental.

Nesta regressão foram eliminados os parâmetros com nível de significância do teste t de Student superiores a 5%, sendo as variáveis relacionadas a estes consideradas não relevantes. Assim, foram desprezados o termo isolado da concentração de carbonato de sódio (Y_3), os termos quadráticos das concentrações de polvilho (Y_1^2), fontes de nitrogênio (Y_2^2) e carbonato de sódio (Y_3^2) e a interação da concentração de polvilho/fontes de nitrogênio (Y_1Y_2). Após a eliminação dos parâmetros não significativos, conforme apresentado na Tabela 6.6, obteve-se a seguinte equação:

$$AE = 50,93 - 7,98Y_1 - 6,61Y_2 + 15,62Y_1Y_3 + 11,50Y_2Y_3 \quad (6.2)$$

Analisando esta equação, pode-se observar pelos coeficientes das variáveis Y_1 e Y_2 que as concentrações de polvilho e fontes de nitrogênio influenciaram mais significativamente na AE. Na Equação 6.2 observa-se que aumentando as concentrações das variáveis isoladas Y_1 e Y_2 a AE diminui. Contudo, se aumentarmos as concentrações das variáveis Y_1Y_3 e Y_2Y_3 aumenta-se AE.

Este fato pode ser confirmado pela comparação dos resultados de AE nos experimentos 10, 12 e 14 em que houve um aumento da AE de 20, 47 e 44% respectivamente, com a diminuição da concentração das variáveis: polvilho, fontes de nitrogênio e carbonato de sódio. Em relação ao experimento 1 observa-se que houve um aumento de AE de 147%, com a diminuição das concentrações das variáveis independentes em relação ao ponto central. O sinal negativo da variável Y_1 e Y_2 pode ser comprovado pela comparação dos resultados dos experimentos 9 e 11, respectivamente. Observa-se nos experimentos 11 e 12, que a concentração de carbonato de sódio não contribuiu significativamente para a variação na AE,

justificando a não inclusão desse termo na Equação 6.2 que apresenta o modelo ajustado.

Em geral, as informações existentes a cerca de produção enzimática tratam de processos conduzidos em condições variadas do meio de cultura. Ibrahim et al. (2004), em estudo desenvolvido em fermentador tipo shaker rotacional, para produção de CGTase obtiveram AE de 59,40 U/mL após 120 h de fermentação. Jemli et al. (2008), utilizando um sistema de fermentação por shaker rotacional, alcançaram AE de 35 U/mL para tempo de produção de 18 h.

Por outro lado, a AE da produção de CGTase por diferentes condições de operação resultou em 80,50 U/mL em farelo de trigo adicionado de farelo de mandioca pela linhagem E16 do *Bacillus* sp em 72 h de fermentação (ALVES-PRADO et al., 2002).

Pode-se notar que o tratamento das variáveis independentes realizado neste trabalho apresenta resultado superior aos obtidos por estes autores. É provável que, o fornecimento de nutrientes essenciais pelos substratos analisados foi suficiente para favorecer o crescimento do *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus*, porém com a otimização do processo de fermentação e com o estabelecimento de condições mais favoráveis ao metabolismo do microrganismo utilizado pode-se conseguir alcançar maiores percentuais de produção.

No entanto, os tratamentos das variáveis do processo de produção da enzima CGTase podem ser também vantajosos uma vez que apresentam baixo custo operacional em função de requererem menores concentrações de componentes do meio de cultivo. Logo, em termos da relação custo/benefício, a fonte de carbono do meio de cultivo utilizado poderá ser uma opção mais adequada, principalmente se maiores percentuais de AE forem alcançados, por meio de estudos que permitam otimizar as condições de processo.

Na Figura 6.4, nota-se que as respostas experimentais para AE apresentaram valores bem próximos aos fornecidos pela equação empírica, com $R=0,95$.

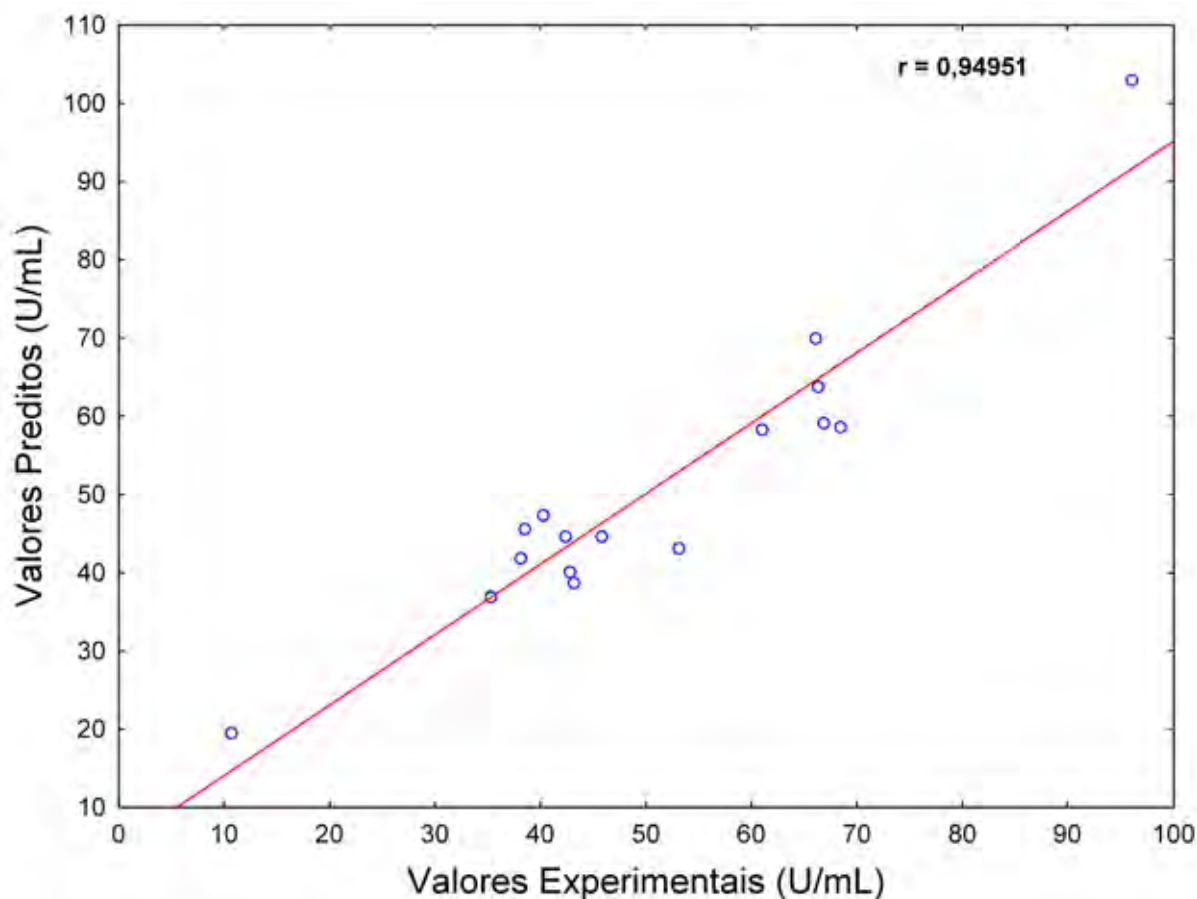


Figura 6.4 - Valores preditos em função dos valores experimentais de atividade enzimática referentes à equação geral 6.1 do primeiro planejamento experimental.

Como forma de ilustrar os efeitos das variáveis na produção de CGTase pela cultura contendo o *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* com relação à AE, estão apresentadas nas Figuras 6.5, 6.6 e 6.7 as superfícies de resposta relacionando as variáveis duas a duas com a resposta.

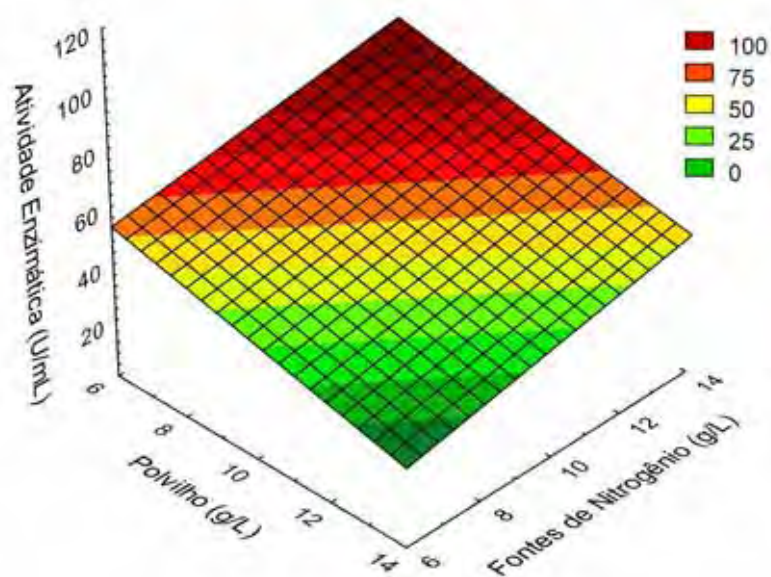


Figura 6.5 - Superfície de resposta para atividade enzimática em função das concentrações de polvilho e fontes de nitrogênio do primeiro planejamento à equação $50,93 - 7,98*((x-10)/2,5) + 6,61*((y-10)/2,5)$

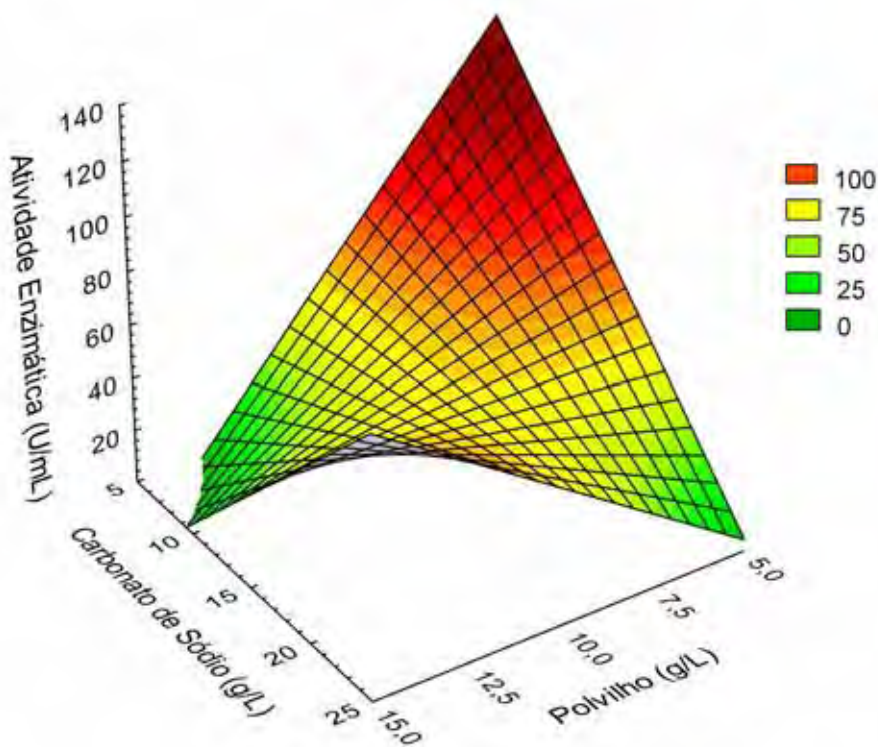


Figura 6.6 - Superfície de resposta para atividade enzimática em função das concentrações de polvilho e Na_2CO_3 do primeiro planejamento referente à equação $50,93 - 7,98*((x-10)/2,5) + 15,62*((x-10)/2,5)*((y-15)/5)$

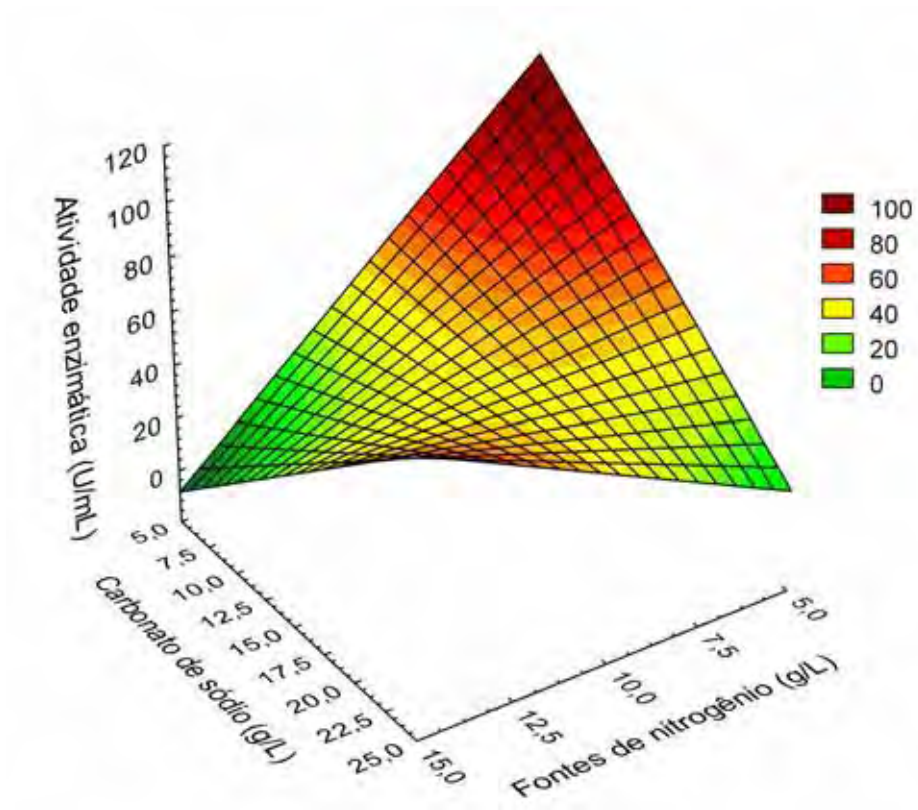


Figura 6.7 - Superfície de resposta para atividade enzimática em função das concentrações das fontes de nitrogênio e Na_2CO_3 referente à equação $50,93 - 6,61*((x-10)/2,5) + 11,50*((y-15)/5)*((x-10)/2,5)$

Mediante as superfícies de resposta (Figura 6.5, 6.6 e 6.7) geradas pela equação do modelo ajustado, conclui-se que o valor máximo da síntese de CGTase foi obtido a partir das extremidades das menores concentrações de polvilho, fontes de nitrogênio e Na_2CO_3 . Portanto, foi necessário verificar se para valores de concentração menores que 7,5 g/L de polvilho, 7,5 g/L de fontes de nitrogênio e 10,0 g/L de Na_2CO_3 a síntese de CGTase seria maior do que o valor obtido no primeiro planejamento experimental, portanto foi realizado o segundo planejamento experimental com estas concentrações da região ótima no ponto central.

6.3.2. Avaliação da produção da enzima ciclodextrina glicosiltransferase para o segundo planejamento experimental das variáveis do meio de cultivo

A realização do segundo planejamento foi importante para obtenção do ponto ótimo a partir da região ótima de AE encontrada nas curvas de superfície do planejamento. Definida uma nova matriz de planejamento, foram realizados os experimentos e analisadas as respostas de AE. Na Tabela 6.7, foram apresentados os resultados obtidos para AE para cada experimento do planejamento experimental nos tempos de 24, 48 e 72 h. Os valores obtidos nas análises em duplicata mostram a variabilidade estatística dos resultados.

Tabela 6.7 - Resultados da atividade enzimática em tempos de fermentação diferentes, nas condições de cada experimento.

Exp.	Polvilho (g/L)	Fontes de nitrogênio (g/L)	Na ₂ CO ₃ (g/L)	AE (24 h)	AE (48 h)	AE (72 h)
1	7,5	07,5	10,0	25,52 ± 0,51	45,17 ± 1,09	53,12 ± 0,42
2	12,5	07,5	10,0	10,77 ± 1,01	34,93 ± 0,13	36,88 ± 0,10
3	7,5	12,5	10,0	18,14 ± 0,04	43,06 ± 0,20	57,54 ± 0,87
4	12,5	12,5	10,0	3,98 ± 0,03	23,60 ± 0,31	44,26 ± 0,12
5	7,5	07,5	20,0	20,65 ± 0,18	31,52 ± 0,01	38,36 ± 0,05
6	12,5	07,5	20,0	23,60 ± 0,95	19,18 ± 0,17	20,65 ± 0,14
7	7,5	12,5	20,0	11,80 ± 0,4	52,89 ± 1,09	56,07 ± 1,59
8	12,5	12,5	20,0	10,32 ± 0,18	28,03 ± 0,13	36,88 ± 0,61
9	5,8	10,0	15,0	26,56 ± 0,19	59,02 ± 0,38	69,64 ± 0,82
10	14,2	10,0	15,0	4,42 ± 0,84	12,83 ± 0,59	48,25 ± 0,87
11	10,0	5,8	15,0	8,85 ± 0,06	27,95 ± 1,37	32,31 ± 0,16
12	10,0	14,2	15,0	2,95 ± 0,14	44,26 ± 0,21	67,87 ± 0,30
13	10,0	10,0	7,0	5,90 ± 0,13	54,59 ± 0,47	63,44 ± 0,62
14	10,0	10,0	23,0	14,75 ± 0,04	22,13 ± 0,84	37,62 ± 0,25
15	10,0	10,0	15,0	39,84 ± 0,04	54,59 ± 0,80	95,32 ± 0,27
16	10,0	10,0	15,0	29,51 ± 0,05	55,33 ± 0,47	97,38 ± 0,49

Observando a Tabela 6.7 nota-se que três ensaios apresentaram um desvio menor do que 15% nas primeiras 24 h (ensaios 2, 6 e 10) e nas medidas realizadas após 48 h (ensaios 10,11 e 14). Após 72 h todos os ensaios apresentaram desvio inferior a 15%. Analisando os desvios, a realização dos ensaios em duplicata mostra maior confiabilidade dos resultados. A diminuição dos desvios com o aumento do tempo pode ocorrer pelo fato da atividade AE aumentar consideravelmente e as influências externas passarem a ter menor importância.

De acordo com a Figura 6.8, verifica-se que o tempo de fermentação influencia na produção de CGTase dos 16 experimentos, com a melhor AE em 72 h.

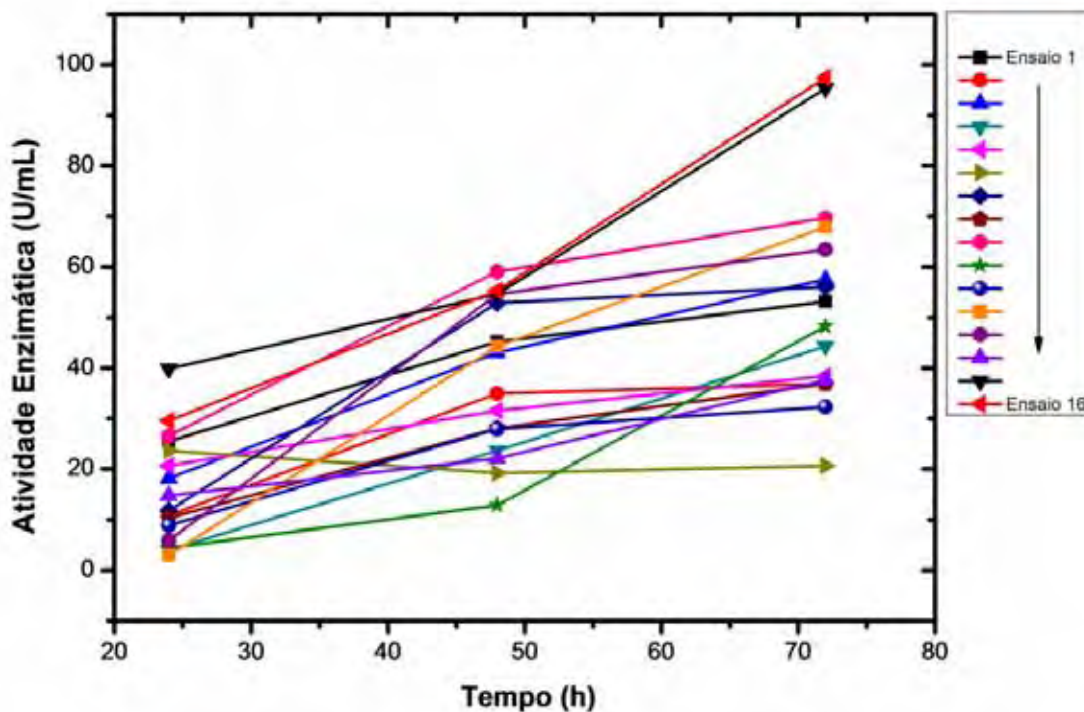


Figura 6.8 - Efeito do tempo de fermentação no segundo planejamento, nas seguintes condições experimentais: agitação = 150 rpm, temperatura = 35°C.

Os resultados obtidos no segundo planejamento experimental do planejamento composto central (PCC) a partir das variáveis estudadas: polvilho, fontes de nitrogênio e Na_2CO_3 no tempo de fermentação de 72 h, encontram-se na Tabela 6.8.

Tabela 6.8 - Segundo planejamento experimental e resultados (experimentais e preditos).

Ensaio	Variáveis (g/L)			AE (U/mL)	AE (U/mL)
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	(experimentais)	(preditos)
1	5,0	5,0	7,5	53,12	53,89
2	5,0	5,0	12,5	36,89	39,28
3	5,0	10,0	7,5	57,55	63,45
4	5,0	10,0	12,5	44,27	49,58
5	10,0	5,0	7,5	38,37	39,10
6	10,0	5,0	12,5	20,66	20,80
7	10,0	10,0	7,5	56,07	59,72
8	10,0	10,0	12,5	36,89	42,16
9	3,3	7,5	10,0	69,65	64,01
10	11,7	7,5	10,0	48,25	45,37
11	7,5	3,3	10,0	32,31	32,82
12	7,5	11,7	10,0	67,88	58,82
13	7,5	7,5	5,8	63,45	59,79
14	7,5	7,5	14,2	37,62	32,74
15	7,5	7,5	10,0	95,32	97,08
16	7,5	7,5	10,0	97,38	97,08

Em todas as condições testadas houve produção de CGTase, demonstrando a capacidade do *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* em utilizar polvilho como fonte de carbono e energia. No entanto, em função da condição, houve uma variação considerável da concentração final AE, de 20,66 a 97,38 U/mL. Comparando os resultados, verifica-se que o aumento na concentração Y₁ de 3,3 para 11,7 g/L (experimentos 9 e 10), para as diferentes proporções Y₂ e Y₃ estudadas, não provocou alteração significativa no aumento da AE. Tal comportamento foi confirmado para os ensaios realizados nas concentrações extremas de Y₂ (experimentos 11 e 12) e Y₃ (experimentos 13 a 16). Esses resultados demonstram a importância da otimização destas variáveis para intensificar a produção enzimática. É possível estabelecer na Tabela 6.8 que os processos fermentativos em condições do ponto central (7,5; 7,5; 10,) propiciaram a maior AE (97,38 U/mL).

Este comportamento já foi relatado por alguns autores (ZAIN et al., 2007; MAHAT et al., 2004; ROSSO et al., 2002) que demonstraram a importância de realizar o planejamento experimental com variações nas concentrações da fonte de carbono e nitrogênio para produção de CGTase. Rosso et al. (2002), Zain et al. (2007) e Mahat et al. (2004) obtiveram a máxima AE de 5,80 U/mL, 80,12 U/mL e 84,00 U/mL investigando as condições otimizadas de fontes de carbono e nitrogênio obtiveram condições otimizadas de 1,50, 3,30 e 1,48 % das fontes de carbono e 0,50, 0,13, 1,89 % das fontes de nitrogênio, respectivamente.

Em estudo de produção de CGTase empregando cultura de *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* foi observado que a fermentação em meio contendo extrato de levedura, peptona e polvilho doce apresentou melhor produção de CGTase (CUCOLO et al., 2006).

Os resultados apresentados na Tabela 6.8 mostram que a síntese de CGTase foi máxima nos ensaios 15 e 16 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.

Com a realização da regressão múltipla (*Statisc 7*), gerou-se a Equação geral (6.3) da síntese da AE.

$$AE = 97,08 - 5,55Y_1 + 7,72Y_2 - 8,04Y_3 + 2,76Y_1Y_2 - 0,92Y_1Y_3 - 0,184Y_2Y_3 - 14,99Y_1^2 - 18,12Y_2^2 - 17,96Y_3^2$$

(6.3)

A Tabela 6.9 apresenta os resultados obtidos dos efeitos significativos das variáveis estudadas, juntamente com o coeficiente de determinação (R^2) e o valor de F da distribuição de Fisher como resposta à produção da CGTase.

Tabela 6.9 - Regressão múltipla do segundo planejamento experimental.

Fatores	Parâmetros	Nível de significância(p)
Constante	97,0854	0,000000
Y₁(polvilho)	-5,5519	0,008845
Y₂(fontes de nitrogênio)	7,7289	0,001235
Y₃(Na₂CO₃)	-8,0420	0,000949
Y₁²	-14,9948	0,000041
Y₂²	-18,1245	0,000009
Y₃²	-17,9682	0,000010
R² = 0,975 F_C = 28,897 F_T (6,9) = 3,19		

A Tabela 6.9 mostra as variáveis que influem na AE. Constata-se que as variáveis isoladas e quadráticas influenciaram significativamente no processo. Os sinais dos coeficientes dessas variáveis indicam um ponto de máximo na produção de CGTase.

Nesta regressão foram eliminados os parâmetros com nível de significância do teste t de Student superiores a 5%, sendo as variáveis relacionadas a estes consideradas não relevantes. Assim, foram desprezadas as interações concentração de polvilho/fontes de nitrogênio, polvilho/carbonato de sódio e concentração de fontes de nitrogênio/carbonato de sódio.

Após a eliminação dos parâmetros não significativos, conforme apresentado na Tabela 6.9, obteve-se a seguinte equação:

$$AE = 97,08 - 5,55Y_1 + 7,72Y_2 - 8,04Y_3 - 14,99Y_1^2 - 18,12Y_2^2 - 17,96Y_3^2 \quad (6.4)$$

Analisando a Equação 6.4 observa-se que aumentando as concentrações das variáveis isoladas Y₁ e Y₃ a AE diminui e aumentando a concentração da variável isolada Y₂ a AE aumenta. Contudo, se diminuir as concentrações das variáveis Y₁², Y₂² e Y₃² aumenta-se AE.

O coeficiente de correlação (R^2) de 0,97 indica um ajuste adequado dos dados experimentais na resposta da AE, mostrando que 97 % da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica proposta.

O resultado de F calculado (F_c) foi superior ao F tabelado (F_T) para um nível de significância de 5%. Esta comparação pode ser interpretada através de um teste de hipótese. A hipótese de nulidade (H_0) diz que o modelo não é significativo, ou seja, todos os parâmetros são iguais a zero. A hipótese alternativa (H_1) afirma que o modelo é significativo. O resultado do teste F mostrou que se pode rejeitar H_0 no nível de significância de 5%, ou seja, tem-se uma confiança de 95% que o modelo é significativo. Esta análise foi extrapolada para as demais respostas obtidas neste planejamento experimental.

A Figura 6.9 mostra a distribuição dos valores preditos em função dos experimentais. Os valores experimentais ficaram próximos dos preditos ($R=0,98$), levando a confiabilidade dos dados.

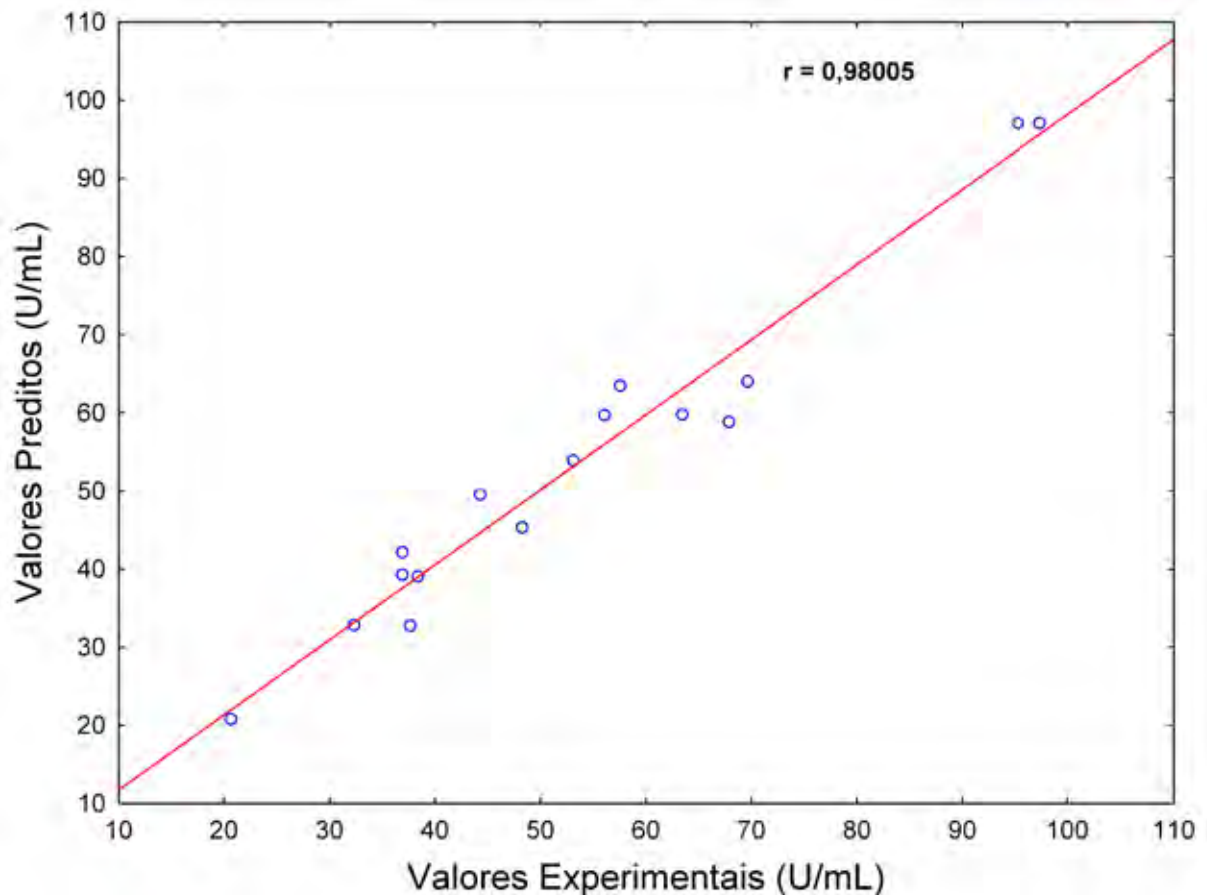


Figura 6.9 - Valores preditos em função dos experimentais de atividade enzimática referentes à equação geral 6.3 do segundo planejamento experimental.

Na Figura 6.9, nota-se que as respostas experimentais para AE apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação empírica.

A partir da equação completa (6.3) foi utilizado um algoritmo de otimização, implementado no *software Maple Reader 11*, para calcular as coordenadas do ponto estacionário para a produção de CGTase, são elas: $Y_1 = 0,696$, $Y_2 = 0,807$ e $Y_3 = 0,945$. No ponto estacionário as coordenadas Y_1 , Y_2 e Y_3 estão dentro da região experimental.

O λ 's referentes à produção de CGTase indicaram que esta resposta possui ponto de máximo, pois $\lambda_1 = -14,51$, $\lambda_2 = -18,54$ e $\lambda_3 = -18,01$ apresentam sinais iguais e negativos.

Calcularam-se os valores de Y_1 , Y_2 e Y_3 correspondentes à maximização da resposta para a produção de CGTase, empregando o *software Maple Reader 11*. Determinado o ponto ótimo em variáveis codificadas $Y_1 = -0,2128$, $Y_2 = 0,2281$ e $Y_3 = 0,2195$, utilizou-se as Equações de codificação 5.6, 5.7, 5.8 e obteve-se valores reais ótimos para as variáveis: Y_1 , Y_2 (50% de extrato de levedura e 50% de triptona) e Y_3 .

O meio otimizado para produção de CGTase nos processos fermentativos foi idealizado com base no meio descrito por Nakamura e Horikoshi (1976), sendo substituída a fonte de carbono de amido solúvel comercial por polvilho, e otimizado os valores das concentrações de polvilho (Y_1), das fontes de nitrogênio (Y_2) e de carbonato de sódio (Y_3) cuja composição está apresentada na Tabela 6.10.

Tabela 6.10 - Composição do meio de cultura otimizado para a produção do microrganismo *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus*.

Componentes	Concentração (g/L)
Polvilho (<i>in natura</i>)	6,960
Triptona	4,035
K ₂ HPO ₄	1,000
*Carbonato de sódio (Na ₂ CO ₃)	9,450
Extrato de levedura	4,035
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,200
Agar bacteriológico	20,000
Fenolftaleína	0,300
Metilorange	0,100

Esterilização por calor úmido (120°C) à 1 atm/15 min.

pH do meio ajustado em 9,2.

* Esterilizado separadamente.

Com o intuito de obter uma melhor visualização do efeito das variáveis independentes sobre a AE foram construídas superfícies de resposta. As superfícies estão apresentadas nas Figuras 6.10, 6.12, 6.14 e as curvas de contorno 6.11, 6.13 e 6.15.

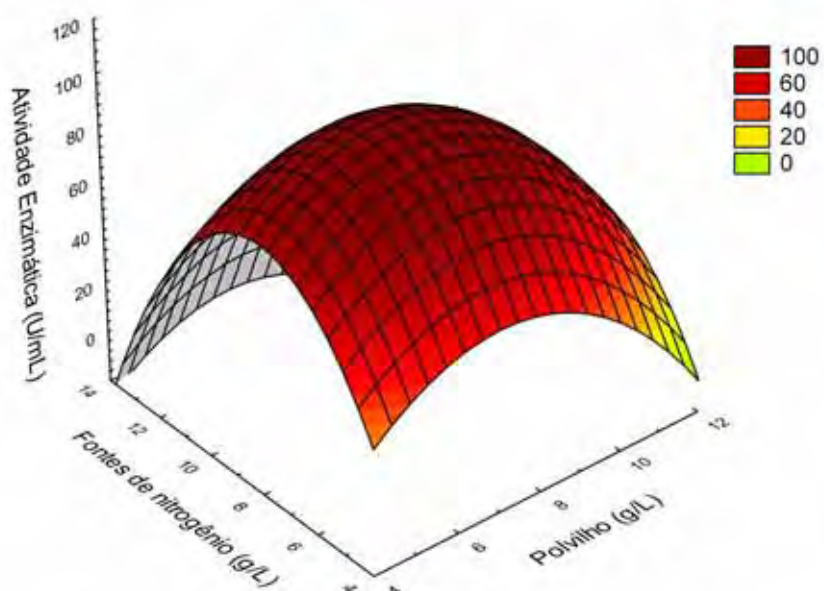


Figura 6.10 – Superfície de resposta para atividade enzimática em função de polvilho e fontes de nitrogênio no segundo planejamento referente à equação $97,08 - 5,55*((x-7,5)/2,5) + 7,72*((y-7,5)/2,5) - 14,99*((x-7,5)/2,5)^2 - 18,12*((y-7,5)/2,5)^2$

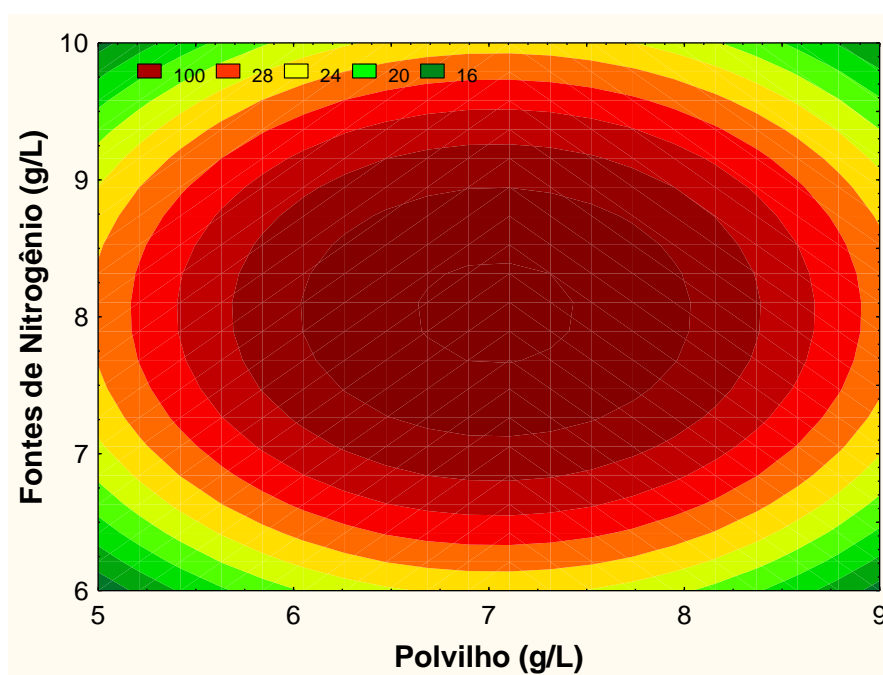


Figura 6.11 - Curva de contorno para a resposta atividade de CGTase em função da concentração de polvilho e fontes de nitrogênio referente à equação $97,08 - 5,55*((x-7,5)/2,5) + 7,72*((y-7,5)/2,5) - 14,99*((x-7,5)/2,5)^2 - 18,12*((y-7,5)/2,5)^2$

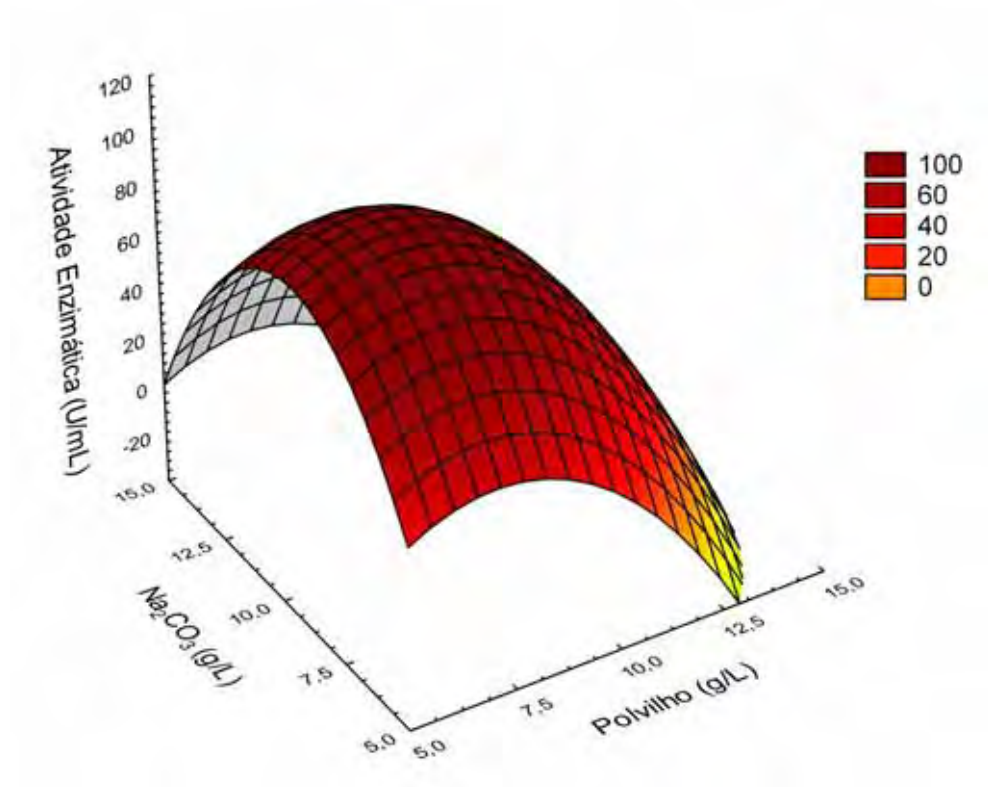


Figura 6.12 - Superfície de resposta para atividade enzimática em função de polvilho e Na_2CO_3 no segundo planejamento referente à equação $97,08 - 5,55 \cdot ((x-7,5)/2,5) - 8,04 \cdot ((y-10)/2,5) - 14,99 \cdot ((x-7,5)/2,5)^2 - 17,96 \cdot ((y-10)/2,5)^2$

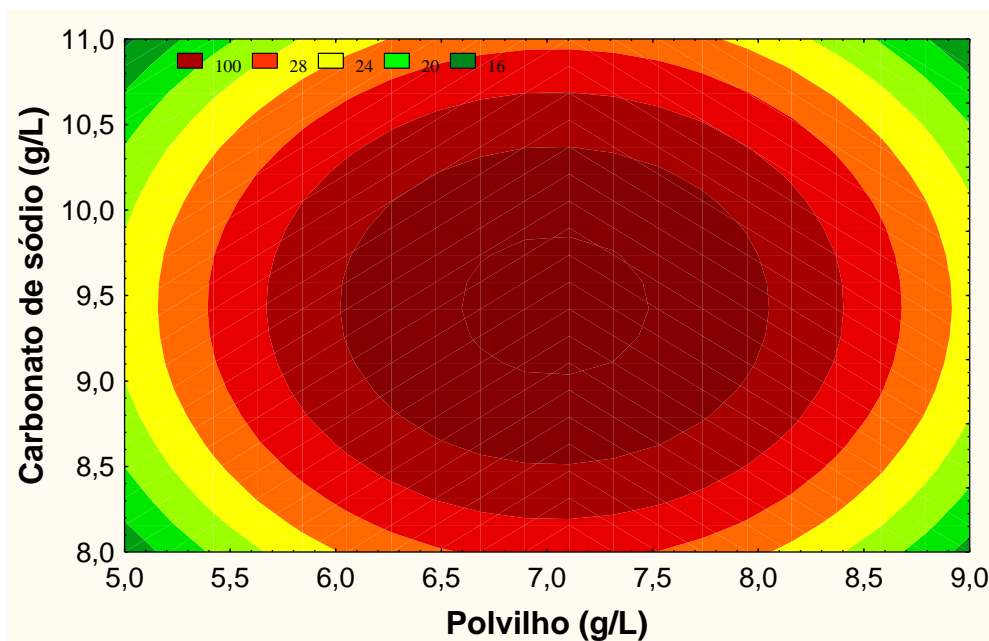


Figura 6.13 - Curva de contorno para a resposta atividade de CGTase em função da concentração de polvilho e carbonato de sódio referente à equação $97,08 - 5,55 \cdot ((x-7,5)/2,5) - 8,04 \cdot ((y-10)/2,5) - 14,99 \cdot ((x-7,5)/2,5)^2 - 17,96 \cdot ((y-10)/2,5)^2$

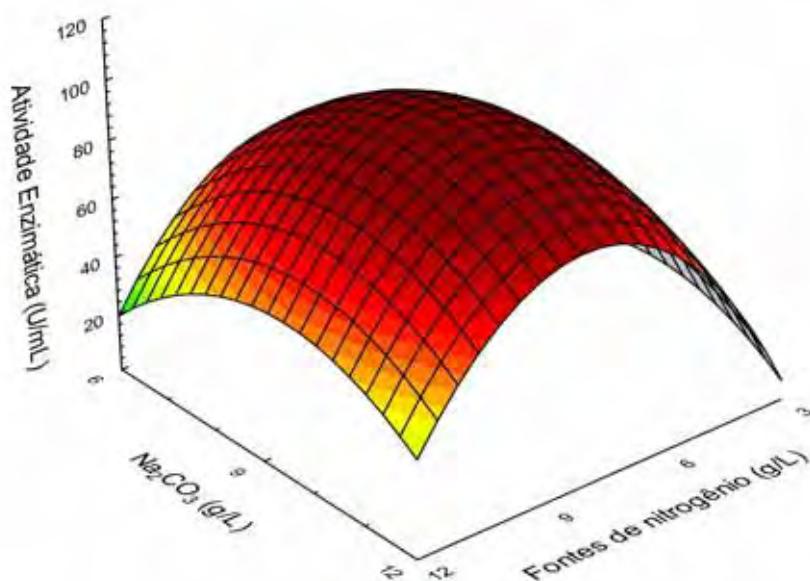


Figura 6.14 - Superfície de resposta para atividade enzimática em função de fontes de nitrogênio e Na_2CO_3 no segundo planejamento referente à equação $97,08+7,72*((x-7,5)/2,5)-8,04*((y-10)/2,5)-18,12*((x-7,5)/2,5)^2-17,96*((y-10)/2,5)^2$

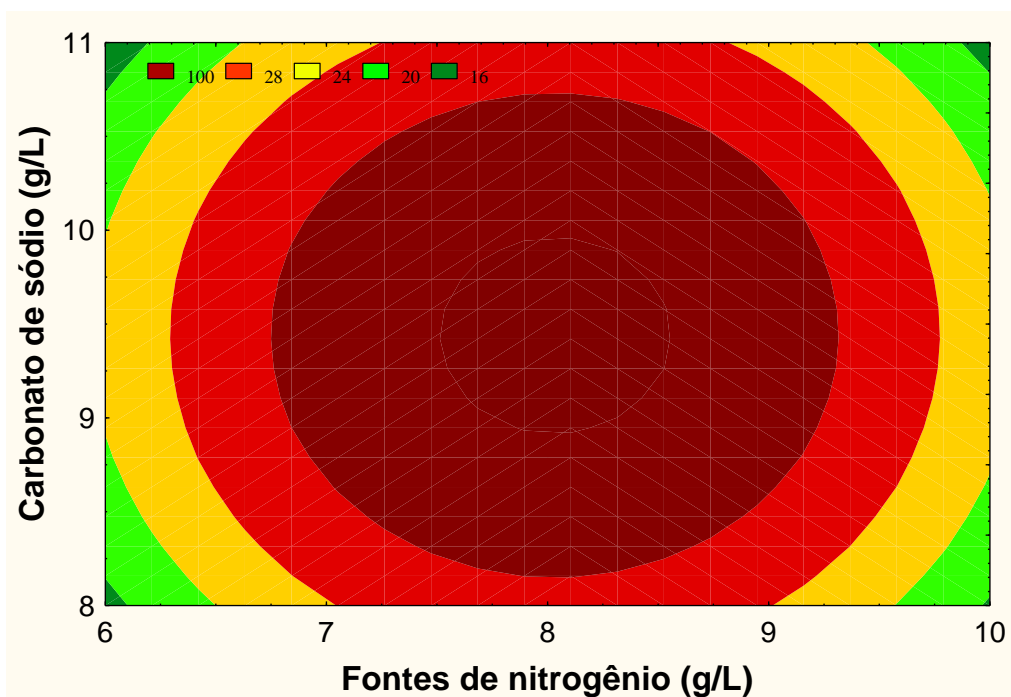


Figura 6.15 - Curva de contorno para a resposta atividade de CGTase em função das fontes de nitrogênio e carbonato de sódio referente à equação $97,08+7,72*((x-7,5)/2,5)-8,04*((y-10)/2,5)-18,12*((x-7,5)/2,5)^2-17,96*((y-10)/2,5)^2$

Constata-se nas Figuras 6.10 e 6.12 e 6.14 que a região de maior de produção de CGTase estão localizadas próximas ao ponto central do planejamento, sendo que os pontos ótimos encontrados para as concentrações de polvilho, fontes de nitrogênio e Na_2CO_3 são 6,96, 8,07 e 9,45 g/L, respectivamente. Constata-se nas Figuras 6.11, 6.13 e 6.15 que a faixa ótima para se trabalhar no processo fermentativo para produção de CGTase encontra-se entre 6,0 a 8,5 g/L de polvilho 7,0 a 9,0 g/L das fontes de nitrogênio e 9,0 e 1,0 de carbonato de sódio.

A partir dos valores codificados das variáveis: polvilho, fontes de nitrogênio e Na_2CO_3 (ponto ótimo), realizou-se ensaios em triplicata (Tabela 6.11) obtendo maior valor experimental de 98,86 U/mL para AE, muito próximo ao valor teórico calculado de 98,87.

Tabela 6.11 - Ensaios de AE para o ponto ótimo das concentrações de polvilho de 6,96 g/L, fontes de nitrogênio de 8,07 g/L e carbonato de sódio de 9,45 g/L.

Ensaios	24 h	48 h	72 h
A	18,29	55,18	85,58
B	24,20	64,33	98,86
C	25,23	63,74	64,33

A, B e C: Ensaios em triplicata

6.3.3. Avaliação da produção da enzima ciclodextrina glicosiltransferase em biorreator para as variáveis agitação e aeração

Nesta etapa foi realizada a otimização do processo de produção em relação às variáveis: aeração e agitação. Com o objetivo de selecionar o tempo de maior produção de CGTase foi avaliado a AE nos tempos de fermentação 24, 48 e 72 h como representado no Figura 6.16.

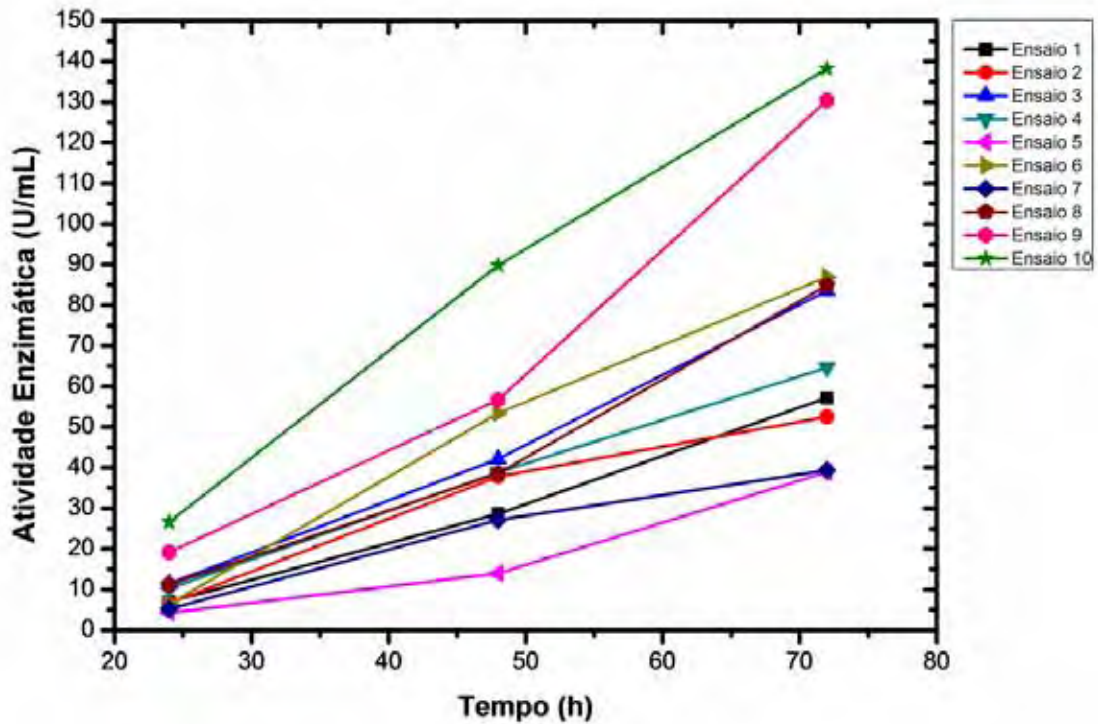


Figura 6.16 - Efeito do tempo de fermentação para aeração e agitação na produção de CGTase, nas seguintes condições experimentais: agitação = 150 rpm, temperatura = 35°C.

Os maiores resultados obtidos das respostas analisadas de AE foram ao tempo de 72 h de fermentação, portanto os resultados obtidos até 72 h são analisados em uma regressão múltipla, tendo como fatores, os termos isolados (Z_1 ; Z_2); a interação (Z_1/Z_2) e os quadráticos (Z_1^2 ; Z_2^2) das variáveis estudadas.

Os efeitos da agitação e aeração foram inicialmente classificados usando fatorial 2^k , 4 pontos axiais e duas repetições mostrada na tabela 6.11, onde é mostrado os resultados obtidos dos 10 experimentos realizados em biorreator no tempo de 72 h de fermentação de acordo com o delineamento composto central adotado.

Tabela 6.12 - Resultados da atividade enzimática de diferentes condições experimentais de agitação e aeração após 72 h de fermentação em biorreator.

Experimento	Aeração(vvm)	Agitação(rpm)	Atividade Enzimática (U/mL)
1	1,50	100	57,16
2	1,50	200	52,48
3	2,50	100	83,52
4	2,50	200	64,68
5	1,29	150	38,92
6	2,70	150	86,88
7	2,00	79,5	39,36
8	2,00	220,5	84,84
9	2,00	150	130,36
10	2,00	150	138,22

Observou-se na Tabela 6.12 que o aumento da AE está relacionado não somente ao aumento da taxa de aeração, mas também ao aumento da velocidade de agitação. É ainda possível estabelecer que os processos fermentativos conduzidos nas condições do ponto central (2 vvm; 150 rpm) propiciaram a produção de maiores quantidades de CGTase (114,68 U/mL e 108,22 U/mL).

O suprimento de oxigênio freqüentemente é limitante para a atividade de microrganismos aeróbicos, devido à baixa solubilidade de oxigênio em meio aquoso. Assim, pode-se concluir que, dentro da faixa estudada de aeração dos pontos axiais de 1,29 e 2,70 vvm apresentam menores AE que as do ponto central (1,50vvm) que apresentou maior produção de CGTase.

Para Peters et al. (1989) o efeito benéfico no aumento da agitação foi atribuído por reduzir a viscosidade do caldo fermentado, aumentando a transferência de nutrientes e oxigênio necessários para produção enzimática. Assim, pode-se concluir que, no ensaio 7 (79,50 rpm) apresenta menor valor de AE (39,36 U/mL).

Com execução da regressão múltipla no *software* Statistic 7.0, obteve-se a equação completa (6.5) para a produção de CGTase:

$$AE = 134,29 + 13,29Z_1 + 5,099Z_2 - 3,54Z_1Z_2 - 35,20Z_1^2 - 35,60Z_2^2 \quad (6.5)$$

A Tabela 6.13 apresenta os resultados obtidos dos efeitos significativos das variáveis estudadas, juntamente com o coeficiente de determinação (R^2) como resposta à produção de CGTase.

Tabela 6.13 - Regressão múltipla para a produção de CGTase no terceiro planejamento.

Fatores	Parâmetros	Nível de significância (p)
Constante	111,452	0,000684
Z ₁ (aeração)	132,982	0,085906
Z ₂	5,099	0,435408
Z ₁ Z ₂	-3,540	0,692704
Z ₁ ²	35,600	0,037412
Z ₂ ²	36,200	0,035585
R² = 0,910		

O coeficiente de correlação (R^2) de 0,91, indica um ajuste adequado dos dados experimentais na resposta produção de CGTase, frente à equação empírica proposta. A determinação dos parâmetros significativos foi realizada por meio de um teste de hipótese utilizando um *t* de *Student* com nível de significância de 10%.

Na Tabela (6.13) foram eliminadas as variáveis com nível de significância superior a 10%. Assim foi desprezada a variável isolada Y_2 e a interação das variáveis Y_1Y_2 . Após a eliminação dos parâmetros não significativos, gerou-se a Equação ajustada (6.6).

$$AE = 134,29 + 13,29Z_1 - 35,20Z_1^2 - 35,60Z_2^2 \quad (6.6)$$

Analisando a Equação 6.6 observa-se que aumentando a concentração da variável isolada Z_1 a AE aumenta. Contudo, se aumentarmos as concentrações das variáveis quadráticas Z_1^2 e Z_2^2 a AE diminui.

A Figura 6.17 mostra a distribuição dos valores preditos em função dos experimentais. Observa-se que a distribuição dos valores experimentais ficou próxima dos preditos, levando a uma tendência, constante e à distribuição normal dos mesmos, apresentando um coeficiente de correlação de 0,95.

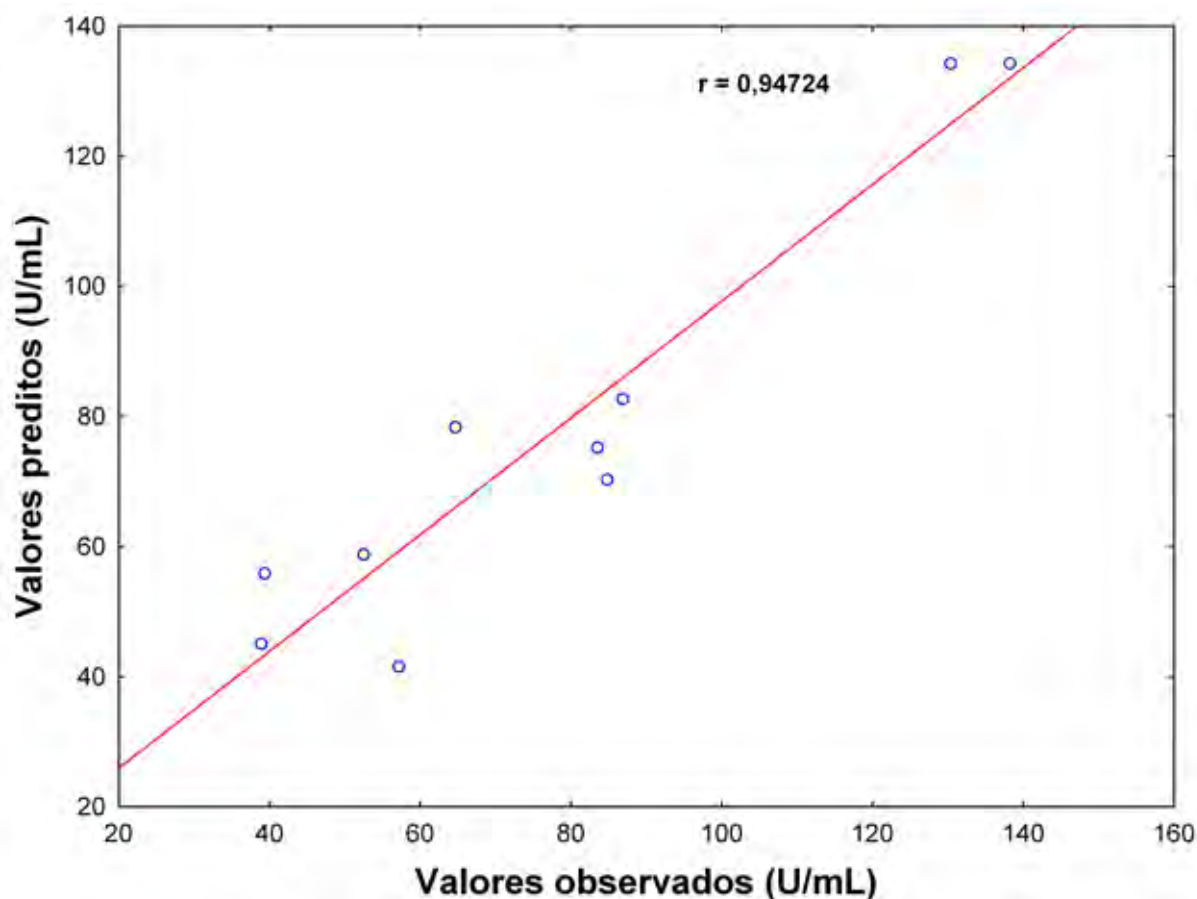


Figura 6.17 - Valores preditos em função dos observados de atividade enzimática referentes à equação 6.5 do terceiro planejamento experimental.

A partir da equação completa (6.5) foi utilizado um algoritmo de otimização, implementado no software Maple Reader 11, para calcular as coordenadas do ponto estacionário para a produção de CGTase, são elas: $Z_1 = 2,18$, $Z_2 = 157,07$. No ponto estacionário as coordenadas Z_1 , Z_2 estão dentro da região experimental.

O λ 's referentes à produção de CGTase indicaram que esta resposta possui ponto de máximo, pois $\lambda_1 = -34,80$ e $\lambda_2 = -35,89$ apresentam sinais iguais e negativos.

Calculou-se os valores de Z_1 , Z_2 correspondentes à maximização da resposta para a produção de CGTase, empregando o software Maple Reader 11. Determinado o ponto ótimo em variáveis codificadas $Z_1 = -0,1852$, $Z_2 = 0,0707$, utilizou-se as equações de codificação 6.9, 6.10 obtendo-se os valores reais para as variáveis: Z_1 (2,18 vvm de aeração), Z_2 (157,07 rpm de agitação).

Com o intuito de obter uma melhor visualização do efeito das variáveis independentes sobre a AE foi construída a superfície de resposta que está apresentada na superfície de resposta (Fig. 6.18) e sua respectiva curva de contorno (Fig. 6.19).

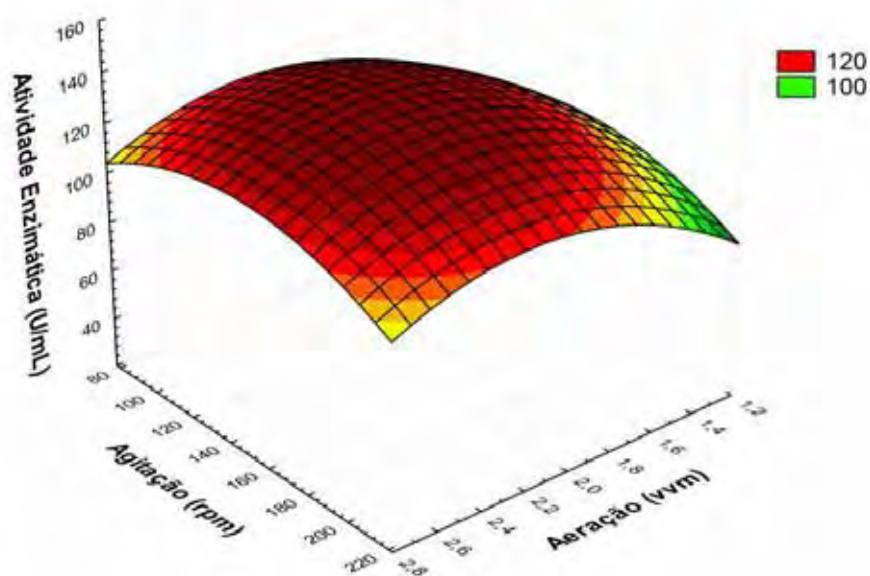


Figura 6.18 - Superfície de resposta para atividade enzimática em função de agitação e aeração no planejamento experimental realizado em biorreator referente à equação $134,29 + 13,29*((x-2)/1) - 35,20*((x-2)/1)^2 - 35,60*((y-150)/100)^2$

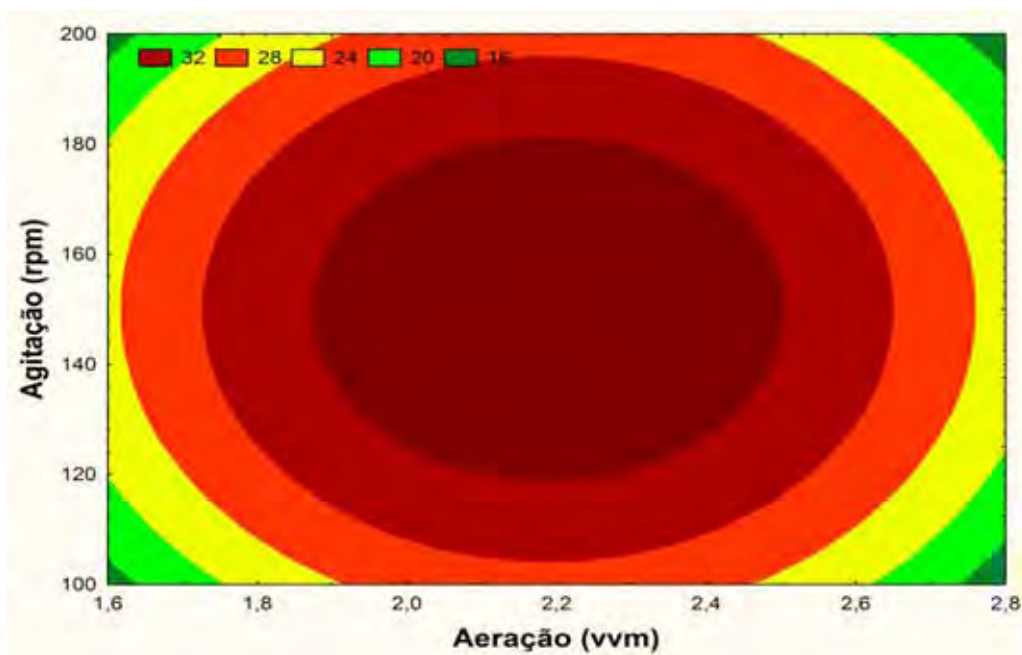


Figura 6.19 - Curva de contorno para a resposta atividade de CGTase em função da aeração e agitação referente à equação $134,29 + 13,29*((x-2)/1) - 35,20*((x-2)/1)^2 - 35,60*((y-150)/100)^2$

Por meio da superfície de resposta (Figura 6.18) gerada pela equação do modelo ajustado (6.6), conclui-se que o valor máximo de CGTase encontra-se na região do ponto central, sendo que os pontos ótimos encontrados para aeração e agitação são 2,18 vvm, 157,07 rpm, respectivamente. Quanto às curvas de contorno (Fig. 6.19), a faixa ótima de aeração encontra-se entre 2,0 a 2,4 vvm e para a velocidade de agitação entre 130 a 170 rpm.

O maior valor experimental de 130,36 U/mL para AE do ponto central foi muito próximo ao valor teórico calculado de 130,33 U/mL.

7. CONCLUSÕES:

Os dados obtidos permitem sugerir que:

- ✓ Os resultados indicaram a potencialidade do emprego do polvilho como substrato para fermentação na produção de CGTase, utilizando o microrganismo *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus*.
- ✓ 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 polvilho, fontes de nitrogênio e carbonato de sódio.
- ✓ As variações das concentrações de polvilho, fontes de nitrogênio e Na_2CO_3 foram significativas na produção da enzima. Segundo o modelo ajustado, as condições ótimas de produção foram: 6,96 g/L de polvilho, 8,07 g/L das fontes de nitrogênio e 9,45 g/L de Na_2CO_3 .
- ✓ O valor experimental da atividade enzimática de 98,86 U/mL 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 (95,31 e 97,38, respectivamente), pois as variáveis do ponto de ótimo estão próximas ao ponto central.
- ✓ As variações da taxa de aeração e velocidade de agitação foram significativas na produção de CGTase. As condições ótimas de produção foram: 2,18 vvm de aeração e 157,07 rpm de agitação. A atividade enzimática obtida no ponto central (130,36 U/mL e 138,22 U/mL, respectivamente) é concordante com o valor teórico calculado de 130,33 indicando que a metodologia estatística utilizada é adequada.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Sabe-se por testes laboratoriais que antecederam este estudo que a linhagem de *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* mantém-se ativa na faixa de pH (8 a 10) e temperatura (35 a 37 °C) e que o mesmo influencia significativamente na produção de CGTase. Em virtude disso, propõe-se realizar ensaios no reator, variando o pH em 8, 9 e 10 e temperatura em 35, 36 e 37 mantendo-se constante as demais variáveis (componentes do meio de cultivo, agitação e aeração). Este estudo poderá ser realizado nas condições operacionais otimizadas.

2. Neste estudo foi determinada a importância do uso da fonte de carbono alternativa no meio de cultivo (1° e 2° planejamento), para produção de CGTase por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus*. Assim, pode-se testar outras fontes de amido, como o sorgo, que não é descrito na literatura para produção de CGTase. Poderá ser mantidas as condições operacionais selecionadas anteriormente, e estas fontes serão testadas na mesma concentração do polvilho otimizado.

3. Determinar a cinética de consumo de substrato durante as 72 horas de processo fermentativo.

4. Produção da ciclodextrina pela enzima e encontrar novas aplicações para a ciclodextrina produzida.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAM. Mandioca: a raiz do sucesso. Disponível em: <http://www.abam.com.br/revista/revista5/raiz_sucesso.php> Acesso em: 25 mar. 2009.

ABDEL-SHAFI, A. A.; AL-SHIHRY. S. S. Fluorescence enhancement of 1-naphthol-5-sulfonate by forming inclusion complex with β -cyclodextrin in aqueous solution. **Spectrochim. Acta A.**, v. 72, p. 533 – 537, 2009.

AGUIAR, C. L. Ciclodextrina glicosiltransferase, produção, ação e aplicação. **CEPPA**, v. 19, p. 119-138, 2001.

AIME, S.; GIANOLIO, E.; ARENA, F.; BARGE, A.; MARTINA, K.; HEROPOULOSC, G. CRAVOTTO, G. New cyclodextrin dimers and trimers capable of forming supramolecular adducts with shape-specific ligands. **Org. Biomol. Chem.**, v. 7, p. 370 – 379. 2009.

ALVES-PRADO, H. F.; GOMES, E.; SILVA, R. Seleção de microrganismos produtores de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produção e caracterização da enzima. **Braz. J. Food Technol.**, v. 5, p.189-196, 2002.

ANDRIOLI, W. J. **Otimização das condições de cultivo de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, visando produção e isolamento de metabólitos secundários biologicamente ativos.** 2008. 113f. Dissertação (Mestrado em ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

ANVISA. Resolução - CNNPA nº 12, de 1978: Amidos e féculas. Disponível em: <http://www7.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78_amidos.htm>. Acesso em: 20 out. 2008.

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

ASTRAY, G. MEJUTO, J.C.; RIAL-OTERO, R.; GONZALEZ-BAREIRO, C.; SIMAL-GANDARA, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. A ser publicado pela **Food Hydrocolloid.**, 2009.

AVCI, A.; DONMEZ, S. A novel thermophilic anaerobic bacteria producing cyclodextrin glycosyltransferase. **Process Biochem.**, 2009.

BHOSALE, S. V. β -Cyclodextrin as a Catalyst in Organic Synthesis. **Mini-Reviews in Org. Chem.**, v. 4, p. 231-242, 2007.

BIWER, A.; ANTRANIKIAN, G.; HEINZLE, E. Enzymatic production of cyclodextrins. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 59, p. 609-617, 2002.

BORZANI, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; SCHIMIDELL, W. Engenharia bioquímica. 1 ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2001

BRITTO, M. A. F. O.; NASCIMENTO JR, C. S.; SANTOS H. F. Análise estrutural de ciclodextrinas: Um Estudo Comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. **Quim. Nova**, v. 27, p. 882-888, 2004.

BUCKLAND, B. C. The Translation of Scale in Fermentation Processes: The Impact of Computer Process Control. **Bio Technology**, v. 2, p. 875 – 883, 1984.

CAIRA, M. R.; BETTINETTI, G.; SORRENTI, M.; CATENACCI, L.; CRUICKSHANK, D.; DAVIES, K. Effect of peracetylation on the conformation of γ -cyclodextrin. **Chem. Commun.**, p.1221 - 1223, 2007.

CENTINI, M.; MAGGIORE M.; CASOLARO, M.; ANDREASSI, M. FACINO, R. M.; ANSELMI, C. Cyclodextrins as cosmetic delivery systems. **J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.**, v. 57, p. 109-112, 2007.

CHO, S. H, KIM, S. Y, LEE S. I, LEE Y. M. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes for transdermal delivery: preparation, inclusion properties, stability, and release behavior. **J. Ind. Eng. Chem.**, v.12, p. 50-59, 2001.

COMMISSION DECISION: Authorising the placing on the market of alpha-cyclodextrin as a novel food ingredient under regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council. Disponível em: <http://www.fsai.ie/legislation/food/eu_docs/Novel_Foods_and_Ingredients/Dec2008>. Acesso em: 13 dez. 2008.

CORTÉZ, G.; TRUJILLO-ROLDÁN, M.A.; RAMÍREZ, O.T.E.; GALINDA, E. Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* under oscillating dissolved oxygen tension. **Process Biochem.**, p.773-778, 2005.

CROFT, A. P.; BARTSCH, R. A. Synthesis of chemically modified cyclodextrins. **Tetrahedron**, v. 39, p. 1417-1474, 1983.

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

FILHO, A. B.; ALMEIDA, J.E.M.; FRANKLIN, C.; LEITE, L.G.; ALVES, L.F.A. Efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de *Sporothrixinsectorum* em fermentação líquido aeróbica. **Arq. Inst. Biol.**, v.70, p.491-496, 2003.

GOMES, Z. M. A. C. S.; FREITAS F. L. M.; FURTADOB R. A. A. L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **CEPPA**, v. 19, 2001.

DAIUTO E, R., M. P. CEREDA, L. J. C. B. CARVALHO. Características e Propriedades do Amido Extraído de Camadas do Tecido da Raiz de Mandioca cv. Mico (*Manihot esculenta* Crantz). **Braz. J. Food Technol.**, v.5, p.217-223, 2002.

DANESI, E. D. G.; MIGUEL, A. S. M; RANGEL-YAGUI, C. O; CARVALHO, J. C. M; PESSOA-JR, A 2005 Effect of carbon: nitrogen ratio (C:N) and substrate source glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Food Eng.**, v.75, p.96-103, 2006.

DEVOR, R.E.; CHANG, T.; SUTHERLAND, J.W. Statistical quality design and control – Contemporary concepts and methods. New Jersey, Prentice Hall, p.503-744, 1992.

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

DODZIUK, H. Cyclodextrins and their complexes: chemistry, analytical methods, applications. Warsaw: WILEY-VCH, 2006. 489 p.

EMBRAPA. Produtos da fécula de mandioca é tema do Prosa Rural. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2007/julho/foldernoticia.2007-0705.5605721790/noticia.2007-07-11.3772688973>>. Acesso em: 3 abr. 2008.

ELIASSON, A. C. Starch in food Structure, function and applications. 1 ed. New York, 2004. 597 p.

FISH, M.; LILLY. M. D. The Interactions between fermentation and protein recovery neville. **Bio-Technol.**, v.2, p. 623 – 627, 1984.

FREITAS, T. L.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Production of CGTase by a *Bacillus* alcalofílico CGII Strain isolated from wastewater of manioc flour industry. **Braz. J. Microb.**, v.35, p. 225-260, 2004.

FREITAS, T. L. **Produção e caracterização da CGTase produzida por *Bacillus* sp.** 2001. 77f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) – Instituto de Química do Campus de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

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

GOH, K. M.; MAHADI, N. M.; HASSAN, O.; RAHAMAN, R. N. Z. R. A.; ILLIAS R. M. A predominant β -CGTase G1 engineered to elucidate the relationship between protein structure and product specificity. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 2009.

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.

GUNARATNE, A.; CORKE, H. Influence of unmodified and modified cycloheptaamylose (β -cyclodextrin) on transition parameters of amylase-lipid complex and functional properties of starch. **Carbohydr. Polym.**, v. 68, p. 226-234, 2007.

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.

HIGUTI, I. H., GRANDE, W. S., SACCO, R. NASCIMENTO, A. J. Isolation of Alkalophilic CGTase-producing bacteria and characterization of cyclodextrin-glycosyltransferase. **Biol. Technol. Int. J.**, v.46, p. 183-186, 2003.

HONG, J. Optimal substrate feeding policy for a fed batch fermentation with substrate and product inhibition kinetics. **Biotechnol. Bioeng.** v 28, p. 1421 – 1431, 2004.

HUANG, L.; ZHANG, M.; YAN, W.; MUJUMDAR, A. S.; SUN. D. Effect of coating on post-drying of freeze-dried strawberry pieces. **J. Food Eng.**, v. 92, p. 107-111, 2009.

JEMLI, S.; MESSAOUD, E. B.; AYADI-ZOUARI, D.; NAILI, B.; KHEMAKHEM, B.; BEJAR, S. α -cyclodextrin glycosyltransferase from a newly isolated *Paenibacillus pabuli* US132 strain: Purification, properties and potential use in bread-making. **Bioch Eng J.**, v. 34, p. 44–50, 2008.

JEULIN, H.; VENARD, V.; CARAPITO, D.; FINANCE, C.; KEDZIEREWIZ, F. Effective ribavirin concentration in mice brain using cyclodextrin as a drug carrier: Evaluation in measles encephalitis. A ser publicado pela **Antiviral Res.**, 2009.

JOHNS, M. R.; GOH, L.; OEGGER, A.. Efect of pH, agitation and aeration on hyalutonic acid production by streptococcus zooepidemicus. **Biotechnol Letters**, v. 16, p.507-512, 1994.

KOGA, S.; BURG, C. R.; HUMPHREY, A. E. All Rights Reserved.Computer Simulation of Fermentation Systems. **Appl Environ Microbiol.** v.4, p. 683-689,1967.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de bioquímica. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 p.

LOFTSSON, T.; DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **Int. J. Pharm.**, v. 329, p.1–11, 2007.

LU, Z.; CHENG, B.; HU, Y.; ZHANG, Y, ZOU, G. Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity. **Food Chem.**, v. 113, p. 17-20, 2009.

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 Microb. Technol.**, v. 35, p. 467-473, 2004.

MAKELA, M.; KORPELA, T.K. Determination of the catalytic activity of cyclomaltodextrin glucanotransferase by maltotriose-methylorange assay. **J. Biochem. Biophys.**, 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, 2000. 124 p.

MATTERNM, 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. Physio Pathophysio Pharmacol.**, v. 1, p. 1-14, 2009.

MENDONÇA, H. O.; SABIONI, J. G. Isolamento de microrganismos alcalofílico produtores da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTASE). **B. Ceppa**, v. 22, p. 173-182, 2004.

MERJI, M.; BENSOUISSI, A.; AROULMOJI, V.; ROGÉCE. B. Hydration and self-association of caffeine molecules in aqueous solution: comparative effects of sucrose and β -cyclodextrin. A ser publicado pela **Mol. Biomol. Spectrosc.**, 2009.

MIGUEL, A. S. M.; NEVES, L. C. M.; VIOTOLO, M.; PESSOA-JR, A. Effect of flow rate pattern on glucose-6-phosphate dehydrogenase synthesis in fed-batch culture of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol.**, v.19, p.320-324, 2003.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 5 ed. New York: John Wiley, 2001. 684 p.

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 Biochem.**, v. 42, p. 1384–1390, 2007.

MOURTZINOS, I.; SALTA F.; YANNAKOPOULOU K.; CHIOU A.; KARATHANOS V. T. Encapsulation of olive leaf extract in cyclodextrin. **J. Agric. Food Chem.**, v.55, p. 8088–8094, 2007.

MUKHOPADHYAY, R.; CHATTERJEE, B. P.; GUHA, A. K. Biochemical changes during fermentation of edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* in whey. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 723-725, 2002.

NAKAMURA, N.; HORIKOSHI, K. Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase-producing alkalophilic *Bacillus* sp. *Agr. Biol. Chem.*, v.40, p. 753-757, 1976.

NAMAZI, H.; KANANI. A Investigation diffusion mechanism of b-lactam conjugated telechelic polymers of PEG and b-cyclodextrin as the new nanosized drug carrier devices. **Carbohyd. Polym.**, v. 76, p.46–50, 2009.

NAOFUMI, S.; KAZUMI, S.; YUKO, I.; SHOKO, Y.; NAOMI, M. Application of laver pigment phycoerythrin to foods. **J. Nishikyushu University**, v. 34, p. 21-25, 2004.

NIGAM, P.; SINGH, D. Enzyme and microbial systems involved in starch processing **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 770-778, 1995.

OLIVEIRA, P. A. P. L. V. **Influência das condições de cultivo na produção de CGTase por *Bacillus* sp. Alcalofílico.** 2002. 90f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.

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.

PARK, H.; MAYER, B.; WOLSCBAN, P.; KIIHLER, G. Excited-state proton transfer of 2-naphthol inclusion complexes with cyclodextrins. **J. Phys. Chem.**, v. 98, p. 6158–6166, 1994.

PETERS, H.; HERBEST, H.; HESSELINK, P. G. M.; LUNSDORF, H.; SCHUMPE, A.; DECKWER, W. The influence of agitation rate and xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 34, p. 1393- 1397, 1989.

PROVENZI, G.; FALCÃO, L.D.; FETT, R.; LUIZ, M. T. B. Estabilidade de antocianinas de uvas cabernet sauvignon com β - e γ -ciclodextrinas. **Braz. J. Food Technol.**, v. 9, p. 165-170, 2006.

RAWAT, S.; JAIN, S. K. Solubility enhancement of celecoxib using β -cyclodextrin inclusion complexes. **European. J. Pharm. Biopharm.**, v. 57, p. 263-267, 2004.

RIBEIRO, A. O.; SERRA, O. A. Spectroscopic study of $Tb^{3+}(b\text{-diketonate})_3$: α -cyclodextrin inclusion compounds in aqueous solution. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, p. 273-278, 2007.

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

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e otimização de Processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos. 1 ed. Campinas; Casa do pão, 2005, 326 p.

ROSSO, A. M; FERRAROTTI, S. A; KRYMKIEWICZ, N; NUDEL, B. C. Optimisation of batch culture conditions for cyclodextrin glucanotransferase production from *Bacillus circulans* DF 9R. **Microbial Cell Factories**, v. 1, p. 1-9, 2002.

SABADINI, E.; COSGROVE, T.; EGÍDIO, F. C Solubility of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) in H_2O and D_2O : a comparative study, **Carbohyd. Res.**, v. 34, p. 1270–274, 2006.

SANABRIA, G. G. R. **Caracterização parcial de carboidrases, morfologia do grão de amido centesimal de raízes de maca (*Lepidium meyenii*)** . 90 f. Dissertação – faculdade de ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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.

SEON, K. H. AHN, J. KWAK. H. S. The accelerated ripening of cholesterol-reduced cheddar cheese by crosslinked β -cyclodextrin. **J. Dairy Sci.** v. 92, p. 49-57, 2009.

SHENE, C.; MIR, N.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. Effect of the growth conditions on the synthesis of a recombinant β -1,4- endoglucanase in continuous and fedbatch cultures. **Enzymol. Microb. Technol.**, v.27, p.248-253, 2000.

SOETAERT, W.; VANDAMME, E. **The impact of industrial biotechnology.** *Biotechnol. J.* v. 1,p.756–769, 2006.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chem.**, v. 98, p. 1743-1753, 1998.

SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. **Trends Food Sci. Tech.**, v.15, p. 137-142, 2004.

SZERMAN, N.; SCHOROH, I.; ROSSI, A L.; ROSSO, A M.; KRYMKIEWICZ, N.; FERRAROTTI, S A. Cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R. **Bioresource Technol.**, v.98, p. 2886–2891, 2007.

TACHIBANA, Y.; KURAMURA, A.; SHIRASAKA, N.; SUZUKI, Y.; YAMAMOTO, T.; FUJIWARA, S.; TAKAGI, M.; IMANAKA. T. Purification and Characterization of a Extremely thermostable cyclomaltodextrin glucanotransferase from a newly isolated hyperthermophilic archaeon, a *Thermococcus* sp. **Applied Environ Microb.**, v. 65, p. 1991–1997, 1999.

TIAN, W.; FAN, X.; KONG, J.; LIU, T.; LIU, Y.; HUANG, Y.; WANG, S.; ZHANG, G. Cyclodextrin-based hyperbranched polymers: molecule design, synthesis, and characterization. A ser publicado pela **Macromolecules**, 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 6. ed. Porto Alegre: Artemd, 2000. 827 p.

UENO, A.; TAKAHASHI, K.; OSA, T.; HINO, Y. Fluorescence enhancement of α -naphthoxyacetic acid in the cavity of γ -cyclodextrin, assisted by a space-regulating molecule. **J. Chem. Soc.**, p. 194-195, 1981.

UENOJO M.; PASTORE G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Quím. Nova**, v.30, 2007.

VASSILEVA, A.; BESCHKOV, V.; IVANOVA, V.; TONKOVA, A. Continuous cyclodextrin glucanotransferase production by free and immobilized cells of *Bacillus circulans* ATCC 21783 in bioreactors. **Process Biochem.**, v. 40 p. 3290–3295, 2003.

VOLKOVA, D. A.; LOPATION, S. A.; VARLAMOV, V. P. One-step affinity purification of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. 1070. **Fund Appl.**, v.41, p. 67–69, 2000.

ZAIN, W. S. W. M.; IIIIAS, 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. **Biochem. Eng. J.** v.33, p. 26-33, 2007.

WANG, F.; DU, G.; LI, Y.; CHEN, J. Regulation of CCR in the γ -CGTase production from *Bacillus macorous* by the specific cell growth rate control. **Enzyme Microbial Tech.**, v. 39, p. 1279–1285, 2006.

WIEĆLAW, K.; KORCHOWIEC, B.; CORVIS, Y.; KORCHOWIEC, J.; GUERMOUCHE, H.; ROGALSKA, E. Meloxicam and meloxicam β -cyclodextrin complex in model membranes: effects on the properties and enzymatic lipolysis of

phospholipid monolayers in relation to anti-inflammatory activity, **Langmuir**, v. 25, p. 1417-1426, 2009.