

UFRRJ

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

TESE

**Produção de Transglutaminase Microbiana e Aplicação em Pão Sem
Glúten**

ROMULO CARDOSO VALADÃO

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE TRANSGLUTAMINASE MICROBIANA E
APLICAÇÃO EM PÃO SEM GLÚTEN**

ROMULO CARDOSO VALADÃO

Sob a orientação da Pesquisadora:
Mônica Caramez Triches Damaso

e co-orientação da Professora:
Lucielen Oliveira dos Santos

Tese submetida como requisito parcial para obtenção de Grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós - Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração Ciência de Alimentos.

**Seropédica, RJ
Dezembro de 2014**

664

V136p Valadão, Romulo Cardoso, 1976-

T Produção de transglutaminase microbiana e aplicação em pão sem glúten / Romulo Cardoso Valadão - 2014.

78 f.: il.

Orientador: Mônica Caraméz Triches Damaso.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Bibliografia: f. 67-74.

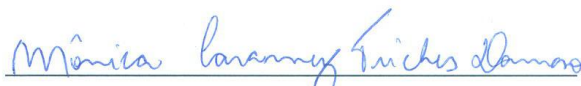
1. Tecnologia de alimentos - Teses. 2. Enzimas microbianas - Teses. 3. Alimentos sem glúten - Teses. 4. Pão - Teses. I. Damaso, Mônica Caraméz Triches, 1973-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

ROMULO CARDOSO VALADÃO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**,
no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de
concentração em Ciência de Alimentos

TESE APROVADA EM 19/12/2014



Mônica Caraméz Triches Damaso (DSc.)/Embrapa Agroenergia
Orientadora



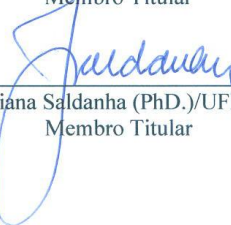
Lucinéia Gomes da Silva (DSc.)/IFRJ
Membro Titular



Sofia Couri (DSc.)/IFRJ
Membro Titular



Rosa Helena Luchese (PhD.)/UFRRJ
Membro Titular



Tatiana Saldanha (PhD.)/UFRRJ
Membro Titular

Ao iniciar esta jornada, não pedi que doassem seus momentos para o doutorado,
simplesmente os roubei.
Mas vocês não reclamaram nem exigiram de volta.
Pelo contrário, me abraçaram e andaram juntas a mim, como um só, uma família.
Por quatro anos...
Dedico esse trabalho a vocês, mulheres da minha vida!!!
Aline, Tetê e Lita.
Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

Durante minha vida, realmente nunca vivenciei um trabalho com a participação de tantas pessoas! Desde sua co-criação à sua própria finalização no momento da defesa de tese.

Começo meus agradecimentos então!!!

Agradeço à minha orientadora Dra. Monica Caramez Triches Damaso, responsável pelo ponto de partida. Pessoa extraordinária e iluminada, profissional exemplar, professora, pesquisadora e colega de trabalho cujo privilégio de passar por seu caminho é de poucos!

Agradeço também à minha co-orientadora Lucielen Oliveira dos Santos, por sua grande contribuição nas áreas estatística e biotecnológica.

Comecei os experimentos no Laboratório de actinomicetos do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes/CCS/UFRJ. Mais que pessoas maravilhosas, fui recebido carinhosamente por um grupo de competência destacável. Professora Rosalie Reed Rodrigues Coelho, Marta, André Grigorevski, Juliana, Marcela, Mariana, Mônica, Raquel e Sthefanie. Muito muito muito obrigado a todos vocês!!!

Ao continuar meu caminho, na UFRRJ (em casa! Rssss), além de aluno de doutorado, aprendi a ser orientador da graduação. Comecei levando-as no “colo” pelo receio da inexperiência e por ser minha tese. Percebi que cometia um grave erro! Tínhamos que crescer juntos, elas e eu. E foi assim que percebi que o processo de orientação seria apenas mais uma forma do meu contínuo processo de aprendizagem. Kelly Hashimoto... é muito fácil ser seu orientador. Você é simplesmente disciplinada (não que as outras não sejam! Rsss). Natasha Meletti, comprometida você me ensinou a confiar e compartilhar meu trabalho com o parceiro (nunca tinha percebido que realmente fingia fazer isso até chegar você). Danielle Lima, brigona, regrada, dona do laboratório... perfeita!!! Na verdade, as três são perfeitas! Tive muita sorte por ter esse aprendizado com vocês. Muito obrigado futuras Engenheiras de Alimentos!!!

Muitos foram os momentos difíceis, complicados e simplesmente... sozinho.

No laboratório tive mais que colegas de trabalho. Tive companheiros que estenderam além de onde suas mãos poderiam alcançar (e não apenas meus ensaios, meus Erlen, pois amigos vão além!!!). Edlene, Daniel, Wanderson, Ivan, Roberto e José Fernandes (Fernandão), meu muito obrigado e minha amizade. Estendendo ao DTA, amigos e colegas de

trabalho, alunos de graduação e pós-graduação acompanharam essa jornada. Consegui força operadora nesse grupo que é minha família UFRuralRJ. Obrigado a todos!!!

Essa jornada aproximara-se do final... e não poderia ser diferente na minha vida! Ao levar o trabalho para a fase de aplicação, na IFRJ, conheci a professora Lucinéia Gomes da Silva!!! Posso utilizar o mesmo adjetivo para qualificá-la pessoal e profissionalmente: uma pessoa RARA!!! Como professora, você realmente coloca a mão na massa. E comigo não foi nem um pouco diferente. Servirá para que eu nunca esqueça quem realmente sou e o que um professor deve fazer no momento do aprendizado!!! Também me mostrou um outro sentido para a Transglutaminase ao apresentar sua linha de trabalho para celíacos (eu já estava me sentindo frio na pesquisa, e de repente você! Você me lembrou que pesquisar também precisa do coração). Obrigado a ti e ao Pablo, e espero poder caminharmos juntos a partir de agora!!!

Desde já agradeço a todos os membros da banca (Lucinéia, Sonia Couri, Tatiana Saldanha e Rosa Helena) e suplentes, que certamente puderam finalizar este árduo trabalho de tese, com suas contribuições na aplicação de seus mais acurados critérios, colaborando em todas as considerações para que a construção deste final de trabalho se tornasse melhor.

Iniciar, construir e finalizar um trabalho com todos esses profissionais me traz imensurável satisfação e motivação para continuar seguindo no caminho que escolhi.

Muitas são as manifestações Divinas para que saibamos Sua existência. Mas apenas sabê-Lo não é o bastante. É por isso que Ele convive entre nós, todos os dias e o dia todo, através dos Amigos (André (Formiga), Arlan, Édio, Júlio, Lucena, Maria Ivone, Sandra e Tatiana) e da Família. Sim... eles são na verdade uma das formas que Ele utiliza, nos ligando ou mandando uma mensagem. Perguntando “e o doutorado?”. Nos abraçando e beijando, dizendo que nos ama ao ser deixado na escola, ou ao nos receber quando chegamos em casa. E aí... aí estou pronto para encarar o próximo experimento.....

Agradeço ao CNPq, Embrapa, UFRRJ, UFRJ e IFRJ pelo apoio financeiro e disponibilidade da infraestrutura para desenvolvimento do trabalho.

RESUMO

VALADÃO, Romulo Cardoso. **Produção de Transglutaminase Microbiana e Aplicação em Pão Sem-Glúten**. 2014. 78p. (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Departamento de Tecnologia de Alimentos. Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2014.

As transglutaminases (EC 2.3.2.13) são transferases capazes de catalisar reações do tipo acil-transferência entre grupos γ -carboxiamida de resíduos de glutamina e grupos amina. As transglutaminases microbianas (MTGases) têm uma grande importância na indústria alimentícia, pelo fato de causarem efeito polimerizante em alimentos ricos em proteína, originando mudanças físicas na estrutura destes e portanto, aumentando consideravelmente o seu valor agregado. Este trabalho consistiu em produzir MTGase, a partir de uma linhagem microbiana selecionada utilizando coprodutos agroindustriais, em fermentação submersa (FS) e no estado sólido (FES). Adicionalmente, a enzima foi concentrada, caracterizada e aplicada na elaboração de pão sem glúten. Dentre 116 linhagens testadas, a selecionada foi identificada como *Streptosporangium roseum* V02 (ATCC 12428), pois produziu a enzima com maior atividade. Foram avaliadas as influências de componentes do meio de cultivo e de condições de processo, como: amido, peptona, extrato de levedura, farinha de arroz, água de maceração de milho (AMM), pH e concentração de inóculo na FS, e concentração de inóculo, relação água/farelo de trigo, AMM, KH_2PO_4 e MgSO_4 para FES. Na FS foi proposto meio de cultivo contendo (g/L): farinha de arroz (40,0), peptona (30,0), K_2HPO_4 (2,0), KH_2PO_4 (2,0) e MgSO_4 (1,0), pH 7,0 e a concentração de inóculo de 10^7 UFC/mL. A maior produção de MTGase foi 0,2 U/mL, em 4 dias de fermentação. Na FES foi proposto meio de cultivo contendo: água/farelo de trigo (80 mL/100 g), KH_2PO_4 (0,1 %) e MgSO_4 (0,1 %) e micronutrientes, pH 7,0 e concentração de inóculo de 10^6 UFC/g, sendo que a maior produção da enzima foi 0,8 U/g_{ms}, em 8 dias de fermentação. O extrato enzimático produzido por FES foi concentrado por liofilização, utilizando como agente crioprotetor sacarose a 5 % (m/m). A temperatura e pH ótimos da enzima foram de 45 °C e 6,6, respectivamente. A enzima apresentou estabilidade a 35 °C, embora tenha apresentado estabilidade moderada a 50 °C, a qual levou um período de 30 min para perder 50 % de sua atividade. A 60 e 70 °C, a enzima perdeu quase totalmente sua atividade após período de 30 e 10 min, respectivamente. A adição de MTGase à massa de pão sem glúten influenciou no aumento do volume específico e na dureza do pão sem glúten. Foi possível observar que, com uma dosagem de 0,2 U/100 g (base farinha) de MTGase *S. roseum* V02, houve aumento de 13 % e 62 % no volume específico e na dureza do pão, respectivamente. Ao aumentar a concentração da enzima MTGase *S. roseum* V02 para 2,0 U/100 g (base farinha), o volume específico do pão aumentou apenas 6 % e a dureza aumentou 70 %, em relação ao controle (sem MTGase). Ao aplicar a enzima comercial, a adição de 0,2 U/100 g (base farinha) não resultou em aumento significativo no volume e na dureza da massa em relação ao controle, enquanto que, a aplicação de 0,2 U/ 100 g (base farinha) resultou em aumento de 11 % e 46 % no volume específico e na dureza, respectivamente. Os resultados da aplicação em massa de pão sem-glúten mostraram que a enzima MTGase *S. roseum* V02 é promissora, apresentando resultados melhores que a comercial quando aplicada à massa a 0,2 U/100 g (base farinha).

Palavras-chave: Transglutaminase, *Streptosporangium roseum*, pão sem glúten

ABSTRACT

VALADÃO, Romulo Cardoso. **Microbial Transglutaminase Production and Gluten-Free Bread Application**. 2014. 78p. Thesis (DSc in Food Science and Technology). Institute of Technology, Department of Food Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, 2014.

The transglutaminases (EC 2.3.2.13) are transferase enzymes capable of catalyzing reactions such as acyl transfer between γ -carboxamide groups of glutamine residues and amino groups. Microbial transglutaminases (MTGases) have a great importance in food industry, because they polymerize foods rich in protein, leading to physical changes in their structure and consequently increasing their value considerably. The aim of this work was to produce MTGase from selected microbial strain using agro-industrial residues by Submerged Fermentation (SF) and by Solid State Fermentation (SSF). Additionally, the crude enzyme was concentrated, characterized and used in gluten-free bread preparation. 116 strains were tested. The strain *Streptosporangium roseum* V02 was selected because it produced higher enzyme activities. Furthermore, the influence of growth medium components and process conditions, such as soluble starch, peptone, yeast extract, rice flour, corn steep liquor (CSL), pH and inoculum concentration by SF, and inoculum concentration, water/wheat bran, CSL, KH_2PO_4 and MgSO_4 by SSF was evaluated. For the SF experiments, the proposed medium (pH 7.0), in $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, consisted of 40.0 rice flour, 30.0 peptone, 2.0 K_2HPO_4 , 2.0 KH_2PO_4 and 1.0 MgSO_4 , and inoculum concentration of 10^7 CFU/mL⁻¹. The MTGase highest production was 0.2 U/mL on 4 days of fermentation by SF. For the SSF experiments, the proposed medium composition (pH 7.0) consisted of 80 mL/100 g water/wheat bran, 0.1 % KH_2PO_4 , 0.1 % MgSO_4 and micronutrients, and an inoculum concentration of 10^6 CFU $\cdot\text{g}^{-1}$. The highest enzyme production was 0.8 U/g_{ms} on 8 days of fermentation. The crude enzyme produced by SSF was lyophilized using sucrose (5% w/w) as a lyoprotectant. The optimum temperature and pH of the enzyme were 45 °C and 6.6, respectively. The enzyme was stable at 35 °C, although it has shown mild stability at 50 °C, temperature, which the enzyme had lost 50 % of its activity in a period of 30 min. At 60 and 70 °C, the enzyme lost its activity almost completely after a period of 30 and 10 min, respectively. The addition of MTGase in the gluten-free bread dough increased specific volume and hardness. It was observed that 0.2 U/100 g (MTGase *S. roseum* V02 activity on flour basis) increased the specific volume and hardness in 13 % and 62 %, respectively. Increasing the concentration of the enzyme MTGase *S. roseum* V02 to 2.0 U/100 g (flour basis), the specific volume and hardness increased 6 % and 70 %, respectively, when compared to the control sample. A commercial enzyme was used in a concentration of 0.2 U/100 g (flour basis) and it was not observed a significant increase on the specific volume and hardness of the dough, when compared to the control. On the other hand, a higher concentration resulted in a significant increase on the specific volume and hardness to 11 % and 46 %, respectively. The application of 0.2 U/100g MTGase *S. roseum* V02 in a flour basis showed better results comparing to the commercial enzyme in the gluten-free bread dough preparation.

Key words: Transglutaminase, *Streptosporangium roseum*, free-gluten bread

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Classificação de enzimas segundo IUBMB | 5 |
| Figura 2. Reações catalisadas por TGase: a) ligação cruzada entre glutamina e lisina de proteína ou peptídeo, b) incorporação de amina, c) desaminação. | 7 |
| Figura 3. Aplicação de MTGase microbiana: (a) bife reestruturado a partir de pequenos pedaços de carne suína; (b) reestruturado de pescado (marisco)..... | 9 |
| Figura 4. Micélio de <i>Streptosporangium roseum</i> | 12 |
| Figura 5. Diagrama de blocos do processo genérico de panificação | 18 |
| Figura 7. Perfil cinético da produção de MTGase pelas seis linhagens selecionadas em meio de cultivo proposto por Ando et al (1989) | 35 |
| Figura 8. Perfil cinético da produção de MTGase pela linhagem V02, conforme delineamento Plackett-Burman, ensaios 1 a 7..... | 38 |
| Figura 9. Perfil cinético da produção de MTGase pela linhagem V02, conforme delineamento Plackett-Burman, ensaios 8 a 15..... | 38 |
| Figura 10. Perfil cinético de produção de MTGase pela linhagem V02, conforme delineamento Fatorial Fracionado 2^{5-1} , ensaios 1 a 10..... | 40 |
| Figura 11. Perfil cinético de produção de MTGase pela linhagem V02, conforme delineamento Fatorial Fracionado 2^{5-1} , ensaios 11 a 20..... | 40 |
| Figura 12. Perfil cinético da produção de MTGase pela linhagem V02, conforme delineamento Fatorial Fracionado 2^{4-1} , ensaios 1 a 6 | 43 |
| Figura 13. Perfil cinético da produção de MTGase pela linhagem V02, conforme delineamento Fatorial Fracionado 2^{4-1} , ensaios 7 a 12..... | 43 |
| Figura 14. Perfil cinético da produção de MTGase pela linhagem V02 utilizando o meio proposto para FS, com base nos resultados dos delineamentos. O desvio padrão foi calculado com base no resultados de sete réplicas do experimento | 46 |
| Figura 15. Perfil cinético da produção de MTGase pela linhagem V02, conforme delineamento Fatorial Fracionado 2^{5-1} em FES, ensaios 1 a 10 | 49 |
| Figura 16. Perfil cinético da produção de MTGase pela linhagem V02, conforme delineamento Fatorial Fracionado 2^{5-1} em FES, ensaios 11 a 20 | 49 |
| Figura 17. Perfil cinético da produção em FES nas condições selecionadas | 51 |

| | |
|--|----|
| Figura 18. Superfície de resposta e curva de contorno da atividade de MTGase em função da temperatura e do pH..... | 54 |
| Figura 19. Efeito da temperatura na estabilidade térmica da MTGase produzida por <i>Streptosporangium roseum</i> V02..... | 58 |
| Figura 20. Avaliação do pão sem-glúten quanto à uniformidade da estrutura celular | 61 |
| Figura 21. Avaliação do pão sem-glúten quanto à presença de rachaduras..... | 61 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Valores de pH e temperatura de MTGase para diferentes espécies microbianas.... | 11 |
| Tabela 2. Potencial industrial de actinomicetos para a produção de bioprodutos | 12 |
| Tabela 3. Diversidade entre espécies microbianas, matriz sólida e bioprodutos por FES..... | 15 |
| Tabela 4. Composição da farinha de arroz, farelo de trigo e AMM | 19 |
| Tabela 5. Composição do meio de cultivo para reativação dos micro-organismos..... | 19 |
| Tabela 6. Composição do meio de cultivo utilizado na FS durante a seleção das linhagens.. | 20 |
| Tabela 7. Valores reais utilizados no delineamento Plackett-Burman na FS..... | 22 |
| Tabela 8. Matriz do delineamento Plackett-Burman na FS..... | 22 |
| Tabela 9. Valores reais utilizados no delineamento fatorial fracionado (2^{5-1}) na FS | 23 |
| Tabela 10. Matriz do delineamento fatorial fracionado (2^{5-1}) na FS | 23 |
| Tabela 11. Valores reais utilizados no delineamento fatorial fracionado (2^{4-1}) na FS..... | 24 |
| Tabela 12. Matriz do delineamento fatorial fracionado (2^{4-1}) na FS | 24 |
| Tabela 13. Valores reais utilizados no delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} na FES..... | 25 |
| Tabela 14. Matriz do delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} na FES..... | 25 |
| Tabela 15. Composição do meio de cultivo para FES | 26 |
| Tabela 16. Condições avaliadas durante processo de liofilização | 27 |
| Tabela 17. Valores reais utilizados no DCCR 2^2 para otimização dos parâmetros reacionais da MTGase | 28 |
| Tabela 18. Matriz do delineamento DCCR 2^2 para otimização dos parâmetros reacionais da MTGase..... | 28 |
| Tabela 19. Ensaios comparativos para aplicação das MTGases à esponja | 29 |
| Tabela 20. Composição da massa de pão sem gúten | 31 |
| Tabela 21. Linhagens que apresentaram produção de MTGase e suas respectivas atividades (U/mL) em 5 e 10 dias de fermentação em meio de cultivo proposto por Ando et al (1989).. | 34 |
| Tabela 22. Avaliação dos componentes e condições de cultivo sobre a produção de MTGase utilizando delineamento Plackett-Burman em FS | 37 |
| Tabela 23. Estimativa dos efeitos para a atividade da MTGase, conforme delineamento PB | 39 |
| Tabela 24. Avaliação dos componentes e condições de cultivo sobre a produção de MTGase utilizando delineamento fracionado 2^{5-1} em FS | 39 |

| | |
|--|----|
| Tabela 25. Avaliação das variáveis do delineamento 2^{5-1} para a produção de MTGase em 7 dias de fermentação..... | 41 |
| Tabela 26. Avaliação dos componentes e condições de cultivo sobre a produção de MTGase utilizando delineamento fracionado 2^{4-1} na FS..... | 42 |
| Tabela 27. Avaliação das variáveis do delineamento 2^{4-1} para a produção de MTGase em 7 dias de fermentação em FS..... | 42 |
| Tabela 28. Perfil das variáveis nos delineamentos estudados em FS para a produção de MTGase..... | 44 |
| Tabela 29. Matriz do delineamento Fatorial Fracionado 2^{5-1} para FES..... | 48 |
| Tabela 30. Avaliação das variáveis do delineamento 2^{5-1} para a produção de MTGase em 8 dias de fermentação FES..... | 50 |
| Tabela 31. Avaliação de AMM no meio de cultivo para produção de MTGase em FES..... | 50 |
| Tabela 32. Produção de proteases pela linhagem V02..... | 51 |
| Tabela 33. Delineamento DCCR 2^2 para otimização reacional da Atividade de MTGase em relação a pH e temperatura..... | 53 |
| Tabela 34. Avaliação das variáveis do DCCR para otimização das condições reacionais de MTGase..... | 53 |
| Tabela 35. Análise de variância do DCCR para temperatura e pH na atividade de MTGase..... | 53 |
| Tabela 36. Validação do modelo obtido para a atividade de MTGase..... | 54 |
| Tabela 37. Temperatura e pH ótimos de MTGase produzida por diferentes espécies..... | 55 |
| Tabela 38. Estabilidade Térmica da MTGase..... | 57 |
| Tabela 39. Avaliação de crioprotetores para liofilização da MTGase <i>S. roseum</i> V02..... | 59 |
| Tabela 40. Liofilização da MTGase <i>S. roseum</i> V02 utilizando sacarose a 5 %..... | 59 |
| Tabela 41. Avaliação dos efeitos da aplicação de MTGase em pão sem glúten..... | 62 |
| Tabela 42. Relação de reagentes usados durante o trabalho de tese..... | 76 |
| Tabela 43. Relação de equipamentos usados durante o trabalho de tese..... | 77 |
| Tabela 44. Acompanhamento da produção de MTGase durante a segunda etapa de seleção pelas linhagens selecionadas na primeira etapa..... | 78 |
| Tabela 45. Perfil cinético da produção de MTGase pela linhagem V02 utilizando o meio proposto e nas condições consideradas adequadas para Fermentação Submersa..... | 78 |

LISTA DE ABREVIÇÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|-----------------------|--|
| ANOVA | Análise de variância |
| AMM | Água de maceração de milho |
| DCCR | Delineamento Composto Central Rotacional |
| FES | Fermentação em Estado Sólido |
| FS | Fermentação Submersa |
| g_{ms} | grama de meio seco |
| IUBMB | União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular |
| MTGase | Transglutaminase microbiana |
| rpm | rotação por minuto |
| TGase | transglutaminase |
| U | Unidade de atividade enzimática |
| UFC | Unidade formadora de colônia |

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| RESUMO | viii |
| ABSTRACT | ix |
| LISTA DE FIGURAS | x |
| LISTA DE TABELAS | xii |
| LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS | xiv |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 OBJETIVOS | 3 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA | 4 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 19 |
| 4.2.1 Meio de cultivo para reativação, produção e contagem das linhagens | 19 |
| 4.2.2 Meio de cultivo para a seleção de linhagens | 20 |
| 4.4.1 Seleção de linhagens produtoras de MTGase - 1ª etapa..... | 21 |
| 4.4.2 Seleção de linhagens produtoras de MTGase – 2ª etapa..... | 21 |
| 4.5.1 Delineamento Plackett-Burman para Fermentação Submersa | 21 |
| 1.1.1 Delineamentos Fatoriais Fracionados para Fermentação Submersa | 22 |
| 4.7.1 Extrato enzimático a partir da FS..... | 26 |
| 4.7.2 Extrato enzimático a partir da FES | 26 |
| 4.9.1 Determinação da temperatura e pH ótimos reacionais..... | 27 |
| 4.9.2 Determinação da termoestabilidade da MTGase | 28 |
| 4.10.1 Preparo da massa..... | 28 |
| 4.10.2 Avaliação da aplicação em massa de pães sem glúten..... | 31 |
| 4.11.1 Determinação de atividade de transglutaminase..... | 31 |
| 4.11.2 Determinação de proteína total no extrato enzimático..... | 32 |
| 4.11.3 Atividade específica aparente de MTGase | 32 |
| 4.11.4 Determinação de atividade de protease | 32 |
| 4.11.5 Determinação de atividade de α -amilase..... | 32 |
| 4.11.6 Determinação de Umidade no meio de cultivo em FES | 32 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 34 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.3.1 | Avaliação dos componentes do meio de cultivo e das condições iniciais de processo para produção de MTGase..... | 36 |
| 5.3.2 | Perfil cinético da produção de MTGase por <i>S. roseum</i> em FS na condição de ensaio selecionada | 45 |
| 5.6.1 | Otimização da temperatura e pH ótimos para atividade da enzima MTGase | 52 |
| 5.6.2 | Determinação da Termoestabilidade..... | 55 |
| 5.6.3 | Determinação da estabilidade a estocagem em refrigeração e congelamento | 58 |
| 5.6.4 | Concentração do extrato enzimático por liofilização..... | 58 |
| 5.6.5 | Aplicação em massa de pão sem-glúten..... | 60 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 65 |
| 7 | SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS | 66 |
| 8 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 67 |
| 9 | ANEXOS..... | 75 |

1 INTRODUÇÃO

As transglutaminases (TGases) (EC 2.3.2.13) são enzimas transferases capazes de catalisar reações do tipo acil-transferência entre grupos γ -carboxiamida de resíduos de glutamina e grupos aminas. Na ausência desses últimos, esta enzima catalisa uma desaminação dos resíduos de glutamina, utilizando moléculas de água como acil-aceptores. Sendo assim, essas enzimas são capazes de modificar estruturas proteicas através de ligações cruzadas a níveis intra e inter-moleculares entre proteínas e resíduos proteicos, ou amina. Estão largamente distribuídas na natureza, desde mamíferos, aves e peixes, a plantas e micro-organismos, auxiliando em vários processos biológicos.

Por agirem em alimentos proteicos, promovendo efeito polimerizante e originando mudanças físicas na estrutura desses alimentos, aumentando consideravelmente o seu valor agregado, as MTGases (transglutaminases microbianas) desempenham importante papel no setor alimentício.

Com base na literatura científica, verifica-se que a enzima MTGase pode ser produzida por diferentes espécies de micro-organismos do gênero *Bacillus* e do grupo de actinomicetos. Geralmente, apresenta maior atividade de atuação em pH 6,5-7,0, enquanto que a temperatura ideal está em torno de 45-50°C. Porém, mantém a sua atividade catalítica em amplas faixas de pH e temperatura, sugerindo fácil adequação de sua aplicação em produtos alimentícios.

A literatura também mostra que a enzima apresenta estabilidade considerada moderada. Geralmente, a mesma suporta valores de temperatura em torno de 50°C, perdendo, a partir deste valor, significativa atividade em curto período de tempo. Em relação aos armazenamentos sob refrigeração e sob congelamento, a enzima apresenta boa estabilidade.

Esses parâmetros são muito importantes não apenas para a vida útil do extrato enzimático, mas também para aplicação no segmento alimentício, pois alguns processos exigem temperaturas moderadas e baixas (refrigeração) a fim de evitar problemas com contaminantes microbiológicos.

No decorrer das últimas décadas, a MTGase vem sendo aplicada principalmente no setor de produtos cárneos, seguido dos setores de pescado e laticínios, além de mostrar grande interesse também na gastronomia. Porém, atualmente, as propriedades dessa enzima vêm despertando especial interesse em setores que utilizam, a princípio, ingredientes que constituem glúten na composição de seus produtos. O setor de panificação é o que vem demonstrando maior interesse nessas propriedades poliméricas proteicas, as quais influenciam diretamente nas propriedades estruturais dos produtos panificados. Assim, a enzima MTGase começa a participar como importante ingrediente no desenvolvimento de produtos com baixo teor, ou mesmo ausência, de glúten.

A MTGase possui algumas vantagens sobre a TGase tecidual, como produção superior e independência de íon cálcio para reação enzimática. A primeira MTGase foi identificada em 1989, em uma cultura de *Streptovercillium* sp., isolada em solos do Japão, e despertou interesse pela possibilidade de produção em grande escala. Posteriormente, diversas linhagens do mesmo gênero, tais como *S. griseocarnium*, *S. cinnamoneum* e *S. mobaraense* foram identificadas como capazes de produzir MTGase. Outras espécies do mesmo Filo, como *Streptomyces* sp. são capazes de produzir essa enzima, como também espécies bacterianas como *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. alvei* e *B. aneurinolyticus*.

Há uma busca incessante por novas linhagens que produzam MTGases com altas atividades e com propriedades diferenciadas, como elevada termoestabilidade, maior

estabilidade à estocagem e parâmetros cinéticos e reacionais específicos para a indústria alimentícia.

A fermentação submersa (FS) e em estado sólido (FES) possuem algumas vantagens e desvantagens operacionais. Por esse motivo, é importante avaliar o potencial de uma linhagem microbiana em ambos os processos para a produção de uma enzima que, segundo dados da literatura, vem apresentando valores relativamente baixos de atividade durante sua produção, quando comparados às demais enzimas aplicadas no setor alimentício. Associado à etapa de produção, vale ressaltar a importância de se integrar uma etapa de concentração do extrato obtido, visando assim aumentar seu potencial enzimático.

Este trabalho consistiu em selecionar um micro-organismo capaz de produzir MTGase, bem como avaliar as condições de cultivo e de processo para a obtenção de um extrato enzimático concentrado, caracterizado e avaliado quanto ao potencial de aplicação em uma formulação de pão sem glúten.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral: Obter e caracterizar transglutaminase microbiana e avaliar sua aplicação na elaboração de pão sem glúten.

Dentro deste contexto, os **objetivos específicos** desse trabalho consistiram em:

- Selecionar micro-organismo(s) produtor(es) de MTGases;
- Avaliar e selecionar a composição do meio de cultivo e de condições de processo na produção de MTGase através de fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES);
- Obter extrato concentrado da enzima;
- Caracterizar o extrato produzido, quanto a temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica e de armazenamento.
- Aplicar o extrato enzimático concentrado na elaboração de pão sem glúten.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Enzimas e suas Aplicações

Por três séculos, estudos em processos bioquímicos demandam esforços em busca de novas enzimas, cujo termo foi inicialmente adotado por Frederick W. Kühne. Este pesquisador reconheceu a existência dessas moléculas com base em estudos realizados por Eduard Buchner, em 1897, sobre a ação fermentativa de açúcar em etanol utilizando leveduras. Pouco antes de Kühne, Christian Hansen iniciara, em 1874, o primeiro passo para a tecnologia enzimática com propósito industrial, extraído pela primeira vez, renina de estômago de bezerro utilizando solução salina (BINOD et al., 2013; LEHNINGER; NELSON; COX, 2006). Nesse contexto, talvez seja possível a consideração de que este tenha sido o surgimento do que atualmente reconhecemos como enzimologia, tecnologia enzimática, ou tecnologia de processos bioquímicos, terminologias utilizadas para as áreas de estudos da produção, caracterização e aplicação de enzimas.

Com exceção das moléculas de ribozimas (grupo de moléculas de RNA), todas as enzimas são proteínas com a capacidade de catalisar reações biológicas, de forma rápida e seletiva, sob condições reacionais brandas. Podem ser encontradas em células animais, vegetais e microbianas, participando essencialmente de seus processos biológicos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006).

Para efeitos legais, segundo Regulamento Técnico sobre Enzimas e Preparações Enzimáticas para Uso na Produção de Alimentos Destinados ao Consumo Humano da ANVISA (BRASIL, 2006), enzimas são proteínas capazes de catalisar reações bioquímicas, aumentando sua velocidade, sem interferir no processo e resultando em alterações desejáveis nas características de um alimento durante o seu processamento.

Do ponto de vista industrial, as enzimas podem ser obtidas a partir da extração de fontes vegetais e animais, ou produzidas por micro-organismos a partir de processos fermentativos, cuja diversidade alcança praticamente todos os grupos de micro-organismos, de bactérias a fungos, unicelulares e filamentosos (LIMA et al, 2007).

As enzimas são classificadas em relação à sua funcionalidade específica reacional, estabelecidas segundo a IUBMB (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular). A Figura 1 representa esta classificação e apresenta, inclusive, a classificação para a enzima transglutaminase (TGase).

Atualmente, um número expressivo de enzimas é produzido comercialmente para uso industrial em vários segmentos, como têxtil, fármaco, cosmético, e inclusive o setor alimentício (alimentos e bebidas). Dentre as enzimas mais aplicadas neste setor estão as amilases, proteases, pectinases, xilanases, celulasas e hemicelulasas, lacases, fitases, inulinasas, isomerases, lipases e transglutaminases (LIMA et al., 2007).

O mercado global para enzimas de uso industrial foi estimado em 3,3 bilhões de dólares em 2010, com expectativa de crescimento para 4,4 bilhões em 2015. O segmento de couro foi o que mais movimentou este mercado, seguido pelo segmento de bioetanol. Espera-se que o segmento alimentício (alimentos e bebidas) alcance pelo menos em torno de 1,3 bilhões de dólares em 2015, o qual expressou em 2010 uma movimentação de 975 milhões de dólares. Dentre essas várias áreas, o segmento alimentício representa 34 % desse mercado, seguida da indústria de detergentes e higiene com 29 %, papel e celulose com 11 % e 17 % pela soma das indústrias têxtil (BINOD et al., 2013).

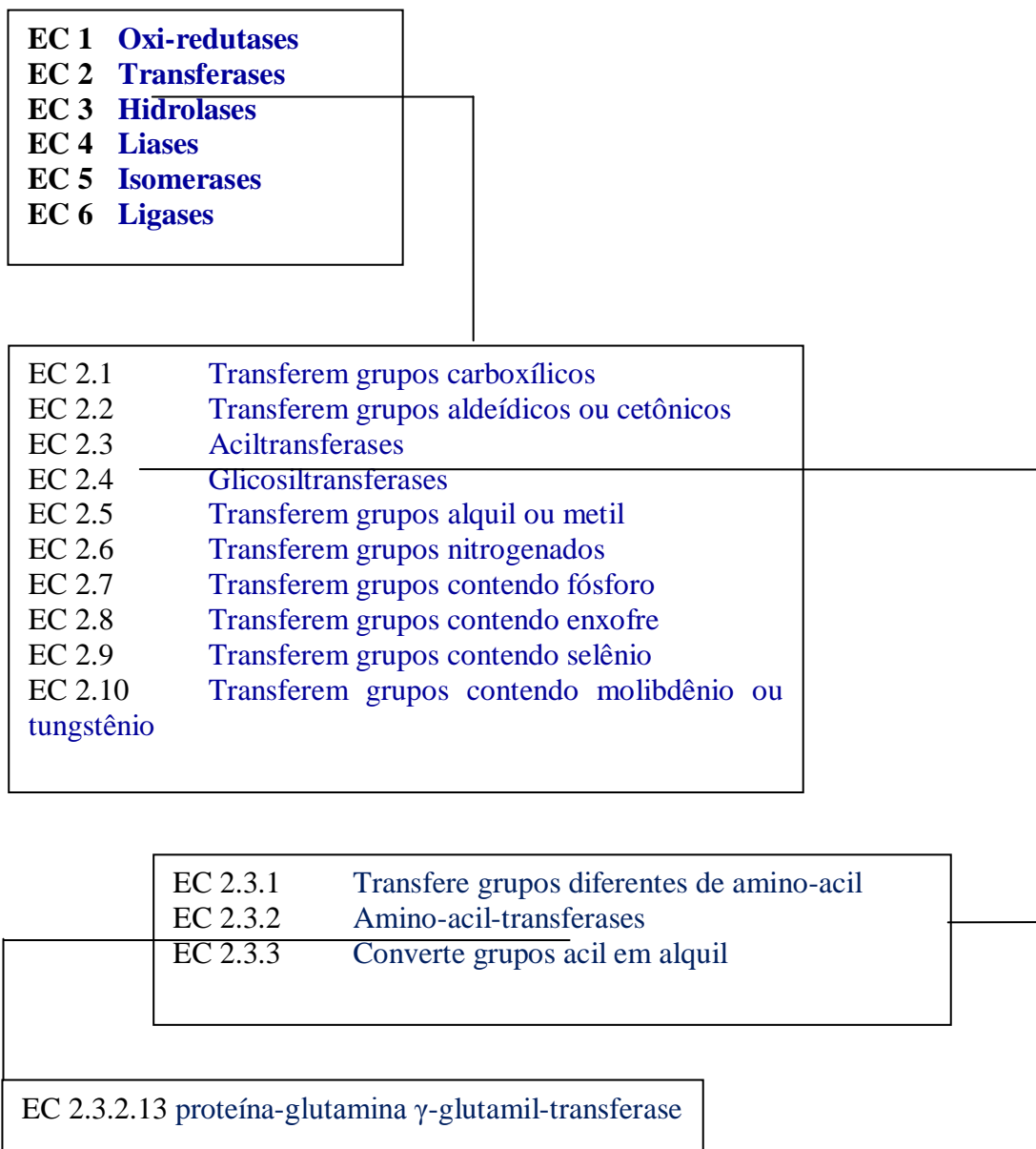


Figura 1. Classificação de enzimas segundo IUBMB

De maneira geral, as aplicações industriais de enzimas sintetizadas por micro-organismos apresentam ampla diversidade, inclusive no setor alimentício, o qual é grande consumidor deste bioproduto. Alguns exemplos dessas aplicações nesse setor podem ser citados: amaciamento de carne, estabilização de cervejas, coagulação, fermentação e melhoria

físico-química de produtos lácteos (maturação de queijos, doce de leite e iogurtes), panificação e extração de sucos e óleos vegetais (LIMA et al., 2007).

A aplicação industrial de enzimas inclui um conjunto de atributos oferecidos por uma determinada enzima, como especificidade, atividade reacional, estabilidade ao pH, temperatura de armazenamento e de uso, disponibilidade e custos (LIMA et al., 2007).

A atividade reacional de uma enzima é dependente de alguns parâmetros, como a relação entre as concentrações enzima/substrato, concentração de cofatores, efeitos alostéricos, a presença, concentração e tipos de inibidores, pH, temperatura e tempo de reação. O estudo da cinética enzimática visa avaliar a influência de todos esses parâmetros, o qual contribuirá diretamente na condução desta enzima numa aplicação (LIMA et al., 2007).

Em 1957, pela primeira vez, Heinrich B. Waelsch e seu grupo de pesquisa observaram uma enzima que poderia desempenhar importantes funções bioquímicas no sistema nervoso e, em particular, no cérebro. Após dois anos, a enzima foi intitulada oficialmente como transglutaminase (FACCHIANO; FACCHIANO, 2009; LORAND, 2002). Desde então, investigações sobre sua produção, purificação, propriedades e aplicações vêm sendo estudadas.

Essas enzimas estão largamente distribuídas na natureza, desde mamíferos, aves e peixes, a plantas e micro-organismos, auxiliando em vários processos biológicos como cicatrização, coagulação sanguínea, regulação de crescimento e diferenciação celular (MOTOKI; SEGURO, 1998).

As TGases de origem tecidual (plantas e animais) são cálcio dependentes, enquanto que as de origem microbiana (MTGases) apresentam-se independentes do íon cálcio para reagirem. Essa independência ao cálcio torna essas MTGases importantes do ponto de vista industrial, pois, além da independência reacional do íon, as mesmas ofereceriam diferencial produtivo incomparável em relação às de origem tecidual e processos de produção por micro-organismos apresentam custos muito mais reduzidos (ARRIZUBIETA, 2007).

Por suas propriedades reacionais e a busca por processos e produtos inovadores, esta enzima vem encontrando aplicações além da área médica. Na indústria alimentícia, a TGase tem campo diverso de aplicações, dentre estes, produtos cárneos, pescado e avícolas, de origem vegetal, e derivados com significativo teor proteico.

3.2 Reações catalisadas e propriedades de transglutaminase

Segundo a IUBMB, a TGase, cujo nome sistemático é proteína-glutamina: amina γ -glutamyltransferase, também é conhecida como Factor XIIIa, Fibrinogase, fator fibrino-estabilizante, glutaminilpeptídeo γ -glutamyltransferase, poliamina transglutaminase, transglutaminase tecidual e R-glutaminil-peptídeo: amina γ -glutamyl transferase.

A TGase ou MTGase (EC 2.3.2.13) é uma enzima que catalisa reações de transferência de um grupo acil introduzindo ligações cruzadas covalentes entre proteínas, bem como peptídeos e várias aminas primárias (MOTOKI; SEGURO, 1998). Durante a reação, o grupo γ -carboxiamida de resíduos peptídicos de glutamina age como acil-doador, enquanto grupos amínicos primários ou ϵ -amino de lisina residual ou livre, agem como acil-aceptores, podendo formar pontes covalentes intra ou inter-moleculares. Na ausência dos últimos, a água pode agir como aceptora, ocorrendo então uma desaminação do grupo γ -carboxiamida, produzindo resíduos de glutamina em ácido glutâmico (ANDO et al., 1989; NIELSEN, 1995). Sendo assim, a enzima MTGase é capaz de modificar estruturas proteicas através de ligações cruzadas em níveis intra e inter-moleculares entre proteínas e resíduos proteicos, ou amina, como pode ser observado na Figura 2.

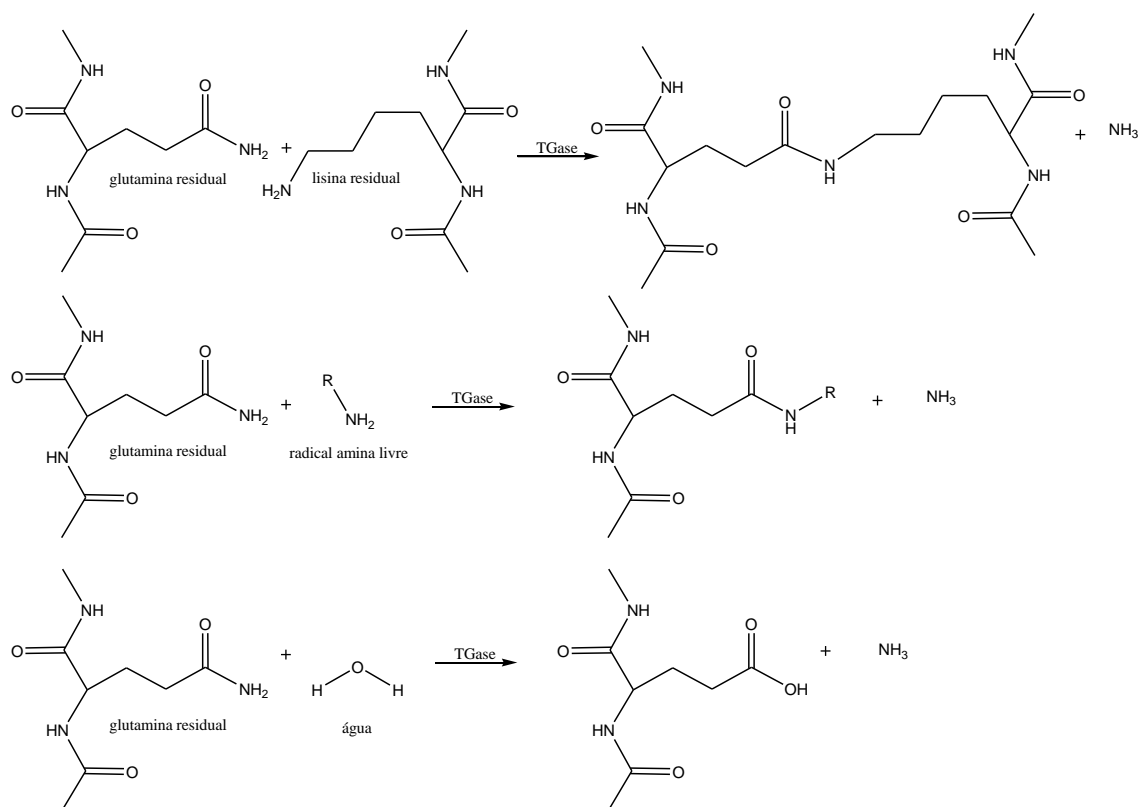


Figura 2. Reações catalisadas por TGase: a) ligação cruzada entre glutamina e lisina de proteína ou peptídeo, b) incorporação de amina, c) desaminação.

Fonte: DAMASO et al., 2013

Embora a reação de transferência do grupo acil catalisada pela TGase e MTGase entre os substratos de glutamina e lisina seja bem elucidada, a preferência dessas enzimas por uma sequência específica ainda não é conhecida. Logo a maioria dos resíduos de glutamina e lisina reagiria como substrato em diferentes graus de reatividade (COUSSONS et al., 1992). Limitando assim, a reação da enzima em função de proteínas de diferentes origens, pois existiria a necessidade de reação em um substrato específico. A dificuldade de encontrar um substrato específico deve-se à estrutura secundária circundante à glutamina, investigada e que seria determinante na reatividade (PIPER; GRAY; KHOSLA, 2003). Tanto a especificidade a substratos quanto à função fisiológica da enzima MTGase ainda não são completamente elucidados. Estudos com diferentes abordagens sobre a preferência a substratos embora pouco elucidados apontam para duas concepções diferentes. A primeira refere-se à avaliação quanto à especificidade da enzima em relação a substratos peptídicos ou proteínas específicas de interesse para analisar quais glutaminas ou lisinas são específicas e até qual grau. E a segunda seria a respeito de bibliotecas de sequências de peptídeos ou outros compostos com o objetivo de identificar um padrão ou sequência preferida, ou para identificar substratos altamente reativos. Os recentes avanços com essas duas concepções ofereceriam uma visão mais detalhada da natureza das MTGases, bem como as limitações remanescentes destas enzimas em relação às aplicações (RACHEL; PELLETIER, 2013).

As propriedades bioquímicas das MTGases e TGases contribuíram para seu emprego em larga escala na indústria de alimentos, pois estas enzimas são capazes de introduzir ligações covalentes nas proteínas, alterando propriedades como: solubilidade, habilidade de hidratação, capacidade emulsificante e espumante, viscosidade, elasticidade e geleificação das proteínas para o consumo humano (JAROS et al., 2006; LORENZEN et al., 2002;).

características finais de cada produto seriam determinadas pela concentração e disponibilidade dos resíduos de glutamina e lisina. Pode-se citar alimentos como leite, gelatina, miofibrila (miosina) e soja como matérias-primas que reagem muito bem com as MTGases e TGases, por terem resíduos de glutamina e lisina em maior disponibilidade para a reação (PAYNE, 2000b).

3.3 Aplicações da transglutaminase na indústria alimentícia

O uso tecnológico de enzimas se torna vantajoso pela obtenção de produtos com maior valor agregado, mais puros e de qualidade, por não haver formação de subprodutos indesejáveis durante a reação, sendo assim considerada uma tecnologia mais limpa se comparada à tradicional química. Apresenta custo reduzido por tratar-se de processos com gasto energético menor em comparação aos processos convencionais, além de menores gastos com tratamento de efluentes.

Assim como outras enzimas, a MTGase também é classificada como GRAS (*Generally Recognized As Safe*). A legislação brasileira permite a utilização da MTGase (de origem microbiana por *Streptovorticilium mobaraense* ou *Streptomyces mobaraense*), porém abre possibilidade para inclusão de novas enzimas consideradas GRAS, ou seja, MTGases produzidas por outros micro-organismos, seguindo procedimentos legais para tal. A adição das enzimas nos alimentos ou bebidas deve ser em concentração suficiente para o efeito desejado. Não há especificação para limite máximo permitido (BRASIL, 2006).

Como a reação entre MTGase e substrato pode ocorrer ao nível intra e/ou inter-molecular, a ação resulta em efeito polimerizante em alimentos ou em soluções alimentícias proteicas, originando mudanças físicas na estrutura desses materiais, aumentando consideravelmente o seu valor agregado (DONDERO et al., 2006). Sendo assim, podem ser aplicadas:

- em massas e panificação: através de reações cruzadas entre proteínas. Participa na formação de uma rede proteica com propriedades viscoelásticas, utilizando fontes proteicas alternativas sem glúten, já que o mesmo é o principal promotor dessas propriedades nestes alimentos;
- aumento de vida-útil de massas (panificação) congeladas, embora o mecanismo de ação da enzima às proteínas na estrutura das massas ainda não seja completamente elucidado (STEFFOLANI et al., 2011).
- enriquecimento proteico em produtos amiláceos. Ingredientes proteicos e a MTGase são adicionados intencionalmente a um produto alimentício amiláceo, promovendo não somente mudanças reológicas e texturais, como também aumento nutricional (RIBOTTA; COLOMBO; ROSELL, 2012);
- modificações reológicas, texturais e melhoria das propriedades funcionais em diversos produtos derivados de laticínio.
- reestruturação de produtos cárneos: inclusive no âmbito da gastronomia, como pode ser observado na Figura 3;
- formação de géis proteicos (hidrogéis): aplicáveis à processamento de alimentos, encapsulamento de drogas (fármacos) e biossensores (GUO; ZHANG; YANG, 2012).

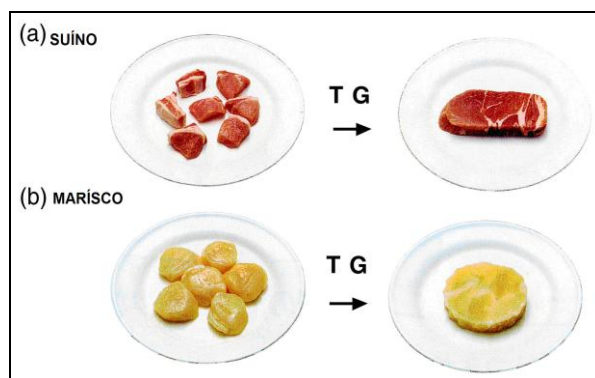


Figura 3. Aplicação de MTGase microbiana: (a) bife reestruturado a partir de pequenos pedaços de carne suína; (b) reestruturado de pescado (marisco).

Fonte: MOTOKI; SEGURO, 1998

A aplicação de TGase visa inovar processos e produtos, pois possibilita o desenvolvimento de novos produtos, inclusive com o aproveitamento e valorização de subprodutos alimentícios, principalmente nas indústrias de carne, pescado e laticínios. Adicionalmente, a possibilidade de desenvolvimento de produtos para fins especiais - como produtos sem glúten e alimentos funcionais - traz a inclusão de um novo grupo de consumidores e novos hábitos alimentares.

Por isso, a importância da tecnologia enzimática no âmbito sócio-econômico-ambiental já é bem clara e estabelecida, e a produção da MTGase traz ao setor alimentício - em especial as áreas industrial, gastronômica e saúde - uma gama de possibilidades e transformações.

3.4 Produção e caracterização de transglutaminase

As TGases são encontradas em vários organismos, de bactérias a mamíferos (LIN et al., 2006). Inicialmente, a enzima era obtida do porquinho da Índia (*Cavia aperea*), sendo a fonte exclusiva de produção de TGase por muito tempo. A escassez dessa fonte, associada aos difíceis processos de separação e purificação e ao fato de serem dependentes de íons cálcio, além do preço extremamente alto do produto, levaram a esforços focados na produção da MTGase (YAN et al., 2005).

A primeira MTGase foi identificada por Ando et al. em 1989, sendo oriunda de uma cultura de *Streptoverticillium* sp., isolada em solos do Japão, despertando interesse para a possibilidade de produção em grande escala. Posteriormente, diversas espécies de *Streptoverticillium*, tais como, *S. griseocarnium*, *S. cinnamoneum* e *S. mobaraense* foram identificadas como capazes de produzir MTGase, seguidas também pela identificação da enzima em outras espécies do filo Actinobacteria, como *Streptomyces* sp. (ZHU et al., 1995), e de espécies de filos diferentes a este, como *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. alvei* e *B. aneurinolyticus* (KOBAYASHI et al., 1998), que também apresentaram essa capacidade.

Em virtude da ação das MTGases produzidas por procariotos ser cálcio-independente e por serem estáveis durante longo tempo de armazenamento, houve um aumento do interesse industrial por essa enzima microbiana (GERBER et al., 1994; JUNQUA et al., 1997; NIELSEN, 1995). Contudo, a maioria das linhagens microbianas já estudadas apresenta baixa produção da enzima. A produção de MTGase utilizando micro-organismos geneticamente modificados (DATE et al., 2004; LIN et al., 2006), com a busca por meios de cultivos e condições otimizados, estudo de processos fermentativos em diferentes escalas de produção,

concentração e purificação, tem sido motivada com o intuito de obter maiores quantidades de enzima a custos mais reduzidos.

No entanto, no tocante à produção da enzima, resultados mostram a necessidade de associar técnicas para melhoria das linhagens microbianas, processos fermentativos – meios de cultivo e tipos de fermentadores – extração e purificação. Embora haja estudos avaliando a ação de MTGases sobre proteínas alimentícias, infelizmente não são encontradas observações sobre a ação de MTGases na estrutura proteica das próprias enzimas, como o caso de proteases, o que poderia pressupor mais uma hipótese para atividade baixa que a mesma é citada na literatura.

Em 2007, Macedo, Sette e Sato testaram 200 linhagens de actinomicetos na produção de MTGase e selecionaram uma linhagem de *Streptomyces* sp. Com a linhagem selecionada, realizaram planejamentos experimentais como ferramenta de melhoria para produção da enzima, e testaram diversos substratos, buscando a composição do meio e as condições mais adequadas para produção de MTGase em FS, em escala de bancada. Com o processo de produção otimizado, a produção foi apenas 1,41 U/mL, sendo esta considerada discreta, porém deve-se levar em consideração que trata-se de uma linhagem selvagem, sendo assim, ainda existem possibilidades de melhoria na produção.

Utilizando a linhagem de *Bacillus circulans* BL32 para produzir MTGase em um biorreator cilíndrico apropriado para realizar FES, Souza et al. (2008) obtiveram em condições otimizadas apenas 0,291 U/mg de massa seca. Por se tratar de FES, foi utilizado como componente principal no meio de cultivo, coproduto de soja (farelo), além de fontes quimicamente definidas para suprir as exigências nutricionais do micro-organismo.

Souza, Rodrigues e Ayub (2009a) investigaram a produção de MTGase por FS, utilizando a mesma linhagem de *Bacillus circulans*, sendo avaliado o efeito da concentração de oxigênio, através de agitação e aeração em reator agitado mecanicamente. A produção observada foi 0,589 U/mL em 50 h de fermentação.

A MTGase produzida por diferentes espécies de micro-organismos mantém a sua atividade catalítica em ampla faixa de pH e temperatura. Muitas vezes, essa atividade é melhor em pH ligeiramente ácido, enquanto que a temperatura ideal fica em torno de 50 °C, sugerindo valores adequados à sua aplicação na indústria alimentícia. Na Tabela 1 são apresentados os parâmetros pH e temperatura de MTGases produzidas por algumas espécies microbianas já estudadas.

Tabela 1. Valores de pH e temperatura de MTGase para diferentes espécies microbianas

| Micro-organismo | pH estável | pH ótimo | Temperatura estável (°C) | Temperatura ótima (°C) | Referência |
|--|------------|-----------|--------------------------|------------------------|-----------------------|
| <i>Streptoverticillium mobaraensis</i> | 4,0 - 9,0 | 5,0 - 8,0 | 10 – 70 | 50 | Motoki; Seguro (1998) |
| <i>Streptoverticillium mobaraensis</i> | 5,0 - 7,0 | 6,0 | 20 – 40 | 52 | Lu et al. (2003) |
| <i>Streptomyces hygroscopicus</i> WSH03-13 | 5,0 - 8,0 | 6,0 - 7,0 | < 50 | 37 – 45 | Cui et al. (2007) |
| <i>Streptomyces platensis</i> | 5,0 - 6,0 | 6,0 | 45 – 55 | 55 | Lin et al. (2008) |
| <i>Bacillus subtilis</i> AJ1307 | --- | 8,2 | --- | 60 | Suzuki et al. (2000) |
| <i>Bacillus circulans</i> BL32 | --- | 5,7 - 8,7 | < 50 | 25 – 45 | Souza et al. (2011) |

3.5 Os Actinomicetos e sua importância biotecnológica

Actinomicetos ou actinobactérias trata-se de um filo de bactérias conhecidas por sua organização filamentosa, muitas vezes ramificada e, por algumas produzirem cadeias de esporos utilizados na reprodução assexuada, semelhantes aos conídios de fungos filamentosos (BERGEY`S, 1989; TORTORA; FUNKE; CASE, 2000;).

Actinomicetos são micro-organismos procariotos, em sua grande maioria aeróbia e gram-positiva. A faixa ótima de pH para o seu desenvolvimento está entre 6,5 e 8,0, sendo o pH 5,0 limitante para o crescimento da maioria das espécies em meio de cultura (NEVES; GAVA, 2001).

Os actinomicetos ocorrem amplamente no solo, onde desempenham relevante papel biológico. Dentre os gêneros mais representativos, pode-se citar: *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Actinomyces* e *Frankia* (BERGEY`S, 1989).

Os actinomicetos compõem um dos grupos mais investigados, em particular aqueles do gênero *Streptomyces*, principalmente, no que diz respeito à obtenção e estudos de antibióticos e enzimas. Atualmente, outros gêneros do grupo têm sido investigados, com o objetivo de obter metabólitos secundários com características diferenciadas, como por exemplo, antibióticos mais efetivos a micro-organismos patogênicos resistentes, ou enzimas mais estáveis. Além disso, novos métodos de isolamento e seleção, associados a técnicas genéticas atuais e otimização das condições de crescimento microbiano e produção dos metabólitos vem possibilitando a exploração de outros gêneros, além de *Streptomyces* (BOUDJELLAA et al., 2006; PFEFFERLE et al., 2000). Os actinomicetos produzem enzimas capazes de degradar carboidratos, compostos nitrogenados orgânicos, vários esteróides, compostos aromáticos, acetileno dentre outros (WASKMAN, 1957), o que também os torna importantes para o uso industrial. Alguns exemplos de actinomicetos são apresentados na Tabela 2, e a Figura 4 apresenta a estrutura microscópica de um membro pertencente ao gênero *Streptosporangium*.

Tabela 2. Potencial industrial de actinomicetos para a produção de bioprodutos

| Micro-organismos | Enzimas | Referências |
|--|--------------------------------------|------------------------|
| <i>Streptomyces megasporus</i> DSM41476 | Xilanases | Qiu et al. (2010) |
| <i>Streptosporangium</i> sp. | Glucoamilases | Stamford et al. (2002) |
| <i>Streptomyces lavendulae</i> | Lacase e lignina peroxidase | Jing (2010) |
| <i>Streptomyces griseoloalbus</i> | α -galactosidase termoestável | Anisha et al. (2008) |
| <i>Streptomyces setonii</i> | 4-vinil-guaiacol | Salgado et al. (2012) |
| <i>Streptomyces roseolus</i> DH | Quitinase | Jiang et al. (2012) |
| <i>Streptomyces drozdowiczii</i> | Celulases | Lima et al. (2005) |

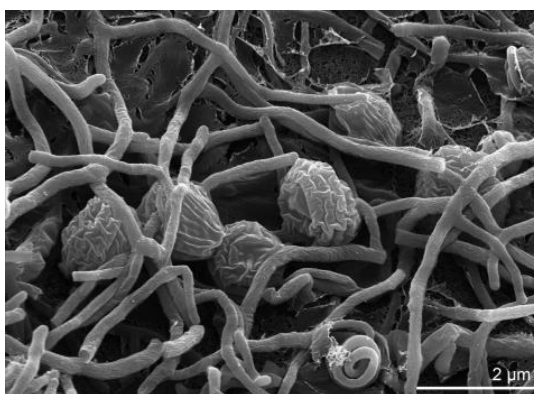


Figura 4. Micélio de *Streptosporangium roseum*
Fonte: NOLAN et al. (2010)

3.6 Fermentação em Estado Sólido (FES)

Utilizada há muitos séculos no preparo de alimentos e compostagem, a FES é uma tecnologia que teve origem e se desenvolveu em países do Oriente. Várias formas de alimentos utilizando este tipo fermentação, como produção de molho de soja em torno de 1.000 a.C. ou a de “chiang” entre 2.500 e 500 a.C. utilizando “koji” (massa umidificada de um cereal cozido na qual houve crescimento de *Aspergillus orizae* e produção enzimática de amilases) na China, são exemplos desses alimentos fermentados por FES. O Japão se destacou no avanço da tecnologia em FES, utilizando para vários produtos, diversas matérias-primas e linhagens microbianas mutantes, projetando também automatização e controle das condições de processo (CHEN, 1992; SCHMIDELL et al., 2007). Em países ocidentais, este tipo de processo fermentativo não foi expressivo, sendo muito utilizada a fermentação submersa. Em função das dificuldades associadas aos parâmetros de processo, como transferência de calor e massa em FES, os estudos na área de processos fermentativos se direcionaram principalmente para fermentação submersa, que apresenta características que favorecem as medições e controles nas observações dos fenômenos de transporte durante o processo, em detrimento aos estudos da FES. Com objetivo principal de diminuir custos de produção, as pesquisas na área de FES se desenvolveram e, nos últimos anos, houve um aumento na procura de processos capazes de utilizar resíduos (coprodutos) em função de diferentes descartes industriais e agroindustriais.

A FES caracteriza-se pelo crescimento microbiano em meio de cultivo constituído por uma matriz sólida umedecida, a quantidade muito baixa de água livre ou até na ausência desta. Compõe sistema heterogêneo de três fases – líquida, sólida e gasosa – no qual, geralmente, a matriz sólida contém o substrato e, sob a qual, o micro-organismo realiza seu crescimento (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). Atualmente, a FES pode ser classificada em dois tipos, segundo a natureza da fase sólida: FES sobre o substrato sólido natural; e FES sobre suporte inerte impregnado com nutrientes, inclusive substrato. São empregados micro-organismos dentre fungos e bactérias, inclusive actinomicetos. Porém, por sua característica fisiológica, os fungos filamentosos são mais utilizados nesse tipo de fermentação em relação aos demais (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012; NAGY; SZAKACS, 2008).

Devido à sua capacidade de formar hifas, sua morfologia permite que os fungos filamentosos colonizem a superfície do substrato e penetrem na matriz do mesmo em busca de nutrientes. A biomassa microbiana, então na matriz, libera enzimas e obtém os nutrientes disponíveis e, na ausência de transporte convectivo, há gradientes de concentração, que são necessários para o fornecimento do substrato e liberação dos produtos, ocorrendo também em relação a indutores e inibidores que afetariam a produção de enzimas (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012).

Barrios-González (2012) salienta que determinados “estímulos” que podem representar barreiras físicas para o crescimento, como ar e atividade de água, induziriam a maior produção de metabólitos secundários, e que estes podem estar relacionados com a indução de enzimas específicas em FES. Destaca-se a estreita relação dessas enzimas com a produção desses metabólitos em FES com teores elevados de umidade, assim como outras enzimas, que também seriam específicas para FES, apresentarem de maneira obrigatória a necessidade de baixos teores de umidade para serem produzidas. Porém, Barrios-González (2012) menciona também a importante existência de fatores regulatórios, como o nutriente limitante e pH que estariam relacionados tanto com FES como a FS. A essas enzimas e esses metabólitos, que são frequentemente produzidos com rendimentos muito mais elevados em FES, tem-se atribuído à fisiologia exibida pelos micro-organismos nesse tipo de fermentação, a qual também vem sendo chamada de fisiologia de forma sólida, pois há consideração como sendo parte da fisiologia diferente exibida por estes micro-organismos em FES.

Devido ao baixo custo relacionado à matéria-prima, geralmente coprodutos agroindustriais, nas duas últimas décadas, a FES tem despertado interesse em pesquisas para a produção de compostos bioativos, especialmente enzimas, aromas, pigmentos, corantes, dentre outros produtos de interesse na indústria alimentícia (COUTO; SANROMÁN, 2006; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

Quando comparada à FS, a FES oferece vantagens operacionais, e dentre as principais, pode-se citar a alta produtividade volumétrica, alta concentração e recuperação de bioproduto, maior simplicidade no design dos biorreatores e operações, inclusive na etapa de *downstream*, menor gasto de energia e redução na produção de águas residuárias (MAHMOOD, 2013; NAGY; SZAKACS, 2008). Porém, este tipo de fermentação também demonstra dificuldades operacionais e algumas desvantagens, como dificuldades de dissipar calor devido à heterogeneidade de alguns meios e ao tipo de reator empregado, assim como o controle de parâmetros de processo (pH, temperatura, aeração, umidade e crescimento microbiano). É importante deter conhecimento sobre os fenômenos de transferência de calor e massa nesse tipo de fermentação, pois nesses predominam aspectos críticos, inclusive, projetar as operações e modelos cinéticos estudados para o escalonamento do processo. O adequado estabelecimento desses fenômenos reflete diretamente na qualidade e na eficiência da produção (CHEN; ZHAO; LI, 2014; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

Coprodutos tem sido estudados como fontes alternativas, para obtenção de novos produtos no aproveitamento de seu potencial energético e no combate à poluição, e desta forma a FES tem sido apontada como potencial. Diversos coprodutos agrícolas vêm sendo explorados em estudos envolvendo FES, e por suas características nutricionais, o farelo de trigo é escolhido como matriz/substrato para a produção de enzimas extracelulares na maioria dos casos (MAHMOOD, 2013). É fato que os cereais representam as culturas cultivadas mais abundantes no mundo e, naturalmente, seus resíduos, como cascas e palhas representam um dos mais abundantes recursos renováveis. Esses resíduos (coprodutos) agroindustriais oriundos das práticas agrícolas e processamentos industriais, atualmente, vêm sendo cada vez mais utilizados para fins de processos microbianos fermentativos, considerados também como substratos nutritivos, reduzindo gradativamente o seu desperdício.

O aproveitamento dos coprodutos agroindustriais como matéria-prima para os processos fermentativos, também contribui para processos com custo reduzido, além de consolidar o uso de fontes renováveis e a prática de tecnologia mais limpa e que impacta positivamente o meio ambiente. Porém, embora ainda sejam poucos os estudos existentes no que diz respeito à produção de MTGase em processos envolvendo FES (MAHMOOD, 2013), este tipo de tecnologia para a produção de MTGase apresenta grande potencial, se mostrando muito interessante do ponto de vista industrial.

Além das fontes apresentadas na Tabela 3, há ainda outras que podem ser destacadas, cujas composições apresentam potencial ao oferecerem nutrientes complementares e indispensáveis ao processo metabólico microbiano. Como exemplo, o uso de hidrolisados proteicos (peptonas) como fonte nitrogenada, que são obtidos de origem animal, inclusive produtos lácteos ou de origem vegetal. As peptonas vêm sendo obtidas a partir de plantas, peixes e pescados devido a problemas ocorridos há alguns anos relacionados a doenças de príon entre os animais. Além da peptona, outra fonte nutritiva que merece destaque seria a água de maceração de milho (AMM), que é um subproduto do processo de moagem por via úmida do milho, sendo rica em sais minerais, aminoácidos, vitaminas e fatores de crescimento (NIGAM; PANDEY, 2009).

Tabela 3. Diversidade entre espécies microbianas, matriz sólida e bioprodutos por FES

| Micro-organismo | Matriz sólida | Bioproduto | Referência |
|---|--|---|---------------------------------|
| <i>Rhodotorula glutinis</i> | Espuma de poliuretano (impregnado com caldo YM e imidazol) | Carotenoides | Hernandez-Almanza et al. (2014) |
| <i>Streptomyces sp</i> | Farelo de trigo | Transglutaminase | Mahmood (2013) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> e kefir | Mistura de diversos resíduos (coprodutos) de alimentos | Proteína celular, aromas voláteis e ácidos graxos | Aggelopoulos et al. (2014) |
| <i>Aspergillus niger</i> | Casca de batata | Celulases | Santos et al. (2012) |
| <i>Streptomyces griseorubens</i> | Palha de arroz | Celulases | Saritha et al. (2013) |
| <i>Penicillium purpurogenum</i> | Sabugo e farelo de milho | Fitase | Awad et al. (2014) |
| <i>Cordyceps militaris</i> | Grão-de-bico | Antioxidante | Xiao et al. (2014) |

O aproveitamento dos coprodutos agroindustriais como matéria-prima para os processos fermentativos, também contribui para processos com custo reduzido, além de consolidar o uso de fontes renováveis e a prática de tecnologia mais limpa e que impacta positivamente o meio ambiente. Porém, embora ainda sejam poucos os estudos existentes no que diz respeito à produção de MTGase em processos envolvendo FES (MAHMOOD, 2013), este tipo de tecnologia para a produção de MTGase apresenta grande potencial, se mostrando muito interessante do ponto de vista industrial.

3.7 A panificação, as doenças celíacas e o papel tecnológico das MTGases em massas de pães livres de glúten

Embora não se possa assegurar com precisão o surgimento da produção de pães, supõe-se que o homem possui tal conhecimento há pelo menos 10.000 anos. Foi no antigo Egito (3.000 a.C.), que se descobriu o processo de fermentação da massa, e daí por diante, em tempos e regiões diferentes, a área tecnológica de panificação se desenvolveu, até chegar à década de 1940, época em que o desenvolvimento científico e tecnológico teve maior expressão nessa área, avançando até os dias atuais, inclusive com produtos alternativos para grupos específicos de consumidores (SEBESS, 2010; CAUVAIN; YOUNG, 2009).

No ano de 2011, o mercado consumidor brasileiro de pães apresentava um quantitativo em torno de 33,5 kg/habitante/ano, praticamente a metade do consumo recomendado pela OMS (Organização Mundial da Saúde), 60 kg/habitante/ano. Quando comparado a outros países da América Latina, o Brasil encontra-se em 5º lugar, num ranking liderado pelo Chile (98 kg/habitante), seguido por Argentina, Uruguai e Costa Rica (ABIP, 2011). Segundo a Abip (Associação Brasileira da Indústria da Panificação e Confeitaria), dentre os fatores considerados, estão os impostos que encarecem o produto, e a falta de hábito dos brasileiros

de consumirem esses produtos produzidos a base de milho e mandioca. Esse panorama reflete o potencial brasileiro para crescimento na área de panificação, que já responde por 40 % do setor na indústria de produtos alimentícios.

O crescimento econômico e a mudança no estilo de vida e hábitos alimentares vieram acompanhados por aumento gradual de casos de alergia e intolerância alimentares em todo o mundo. Esse fenômeno é recorrente nas últimas décadas, apresentando atualmente uma população dentre 1 a 3 % intolerante aos cereais que contém glúten, variando entre os países. O aumento do consumo de glúten, inserido em uma ampla variedade de produtos alimentícios à base de farinha de trigo, possivelmente, contribuiu para o aumento da população de intolerantes (GILISSEN; van der MEER; SMULDERS, 2014; LINDFORS et al., 2012).

Por essa razão, atualmente, a comunidade científica se depara com um grande desafio na área de panificação: desenvolver pães para um seleto grupo de consumidores, aqueles que apresentam intolerância a alimentos com glúten – doença celíaca. A intolerância ao glúten ou doença celíaca, como também é chamada, é classificada como uma doença autoimune, sendo a gliadina a proteína relacionada às causas dessa intolerância, causando alergias geralmente agressivas (GILISSEN; van der MEER; SMULDERS, 2014).

Gilissen, van der Meer e Smulders (2014) sugerem estratégias para o consumo, sustentadas na redução do montante global de glúten "tóxico" em produtos alimentícios. Isso ajudaria na diminuição da sensibilidade e gravidade dos sintomas associados, a qual depende principalmente da fração de glutenina, já que a fração de gliadina apresenta maior contribuição para a toxicidade. Outras estratégias concentrar-se-iam em indivíduos com diagnóstico de doença celíaca, e neste caso se desenvolveriam produtos alimentícios utilizando glúten hidrolisado em sua composição, além também do desenvolvimento de cereais seguros alternativos, mas sempre garantindo a qualidade nutricional e a segurança da dieta isenta de glúten desse público consumidor.

Com o surgimento dessa população cada vez maior de consumidores que evitam a ingestão de glúten em sua dieta, seja por motivos alergênicos ou não, a busca por produtos, principalmente panificados, que não apresentem glúten em sua composição, desperta maior interesse em estudos envolvendo composições e processos que viabilizem a difícil tarefa do desenvolvimento desses produtos.

Estudos avaliam a influência de TGase ou MTGase em formulações de produtos panificados sem-glúten. Porém, ainda há poucos trabalhos que investigam o efeito das interações entre a enzima e o perfil proteico do produto. Essas interações refletem diretamente sobre as características tecnológicas e propriedades físico-químicas do produto (STORCK et al., 2013). Stork et al (2013) em seu trabalho, utilizaram farinhas enriquecidas com proteínas e avaliaram os efeitos dessas na otimização de formulações para pães livres de glúten.

Ao avaliarem o efeito da adição da TGase ou MTGase em farinha de arroz, Gujral e Rosell (2004) observaram que a enzima melhorou as propriedades reológicas da massa, ou seja, um aumento da viscosidade e elasticidade da massa, e aumento do volume do pão.

Alguns autores estudam inclusive, a aplicação de TGase ou MTGase associada a outras enzimas e/ou a outros componentes, como polissacarídeos e emulsificantes, de forma a colaborarem juntas na formação de uma rede que possa assumir o papel do glúten nesses produtos.

Para ilustrar o potencial dessas associações entre diferentes tipos de enzimas, por exemplo, o trabalho de Steffolani et al. (2012) pode ser observado, cujo envolvimento das enzimas TGase, pentosanase e glicose-oxidase para a melhoria das propriedades reológicas de massas congeladas de pães, formulados com farinha de trigo, foi avaliado. Neste trabalho, os efeitos dessa associação na massa foram avaliados, e apresentaram contribuição na redução dos danos causados pelo congelamento sobre a estrutura do glúten pelos cristais de gelo. As

enzimas aumentaram a viscosidade e a extensibilidade da massa, parâmetros que refletem diretamente no aumento da capacidade de retenção de CO₂ na mesma durante a fermentação.

Para que se entenda a expectativa no campo dos produtos de panificação livres de glúten, primeiro se faz necessário conhecer a função tecnológica dos ingredientes e das etapas que levam à formação estrutural do produto.

Os ingredientes que compõem a massa de pão influenciam diretamente nas características físico-químicas e sensoriais dos produtos. Embora a farinha de trigo e a água sejam ingredientes básicos para produzir o pão, geralmente, os produtos de panificação apresentam também: água, gordura, açúcar, sal e melhoradores. Diferentes condições de processo, composição da massa e outros ingredientes adicionados variam em função do tipo de produto (CAUVAIN; YOUNG, 2009).

Embora possa ser parcial ou totalmente substituída por farinha de outros cereais, a farinha de trigo constitui o principal ingrediente da panificação. Classificada em forte ou fraca, em função de seu teor em proteínas, promove forma e consistência à massa, obtendo estrutura e flexibilidade conforme esse teor proteico. Segundo Cauvain e Young (2009), essa “força” da farinha nas massas fermentadas está intimamente vinculada à duração do período de fermentação, sendo diretamente proporcionais, com o objetivo de alcançar o desenvolvimento ideal da massa e qualidade final do produto.

A farinha de trigo apresenta em sua composição cerca de 8-12 % de glúten. E este se caracteriza pela formação de um complexo proteico formado por gliadina - responsável pela coesividade da massa - e glutenina - responsável pela resistência da massa à extensão. O resultado desta combinação é a formação de uma massa com propriedade viscoelástica única e uma capacidade de reter o gás carbônico formado durante a fermentação (CAUVAIN; YOUNG, 2009).

As gorduras também influenciam na qualidade do produto, diretamente na maciez e no volume do pão. Elas promovem aumento da estabilidade da massa, maior volume, maior tempo de conservação, melhoria da textura, melhoria sensorial e do valor nutritivo (QUEIROZ; LOPES, 2008).

Os melhoradores geralmente são adicionados com o objetivo de auxiliar na elaboração da massa e conferir aprimoramento nas características sensoriais e físico-químicas. Promovem benefícios à massa, como menor tempo de trabalho para atingir ponto ideal, redução do tempo de fermentação, maior força e maleabilidade da massa, aumentando sua resistência ao atrito mecânico da masseira e maior vida útil do produto final. Geralmente, os melhoradores utilizados são emulsificantes, antioxidantes, pectina, ácido cítrico, glúten dentre outros, considerados aditivos, e suplementos enzimáticos, considerados auxiliares de processamento (CAUVAIN; YOUNG, 2009; QUEIROZ; LOPES, 2008).

Neste caso, além da aplicação da enzima MTGase como aditivo para a melhoria de massas de pães convencionais, que vem a contribuir na estrutura do glúten e na melhoria da capacidade de retenção de CO₂, a mesma enzima vêm sendo aplicada em massas de pães sem-glúten, auxiliando na formação de uma estrutura polimérica que possa oferecer a mesma capacidade de retenção de CO₂.

O uso da enzima MTGase surge como mais uma opção na lista de aditivos para o desenvolvimento de panificados sem-glúten

Os processos de panificação constituem um conjunto de etapas específicas para cada tipo de pão, porém com poucas variações entre si e baseadas em um processo genérico aplicado a todos os tipos (Figura 5), o qual possui como objetivo principal e comum a conversão da farinha em um alimento aerado e palatável (CAUVAIN; YOUNG, 2009).

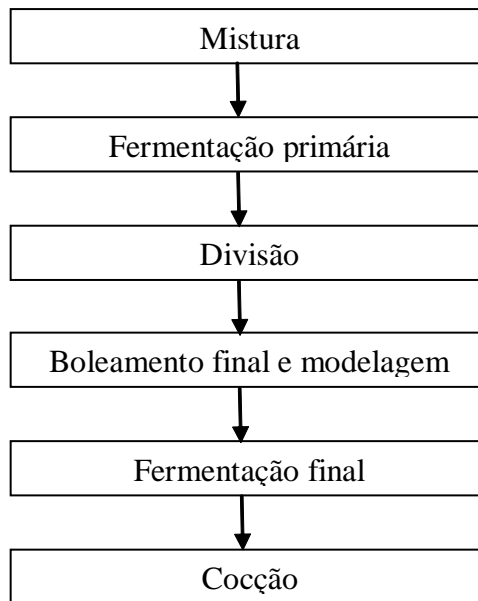


Figura 5. Diagrama de blocos do processo genérico de panificação

O processo genérico também se apresenta em quatro métodos ou grupos principais para o preparo de pães (CAUVAIN; YOUNG, 2009):

- método direto – onde há mistura e homogeneização de todos os ingredientes da massa, e os períodos de fermentação focam no volume da massa, entre a etapa de mistura e a etapa de divisão da própria massa;
- método “esponja e massa” - cuja uma parte dos ingredientes são separados e preparada uma massa para uma pré-fermentação (esponja), e após este período, são adicionados os demais ingredientes à massa, misturados e então submete-se a massa final a uma fermentação principal;
- processamento rápido - baseia-se em tempo muito curto ou nenhum tempo dado à etapa de fermentação, entre a mistura e a divisão;
- desenvolvimento mecânico da massa - onde uma função fundamental no processo de mistura é a geração de energia.

A etapa de fermentação da massa de pão caracteriza um processo de transformações bioquímicas e físico-químicas, onde o consumo de substrato pela ação microbiana (*Saccharomyces cerevisiae*) promove a formação de etanol, ácidos e de gás carbônico, o qual grande parte acaba retida pela rede do complexo proteico de glúten e pela gordura da massa. Durante esta etapa o calor é produzido e umidade é perdida, necessitando o controle do processo em câmaras de fermentação específicas para a área de panificação, as quais oferecem tais controles. A adição das enzimas, em especial as MTGases, é realizada na etapa de mistura dos ingredientes, para que as mesmas possam atuar concomitantemente à ação da levedura durante a etapa de fermentação. No caso do método “esponja”, esta adição pode variar de acordo com a formulação da massa e, nesse caso, as enzimas podem ser aplicadas integralmente na esponja ou na etapa seguinte, ou parcialmente na esponja, com o restante na etapa seguinte junto ao restante dos ingredientes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi realizado nos laboratórios de Processos Fermentativos do Departamento de Tecnologia de Alimentos do Instituto de Tecnologia da UFRRJ, no Laboratório de Actinomicetos do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da UFRJ, e no Laboratório de Processamento de Alimentos e Análise Instrumental de Alimentos (LAIA) do Instituto Federal do Rio de Janeiro.

4.1 Micro-Organismos e manutenção das linhagens

Um total de 116 linhagens, dentre elas actinomicetos e bacilos, pertencentes ao banco de culturas do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes/UFRJ foram investigadas quanto à produção da MTGase. Estas linhagens foram mantidas em glicerol a -18°C .

4.2 Meios de Cultivo

A composição das matérias-primas (coprodutos) avaliadas para compor os meios de cultivo durante a produção de MTGase por FS e FES está apresentada na Tabela 4. Os reagentes utilizados em meios de cultivo e soluções, assim como os equipamentos envolvidos neste trabalho estão todos apresentados na seção Anexos nas Tabelas 42 e 43.

Tabela 4. Composição da farinha de arroz, farelo de trigo e AMM

| | Farinha de arroz | Farelo de trigo | AMM |
|---------------|-------------------------|------------------------|------------|
| Amido (%) | 39,17±2,18 | 63,00 | ND |
| Proteínas (%) | 11,00±0,17 | 14,00 | 22,11±0,15 |
| Cinzas (%) | 8,3 ± 0,6 | ND | ND |
| Umidade (%) | 7,94± 0,17 | 7,00 | 57±0,3 |

ND – Não Determinado

4.2.1 Meio de cultivo para reativação, produção e contagem das linhagens

O meio de cultivo utilizado para reativação das linhagens foi descrito por Shirling e Gottlieb (1966) e sua composição encontra-se na Tabela 5. O meio foi diluído em água destilada, e ajustado a pH 7,0, e esterilizado a 121°C por 15 min.

Tabela 5. Composição do meio de cultivo para reativação dos micro-organismos

| Componente | Concentração (g/L) |
|---------------------|---------------------------|
| Extrato de levedura | 4,0 |
| Extrato de malte | 10,0 |
| Glicose | 4,0 |
| Ágar-ágar | 15,0 |
| Água | 1 Litro |

Fonte: SHIRLING; GOTTLIEB (1966)

4.2.2 Meio de cultivo para a seleção de linhagens

O meio de cultivo utilizado na FS para a produção de MTGase foi inicialmente o meio descrito por Ando et al (1989), e a Tabela 6 apresenta sua composição. Os reagentes foram pesados e diluídos em água destilada. O meio de cultivo foi ajustado a pH 7,0 e esterilizado a 121°C por 15 min.

Este meio foi usado nas etapas de seleção das linhagens. Por ser um meio mais adequados à produção de MTGase por linhagens selecionadas, este meio também serviu como base para o estudo da composição de um meio e das condições de cultivo na produção de MTGase,.

Tabela 6. Composição do meio de cultivo utilizado na FS durante a seleção das linhagens

| Componente | Concentração (g/L) |
|-----------------------------|---------------------------|
| Amido solúvel | 20,0 |
| Peptona de carne | 20,0 |
| Extrato de levedura | 2,0 |
| Potássio fosfato dibásico | 2,0 |
| Potássio fosfato monobásico | 2,0 |
| Sulfato de magnésio | 1,0 |
| Água | 1 Litro |

Fonte: Ando et al. (1989)

4.3 Preparo de inóculo

A reativação das linhagens foi realizada inoculando-se cada linhagem no meio de cultivo descrito na Tabela 5, em placas de Petri e incubando-as a 28°C por 7 a 10 dias.

Após a reativação do micro-organismo, seguiu-se o preparo do inóculo, com a transferência por repique do micro-organismo reativado para garrafas de Roux contendo o mesmo meio utilizado (Tabela 5), sendo então incubada a 28°C por até 12 dias.

Após este período foi adicionado à garrafa de Roux, 15 mL de solução de glicerol a 20 % em água destilada e pérolas de vidro estéreis. Movimentos aleatórios de agitação foram feitos, de forma que as pérolas de vidro auxiliassem na retirada do micélio formando uma suspensão de biomassa sobre a superfície do ágar. A suspensão contendo os micélios foi então filtrada em lã de vidro estéril, separando os esporos (filtrado) do micélio (retido). O filtrado foi inserido em tubo Falcon estéril, centrifugado, e o sobrenadante descartado. O centrifugado constituiu a suspensão concentrada de esporos. Em seguida essa suspensão foi congelada.

Para determinar a concentração desta suspensão, realizaram-se diluições seriadas até 10^9 e inoculou-se alíquotas de 0,1 mL em placas de Petri contendo o meio de cultivo (Tabela 5), sendo incubadas a 28 °C por até 48 h e, quando então foi realizada a contagem de células. Este procedimento possibilitou a determinação da concentração microbiana na suspensão de glicerol para utilizá-la como inóculo nos estudos subsequentes.

A partir do inóculo produzido e determinada sua concentração, todos os experimentos para produção da enzima MTGase foram iniciados com a inoculação direta e concentração sabida deste inóculo ao meio de cultivo, com exceção da 1ª etapa de seleção de linhagens (*screening*), a qual houve uma etapa prévia de reativação.

4.4 Seleção de linhagens produtoras de MTGase (screening)

O objetivo dessa etapa foi selecionar uma linhagem que apresentasse potencial para a produção de MTGase, para que, posteriormente, fosse utilizada em processos de produção da enzima por FS e FES.

4.4.1 Seleção de linhagens produtoras de MTGase - 1ª etapa

Nesta etapa uma alçada de cada uma das linhagens reativadas foi inoculada em 15 mL de meio de cultivo (Tabela 6) em frascos Erlenmeyer de 50 mL, e incubadas sob agitação de 180 rpm, a 28°C. Em 5 e 10 dias de fermentação, retirou-se amostras para determinação da atividade de MTGase, conforme seção 4.11.1. Foram selecionadas para a próxima etapa de seleção, as linhagens que apresentaram melhor desempenho em termos de atividade da enzima.

4.4.2 Seleção de linhagens produtoras de MTGase – 2ª etapa

Para melhor avaliar a produção de MTGase das linhagens selecionadas na primeira etapa (594, Cel-43, CG-08, FOP-33, P19 e V02), foi determinado período de 7 dias de fermentação, com retirada de amostras a cada 24 h. As linhagens foram inoculadas com concentração de 10^7 UFC/mL. Os experimentos foram conduzidos em frascos agitados (Erlenmeyer de 250 mL) contendo 75 mL de meio de cultivo sob agitação de 180 rpm, incubados a 28 °C.

A linhagem que apresentou melhor produção de MTGase - *Streptosporangium roseum* V02 - foi a selecionada para o desenvolvimento deste trabalho. Embora codificada como “V02”, trata-se de uma linhagem ATCC 12428.

4.5 Fermentação Submersa para Produção da MTGase

Após a escolha da linhagem que apresentou o melhor desempenho para a produção da MTGase, foram conduzidos planejamentos experimentais, que tiveram como objetivo avaliar a influência do pH, concentração de inóculo e concentração de componentes para um meio de cultivo, partindo como meio-base o descrito por Ando et al (1989). A temperatura de incubação e a velocidade de agitação foram fixadas em 28°C e 180 rpm, respectivamente.

Os ensaios referentes a este estudo foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 75 mL de meio de cultivo por até 7 dias, com acompanhamento através da determinação da atividade da MTGase em 3, 5 e 7 dias de fermentação. Para a escolha do tipo de planejamento a ser usado foi levado em consideração o número de variáveis a serem estudadas (variáveis independentes). Os experimentos foram executados em duplicata.

4.5.1 Delineamento Plackett-Burman para Fermentação Submersa

A influência dos componentes do meio de cultivo e dos parâmetros de processo sobre a produção MTGase pela linhagem selecionada foi testada através de delineamento experimental Plackett-Burman, o qual apresentou-se como opção adequada em função do número de variáveis segundo Rodrigues e Iema (2005). Os efeitos de alguns componentes do meio descrito por Ando et al (1989) foram investigados, porém as concentrações de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 e K_2HPO_4 não foram estudadas, sendo fixadas neste delineamento. As variáveis estudadas foram concentração de amido solúvel, peptona, extrato de levedura,

farinha de arroz, água de maceração de milho (AMM), pH e concentração inicial de inóculo, e as faixas dessas variáveis foram estabelecidas de acordo com valores observados na literatura, tanto no que diz respeito a estudos da produção de MTGase, como às exigências nutricionais para o crescimento da espécie utilizada. A matriz dos ensaios realizados, juntamente com as variáveis e seus respectivos valores reais e codificados, está apresentada nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Valores reais utilizados no delineamento Plackett-Burman na FS

| Variáveis | -1 | 0 | 1 |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Amido (g/L) | 10,0 | 20,0 | 30,0 |
| Farinha de arroz (g/L) | 10,0 | 20,0 | 30,0 |
| Peptona (g/L) | 10,0 | 20,0 | 30,0 |
| Extrato de levedura (g/L) | 2,0 | 4,0 | 6,0 |
| AMM (g/L)* | 10,0 | 20,0 | 30,0 |
| pH | 6,0 | 7,0 | 8,0 |
| Conc. do Inóculo (UFC/mL) | 10 ⁶ | 10 ⁷ | 10 ⁸ |

* AMM – água de maceração de milho

Tabela 8. Matriz do delineamento Plackett-Burman na FS

| Ensaio | Amido (g/L) | Farinha de arroz (g/L) | Peptona (g/L) | Extrato de levedura (g/L) | AMM (g/L) | pH | Concentração inóculo (UFC/mL) |
|--------|-------------|------------------------|---------------|---------------------------|-----------|----------|-------------------------------|
| 1 | +1 (30,0) | -1 (10,0) | +1 (30,0) | -1 (2,0) | -1 (10,0) | -1 (6,0) | +1 (10 ⁸) |
| 2 | +1 (30,0) | +1 (30,0) | -1 (10,0) | +1 (6,0) | -1 (10,0) | -1 (6,0) | -1 (10 ⁶) |
| 3 | -1 (10,0) | +1 (30,0) | +1 (30,0) | -1 (2,0) | +1 (30,0) | -1 (6,0) | -1 (10 ⁶) |
| 4 | +1 (30,0) | -1 (10,0) | +1 (30,0) | +1 (6,0) | -1 (10,0) | +1 (8,0) | -1 (10 ⁶) |
| 5 | +1 (30,0) | +1 (30,0) | -1 (10,0) | +1 (6,0) | +1 (30,0) | -1 (6,0) | +1 (10 ⁸) |
| 6 | +1 (30,0) | +1 (30,0) | +1 (30,0) | -1 (2,0) | +1 (30,0) | +1 (8,0) | -1 (10 ⁶) |
| 7 | -1 (10,0) | +1 (30,0) | +1 (30,0) | +1 (6,0) | -1 (10,0) | +1 (8,0) | +1 (10 ⁸) |
| 8 | -1 (10,0) | -1 (10,0) | +1 (30,0) | +1 (6,0) | +1 (30,0) | -1 (6,0) | +1 (10 ⁸) |
| 9 | -1 (10,0) | -1 (10,0) | -1 (10,0) | +1 (6,0) | +1 (30,0) | +1 (8,0) | -1 (10 ⁶) |
| 10 | +1 (30,0) | -1 (10,0) | -1 (10,0) | -1 (2,0) | +1 (30,0) | +1 (8,0) | +1 (10 ⁸) |
| 11 | -1 (10,0) | +1 (30,0) | -1 (10,0) | -1 (2,0) | -1 (10,0) | +1 (8,0) | +1 (10 ⁸) |
| 12 | -1 (10,0) | -1 (10,0) | -1 (10,0) | -1 (2,0) | -1 (10,0) | -1 (6,0) | -1 (10 ⁶) |
| 13 | 0 (20,0) | 0 (20,0) | 0 (20,0) | 0 (4,0) | 0 (20,0) | 0 (7,0) | 0 (10 ⁷) |
| 14 | 0 (20,0) | 0 (20,0) | 0 (20,0) | 0 (4,0) | 0 (20,0) | 0 (7,0) | 0 (10 ⁷) |
| 15 | 0 (20,0) | 0 (20,0) | 0 (20,0) | 0 (4,0) | 0 (20,0) | 0 (7,0) | 0 (10 ⁷) |

1.1.1 Delineamentos Fatoriais Fracionados para Fermentação Submersa

Depois de analisar os efeitos observados no primeiro delineamento, um segundo delineamento, do tipo fatorial fracionado foi proposto conforme apresentado nas Tabelas 9 e 10, para avaliar o efeito de variáveis significativas observadas no delineamento anterior. Neste delineamento foram retiradas amostras para análise da atividade MTGase em 3, 5 e 7 dias.

Neste segundo delineamento foram estudadas as variáveis de processo com o objetivo de, posteriormente, estabelecer condições otimizadas para a produção de MTGase. A faixa de estudo para cada variável foi estabelecida mediante os efeitos observados no delineamento anterior.

Tabela 9. Valores reais utilizados no delineamento fatorial fracionado (2^{5-1}) na FS

| Variáveis | -1 | 0 | 1 |
|---------------------------|-----------|----------|----------|
| Farinha de arroz (g/L) | 40,0 | 60,0 | 80,0 |
| Peptona (g/L) | 20,0 | 30,0 | 40,0 |
| Extrato de levedura (g/L) | 0,0 | 1,0 | 2,0 |
| pH | 7,0 | 8,0 | 9,0 |
| Conc. do Inóculo (UFC/mL) | 10^7 | 10^8 | 10^9 |

Tabela 10. Matriz do delineamento fatorial fracionado (2^{5-1}) na FS

| Ensaio | Farinha de arroz (g/L) | Peptona (g/L) | Extrato de levedura (g/L) | pH | Concentração inóculo (UFC/mL) |
|---------------|-------------------------------|----------------------|----------------------------------|-----------|--------------------------------------|
| 1 | -1 (40,0) | -1 (20,0) | -1 (0,0) | -1 (7,0) | +1 (10^9) |
| 2 | +1 (80,0) | -1 (20,0) | -1 (0,0) | -1 (7,0) | -1 (10^7) |
| 3 | -1 (40,0) | +1 (40,0) | -1 (0,0) | -1 (7,0) | -1 (10^7) |
| 4 | +1 (80,0) | +1 (40,0) | -1 (0,0) | -1 (7,0) | +1 (10^9) |
| 5 | -1 (40,0) | -1 (20,0) | +1 (2,0) | -1 (7,0) | -1 (10^7) |
| 6 | +1 (80,0) | -1 (20,0) | +1 (2,0) | -1 (7,0) | +1 (10^9) |
| 7 | -1 (40,0) | +1 (40,0) | +1 (2,0) | -1 (7,0) | +1 (10^9) |
| 8 | +1 (80,0) | +1 (40,0) | +1 (2,0) | -1 (7,0) | -1 (10^7) |
| 9 | -1 (40,0) | -1 (20,0) | -1 (0,0) | +1 (9,0) | -1 (10^7) |
| 10 | +1 (80,0) | -1 (20,0) | -1 (0,0) | +1 (9,0) | +1 (10^9) |
| 11 | -1 (40,0) | +1 (40,0) | -1 (0,0) | +1 (9,0) | +1 (10^9) |
| 12 | +1 (80,0) | +1 (40,0) | -1 (0,0) | +1 (9,0) | -1 (10^7) |
| 13 | -1 (40,0) | -1 (20,0) | +1 (2,0) | +1 (9,0) | +1 (10^9) |
| 14 | +1 (80,0) | -1 (20,0) | +1 (2,0) | +1 (9,0) | -1 (10^7) |
| 15 | -1 (40,0) | +1 (40,0) | +1 (2,0) | +1 (9,0) | -1 (10^7) |
| 16 | +1 (80,0) | +1 (40,0) | +1 (2,0) | +1 (9,0) | +1 (10^9) |
| 17 | 0 (60,0) | 0 (30,0) | 0 (1,0) | 0 (8,0) | 0 (10^8) |
| 18 | 0 (60,0) | 0 (30,0) | 0 (1,0) | 0 (8,0) | 0 (10^8) |
| 19 | 0 (60,0) | 0 (30,0) | 0 (1,0) | 0 (8,0) | 0 (10^8) |
| 20 | 0 (60,0) | 0 (30,0) | 0 (1,0) | 0 (8,0) | 0 (10^8) |

Após analisar os efeitos observados no delineamento fatorial fracionado, um terceiro delineamento, também do tipo fatorial fracionado, foi proposto conforme apresentado nas Tabelas 11 e 12, para avaliar o efeito de variáveis que se mostraram significativas no delineamento fracionado anterior. As amostras para análise da atividade MTGase também foram retiradas em 3, 5 e 7 dias.

Tabela 11. Valores reais utilizados no delineamento fatorial fracionado (2^{4-1}) na FS

| Variáveis | -1 | 0 | 1 |
|---------------------------|--------|--------|--------|
| Farinha de arroz (g/L) | 20,0 | 30,0 | 40,0 |
| Peptona (g/L) | 20,0 | 30,0 | 40,0 |
| pH | 7,0 | 8,0 | 9,0 |
| Conc. do Inóculo (UFC/mL) | 10^7 | 10^8 | 10^9 |

Tabela 12. Matriz do delineamento fatorial fracionado (2^{4-1}) na FS

| Ensaio | Farinha de arroz (g/L) | Peptona (g/L) | pH | Concentração inóculo (UFC/mL) |
|--------|------------------------|---------------|----------|-------------------------------|
| 1 | -1 (20,0) | -1 (20,0) | -1 (7,0) | -1 (10^7) |
| 2 | +1 (40,0) | -1 (20,0) | -1 (7,0) | +1 (10^9) |
| 3 | -1 (20,0) | +1 (40,0) | -1 (7,0) | +1 (10^9) |
| 4 | +1 (40,0) | +1 (40,0) | -1 (7,0) | -1 (10^7) |
| 5 | -1 (20,0) | -1 (20,0) | +1 (9,0) | +1 (10^9) |
| 6 | +1 (40,0) | -1 (20,0) | +1 (9,0) | -1 (10^7) |
| 7 | -1 (20,0) | +1 (40,0) | +1 (9,0) | -1 (10^7) |
| 8 | +1 (40,0) | +1 (40,0) | +1 (9,0) | +1 (10^9) |
| 9 | 0 (30,0) | 0 (30,0) | 0 (8,0) | 0 (10^8) |
| 10 | 0 (30,0) | 0 (30,0) | 0 (8,0) | 0 (10^8) |
| 11 | 0 (30,0) | 0 (30,0) | 0 (8,0) | 0 (10^8) |
| 12 | 0 (30,0) | 0 (30,0) | 0 (8,0) | 0 (10^8) |

Após os delineamentos, foi selecionada uma condição de ensaio para a produção de MTGase em FS, realizando-se acompanhamento cinético da produção durante 7 dias, para que tais condições fossem confirmadas. O acompanhamento sob estas condições foi realizado em quatro réplicas.

4.6 Fermentação em Estado Sólido para Produção da MTGase

Após avaliar o desempenho da linhagem selecionada para produção da enzima em FS foram feitos ensaios com esta mesma linhagem utilizando FES.

Para este tipo de fermentação, utilizou-se farelo de trigo (matéria-prima contendo 7 % de umidade) tanto como suporte sólido, como fonte de carbono (amido residual).

Para a Fermentação em Estado Sólido, foi utilizado apenas um delineamento, o delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} , com o objetivo de avaliar a influência da concentração de inóculo, relação água:farelo de trigo, concentração de AMM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e KH_2PO_4 na produção da enzima. Adicionou-se ao meio, uma solução salina contendo micronutrientes utilizada por Nagy e Szakacs (2008), composta por $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $MnSO_4$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, cujas concentrações foram fixadas e estão apresentadas na Tabela 15. O pH do meio de cultivo foi fixado em 7,0.

Em função do número de variáveis independentes para esse estudo, utilizou-se o delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} . A matriz utilizada para avaliar as variáveis com seus respectivos valores reais e codificados estão dispostos nas Tabelas 13 e 14. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Tabela 13. Valores reais utilizados no delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} na FES

| Variáveis | -1 | 0 | 1 |
|---|--------|--------|--------|
| Conc. do Inóculo (UFC/g de meio) | 10^6 | 10^7 | 10^8 |
| Relação H ₂ O/Farelo de trigo (mL/100g) | 40,0 | 60,0 | 80,0 |
| AMM (g/100g de meio) | 5,0 | 30,0 | 55,0 |
| KH ₂ PO ₄ (g/100g de meio) | 1,0 | 5,0 | 9,0 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O (g/100g de meio) | 1,0 | 3,0 | 5,0 |

Tabela 14. Matriz do delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} na FES

| Ensaio | Concentração inóculo (UFC/g _{meio}) | H ₂ O/Farelo (mL/100 g) | AMM* (g/100 g _{meio}) | KH ₂ PO ₄ (g/100 g _{meio}) | MgSO ₄ .7H ₂ O (g/100 g _{meio}) |
|--------|---|------------------------------------|---------------------------------|--|---|
| 1 | -1 (10^6) | -1 (40,0) | -1 (5,0) | -1 (1,0) | +1 (5,0) |
| 2 | +1 (10^8) | -1 (40,0) | -1 (5,0) | -1 (1,0) | -1 (1,0) |
| 3 | -1 (10^6) | +1 (80,0) | -1 (5,0) | -1 (1,0) | -1 (1,0) |
| 4 | +1 (10^8) | +1 (80,0) | -1 (5,0) | -1 (1,0) | +1 (5,0) |
| 5 | -1 (10^6) | -1 (40,0) | +1 (55,0) | -1 (1,0) | -1 (1,0) |
| 6 | +1 (10^8) | -1 (40,0) | +1 (55,0) | -1 (1,0) | +1 (5,0) |
| 7 | -1 (10^6) | +1 (80,0) | +1 (55,0) | -1 (1,0) | +1 (5,0) |
| 8 | +1 (10^8) | +1 (80,0) | +1 (55,0) | -1 (1,0) | -1 (1,0) |
| 9 | -1 (10^6) | -1 (40,0) | -1 (5,0) | +1 (9,0) | -1 (1,0) |
| 10 | +1 (10^8) | -1 (40,0) | -1 (5,0) | +1 (9,0) | +1 (5,0) |
| 11 | -1 (10^6) | +1 (80,0) | +1 (55,0) | +1 (9,0) | +1 (5,0) |
| 12 | +1 (10^8) | +1 (80,0) | +1 (55,0) | +1 (9,0) | -1 (1,0) |
| 13 | -1 (10^6) | -1 (40,0) | +1 (55,0) | +1 (9,0) | +1 (5,0) |
| 14 | +1 (10^8) | -1 (40,0) | +1 (55,0) | +1 (9,0) | -1 (1,0) |
| 15 | -1 (10^6) | +1 (80,0) | 0 (30,0) | +1 (9,0) | -1 (1,0) |
| 16 | +1 (10^8) | +1 (80,0) | 0 (30,0) | +1 (9,0) | +1 (5,0) |
| 17 | 0 (10^7) | 0 (60,0) | 0 (30,0) | 0 (5,0) | 0 (3,0) |
| 18 | 0 (10^7) | 0 (60,0) | 0 (30,0) | 0 (5,0) | 0 (3,0) |
| 19 | 0 (10^7) | 0 (60,0) | 0 (30,0) | 0 (5,0) | 0 (3,0) |
| 20 | 0 (10^7) | 0 (60,0) | 0 (30,0) | 0 (5,0) | 0 (3,0) |

* AMM – água de maceração de milho

Os ensaios referentes a este estudo foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 20 g de meio de cultivo. Esses foram incubados em estufa B.O.D. a 28°C por período de até 7 dias, com acompanhamento através da determinação da atividade da MTGase nos tempos de 3, 5 e 7 dias de fermentação.

A partir dos resultados do delineamento proposto na Tabela 14, foi selecionado um meio de cultivo conforme a Tabela 15, e a concentração considerada ideal do inóculo foi 10^6 UFC/g.

Tabela 15. Composição do meio de cultivo para FES

| Componentes | Quantidades |
|--------------------------------------|--|
| Farelo de trigo | 100 g |
| H ₂ O | 80 mL |
| KH ₂ PO ₄ | 0,1813 g (corresponde a 0,1 % no meio) |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,1813 g (corresponde a 0,1 % no meio) |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 6,67x10 ⁻⁴ g |
| MnSO ₄ | 5,32 x10 ⁻⁴ g |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 1,386 x10 ⁻³ g |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 2,029 x10 ⁻³ g |
| pH | 7,0 |

A temperatura e o período de incubação foram 28 °C e 8 dias, respectivamente. Com o objetivo de confirmar as condições de cultivo e a composição do meio de cultivo, foi então procedido, em triplicata, o acompanhamento cinético da produção de MTGase pela linhagem V02 por 8 dias.

4.7 Obtenção do extrato enzimático

4.7.1 Extrato enzimático a partir da FS

Nos estudos em FS, as amostras do meio fermentado foram retiradas para obtenção do extrato enzimático, e posterior determinação e acompanhamento da produção de MTGase.

Alíquotas de 2,0 mL das amostras foram colocadas em tubos Eppendorf, os quais foram centrifugados a 12.000 rpm por 3 min. O sobrenadante recolhido compunha o extrato enzimático utilizado para determinações da atividade de MTGase.

4.7.2 Extrato enzimático a partir da FES

Nos estudos em FES, a extração procedeu-se conforme Gomes (1995), utilizando-se para esta enzima solução tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 6,0 na razão de 50 mL de solução por 20 g de meio fermentado. Após adicionar a solução tampão ao meio fermentado, incubou-se o mesmo em banho termostático a 28°C por 1 h. Seguiu-se com filtração em peneira de 1 mm de diâmetro e, posterior centrifugação a 4.000 rpm por 15 min. O sobrenadante (extrato enzimático) foi utilizado nas determinações da atividade enzimática.

4.8 Concentração por liofilização

Estabelecidas as melhores condições, dentro das faixas estudadas, para a produção de MTGase obtida a partir da FES pela linhagem selecionada, foram conduzidos ensaios para determinar as melhores condições para concentração da enzima MTGase produzida nesse trabalho, através de liofilização.

Com o objetivo de promover o aumento da estabilidade da enzima durante o processo de concentração, juntamente com o material a ser liofilizado, foram adicionadas substâncias com capacidade “crioprotetora”, conforme Tabela 16, buscando produzir uma matriz de estabilização amorfa ou parcialmente amorfa com auxílio deste aditivo.

Um ensaio controle também foi realizado, o qual não foi adicionado qualquer aditivo. O processo de liofilização foi conduzido a 30 µHg, -51°C por 48 h.

A fim de avaliar a capacidade de manutenção da atividade catalítica da enzima durante o processo de liofilização, foram conduzidos experimentos na presença e na ausência dessas substâncias crioprotetoras. Frascos contendo 100 mL do extrato enzimático, com adição ou não do referido agente, foram inseridos no liofilizador. As concentrações do aditivo utilizado estão apresentadas na Tabela 16. Depois de liofilizado, os extratos enzimáticos secos foram solubilizados em volume de 10 mL. As atividades desses extratos foram medidas para avaliar a real necessidade da presença desses aditivos como crioprotetores e, caso a presença fosse necessária foi avaliado qual crioprotetor apresentaria melhor funcionalidade. A eficiência deste processo foi calculada pela razão entre a atividade do extrato liofilizado e solubilizado, pela atividade que seria esperada num processo considerado ideal, ou seja, teoricamente sem perdas de atividade do extrato. A eficiência é representada pela equação 1. Esta etapa foi feita em triplicata sendo que, cada replicata foi feita em diferentes dias.

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{\text{atividade do extrato liofilizado solubilizado} \times 100}{\text{atividade teórica do extrato} \times 10} \quad \text{Equação (1)}$$

Escolhido o melhor crioprotetor e sua respectiva concentração, foi realizado um novo processo de liofilização, repetindo-se a condição selecionada para o agente escolhido, porém, solubilizando o extrato liofilizado em menor volume possível, com o objetivo de obter um extrato o mais concentrado possível, em relação ao original. Neste ensaio foram realizadas 7 replicatas e de forma aleatória.

Tabela 16. Condições avaliadas durante processo de liofilização

| Ensaios | Componentes | Concentração (%) |
|---------|---------------|------------------|
| 1 | Controle | Sem aditivo |
| 2 | Sacarose | 2,5 |
| 3 | Sacarose | 5,0 |
| 4 | Maltodextrina | 2,5 |

Ao término do processo, as amostras foram submetidas às análises de atividade da MTGase e de proteínas totais. O extrato enzimático liofilizado foi utilizado para estudos de caracterização bioquímica da MTGase.

4.9 Ensaios para caracterização bioquímica da enzima MTGase

Estabelecidas as melhores condições para a produção da MTGase e sua concentração por liofilização, foram realizados ensaios para determinar as melhores condições de reação da enzima e de sua estabilidade térmica.

4.9.1 Determinação da temperatura e pH ótimos reacionais

Para a determinação da temperatura e pH ótimos do extrato enzimático contendo MTGase foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2², conforme as Tabelas 17 e 18, com os valores das variáveis em estudo estabelecidos de acordo com a literatura.

Tabela 17. Valores reais utilizados no DCCR 2² para otimização dos parâmetros reacionais da MTGase

| Variáveis | -1,4142 | -1 | 0 | 1 | 1,4142 |
|------------------|----------------|-----------|----------|----------|---------------|
| Temperatura (°C) | 30 | 36 | 50 | 64 | 70 |
| pH | 4,0 | 4,6 | 6,0 | 7,4 | 8,0 |

Tabela 18. Matriz do delineamento DCCR 2² para otimização dos parâmetros reacionais da MTGase

| Ensaio/ | Temperatura (°C) | pH |
|----------------|-------------------------|---------------|
| 1 | -1 (36) | -1 (4,6) |
| 2 | 1 (64) | -1 (4,6) |
| 3 | -1 (36) | 1 (7,4) |
| 4 | 1 (64) | 1 (7,4) |
| 5 | -1,4142 (30) | 0 (6,0) |
| 6 | 1,4142 (70) | 0 (6,0) |
| 7 | 0 (50) | -1,4142 (4,0) |
| 8 | 0 (50) | 1,4142 (8,0) |
| 9 | 0 (50) | 0 (6,0) |
| 10 | 0 (50) | 0 (6,0) |
| 11 | 0 (50) | 0 (6,0) |
| 12 | 0 (50) | 0 (6,0) |

A determinação da atividade da MTGase ocorreu conforme metodologia descrita no seção 4.11.1, substituindo-se a temperatura de reação e o pH das soluções tampão pelos valores escolhidos para o delineamento. As análises dos resultados foram realizadas considerando-se 5 % de significância.

4.9.2 Determinação da termoestabilidade da MTGase

A avaliação da termoestabilidade da MTGase foi realizada incubando-se o extrato enzimático, sem o substrato, sob várias temperaturas (35, 50, 60 e 70 °C). Em intervalos regulares, alíquotas do extrato foram retiradas e a atividade da MTGase residual foi medida, utilizando-se temperatura e pH ideais (45°C, 6,6) estabelecidos no seção 4.9.1.

Para avaliar a estabilidade da enzima após estocagem, o extrato enzimático foi mantido a -18°C (freezer) e a 4°C (geladeira). Em intervalos de 1 semana, amostras foram retiradas e a atividade da MTGase residual determinada.

4.10 Aplicação de MTGase em massa de pão sem glúten

4.10.1 Preparo da massa

Para a elaboração do pão, ilustrada no diagrama de blocos (Figura 6), foi utilizada a metodologia esponja e massa. A fração farinácea seguiu composição conforme Ramos (2013), baseada na mistura de farinhas alimentícias sem glúten.

Nesta metodologia, a fração da esponja corresponde a 30 % da mistura farinácea. As condições dos ensaios de aplicação das enzimas MTGase, comercial e produzida pelo *S. roseum* V02 na massa do pão estão apresentados na Tabela 19. Primeiramente, para cada ensaio estudado, a enzima foi solubilizada em uma fração aquosa de gel de amido, que em seguida foi adicionada à esponja. A esponja foi incubada a temperatura de 35 °C com umidade controlada, por 20 min.

Tabela 19. Ensaios comparativos para aplicação das MTGases à esponja

| Ensaios | Aplicação de MTGases à esponja |
|-------------------------|---------------------------------------|
| Controle | Sem adição de MTGases |
| MTGase comercial | 0,2 U/100 g (base farinha) |
| MTGase comercial | 2,0 U/100 g (base farinha) |
| MTGase <i>S. roseum</i> | 0,2 U/100 g (base farinha) |
| MTGase <i>S. roseum</i> | 2,0 U/100 g (base farinha) |

Após o tempo de incubação, à esponja foi adicionado ao restante dos ingredientes e submetidos à etapa de mistura.

Porções de 50 g foram submetidas novamente à incubação por 35 °C por 40 min. E por fim, a massa fermentada foi ao cozimento entre 160-170 °C, por aproximadamente 1 h, até coloração característica do pão.

Preparo de Pão sem-glúten
(Método Esponja)

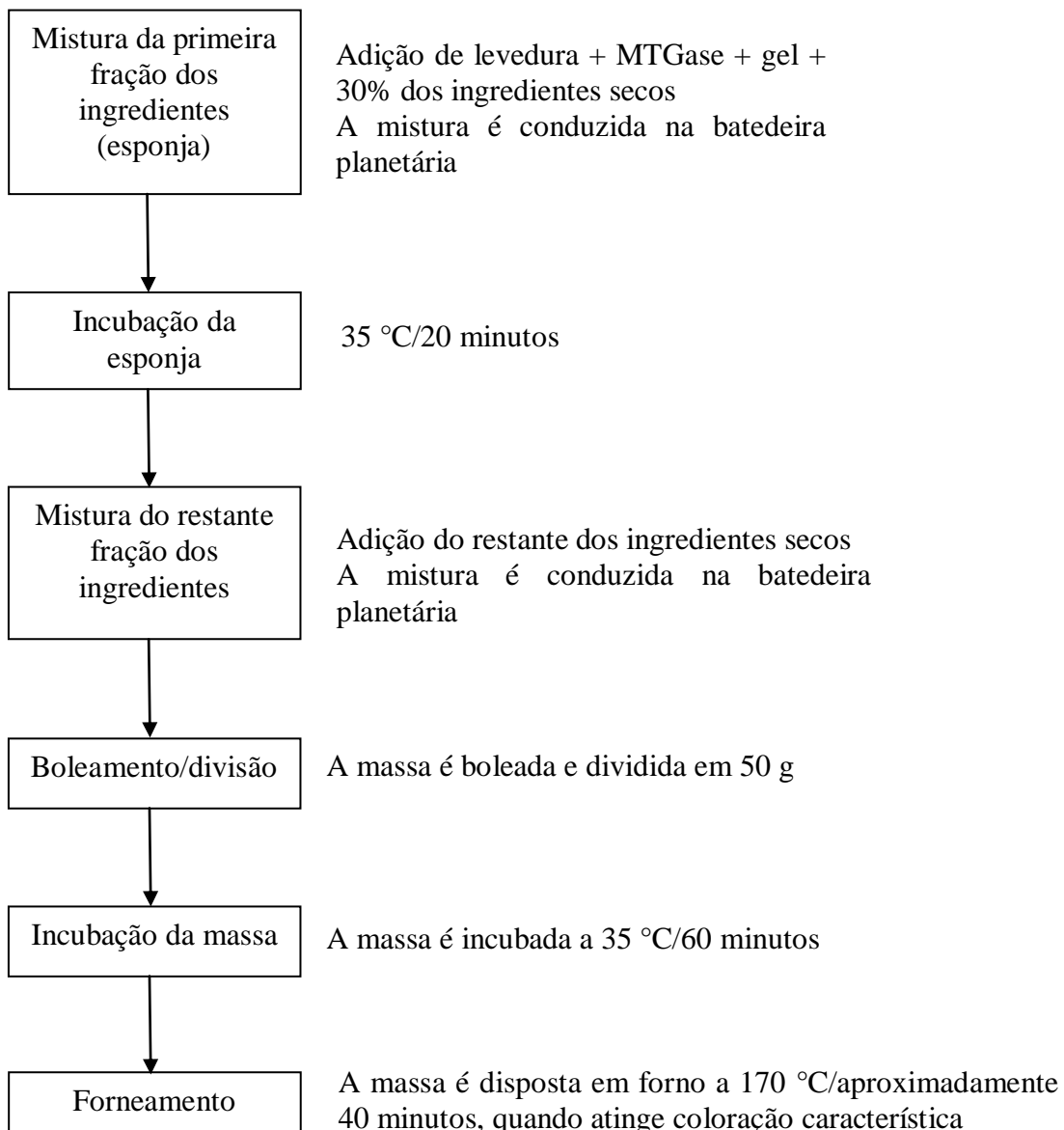


Figura 6. Diagrama de blocos do processo de fabricação de pão pelo método esponja

4.10.2 Avaliação da aplicação em massa de pães sem glúten

O produto foi avaliado por seu aspecto visual quanto à presença de rachaduras e uniformidade da estrutura celular, volume específico e força de compressão do miolo através de texturômetro.

A composição da massa de pão sem glúten está expressa na Tabela 20. Os percentuais foram calculados considerando-se as farinhas amiláceas (90 g) como 100 % e os outros percentuais foram obtidos a partir desta.

Tabela 20. Composição da massa de pão sem glúten

| Ingredientes | Massa (g) | Percentual |
|----------------------------------|------------------|-------------------|
| Farinhas amiláceas | 90 | --- |
| Fermento | 2 | 2,2 |
| Sal Refinado | 2 | 2,2 |
| Açúcar refinado | 5 | 5,6 |
| Proteína do leite | 15 | 16,7 |
| Gordura | 5 | 5,6 |
| Fibra de Maçã | 5 | 5,6 |
| Goma Xantana + HPMC (1,5+0,5) | 2 | 2,2 |
| Gel de amido | 120 | 133,0 |

Os pães assados foram pesados e o volume foi determinado pelo método de deslocamento de sementes de painço, sendo o volume de sementes deslocadas medidas em proveta graduada em mL. O volume específico foi verificado pela razão entre o volume e o peso assado de uma mesma amostra (mL/g). O percentual de perda de peso no forneamento foi calculado em relação ao peso da massa crua e da massa assada.

4.11 Determinações analíticas gerais

4.11.1 Determinação de atividade de transglutaminase

A atividade enzimática foi determinada de acordo com Grossowicz et al. (1950). Nesse método dois reagentes (Reagente A e Reagente B) foram preparados, sendo a composição:

Reagente A: tampão Tris-acetato 200 mmol/L e pH 6,0 contendo 100 mmol/L de hidroxilamina, 10 mmol/L de glutatona reduzida e 30 mmol/L de CBZ-Gln-Gly.

Reagente B: solução 1:1:1 (v/v/v) de HCl 3 mol/L; ácido tricloroacético 12 %; FeCl₃.6H₂O 5 % dissolvido em HCl 0,1 mol/L.

Em 400 µL de extrato enzimático adicionou-se a mesma quantidade de reagente A. Após a homogeneização incubou-se por 10 min a 37 °C e interrompeu-se a reação adicionando 400 µL do reagente B. Procedeu-se a leitura da coloração em espectrofotômetro a 525 nm.

A curva-padrão foi feita com ácido L-glutâmico-γ-monohidroxâmico. Sendo que uma unidade de atividade enzimática MTGase foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1,0 µmol de hidroxamato por minuto nas condições do ensaio.

As determinações descritas nesta seção foram feitas em duplicata ou triplicatas.

4.11.2 Determinação de proteína total no extrato enzimático

A determinação da proteína total foi realizada conforme metodologia descrita por Bradford (1976). A curva padrão foi construída usando ovoalbumina.

4.11.3 Atividade específica aparente de MTGase

A atividade específica aparente da MTGase foi calculada pela razão da atividade de MTGase (4.11.1) e a concentração de proteína total no extrato enzimático (4.11.2).

4.11.4 Determinação de atividade de protease

A determinação de atividade proteolítica foi realizada conforme Charney e Tomarelli (1947). Este método fundamenta-se na formação de derivados corados em meio alcalino, a partir da digestão de uma solução de azocaseína.

A mistura reacional consistiu em 0,5 mL de solução 0,5 % de azocaseína em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 6,0 e 0,5 mL do extrato enzimático. Após 40 min de reação a 37 °C foi adicionado 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10 %, para parar a reação desnaturando as enzimas.

A amostra foi então centrifugada a 3000 rpm por 15 min, e recolhido 2 mL do sobrenadante. Adicionou-se a este 2 mL de solução hidróxido de sódio (KOH) 5 mol/L, para formação do composto cromóforo. A mistura foi homogeneizada e procedeu-se à leitura em espectrofotômetro a 428 nm.

Para cada amostra foi feito um branco utilizando-se o extrato enzimático inativado em banho-maria a 100°C por 20 min.

Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima que produziu uma diferença de 0,01 de absorvância por minuto de reação entre o branco reacional e a amostra nas condições de ensaio.

As determinações descritas nesta seção foram feitas em triplicata.

4.11.5 Determinação de atividade de α -amilase

A determinação de atividade de α -amilase foi realizada adicionando-se 1,0 mL de solução enzimática a 1,0 mL de solução de amido a 2% em tampão fosfato 0,2 mol/L pH 6,0 (substrato) aclimatado a 37°C. Homogeneizados e mantidos a 37 °C por 30 min.

Após decorrido o tempo de reação, retirou-se 1 mL da mistura e seguiu-se com a determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi (1952).

Para a amostra foi feito um branco utilizando-se o extrato enzimático inativado em banho-maria a 100 °C por 20 min.

Uma unidade corresponde a 1 μ mol de glicose liberado por minuto nas condições de reação.

O experimento foi realizado em triplicata.

4.11.6 Determinação de Umidade no meio de cultivo em FES

A umidade do meio de cultivo utilizado em FES foi determinada pelo método 934.01 da AOAC (2005), onde aproximadamente 50 g da amostra de meio de cultivo foi pesada e

submetida a 100 °C (1 atm) por 24 h. Após esse período, a amostra seca foi colocada em dessecador para resfriamento a temperatura ambiente e posteriormente pesada.

A umidade, expressa em %, foi a relação entre a diferença de massa das amostras seca e antes da secagem, pela massa da amostra antes da secagem.

As determinações descritas nesta seção foram feitas em triplicata.

4.12 Análise Estatística

As análises dos resultados foram feitas utilizando o *software* STATISTICA versão 7.0 (StatSoft Inc.USA), sendo utilizado 90 % de confiança.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Seleção de linhagens (screening) – 1ª etapa

Das 116 linhagens de actinomicetos e bacilos, testadas para produção de MTGase, 44 apresentaram atividade de MTGase em 5 dias de fermentação, enquanto 35 linhagens precisaram de 10 dias para expressar alguma atividade de MTGase, como pode ser observado na Tabela 21.

Tabela 21. Linhagens que apresentaram produção de MTGase e suas respectivas atividades (U/mL) em 5 e 10 dias de fermentação em meio de cultivo proposto por Ando et al (1989)

| Linhagens* | 5 dias | 10 dias | Linhagens* | 5 dias | 10 dias |
|--------------------|--------|---------|------------|--------|---------|
| 606 ^{**} | 0,02 | 0,00 | IGLO-10 | 0,05 | 0,00 |
| AMR ^{**} | 0,01 | 0,03 | IGLO-14 | 0,02 | 0,00 |
| FP4E ^{**} | 0,01 | 0,03 | L28 | 0,00 | 0,02 |
| 52 | 0,02 | 0,00 | LX-01 | 0,02 | 0,00 |
| 80 | 0,06 | 0,00 | LX-16 | 0,02 | 0,03 |
| 578 | 0,05 | 0,04 | LX-18 | 0,02 | 0,02 |
| 594 | 0,14 | 0,00 | MD-05 | 0,01 | 0,00 |
| 788 | 0,00 | 0,04 | MG-28 | 0,03 | 0,01 |
| 810 | 0,00 | 0,03 | MG-65 | 0,04 | 0,00 |
| 3112 | 0,01 | 0,01 | MG-82 | 0,02 | 0,00 |
| 3261 | 0,00 | 0,01 | OP-07 | 0,01 | 0,00 |
| 375-05 | 0,00 | 0,02 | OP-20 | 0,01 | 0,01 |
| 375-16 | 0,01 | 0,01 | OP-25 | 0,01 | 0,00 |
| 375-19 | 0,01 | 0,02 | P-63 | 0,00 | 0,02 |
| Albulus | 0,04 | 0,00 | P19 | 0,00 | 0,09 |
| C | 0,07 | 0,00 | P59 | 0,00 | 0,03 |
| C04 | 0,00 | 0,05 | RM-02 | 0,02 | 0,00 |
| Cel-17 | 0,06 | 0,01 | SI-65 | 0,00 | 0,01 |
| Cel-43 | 0,11 | 0,11 | SI-C11 | 0,00 | 0,04 |
| CG-08 | 0,12 | 0,03 | SI-C26 | 0,00 | 0,03 |
| CG-75 | 0,02 | 0,00 | SL-09 | 0,06 | 0,00 |
| D | 0,02 | 0,00 | SL-13 | 0,00 | 0,01 |
| DRO-08 | 0,00 | 0,04 | SL-30 | 0,00 | 0,01 |
| FOP-07 | 0,07 | 0,00 | SR-09 | 0,00 | 0,01 |
| FOP-08 | 0,05 | 0,00 | SR-14 | 0,05 | 0,01 |
| FOP-33 | 0,13 | 0,00 | V01 | 0,02 | 0,03 |
| IGAR-01 | 0,05 | 0,00 | V05 | 0,00 | 0,02 |
| IGLO-04 | 0,00 | 0,01 | V02 | 0,34 | 0,00 |

* codificação das linhagens no banco de micro-organismos do Instituto de Microbiologia da UFRJ

** linhagens de *Bacillus* sp.

Seis linhagens apresentaram valores de atividade entre 0,09 e 0,34 U/mL, ou seja, as linhagens codificadas como 594, Cel-43, CG-08, FOP-33, P19 e V02, todas actinomicetos,

foram identificadas como melhores produtoras de MTGase, sendo selecionadas para a realização da segunda etapa de seleção.

5.2 Seleção de linhagens – 2ª etapa

A Figura 7 apresentam o perfil cinético de produção de MTGase das seis linhagens selecionadas na primeira etapa de screening. Esta Figura representa os resultados da Tabela 44 (seção Anexo).

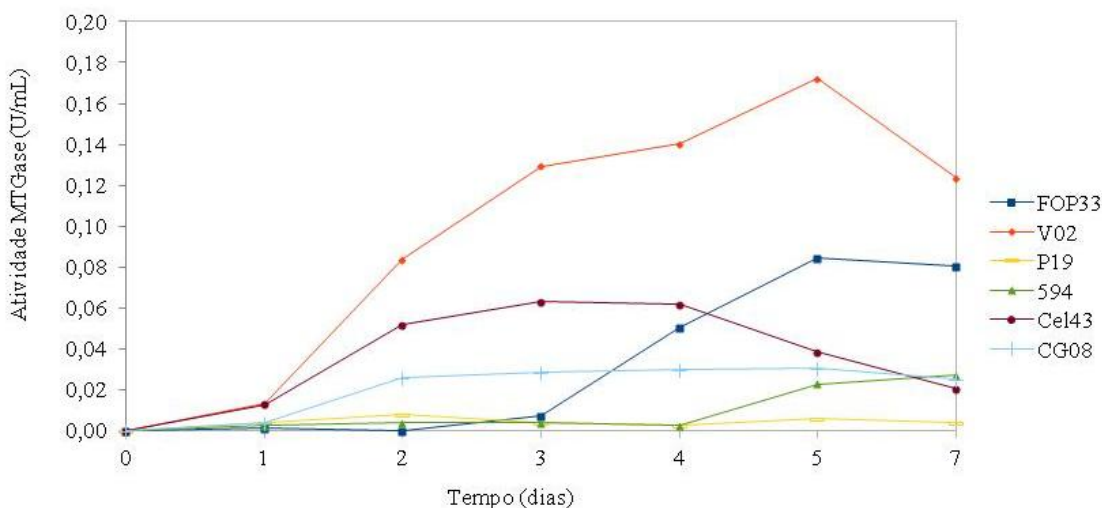


Figura 7. Perfil cinético da produção de MTGase pelas seis linhagens selecionadas em meio de cultivo proposto por Ando et al (1989)

Nesta segunda etapa de seleção, a linhagem V02 apresentou resultado superior em relação às demais linhagens avaliadas durante os 7 dias de fermentação, com a produção máxima de 0,14 U/mL, alcançada após 5 dias de fermentação, como pode ser observado na Figura 7.

Desta forma foi possível selecionar uma linhagem considerada como potencial produtora de MTGase. Esta linhagem, identificada por V02 na Coleção de Micro-organismos, trata-se de uma espécie de actinomiceto, *Streptosporangium roseum* ATCC, a qual foi selecionada para a próxima fase do estudo que consistiu na investigação da influência de variáveis de processo durante a produção de MTGase por FS e FES.

Pfefferle et al. (2000) relataram que, embora o gênero *Streptosporangium* apresente diversidade limitada para produção de metabólitos secundários, este apresenta estreita relação taxonômica com o gênero *Streptomyces*. Como muitos autores acabam aplicando nos trabalhos de produção de MTGase condições de crescimento e produção propícias ao gênero *Streptomyces* por este gênero ser o mais estudado para produção de MTGase, isso impossibilitaria que linhagens de outros gêneros, como é o caso de *Streptosporangium* mostrassem sua potencialidade nos estudos de produção de diversos metabólitos, como a referida enzima, já que há uma errônea tendência de se usar nos estudos de produção, os parâmetros que na verdade são adequados a outros gêneros ou espécies.

O gênero *Streptosporangium* está incluso no grupo dos actinomicetos e são isolados, principalmente, a partir do solo. Assim como outros gêneros pertencentes aos actinomicetos, espécies de *Streptosporangium* também se caracterizam pela capacidade de formar micélio e esporos reprodutivos, são gram positivas, aeróbias obrigatórias, sua temperatura de

crescimento situa-se em torno de 28 °C, não crescendo a partir de 42 °C (NOLAN et al., 2010).

Quanto à sua classificação atual, a espécie *Streptosporangium roseum*, pertence à família Streptosporangiaceae, Ordem dos Actinomycetales, Classe Actinobacteria, Filo Actinobacteria (NOLAN et al., 2010).

Linhagens de *Streptosporangium* produzem metabólitos secundários, tais como antibióticos, enzimas, bioinibidores e compostos inseticidas, o que tem despertado relativo interesse industrial e também científico. Por isso, necessita-se de estudos sobre aspectos fisiológicos, como suas preferências nutricionais, a fim de explorar o seu potencial como produtores de novos metabólitos (PLATAS et al., 1999).

5.3 Produção da MTGase em Fermentação Submersa

5.3.1 Avaliação dos componentes do meio de cultivo e das condições iniciais de processo para produção de MTGase

Para avaliar o efeito de variáveis de processo e de componentes do meio de cultivo na produção de MTGase por *Streptosporangium roseum*, a linhagem selecionada na etapa de screening, foi utilizado como meio-base o descrito por Ando et al (1989). Foi estabelecido que os componentes $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 e K_2HPO_4 não seriam estudados e teriam sua concentração fixa, conforme a composição original do meio. Os demais componentes do meio: amido como fonte de carbono, peptona e extrato de levedura como fontes de nitrogênio foram incluídos no delineamento experimental, bem como outros componentes que também foram adicionados ao meio de cultivo - farinha de arroz como fonte de carbono e nitrogênio e AMM como fonte de nitrogênio - tiveram as suas concentrações avaliadas. Assim essas fontes poderiam contribuir, caso selecionadas, para a produção da enzima e/ou para a redução do custo do meio de cultivo. Variáveis de processo como pH e concentração de inóculo também foram avaliadas. Todas as variáveis tiveram as faixas de valores estabelecidas conforme dados da literatura levando-se em consideração tanto a produção de MTGase por outras espécies produtoras, quanto estudos relacionados às exigências nutricionais da espécie *Streptosporangium roseum*. Na seção 4.5 são apresentados os delineamentos e suas respectivas matrizes utilizados nesse estudo, enquanto que, as condições de processo que não foram estudadas, ou seja, seus valores fixados, foram as descritas na seção 4.4.1. A Tabela 22 apresenta os resultados de produção da enzima utilizando-se o delineamento Plackett-Burman.

Tabela 22. Avaliação dos componentes e condições de cultivo sobre a produção de MTGase utilizando delineamento Plackett-Burman em FS

| Ensaio | Amido | Farinha de arroz | Peptona | Extrato de levedura | AMM | pH | Inóculo | Atividade MTGase (U/mL) | | |
|--------|-----------|------------------|-----------|---------------------|-----------|----------|-----------------------|-------------------------|------|------|
| | | | | | | | | 3 d | 5 d | 7 d |
| 1 | +1 (30,0) | -1 (10,0) | +1 (30,0) | -1 (2,0) | -1 (10,0) | -1 (6,0) | +1 (10 ⁸) | 0,03 | 0,06 | 0,10 |
| 2 | +1 (30,0) | +1 (30,0) | -1 (10,0) | +1 (6,0) | -1 (10,0) | -1 (6,0) | -1 (10 ⁶) | 0,02 | 0,04 | 0,06 |
| 3 | -1 (10,0) | +1 (30,0) | +1 (30,0) | -1 (2,0) | +1 (30,0) | -1 (6,0) | -1 (10 ⁶) | 0,02 | 0,05 | 0,08 |
| 4 | +1 (30,0) | -1 (10,0) | +1 (30,0) | +1 (6,0) | -1 (10,0) | +1 (8,0) | -1 (10 ⁶) | 0,05 | 0,05 | 0,08 |
| 5 | +1 (30,0) | +1 (30,0) | -1 (10,0) | +1 (6,0) | +1 (30,0) | -1 (6,0) | +1 (10 ⁸) | 0,05 | 0,06 | 0,09 |
| 6 | +1 (30,0) | +1 (30,0) | +1 (30,0) | -1 (2,0) | +1 (30,0) | +1 (8,0) | -1 (10 ⁶) | 0,05 | 0,04 | 0,15 |
| 7 | -1 (10,0) | +1 (30,0) | +1 (30,0) | +1 (6,0) | -1 (10,0) | +1 (8,0) | +1 (10 ⁸) | 0,03 | 0,09 | 0,17 |
| 8 | -1 (10,0) | -1 (10,0) | +1 (30,0) | +1 (6,0) | +1 (30,0) | -1 (6,0) | +1 (10 ⁸) | 0,05 | 0,07 | 0,10 |
| 9 | -1 (10,0) | -1 (10,0) | -1 (10,0) | +1 (6,0) | +1 (30,0) | +1 (8,0) | -1 (10 ⁶) | 0,06 | 0,04 | 0,08 |
| 10 | +1 (30,0) | -1 (10,0) | -1 (10,0) | -1 (2,0) | +1 (30,0) | +1 (8,0) | +1 (10 ⁸) | 0,05 | 0,07 | 0,11 |
| 11 | -1 (10,0) | +1 (30,0) | -1 (10,0) | -1 (2,0) | -1 (10,0) | +1 (8,0) | +1 (10 ⁸) | 0,03 | 0,09 | 0,15 |
| 12 | -1 (10,0) | -1 (10,0) | -1 (10,0) | -1 (2,0) | -1 (10,0) | -1 (6,0) | -1 (10 ⁶) | 0,02 | 0,13 | 0,07 |
| 13 | 0 (20,0) | 0 (20,0) | 0 (20,0) | 0 (4,0) | 0 (20,0) | 0 (7,0) | 0 (10 ⁷) | 0,05 | 0,11 | 0,12 |
| 14 | 0 (20,0) | 0 (20,0) | 0 (20,0) | 0 (4,0) | 0 (20,0) | 0 (7,0) | 0 (10 ⁷) | 0,05 | 0,06 | 0,10 |
| 15 | 0 (20,0) | 0 (20,0) | 0 (20,0) | 0 (4,0) | 0 (20,0) | 0 (7,0) | 0 (10 ⁷) | 0,05 | 0,10 | 0,12 |

Embora na segunda etapa de seleção a linhagem tenha apresentado melhor desempenho em 5 dias de fermentação (Figura 7), a linhagem V02 mostrou os melhores resultados de atividade de MTGase em 7 dias de fermentação, como pode ser observado nas Figuras 8 e 9, e por este motivo, os resultados obtidos para este tempo de fermentação nos delineamentos que seguem foram utilizados para a avaliação do efeito das variáveis sob a produção da enzima.

Nesse período de produção (7 dias), os níveis de atividade dos ensaios 6, 7 e 11 foram superiores aos demais, apresentando 0,15 U/mL, 0,17 U/mL, 0,15 U/mL, respectivamente. É interessante ressaltar que os três ensaios apresentavam o mesmo pH inicial (8,0), e a mesma concentração de farinha de arroz (30 g/L), e que não mantiveram produção superior aos demais ensaios durante todo o processo, e sim, apenas ao final de 7 dias de fermentação. Os ensaios que representam o ponto central do delineamento apresentaram produção inferior a esses ensaios (6, 7 e 11), porém são superiores aos demais ensaios do delineamento. Os ensaios relacionados ao ponto central estabeleciam pH 7,0 e concentração de farinha de arroz a 20 g/L. Esta comparação evidencia a importância da concentração da farinha de arroz - fonte de amido e vitaminas - na composição do meio. O valor elevado de pH (8,0) nos ensaios de maior produção (6, 7 e 11) pode ter influenciado diretamente no tempo longo que a linhagem V02 levou para expressar sua produção máxima, conforme pode ser observado nos delineamentos seguintes.

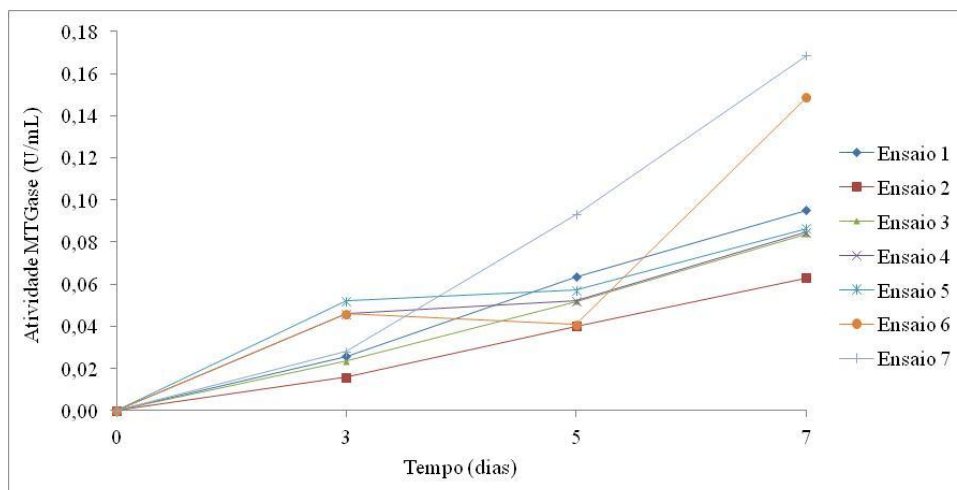


Figura 8. Perfil cinético da produção de MTGase pela linhagem V02, conforme delineamento Plackett-Burman, ensaios 1 a 7

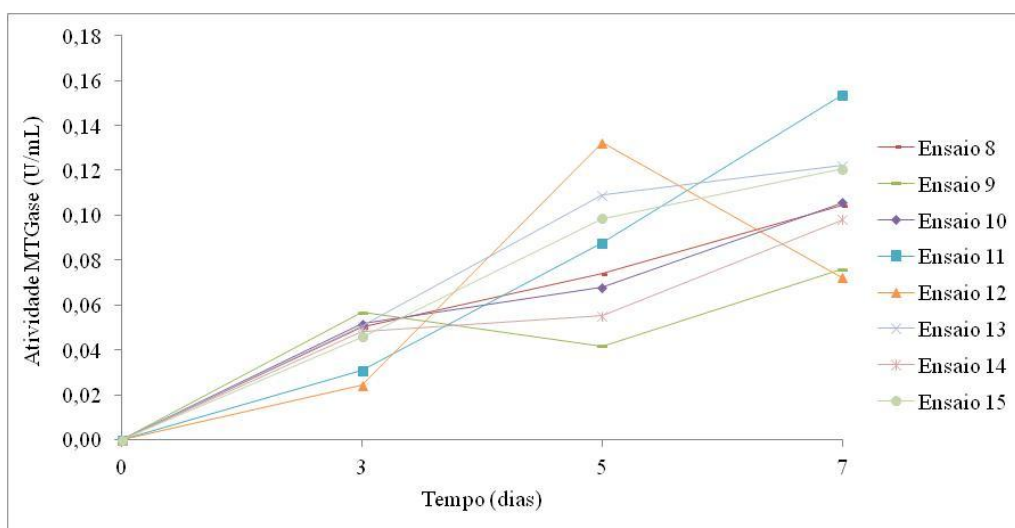


Figura 9. Perfil cinético da produção de MTGase pela linhagem V02, conforme delineamento Plackett-Burman, ensaios 8 a 15

Através dos resultados apresentados na Tabela 23, pode-se observar que apenas as variáveis farinha de arroz, peptona, pH e concentração de inóculo apresentaram, na faixa estudada, efeito significativo na produção de MTGase em 7 dias, em um nível de confiança de 90 %. Por isso, essas variáveis foram selecionadas para serem avaliadas em um próximo planejamento experimental.

Como todas as variáveis selecionadas apresentaram efeito positivo, no próximo delineamento fatorial fracionado foram estudados valores superiores destas variáveis. Embora não tenha apresentado influência significativa, em sua faixa estudada de concentração, para a produção MTGase, o extrato de levedura contém vitaminas que podem contribuir para o crescimento de micro-organismos e, por este motivo, foi também avaliado no próximo delineamento, porém, a faixa de estudo dessa variável foi deslocada conforme o efeito apresentado, ou seja, como o efeito foi negativo, os valores para a nova faixa de estudo foram reduzidos.

Tabela 23. Estimativa dos efeitos para a atividade da MTGase, conforme delineamento PB

| Variáveis | Efeitos | Erro padrão | t (7) | p |
|---------------------|---------|-------------|---------|--------|
| Média* | 0,1055 | 0,0041 | 25,6764 | 0,0000 |
| Amido | -0,0127 | 0,0092 | -1,3858 | 0,2083 |
| Farinha de arroz* | 0,0277 | 0,0092 | 3,0184 | 0,0194 |
| Peptona* | 0,0214 | 0,0092 | 2,3291 | 0,0527 |
| Extrato de levedura | -0,0126 | 0,0092 | -1,3713 | 0,2126 |
| AMM | -0,0057 | 0,0092 | -0,6240 | 0,5524 |
| pH* | 0,0389 | 0,0092 | 4,2373 | 0,0038 |
| Conc. de inóculo* | 0,0309 | 0,0092 | 3,3666 | 0,0120 |

* fatores estatisticamente significativos (90 % confiança).

Como o número de variáveis foi reduzido (farinha de arroz, peptona, pH, concentração de inóculo e extrato de levedura) foi escolhido o delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} com 4 repetições no ponto central, conforme as Tabelas 9 e 10 da seção 4.5.2, para estudar a influência dessas variáveis sobre a produção de MTGase. A Tabela 24 apresenta os resultados desse delineamento e as Figuras 10 e 11 o perfil cinético da produção de MTGase.

Tabela 24. Avaliação dos componentes e condições de cultivo sobre a produção de MTGase utilizando delineamento fracionado 2^{5-1} em FS

| Ensaio | Farinha de arroz | Peptona | Extrato levedura | pH | Inóculo | Atividade MTGase (U/mL) | | |
|--------|------------------|-----------|------------------|----------|---------------|-------------------------|--------|--------|
| | | | | | | 3 dias | 5 dias | 7 dias |
| 1 | -1 (40,0) | -1 (20,0) | -1 (0,0) | -1 (7,0) | +1 (10^9) | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 2 | +1 (80,0) | -1 (20,0) | -1 (0,0) | -1 (7,0) | -1 (10^7) | 0,01 | 0,00 | 0,00 |
| 3 | -1 (40,0) | +1 (40,0) | -1 (0,0) | -1 (7,0) | -1 (10^7) | 0,02 | 0,02 | 0,10 |
| 4 | +1 (80,0) | +1 (40,0) | -1 (0,0) | -1 (7,0) | +1 (10^9) | 0,02 | 0,01 | 0,00 |
| 5 | -1 (40,0) | -1 (20,0) | +1 (2,0) | -1 (7,0) | -1 (10^7) | 0,02 | 0,15 | 0,07 |
| 6 | +1 (80,0) | -1 (20,0) | +1 (2,0) | -1 (7,0) | +1 (10^9) | 0,01 | 0,01 | 0,00 |
| 7 | -1 (40,0) | +1 (40,0) | +1 (2,0) | -1 (7,0) | +1 (10^9) | 0,00 | 0,01 | 0,01 |
| 8 | +1 (80,0) | +1 (40,0) | +1 (2,0) | -1 (7,0) | -1 (10^7) | 0,05 | 0,01 | 0,00 |
| 9 | -1 (40,0) | -1 (20,0) | -1 (0,0) | +1 (9,0) | -1 (10^7) | 0,01 | 0,24 | 0,01 |
| 10 | +1 (80,0) | -1 (20,0) | -1 (0,0) | +1 (9,0) | +1 (10^9) | 0,18 | 0,04 | 0,00 |
| 11 | -1 (40,0) | +1 (40,0) | -1 (0,0) | +1 (9,0) | +1 (10^9) | 0,01 | 0,00 | 0,00 |
| 12 | +1 (80,0) | +1 (40,0) | -1 (0,0) | +1 (9,0) | -1 (10^7) | 0,16 | 0,09 | 0,04 |
| 13 | -1 (40,0) | -1 (20,0) | +1 (2,0) | +1 (9,0) | +1 (10^9) | 0,01 | 0,01 | 0,00 |
| 14 | +1 (80,0) | -1 (20,0) | +1 (2,0) | +1 (9,0) | -1 (10^7) | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 15 | -1 (40,0) | +1 (40,0) | +1 (2,0) | +1 (9,0) | -1 (10^7) | 0,00 | 0,03 | 0,00 |
| 16 | +1 (80,0) | +1 (40,0) | +1 (2,0) | +1 (9,0) | +1 (10^9) | 0,02 | 0,00 | 0,00 |
| 17 | 0 (60,0) | 0 (30,0) | 0 (1,0) | 0 (8,0) | 0 (10^8) | 0,01 | 0,00 | 0,01 |
| 18 | 0 (60,0) | 0 (30,0) | 0 (1,0) | 0 (8,0) | 0 (10^8) | 0,01 | 0,01 | 0,00 |
| 19 | 0 (60,0) | 0 (30,0) | 0 (1,0) | 0 (8,0) | 0 (10^8) | 0,01 | 0,00 | 0,02 |
| 20 | 0 (60,0) | 0 (30,0) | 0 (1,0) | 0 (8,0) | 0 (10^8) | 0,01 | 0,01 | 0,00 |

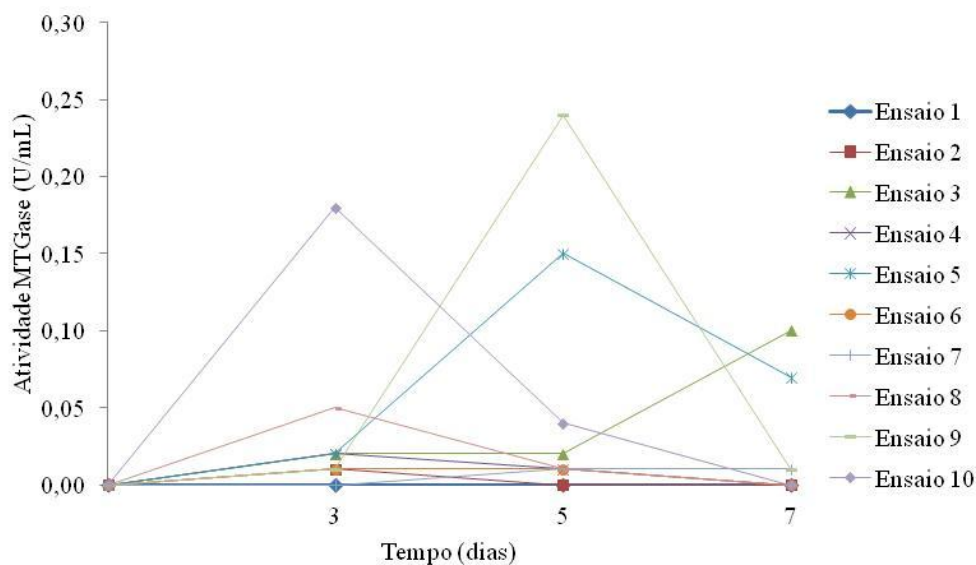


Figura 10. Perfil cinético de produção de MTGase pela linhagem V02, conforme delineamento Fatorial Fracionado 2^{5-1} , ensaios 1 a 10

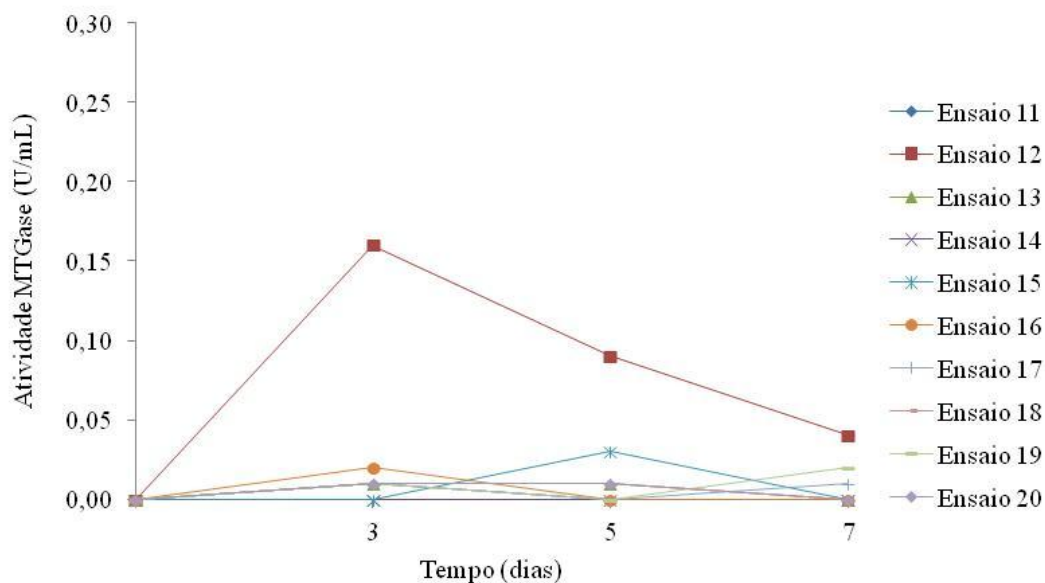


Figura 11. Perfil cinético de produção de MTGase pela linhagem V02, conforme delineamento Fatorial Fracionado 2^{5-1} , ensaios 11 a 20

Como observado, os ensaios 10 e 12 apresentaram os maiores valores de atividade enzimática em relação aos demais ensaios em apenas 3 dias de fermentação, apresentando 0,18 U/mL e 0,16 U/mL, respectivamente. Novamente, a concentração de farinha de arroz (80 g/L) e o pH (9,0) foram os fatores em comum entre esses dois ensaios, corroborando resultados do delineamento anterior. Em 5 dias de fermentação, os ensaios 5, 9 e 12 apresentaram produção superior e destacável aos demais, com 0,15 U/mL, 0,24 U/mL, 0,09 U/mL, respectivamente. Neste período, a linhagem alcançou sua maior produção de MTGase, em relação a todo o tempo de processo, sendo representado pelas condições do ensaio 9. A princípio, o único parâmetro em comum entre esses ensaios foi a concentração do inóculo. Porém, o pH (9,0) relacionado a este ensaio foi o mesmo dos ensaios 10 e 12, que se

destacaram em 3 dias. Em 7 dias de fermentação, de forma geral, a linhagem reduziu sua produção de MTGase.

Nas faixas e condições estudadas neste delineamento, o pH mais uma vez parece ter influenciado no tempo de produção de MTGase pela linhagem *S. roseum* V02. É importante ressaltar a influência do pH nas interações de cargas entre aminoácidos nas estruturas proteicas e também nas funções enzimáticas durante as atividades metabólicas microbianas. Como a MTGase está relacionada à síntese de proteínas, quando a faixa de pH encontra-se acima da neutralidade, pode-se afirmar que deve ocorrer mecanismos microbianos envolvidos na formação estrutural celular e síntese proteica, de forma que a linhagem *S. roseum* V02 possa utilizar as fontes disponíveis no meio de cultivo e naquelas condições de processo.

O delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} mostrou a influência das variáveis nas novas faixas estudadas para a produção de MTGase. Assim como no delineamento anterior, também para este delineamento o efeito das variáveis foi analisado em 7 dias de produção, como mostrado na Tabela 25.

Tabela 25. Avaliação das variáveis do delineamento 2^{5-1} para a produção de MTGase em 7 dias de fermentação

| Variáveis | Efeitos | Erro Padrão | t (14) | p |
|---------------------|-----------|-------------|----------|----------|
| Média* | 0,013000 | 0,005341 | 2,43379 | 0,028932 |
| Farinha de arroz | -0,018750 | 0,011944 | -1,56984 | 0,138772 |
| Peptona | 0,008750 | 0,011944 | 0,73259 | 0,475894 |
| Extrato de levedura | -0,008750 | 0,011944 | -0,73259 | 0,475894 |
| pH | -0,016250 | 0,011944 | -1,36053 | 0,195165 |
| Inóculo* | -0,026250 | 0,011944 | -2,19778 | 0,045288 |

* fatores estatisticamente significativos (90 % confiança).

Apenas a concentração de inóculo foi significativa e, com exceção da variável peptona, todas as outras variáveis apresentaram efeito negativo, representando uma necessidade de redução de seus valores para o aumento da produção de MTGase. O efeito positivo da variável peptona indicaria uma proporcionalidade direta à variável resposta – produção de MTGase – ou seja, o aumento da concentração de peptona no meio de cultivo aumentaria a produção da enzima.

Para buscar uma faixa de estudo mais adequada, um terceiro delineamento foi realizado, estabelecendo novas faixas para as variáveis em função de seus efeitos apresentados na Tabela 25. Porém, como a variável extrato de levedura não apresentou novamente efeito significativo para a produção de MTGase nas faixas estudadas, esta não foi estudada neste terceiro delineamento. Quanto à variável peptona, sua faixa de estudo foi mantida, pois, como o efeito desta variável não foi significativo, tornou-se irrelevante o aumento da concentração da variável, além de representar aumento para o custo do meio de cultivo.

Com a redução do número de variáveis (farinha de arroz, peptona, pH e concentração de inóculo), optou-se por delineamento fatorial fracionado 2^{4-1} com 4 repetições do ponto central, conforme as Tabelas 11 e 12 na seção 4.5.2, para estudar a influência desses componentes na produção de MTGase utilizando-se meio de cultivo nas novas faixas estabelecidas.

A Tabela 26 apresenta os resultados para esse delineamento fatorial fracionado 2^{4-1} e as Figuras 12 e 13 apresentam o perfil cinético da produção de MTGase. A Tabela 27 mostra a influência das variáveis sob as novas faixas estudadas para a produção da enzima.

Tabela 26. Avaliação dos componentes e condições de cultivo sobre a produção de MTGase utilizando delineamento fracionado 2^{4-1} na FS

| Ensaio | Farinha de arroz | Peptona | pH | Inóculo | Atividade MTGase (U/mL) | | |
|--------|------------------|-----------|----------|---------------|-------------------------|--------|--------|
| | | | | | 3 dias | 5 dias | 7 dias |
| 1 | -1 (20,0) | -1 (20,0) | -1 (7,0) | -1 (10^7) | 0,01 | 0,01 | 0,05 |
| 2 | +1 (40,0) | -1 (20,0) | -1 (7,0) | +1 (10^9) | 0,01 | 0,20 | 0,10 |
| 3 | -1 (20,0) | +1 (40,0) | -1 (7,0) | +1 (10^9) | 0,05 | 0,03 | 0,03 |
| 4 | +1 (40,0) | +1 (40,0) | -1 (7,0) | -1 (10^7) | 0,02 | 0,23 | 0,12 |
| 5 | -1 (20,0) | -1 (20,0) | +1 (9,0) | +1 (10^9) | 0,02 | 0,04 | 0,00 |
| 6 | +1 (40,0) | -1 (20,0) | +1 (9,0) | -1 (10^7) | 0,12 | 0,04 | 0,01 |
| 7 | -1 (20,0) | +1 (40,0) | +1 (9,0) | -1 (10^7) | 0,01 | 0,01 | 0,02 |
| 8 | +1 (40,0) | +1 (40,0) | +1 (9,0) | +1 (10^9) | 0,19 | 0,17 | 0,05 |
| 9 | 0 (30,0) | 0 (30,0) | 0 (8,0) | 0 (10^8) | 0,08 | 0,21 | 0,01 |
| 10 | 0 (30,0) | 0 (30,0) | 0 (8,0) | 0 (10^8) | 0,17 | 0,04 | 0,03 |
| 11 | 0 (30,0) | 0 (30,0) | 0 (8,0) | 0 (10^8) | 0,14 | 0,13 | 0,03 |
| 12 | 0 (30,0) | 0 (30,0) | 0 (8,0) | 0 (10^8) | 0,16 | 0,13 | 0,04 |

Tabela 27. Avaliação das variáveis do delineamento 2^{4-1} para a produção de MTGase em 7 dias de fermentação em FS

| Variáveis | Efeito | Erro Padrão | t (7) | p |
|-------------------|---------|-------------|---------|--------|
| Média* | 0,0408 | 0,0066 | 6,1595 | 0,0005 |
| Farinha de arroz* | 0,0450 | 0,0162 | 2,7712 | 0,0276 |
| Peptona | 0,0150 | 0,0162 | 0,9237 | 0,3864 |
| pH* | -0,0550 | 0,0162 | -3,3870 | 0,0116 |
| Inóculo | -0,0050 | 0,0162 | -0,3079 | 0,7671 |

* fatores estatisticamente significativos (90 % confiança).

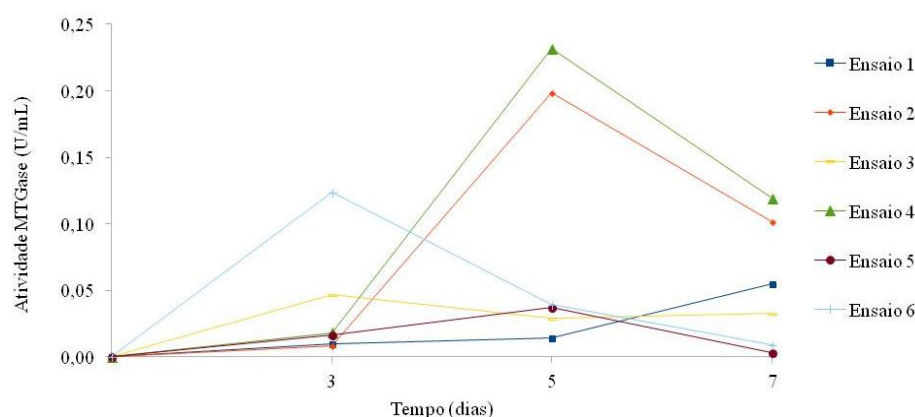


Figura 12. Perfil cinético da produção de MTGase pela linhagem V02, conforme delineamento Fatorial Fracionado 2^{4-1} , ensaios 1 a 6

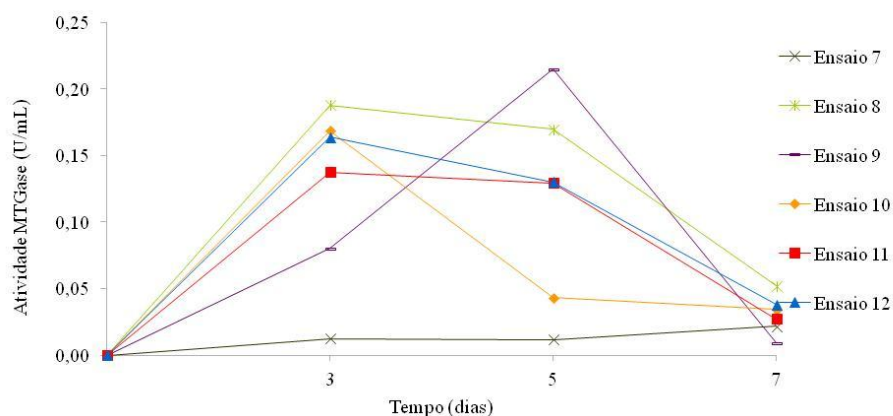


Figura 13. Perfil cinético da produção de MTGase pela linhagem V02, conforme delineamento Fatorial Fracionado 2^{4-1} , ensaios 7 a 12

Neste delineamento, em 3 dias de fermentação as condições representadas pelos ensaios 8 e o ponto central (ensaios 10, 11 e 12) possibilitaram destacada produção de MTGase, apresentando 0,19 U/mL, 0,17 U/mL, 0,14 U/mL e 0,16 U/mL, respectivamente. Esta produção foi maior em 5 dias de fermentação nos ensaios 2, 4 e 9, os quais apresentaram 0,20 U/mL, 0,23 U/mL, 0,21 U/mL, respectivamente. Após este período, assim como no delineamento anterior, há uma redução da produção da MTGase. É possível que as condições desses ensaios influenciem no mecanismo de síntese proteica do micro-organismo, o qual a MTGase está relacionada, promovendo diretamente o aumento da produção da mesma e, após o período de produção máxima de MTGase, ocorreu uma produção suficiente de proteases que poderia reduzir a de MTGase. Assim como neste delineamento, essa relação do mecanismo de síntese proteica às condições de ensaios também pode ser observada como nos delineamentos anteriores.

Embora o pH ideal de crescimento para actinomicetos seja próximo à neutralidade, notadamente, esta variável influenciou para que a linhagem *S. roseum* V02 produzisse MTGase em menor tempo, o que foi ratificado pela análise estatística dos resultados. Na produção desta enzima em reatores, o controle desse parâmetro durante a fermentação poderá

ser uma estratégia promissora para maximizar a produção da enzima MTGase por essa linhagem.

Meiying; Guocheng; Jian (2002) avaliaram os efeitos do pH no crescimento microbiano e na formação MTGase de uma linhagem de *Streptoverticillium mobaraense* WSH-Z2 em um fermentador mecanicamente agitado com volume útil de 1,5 L, utilizando meio de cultivo composto por amido (3 %), peptona (2 %), extrato de levedura (0,2 %), MgSO₄ (0,2 %), K₂HPO₄ (0,2 %), KH₂PO₄ (0,2 %). Utilizando como estratégia o controle de pH ótimo com objetivo de maximizar a atividade MTGase e sua produtividade durante o processo. O pH é também uma das variáveis ambientais mais importantes que afetam o crescimento celular e formação de produto, no entanto, segundo os autores, pouco se sabe sobre os efeitos do pH sobre a produção MTGase incluindo informações a respeito dos efeitos do pH sobre sua cinética de fermentação. O trabalho dos autores mostrou que o pH influencia no crescimento microbiano e produção de MTGase diretamente na fase lag de crescimento microbiano, aumentando-a ou reduzindo-a. Os valores de pH 5,0 e 8,0 dificultaram o crescimento do micro-organismo, porém, os valores entre 6,0 e 7,5 possibilitaram aumentar a atividade máxima da enzima e sua produtividade de maneira significativa, ou seja, de 2,90 U/mL e 61,4 U/L/h (a pH constante durante o processo) para 3,40 U/mL e 81,4 U/L/h (utilizando mudanças nos valores do pH durante o processo).

Para estas novas faixas estudadas, apenas as variáveis farinha de arroz e pH foram significativas, sendo que, a farinha de arroz apresentou efeito positivo, sugerindo que o aumento da concentração desta pode promover o aumento de produção de MTGase. Enquanto que o inverso ocorreu com o pH, o qual apresentou efeito negativo nesta faixa estudada, sugerindo a redução dos valores para que ocorra o aumento da produção de MTGase.

Após os delineamentos para a seleção e avaliação da influência das variáveis no meio de cultivo e no processo, um delineamento para a otimização dessas variáveis seria o próximo passo. Porém, como a produção de MTGase pela linhagem *S. roseum* V02 é baixa quando comparada à literatura científica, decidiu-se realizar uma avaliação comparativa dos resultados obtidos com os delineamentos realizados, propondo-se faixas para cada uma das variáveis em função da interpretação dos seus efeitos.

Diante dos resultados dos três delineamentos realizados, e com o objetivo de avaliar os efeitos das variáveis nas suas respectivas faixas estudadas para a produção de MTGase, foi construída a Tabela 28, a qual mostra o perfil dessas variáveis nesses delineamentos para esta etapa de trabalho em FS.

Tabela 28. Perfil das variáveis nos delineamentos estudados em FS para a produção de MTGase

| | Plackett-Burman | | Fracionado 2 ⁵⁻¹ | | Fracionado 2 ⁴⁻¹ | |
|---------------------------|-----------------|----------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| | Efeito | Faixa | Efeito | Faixa | Efeito | Faixa |
| Farinha de arroz (g/L) | + | 10-30 | - | 40-80 | + | 20-40 |
| Peptona (g/L) | + | 10-30 | + | 20-40 | + | 20-40 |
| pH | + | 6-8 | - | 7-9 | - | 7-9 |
| Inóculo (UFC/mL) | + | 10 ⁶ -10 ⁸ | - | 10 ⁷ -10 ⁹ | - | 10 ⁷ -10 ⁹ |
| Extrato de levedura (g/L) | - | 2-6 | - | 0-2 | | |

Os termos de efeito + e - marcados em amarelo são os fatores que foram significativos em cada etapa do planejamento experimental

A farinha de arroz mostrou influência significativa com efeito positivo entre 10-40 g/L, sendo que ao aumentar essa concentração acima de 40 g/L, esse deixa de ser significativo

e o efeito passa a ser negativo. Ou seja, a influência de farinha de arroz sobre a produção de MTGase se dá sob aumento dessa até em torno de 40 g/L.

Embora a peptona tenha mostrado efeito positivo em todos os delineamentos, a partir da concentração de 10-30 g/L, esta variável deixa de influenciar a produção de MTGase. Sendo a AMM um coproduto que poderia substituir a peptona, haja visto que ambas são fontes de nitrogênio no meio de cultivo, e que assim o tornaria mais barato, este infelizmente não mostrou resultados estatísticos que poderiam levar à substituição da peptona.

O pH apresentou efeito positivo na faixa entre 6 e 8. Porém, ao estudar o meio de cultivo em pH na faixa entre 7 e 9, o mesmo apresentou efeito estatístico negativo, o que indicou que um meio de cultivo com pH entre 6 e 7 para produção de MTGase é o ideal. Esta faixa de pH estabelecida apresenta consonância com a literatura para as linhagens do gênero *Streptosporangium* e *Streptomyces* na utilização destes na produção de diversos metabólitos.

No primeiro delineamento a concentração de inóculo apresentou efeito significativo e positivo, ou seja, para a faixa estudada, sugerindo o aumento da concentração de inóculo para melhorar a produção de MTGase. Porém, ao estudar a concentração entre 10^7 e 10^9 UFC/mL, nos delineamentos seguintes, a faixa estudada apresentou efeito negativo, sugerindo uma redução da concentração de inóculo em relação àquela faixa. Diante dos efeitos relacionados às faixas estudadas, pode-se assumir que a faixa adequada de inóculo para este meio de cultivo encontra-se em torno de 10^7 UFC/mL.

Os componentes amido solúvel, AMM e extrato de levedura não mostraram influência para a produção de MTGase, sendo desnecessária suas inclusões na composição do meio de cultivo sugerido.

A análise de resultados possibilitou a proposição de um meio de cultivo para avaliação do perfil de produção de MTGase por *S. roseum* em FS.

5.3.2 Perfil cinético da produção de MTGase por *S. roseum* em FS na condição de ensaio selecionada

Com base nos resultados dos planejamentos experimentais, para a FS foi proposto um meio de cultivo e condições iniciais de processo, sendo essas: 40,0 g/L de farinha de arroz, 30,0 g/L de peptona, 2,0 g/L de K_2HPO_4 , 2,0 g/L de KH_2PO_4 , e 1,0 g/L $MgSO_4$. O pH ajustado a 7 e a concentração de inóculo de 10^7 UFC/mL.

Para validar a condição selecionada com base nos resultados obtidos através dos planejamentos experimentais, a linhagem V02 foi inoculada neste meio de cultivo, pH e concentração de inóculo selecionados, sendo as demais condições de processo conforme descrito na seção 4.5. Foi realizado acompanhamento cinético da produção de MTGase durante 7 dias (Figura 14).

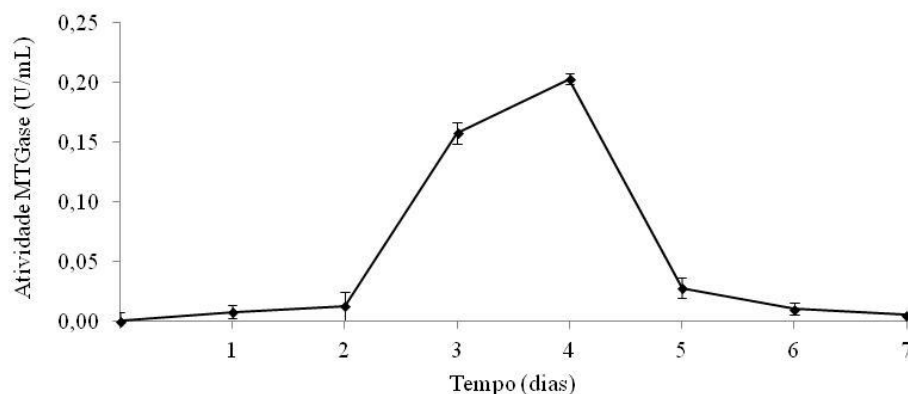


Figura 14. Perfil cinético da produção de MTGase pela linhagem V02 utilizando o meio proposto para FS, com base nos resultados dos delineamentos. O desvio padrão foi calculado com base no resultados de sete réplicas do experimento

Como pode ser observado, a linhagem V02 atingiu sua produção máxima de MTGase (0,2 U/mL) em 4 dias de fermentação, indicando até este período uma produção superior a dos ensaios nos delineamentos estudados anteriormente, nos quais as produções máximas foram conseguidas somente em 5 ou 7 dias de fermentação. Esta comparação evidencia que a condição selecionada foi adequada para a produção de MTGase pela linhagem V02.

Trabalhos previamente consultados na literatura mostraram que os valores relacionados à produção de MTGase, apresentam-se relativamente baixos quando comparados a outras enzimas também aplicadas na indústria alimentícia, mesmo após a otimização das condições de cultivo.

Macedo, Sette e Sato (2007) isolaram e identificaram uma linhagem de *Streptomyces* sp. a partir da etapa de seleção com 200 linhagens de actinomicetos. Com essa linhagem selecionada, os autores otimizaram o meio de cultivo submerso, cuja composição foi 25,0 g/L de farinha de soja; 10,0 g/L de peptona bacteriológica; 1,0 g/L de glicose; 20,0 g/L de amido de batata; 4,0 g/L de KH_2PO_4 e 2,0 g/L de MgSO_4 . O melhor resultado desse trabalho foi atividade máxima de 1,40 U/mL com 5 dias de fermentação, o que representou, segundo os autores, aumento de 86 % em relação à atividade enzimática da linhagem antes da otimização do meio.

Com o objetivo de aumentar a produção de MTGase pela linhagem de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 em meio de cultivo composto por 0,2 % de KH_2PO_4 , 0,1 % de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 % solução filtrada de farinha de soja, 2 % de amido solúvel de batata, 0,2 % de glicose, e 2 % de peptona, Bagagli e Sato (2013) realizaram estudo em fermentador de 6,0 L, investigando o efeito da temperatura, agitação e aeração sobre a produção da enzima. Após a otimização das condições de processo, os autores obtiveram atividade máxima de 2,18 U/mL, o que representou um aumento de 2 vezes na atividade de MTGase em relação ao valor obtido antes da otimização do processo.

Com uma linhagem mutante de *Streptoverticillium mobaraense* WSH Z2, Yan et al. (2005) estudaram as condições controladas de agitação e aeração, onde obtiveram atividade máxima de 3,32 U/mL em 7 dias de fermentação. Essa dificuldade em se obter linhagens que possam apresentar uma produção expressiva de MTGase não se limita aos actinomicetos.

Espécies de *Bacillus* também apresentam baixas atividades de MTGase, conforme Souza, Flores e Ayub (2006) que otimizaram um meio de cultivo para produção de MTGase pela linhagem de *Bacillus circulans* BL32, e obtiveram atividade máxima de 0,306 U/mL

utilizando o meio que continha 9,0 g/L de glicerol; 2,0 g/L de sacarose; 7,0 g/L de peptona; 1,0 g/L de triptona; 1,0 g/L de Na₂HPO₄; 1,0 g/L de MgSO₄·7H₂O e 0,1 g/L de FeSO₄·7H₂O.

Em 2009b, Souza e colaboradores realizaram trabalho de otimização para a produção de MTGase e obtiveram atividade máxima de 0,37 U/mL com 8 dias de fermentação.

Utilizando como micro-organismo produtor uma linhagem de *Streptomyces hygroscopicus* WSH03-13, Cui et al. (2007) obtiveram atividade específica de 0,25 U/mg de MTGase, após o período de 42 h de fermentação, em fermentador de 7 L. O meio de cultivo era composto de 5,0 g/L de amido; 5,0 g/L de glicose; 10,0 g/L de glicerina; 15 g/L de peptona; 20 g/L de soja em pó; 5,0 g/L de extrato de levedura; 2,0 g/L de MgSO₄; 2,0 g/L de KH₂PO₄, 2,0 g/L de K₂HPO₄ e 5,0 g/L de CaCO₃ e pH 6,5,

Portilla-Rivera; Téllez-Luis e León (2009) relataram que a produção MTGase por *Streptoverticillium ladakanum* NRRL 3191 em meio de cultivo a base de uma mistura de melão de cana-de-açúcar e glicerol, seria um meio de cultivo adequado para a produção de MTGase por esta linhagem, sugerindo efeito sinérgico de ambas as fontes de carbono, as quais duplicariam a produção quando comparadas pelo mesmo meio, porém usadas separadamente. A maior atividade de MTGase (0,46 U/mL) foi obtida no meio contendo a mistura de melão de cana de açúcar e glicerol após 3 dias de fermentação.

Zhang et al. (2012) estudaram a influência de oito diferentes sais no estresse de uma linhagem de *Streptomyces mobaraensis* DSM40587 na produção de MTGase. O meio de cultivo para produção continha 30,0 g/L de peptona; 10,0 g/L de amido solúvel; 10,0 g/L de frutose; 2,0 g/L de K₂HPO₄; 2,0 g/L de KH₂PO₄ e 2,0 g/L de MgSO₄·7H₂O e pH 7,0. O efeito da adição dos sais (MgCl₂, NaCl, KCl, Na₂SO₄, C₆H₅Na₃O₇, Na₃PO₄, CH₃COONa e CaCl₂) foi estudado individualmente na concentração 0,2 mol/L. Ao final do trabalho, os autores obtiveram produção de 4,3 U/mL da enzima com o meio de cultivo proposto contendo o sal MgCl₂.

Utilizando a linhagem de *Streptomyces mobaraensis* CECT 3230 em meio de cultivo contendo exclusivamente leite desnatado, batata e glicerol, Guerra-Rodriguez e Vázquez (2014) obtiveram produção de MTGase de 3,20 U/mL em 3 dias de fermentação. Segundo os autores, o objetivo do trabalho foi obter MTGase pela linhagem, a partir de um meio de cultivo de baixo custo, utilizando estas matérias-primas.

Após a avaliação das condições selecionadas para o processo em FS, a produção de MTGase pela linhagem selecionada *S. roseum* V02 ainda se mostrou muito baixa. Embora os resultados de produção de MTGase na literatura não sejam muito altos quando comparados aos de outras enzimas, ainda assim são bem superiores aos obtidos na presente Tese. Portanto, como tentativa para aumentar o nível de atividade de MTGase produzido por *S. roseum* V02, a FES aparece como uma estratégia que pode se tornar exitosa, pois, as condições ambientais são bem diferentes quando comparadas à FS. Sendo assim, neste trabalho também foi estudada a produção de MTGase pela linhagem *S. roseum* em FES, vislumbrando resultados mais promissores para a linhagem.

5.4 Produção da MTGase em Fermentação em Estado Sólido

A FES caracteriza-se pelo crescimento microbiano em uma matriz sólida, a qual pode conter água ou não em nível covalente à sua estrutura. Porém, há necessidade da presença de nutrientes e uma quantidade de água considerada mínima para viabilizar o crescimento microbiano. Geralmente, este tipo de processo fermentativo utiliza coprodutos agroindustriais por estes apresentarem biodisponibilidade nutritiva diversa, além de oferecerem custos relativamente baixos por se tratarem de coprodutos. Nesse trabalho, avaliou-se a influência da

relação da água no meio, de farelo de trigo e de AMM, considerados resíduos agrícolas (coprodutos), e de sais $MgSO_4$ e KH_2PO_4 , geralmente considerados importantes na composição de meios de cultivo devido às funções desses íons no transporte metabólico e constitutivo. Conduziu-se, portanto, o delineamento fatorial do tipo 2^{5-1} para avaliar essas variáveis, sendo os resultados desse delineamento apresentados na Tabela 29.

Tabela 29. Matriz do delineamento Fatorial Fracionado 2^{5-1} para FES

| Ensaio | Inóculo | H_2O /Farelo | AMM | KH_2PO_4 | $MgSO_4$ $\cdot 7H_2O$ | Atividade MTGase (U/g _{ms}) | | | |
|--------|---------------|----------------|-----------|------------|---------------------------|--|-------|-------|-------|
| | | | | | | 4 d | 6 d | 8 d | 10 d |
| 1 | -1 (10^6) | -1 (40,0) | -1 (5,0) | -1 (1,0) | +1 (5,0) | 0,034 | 0,102 | 0,137 | 0,078 |
| 2 | +1 (10^8) | -1 (40,0) | -1 (5,0) | -1 (1,0) | -1 (1,0) | 0,088 | 0,084 | 0,058 | 0,069 |
| 3 | -1 (10^6) | +1 (80,0) | -1 (5,0) | -1 (1,0) | -1 (1,0) | 0,081 | 0,446 | 0,615 | 0,613 |
| 4 | +1 (10^8) | +1 (80,0) | -1 (5,0) | -1 (1,0) | +1 (5,0) | 0,191 | 0,399 | 0,250 | 0,215 |
| 5 | -1 (10^6) | -1 (40,0) | +1 (55,0) | -1 (1,0) | -1 (1,0) | 0,144 | 0,275 | 0,038 | 0,000 |
| 6 | +1 (10^8) | -1 (40,0) | +1 (55,0) | -1 (1,0) | +1 (5,0) | 0,176 | 0,056 | 0,109 | 0,006 |
| 7 | -1 (10^6) | +1 (80,0) | +1 (55,0) | -1 (1,0) | +1 (5,0) | 0,004 | 0,183 | 0,213 | 0,312 |
| 8 | +1 (10^8) | +1 (80,0) | +1 (55,0) | -1 (1,0) | -1 (1,0) | 0,099 | 0,103 | 0,000 | 0,000 |
| 9 | -1 (10^6) | -1 (40,0) | -1 (5,0) | +1 (9,0) | -1 (1,0) | 0,003 | 0,284 | 0,098 | 0,145 |
| 10 | +1 (10^8) | -1 (40,0) | -1 (5,0) | +1 (9,0) | +1 (5,0) | 0,065 | 0,063 | 0,033 | 0,063 |
| 11 | -1 (10^6) | +1 (80,0) | +1 (55,0) | +1 (9,0) | +1 (5,0) | 0,005 | 0,218 | 0,367 | 0,067 |
| 12 | +1 (10^8) | +1 (80,0) | +1 (55,0) | +1 (9,0) | -1 (1,0) | 0,104 | 0,160 | 0,409 | 0,240 |
| 13 | -1 (10^6) | -1 (40,0) | +1 (55,0) | +1 (9,0) | +1 (5,0) | 0,025 | 0,070 | 0,099 | 0,085 |
| 14 | +1 (10^8) | -1 (40,0) | +1 (55,0) | +1 (9,0) | -1 (1,0) | 0,111 | 0,066 | 0,027 | 0,016 |
| 15 | -1 (10^6) | +1 (80,0) | 0 (30,0) | +1 (9,0) | -1 (1,0) | 0,336 | 0,258 | 0,411 | 0,132 |
| 16 | +1 (10^8) | +1 (80,0) | 0 (30,0) | +1 (9,0) | +1 (5,0) | 0,270 | 0,246 | 0,239 | 0,089 |
| 17 | 0 (10^7) | 0 (60,0) | 0 (30,0) | 0 (5,0) | 0 (3,0) | 0,011 | 0,054 | 0,069 | 0,074 |
| 18 | 0 (10^7) | 0 (60,0) | 0 (30,0) | 0 (5,0) | 0 (3,0) | 0,039 | 0,055 | 0,047 | 0,024 |
| 19 | 0 (10^7) | 0 (60,0) | 0 (30,0) | 0 (5,0) | 0 (3,0) | 0,013 | 0,013 | 0,000 | 0,016 |
| 20 | 0 (10^7) | 0 (60,0) | 0 (30,0) | 0 (5,0) | 0 (3,0) | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

Como observado nas Figuras 15 e 16, que descrevem o perfil cinético da produção de MTGase conforme o delineamento fracionado descrito Tabela 29, a produção da enzima nas condições do ensaio 3 foi superior a ponto de se destacar dos demais ensaios a partir do quarto dia de fermentação, mantendo essa superioridade até o final do processo. As condições de cultivo desse ensaio apresentaram uma quantidade maior de água no meio de cultivo (80 mL/100 g de farelo), indicando uma exigência de *S. roseum* por um meio de cultivo com maior umidade, resultado este já esperado por se tratar de uma linhagem procariota, cuja exigência quanto à unidade do meio ser superior a dos fungos filamentosos. Um fato que vale destacar é que as demais variáveis que compõem o meio de cultivo desse ensaio estão todas em nível de menor teor na faixa das concentrações estudadas, o que pode indicar pouca exigência dos mesmos pela linhagem *S. roseum* V02.

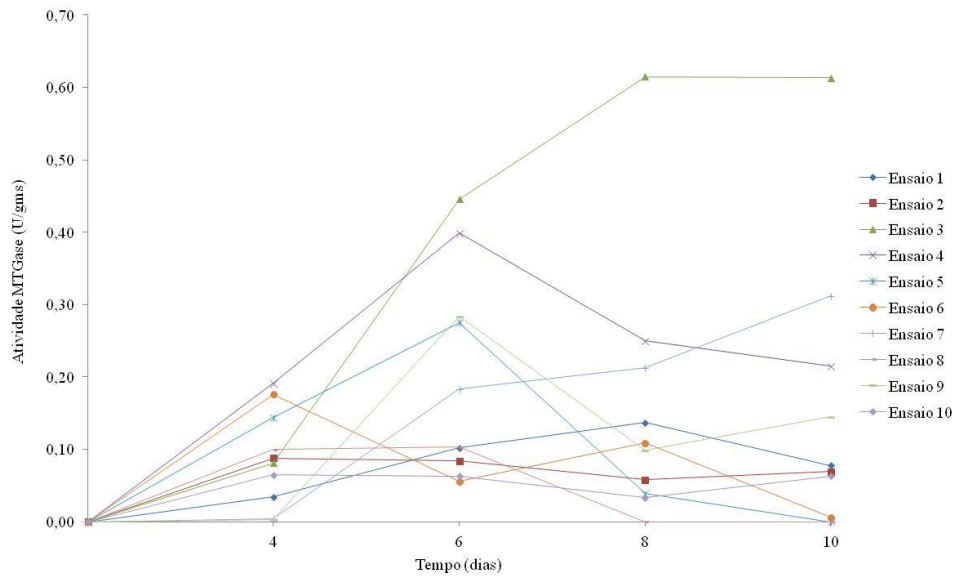


Figura 15. Perfil cinético da produção de MTGase pela linhagem V02, conforme delineamento Fatorial Fracionado 2^{5-1} em FES, ensaios 1 a 10

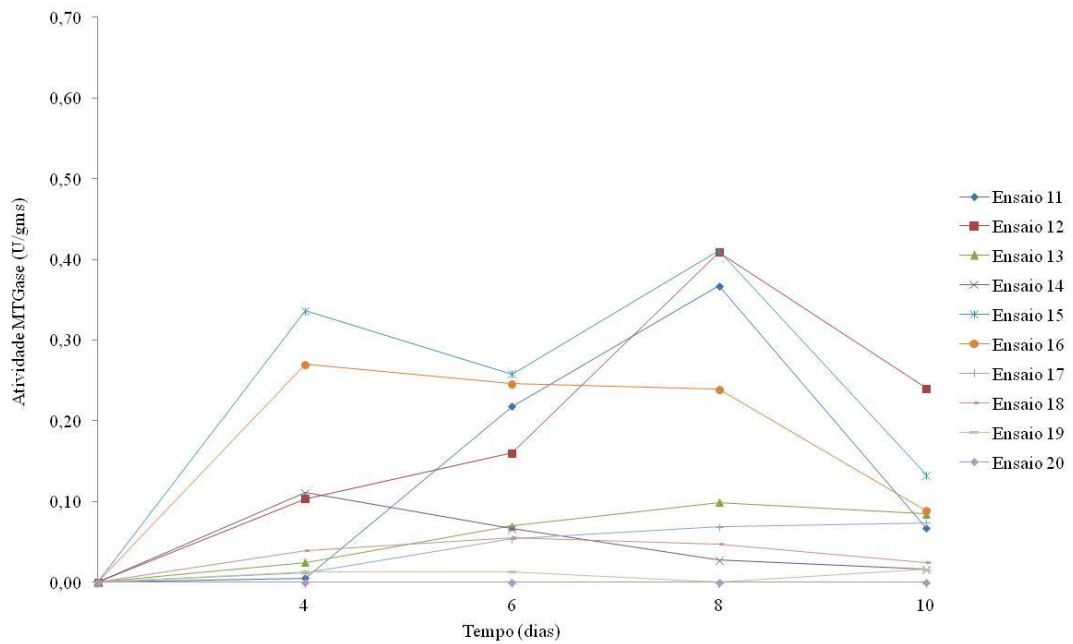


Figura 16. Perfil cinético da produção de MTGase pela linhagem V02, conforme delineamento Fatorial Fracionado 2^{5-1} em FES, ensaios 11 a 20

Uma análise estatística foi realizada para compreender como essas variáveis podem ter contribuído na produção de MTGase pela linhagem. A Tabela 30 apresenta o efeito dessas variáveis.

Observa-se que, de acordo com o exposto em relação às exigências quanto à relação de água no meio de cultivo, essa foi a única variável significativa e seu efeito positivo, indicando a tendência da linhagem, como bactéria, em crescer em meios com umidade mais elevada. Todas as outras variáveis não foram significativas e, inclusive, a AMM apresentou efeito negativo, sugerindo ser um componente desnecessário nesse meio de cultivo para a produção de MTGase por esta linhagem. Embora a AMM apresente em sua composição grande quantidade de água, e essa água influenciaria a umidade do meio, o efeito negativo da

AMM no delineamento contrasta com o efeito positivo da variável relação água/farelo, “compensando” o parâmetro umidade no meio através desta variável e, ao mesmo tempo reduzindo a concentração de nitrogênio orgânico através da redução da AMM.

Mesmo apresentando a necessidade de um meio simples para a produção de MTGase, a linhagem não conseguiu produzir elevada quantidade da enzima, que justificasse continuar os estudos de otimização de meio de cultivo em FES. Por esse motivo, as condições do ensaio 3 foram selecionadas para produzir MTGase em FES pela linhagem *S. roseum* V02. Porém, como a avaliação estatística deste delineamento mostrou que a variável AMM não influenciou de forma significativa a produção da enzima, um experimento utilizando as condições do ensaio 3, mas sem a AMM, foi feito afim de observar e confirmar a possível retirada desse componente no meio de cultivo sem redução no valor de atividade enzimática produzida.

Tabela 30. Avaliação das variáveis do delineamento 2^{5-1} para a produção de MTGase em 8 dias de fermentação FES

| Variáveis | Efeito | Erro Padrão | t(14) | p |
|---------------------------------|----------|-------------|----------|---------|
| Média* | 0,16200 | 0,02926 | 5,53658 | 0,00007 |
| Inóculo | -0,10750 | 0,06543 | -1,64305 | 0,12264 |
| Água/Farelo* | 0,23750 | 0,06543 | 3,62999 | 0,00273 |
| AMM | -0,10500 | 0,06543 | -1,60484 | 0,13084 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,03250 | 0,06543 | 0,49674 | 0,62708 |
| MgSO ₄ | -0,02750 | 0,06543 | -0,42031 | 0,68064 |

* fatores estatisticamente significativos (90 % confiança).

Dessa forma, foram conduzidos dois ensaios, em triplicata, o primeiro reproduzindo as condições do ensaio 3, e um segundo reproduzindo as mesmas condições, porém sem a adição de AMM. O tempo de fermentação selecionado e analisado foi 8 dias, pois a máxima produção da enzima no delineamento fracionado foi obtido neste tempo de cultivo. Os resultados estão apresentados na Tabela 31. O ensaio com AMM apresentou atividade de $0,69 \pm 0,04$ U/g_{ms}, enquanto que no ensaio sem o uso deste componente observou-se atividade de $0,73 \pm 0,08$ U/g_{ms}. Portanto, o uso de AMM no meio de cultivo mostrou-se dispensável para este processo.

Tabela 31. Avaliação de AMM no meio de cultivo para produção de MTGase em FES

| Ensaio | Atividade (U/g) | Atividade (U/g) | Media | Desvio Padrão |
|-----------|-----------------|-----------------|-------|---------------|
| Sem AMM 1 | 0,83 | 0,75 | | |
| Sem AMM 2 | 0,66 | 0,71 | 0,73 | 0,056 |
| Sem AMM 3 | 0,71 | 0,73 | | |
| Com AMM 1 | 0,66 | 0,71 | | |
| Com AMM 2 | 0,71 | 0,66 | 0,69 | 0,029 |
| Com AMM 3 | 0,67 | 0,72 | | |

O meio de cultivo para FES foi então estabelecido e disposto conforme a Tabela 15, na seção 4.6. A confirmação das condições de cultivo e da composição do meio de cultivo selecionados, podem ser comprovadas pelo perfil cinético da produção de MTGase pela linhagem V02 por 8 dias, conforme observado na Figura 17.

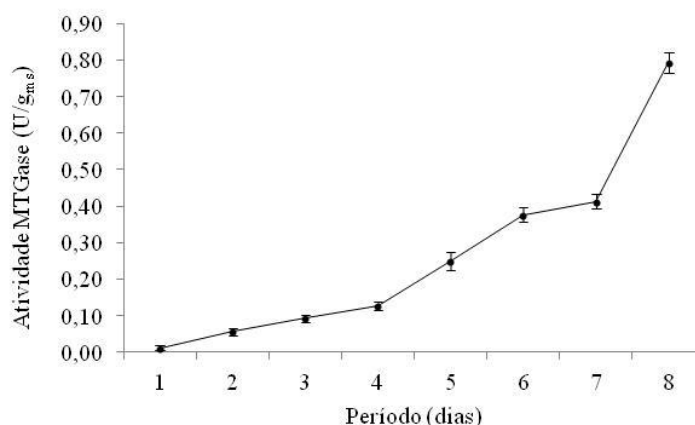


Figura 17. Perfil cinético da produção em FES nas condições selecionadas

A linhagem *Streptosporangium roseum* V02 apresentou maior produção da enzima MTGase (0,79 U/g_{ms}) em 8 dias de fermentação. Durante este período, acompanhou-se também a atividade proteolítica, pois o micro-organismo pode produzir além da MTGase, também as proteases, que podem agir reduzindo a atividade da enzima de interesse (MTGase) pela hidrólise da mesma.

Como observado na Tabela 32, não houve produção expressiva de proteases durante os 8 dias de cultivo, o que colabora com o objetivo deste trabalho. prejudicar o objetivo do trabalho em produzir MTGase.

Tabela 32. Produção de proteases pela linhagem V02

| Tempo (dias) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Atividade proteolítica (U/g _{ms}) | 0,002 | 0,001 | 0,002 | 0,004 | 0,005 | 0,010 | 0,002 | 0,001 |

Souza et al. (2008) relataram em seu trabalho utilizando a linhagem de *Bacillus circulans* BL32 para produção de MTGase em FES, que a concentração de inóculo seria um fator importante e significativo para a produção da enzima MTGase, com indicativo de aumento da produção ao elevar esta concentração. Porém, como observado para a linhagem *Streptosporangium roseum* V02 neste trabalho, a concentração de inóculo que se mostrou ideal foi 10⁶ UFC/g_{ms}, ou seja, a menor concentração de inóculo utilizada.

Após um trabalho de seleção de linhagens com potencial produtor de MTGase, Nagy e Szakacs (2008) isolaram 3 espécies diferentes, porém do gênero *Streptomyces* – *S. mobaraensis*, *S. paucisporogenes* e *S. platensis*. Avaliaram a produção de MTGase por essas linhagens em FES, testando 26 diferentes coprodutos agroindustriais como substrato, incluindo cereais (arroz, cevada, trigo, centeio, aveia, trigo, sorgo), feijões, ervilhas, lentilhas, papoula e farelo de trigo. As linhagens apresentaram melhores performances sobre os meios de cultivos contendo esses coprodutos, com umidade entre 67 e 70 %, e levaram entre 4 e 11 dias para atingir sua produção máxima, com valores entre 0,9 e 5,1 U/g de atividade enzimática MTGase. Esses valores estão próximos aos considerados adequados para linhagem *Streptosporangium roseum* V02 neste trabalho de tese, sendo que a linhagem *S. roseum* V02 precisou de 8 dias para atingir sua produção máxima.

Utilizando uma linhagem selvagem de *Streptomyces* sp. em FES, Mahmood (2013) avaliou o potencial de crescimento desta linhagem em meio a base de farelo de trigo, testando

diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose, melão, amido e glicerol), de nitrogênio (peptona, extrato de levedura, caseína e sulfato de amônio) e concentração de inóculo e umidade inicial. O melhor resultado para a produção de MTGase foi 1,55 U/g utilizando no meio de cultivo 4 % de amido, 3 % de peptona, umidade de 70 % e concentração de inóculo de 15 % (v/m), precisando de 6 dias de incubação para atingir essa produção.

Os trabalhos apresentados mostram a busca de meios de cultivo menos onerosos, através da utilização de fontes alternativas de carbono e de nitrogênio pelos autores. O meio de cultivo proposto para a linhagem *S. roseum* V02 na produção de MTGase em FS contém peptona como fonte de nitrogênio, porém, a presença de farinha de arroz como fonte de carbono (amido) vem a colaborar para a redução do custo deste meio. Quando comparado aos trabalhos citados, pode ser observado que a proposta de um meio de cultivo menos oneroso foi alcançada, porém a linhagem ainda assim apresenta produção abaixo da maioria das linhagens citadas.

5.5 Comparação entre FS e FES para Produção de MTGase pela linhagem V02

Ao comparar as produções de MTGase na FS e FES pela linhagem V02 foi possível perceber que as mesmas apresentam distinções que contribuíram na escolha do processo de produção.

Em FS, a linhagem *S. roseum* V02 apresentou uma produtividade máxima de 0,05 U/mL.dia, precisando de 3 ou 4 dias, enquanto que o processo FES precisou de 5 dias para alcançar a mesma produtividade. Porém, o processo de produção por FES apresentou uma produtividade máxima de 0,1 U/g_{ms}.dia, após 8 dias de cultivo.

A concentração de inóculo necessária para FES (10^6 UFC/g_{ms}) foi 10 vezes menor do que para FS (10^7 UFC/mL de meio).

Quanto à composição dos meios de cultivo, ao se comparar os componentes entre os meios para FS e FES, percebeu-se que a presença dos coprodutos como farinha de arroz na FS e farelo de trigo na FES, colaboraram para compor um meio de cultivo menos oneroso. Porém, observou-se que o meio de cultivo para FS utilizou peptona, um componente considerado de custo elevado, enquanto que no meio de cultivo para FES utilizou-se apenas farelo de trigo umidificado e sais. Embora esse trabalho não tenha realizado uma avaliação financeira dos meios de cultivos, baseado na composição desses meios sugere que, a princípio, o meio de cultivo para FES apresentaria ainda menor custo em sua composição quando comparado ao meio de cultivo para FS. Por este motivo, a produção de extrato enzimático escolhido para ser utilizado nas próximas etapas desse trabalho foi pelo processo de FES.

5.6 Caracterização bioquímica da enzima MTGase

5.6.1 Otimização da temperatura e pH ótimos para atividade da enzima MTGase

Para a aplicação de enzimas é necessário o conhecimento de particularidades da mesma, que venham a possibilitar as melhores condições ambientais para que a atividade reacional e a obtenção do produto gerado pela enzima sejam o máximo possível.

Nesse contexto, investigar e determinar a faixa de temperatura e de pH ideais conduzem ao primeiro passo na caracterização de uma enzima. O uso de ferramentas estatísticas na otimização de processos se mostra importante quando oferece uma visão clara

das faixas e valores desses parâmetros que tornam os resultados efetivos. Assim, foi utilizado um delineamento composto central rotacional para determinar as faixas desses parâmetros.

O resultado do delineamento no qual foi estudada a influência da temperatura e do pH sobre a atividade reacional de MTGase (Tabela 33) foram avaliados no programa Statistica v. 7.0 e os resultados dos coeficientes de regressão e desvio padrão a nível de confiança de 95 % estão apresentados na Tabela 34.

Tabela 33. Delineamento DCCR 2² para otimização reacional da Atividade de MTGase em relação a pH e temperatura

| Ensaio | Temperatura | pH | Atividade (U/mL) |
|--------|-------------|---------|------------------|
| 1 | -1 | -1 | 0,033 |
| 2 | 1 | -1 | 0,032 |
| 3 | -1 | 1 | 0,075 |
| 4 | 1 | 1 | 0,064 |
| 5 | -1,4142 | 0 | 0,099 |
| 6 | 1,4142 | 0 | 0,014 |
| 7 | 0 | -1,4142 | 0,039 |
| 8 | 0 | 1,4142 | 0,087 |
| 9 | 0 | 0 | 0,099 |
| 10 | 0 | 0 | 0,104 |
| 11 | 0 | 0 | 0,097 |
| 12 | 0 | 0 | 0,098 |

Tabela 34. Avaliação das variáveis do DCCR para otimização das condições reacionais de MTGase

| Variáveis | Efeito | Erro Padrão | t(7) | p |
|-------------------|---------|-------------|---------|--------|
| Média* | 0,0995 | 0,0083 | 11,9986 | 0,0000 |
| Temperatura (L) * | -0,0330 | 0,0117 | -2,8183 | 0,0304 |
| Temperatura (Q) * | -0,0474 | 0,0131 | -3,6132 | 0,0112 |
| pH (L) * | 0,0355 | 0,0117 | 3,0246 | 0,0233 |
| pH (Q) * | -0,0409 | 0,0131 | -3,1174 | 0,0206 |
| Temp (L) x pH (L) | -0,0050 | 0,0166 | -0,3015 | 0,7732 |

* fatores significativos a 95 % de confiança. R² = 0,86

A Tabela 35 apresenta a análise de variância (ANOVA) desses resultados, a qual pôde-se obter F calculado, que apresentou valor 2,5 vezes maior que o F tabelado (4,12), validando o modelo para o delineamento e permitindo a construção da superfície de resposta e da curva de contorno das variáveis temperatura e pH sobre a atividade reacional de MTGase, como apresentado na Figura 18.

Tabela 35. Análise de variância do DCCR para temperatura e pH na atividade de MTGase

| Fonte de Variação | Soma dos Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado Médio | F calculado |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|-------------|
| Regressão | 0,0010 | 4 | 0,0025 | 10,38 |

| | | | |
|---------|--------|----|--------|
| Resíduo | 0,0017 | 7 | 0,0002 |
| Total | 0,0116 | 11 | |

$$F_{\text{tabelado}(4,7)} = 4,12; p < 0,05$$

O modelo que apresenta a influência dessas variáveis sobre a atividade reacional da MTGase produzida pela linhagem *S. roseum* V02 é apresentado pela Eq. 2, onde a atividade de MTGase é expressa em U/mL.

$$\text{Atividade MTGase} = -0,62 - 0,0001 \cdot \text{Temp}^2 + 0,01 \cdot \text{Temp} - 0,01 \cdot \text{pH}^2 + 0,14 \cdot \text{pH} \quad \text{Eq. (2)}$$

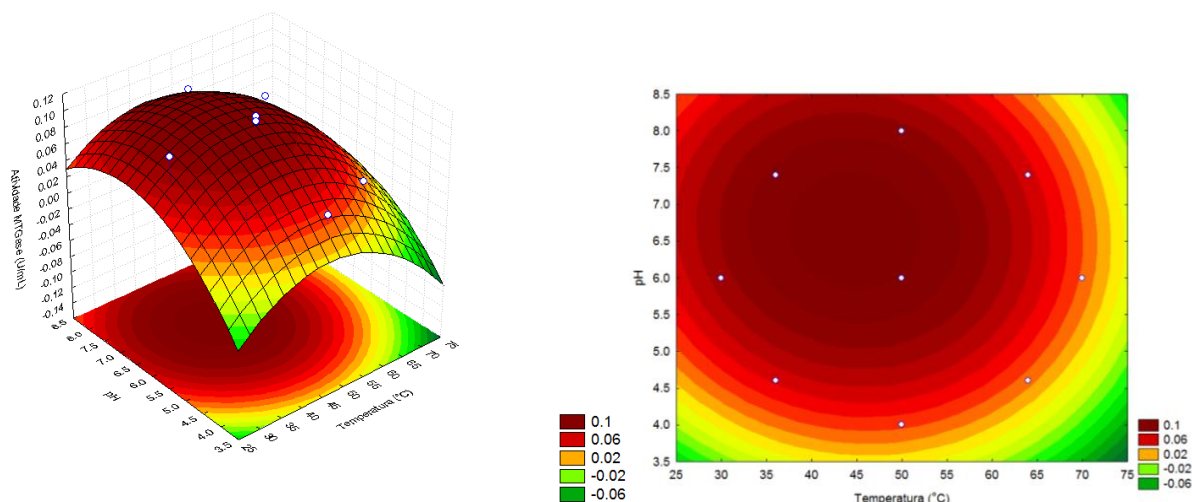


Figura 18. Superfície de resposta e curva de contorno da atividade de MTGase em função da temperatura e do pH

Percebe-se que a melhor atividade reacional da enzima encontra-se em valores de pH e temperatura próximos aos valores dos pontos centrais estudados nesse delineamento. Sendo que, à medida que se afasta desses valores, a atividade tende a reduzir. Essa observação pode ser confirmada pela Eq. 2, a qual retrata esta influência a partir dessas variáveis.

Ao derivar a Eq. 2 em função dessas variáveis independentes, foi possível determinar os valores de pH (6,6) e temperatura (45 °C) máximos para a atividade reacional da enzima.

Após determinação do pH e da temperatura ótimos, experimentos foram realizados para validar o modelo proposto e confirmar as faixas de trabalho para ambas variáveis. Assim, foi estabelecida uma combinação de valores dentro da faixa de ótimo, conforme apresentado na Tabela 36, na qual os valores de cada variável foram combinados entre si.

Tabela 36. Validação do modelo obtido para a atividade de MTGase

| Temperatura (°C) | pH | Atividade (U/mL) |
|------------------|-----|--------------------------|
| 40 | 6,0 | 0,088±0,003 ^a |
| 40 | 7,0 | 0,087±0,003 ^b |
| 45 | 6,6 | 0,097±0,001 ^a |
| 50 | 6,0 | 0,095±0,002 ^b |
| 50 | 7,0 | 0,098±0,002 ^b |

Observou-se que houve variação na atividade da enzima de até 0,015 U/mL, dependendo do valor do binômio T e pH testado. Este valor que representa uma variação de 7,6 % em relação ao ótimo teórico (45 °C e pH 6,6). Assim, o modelo pode ser considerado

válido, representando uma possibilidade de trabalho numa faixa de temperatura de 45 ± 5 °C e de pH $6,6 \pm 0,4$, com ótimo estabelecido de acordo com os resultados experimentais do DCCR, e comprovados pelos resultados apresentados na Tabela 36. O teste de Tukey demonstra que os valores ótimos de temperatura e pH não diferem de maneira significativa em relação ao seu binômio inferior (40 °C e pH 6,0) sobre a atividade de MTGase. Enquanto que, ao relacioná-los ao seu binômio superior (50 °C e pH 7,0), há diferença significativa sobre a atividade da enzima. A temperatura acima de 45 °C influencia na atividade independente do pH, enquanto que o pH influencia apenas acima do pH ótimo. Essa análise possibilita avaliar a possibilidade do uso de valores abaixo (40 °C e pH 6,0) dos estabelecidos como ótimo. Enquanto que, acima destes, a atividade seria comprometida.

A literatura científica apresenta os valores de pH e temperatura considerados ótimos para MTGase de diferentes espécies microbianas, sendo que algumas estão apresentadas na Tabela 37. Em sua grande maioria, apresentam pH ótimo entre 6,0 e 7,0, porém apresentam atividade em uma faixa mais ampla de pH entre 5,0 a 9,0. Quanto a temperatura, essas MTGases apresentam atividade ótima numa faixa entre 35 °C a 60 °C.

Tabela 37. Temperatura e pH ótimos de MTGase produzida por diferentes espécies

| Micro-organismo | pH ótimo | Temperatura ótima (°C) | Referência |
|--|-----------|------------------------|-----------------------|
| <i>Streptoverticillium mobaraensis</i> | 5,0 – 8,0 | 50 | Motoki; Seguro (1998) |
| <i>Bacillus subtilis</i> AJ1307 | 8,2 | 60 | Suzuki et al. (2000) |
| <i>Streptoverticillium mobaraensis</i> | 6,0 | 52 | Lu et al. (2003) |
| <i>Streptomyces hygroscopicus</i> WSH03-13 | 6,0 – 7,0 | 37 - 45 | Cui et al. (2007) |
| <i>Streptomyces platensis</i> | 6,0 | 55 | Lin et al. (2008) |
| <i>Bacillus circulans</i> BL32 | 5,7 – 8,7 | 25 - 45 | Souza et al. (2011) |
| <i>Streptomyces</i> sp. | 6,5 | 45 | Mahmood (2013) |

Os valores de pH e de temperatura encontrados para MTGase produzida pela linhagem de *S. roseum* V02 situam-se dentro da faixa estimada para MTGase de outras espécies pela literatura, o que poderia ser considerada tão promissora quanto às demais para aplicações industriais, embora vários parâmetros de processo devam ser considerados.

5.6.2 Determinação da Termoestabilidade

O estudo da termoestabilidade de uma enzima se faz importante, haja vista que a mesma pode apresentar diversas aplicações, necessitando de temperaturas específicas para os processos em que serão aplicadas.

A enzima MTGase produzida pela linhagem *Streptosporangium roseum* V02 foi submetida à incubação em diferentes temperaturas (35, 50, 60 e 70 °C) e por diferentes tempos em função da apresentação de sua estabilidade térmica (Tabela 38 e Figura 19).

A 35 °C a enzima apresentou boa estabilidade durante os primeiros 30 min de incubação, com perda de 10 % de sua capacidade catalítica. Levando 270 min (pouco mais que 4 h) para apresentar perda de 50 % de sua capacidade catalítica.

A 50 °C a enzima apresentou perda de aproximadamente 50 % de sua atividade catalítica em torno de 30 min de incubação.

A enzima não apresentou estabilidade a 60 e 70 °C, ocorrendo a perda quase total de sua capacidade catalítica em pelo menos 30 e 10 min de incubação nessas temperaturas, respectivamente.

Diante dos resultados, observou-se que a MTGase produzida pela linhagem *Streptosporangium roseum* V02 apresenta estabilidade térmica muito próxima a MTGase de outras espécies microbianas.

Ao investigarem a estabilidade térmica de uma MTGase produzida por uma linhagem de *Streptomyces hygroscopicus* WSH03-13, Cui et al. (2007) observaram a perda da capacidade catalítica da enzima quando submetida a 70 °C por 10 min de incubação. Porém sob 20 °C, a enzima não apresentou perda em pelo menos 30 min de incubação, enquanto que no mesmo período a 40 °C, a mesma perdeu 20 % de sua capacidade catalítica e, a 60 °C a enzima preservou apenas 7 % de sua capacidade catalítica.

Nagy e Szakacs (2008) também avaliaram a estabilidade térmica de MTGase produzida por *Streptomyces mobaraensis*, *S. paucisporogenes* e *S. platensis*, incubadas a 60 °C por 60 min, as enzimas apresentaram 50, 20 e 30 % de suas capacidades catalíticas, respectivamente. Esses resultados foram superiores aos demais e, inclusive à MTGase produzida neste trabalho.

Souza et al. (2011) observaram a atividade catalítica da MTGase produzida por *Bacillus circulans* BL32, a qual apresentou a 60 e 70 °C em 10 min, perda quase total desta atividade. Porém, a 30, 40 e 50 °C, sua enzima manteve-se estável por até 120 min.

Estudando a produção de MTgase por uma linhagem de *Streptomyces* sp. em FES, Mahmood (2013) observou que a enzima apresentava estabilidade térmica a 40 °C por 60 min de incubação. Nesse mesmo período, a referida enzima conseguiu preservar aproximadamente 35 % e 10 % de sua capacidade catalítica a 50 e 55 °C, respectivamente, e não apresentou atividade em 30 min de incubação a 60 °C.

Como já foi observado quanto ao pH e temperatura ótimos, a MTGase produzida neste trabalho apresenta características reacionais, incluindo sua termoestabilidade, parecidas a de outras espécies encontradas na literatura.

Tabela 38. Estabilidade Térmica da MTGase

| Tempo(min) | Atividade (U/mL) | | Média | Desvio Padrão |
|-------------------|-------------------------|------|--------------|----------------------|
| T 35°C | | | | |
| 0 | 0,15 | 0,16 | 0,15 | 0,0058 |
| 30 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,0039 |
| 60 | 0,10 | 0,09 | 0,08 | 0,0116 |
| 90 | 0,11 | 0,10 | 0,11 | 0,0019 |
| 120 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,0022 |
| 150 | 0,09 | 0,08 | 0,09 | 0,0078 |
| 180 | 0,08 | 0,08 | 0,08 | 0,0009 |
| 240 | 0,08 | 0,08 | 0,08 | 0,0025 |
| 270 | 0,04 | 0,06 | 0,06 | 0,0107 |
| 300 | 0,06 | 0,07 | 0,06 | 0,0076 |
| 330 | 0,06 | 0,06 | 0,05 | 0,0019 |
| 360 | 0,06 | 0,05 | 0,05 | 0,0045 |
| T 50 °C | | | | |
| 0 | 0,15 | 0,16 | 0,15 | 0,0058 |
| 10 | 0,07 | 0,08 | 0,07 | 0,0103 |
| 20 | 0,07 | 0,06 | 0,08 | 0,0075 |
| 30 | 0,08 | 0,07 | 0,08 | 0,0045 |
| 40 | 0,05 | 0,07 | 0,07 | 0,0104 |
| 50 | 0,08 | 0,07 | 0,08 | 0,0040 |
| 60 | 0,08 | 0,08 | 0,08 | 0,0015 |
| 90 | 0,06 | 0,07 | 0,07 | 0,0045 |
| 120 | 0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,0019 |
| 150 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,0015 |
| 180 | 0,07 | 0,06 | 0,06 | 0,0043 |
| T 60 °C | | | | |
| 0 | 0,15 | 0,16 | 0,15 | 0,0058 |
| 10 | 0,10 | 0,11 | 0,10 | 0,0040 |
| 20 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,0034 |
| 30 | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,0070 |
| 40 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,0000 |
| 50 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,0000 |
| 60 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,0000 |
| T 70 °C | | | | |
| 0 | 0,15 | 0,16 | 0,15 | 0,0058 |
| 10 | 0,01 | 0,02 | 0,00 | 0,0077 |
| 20 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,0000 |
| 30 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,0000 |
| 40 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,0000 |
| 50 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,0000 |
| 60 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,0000 |

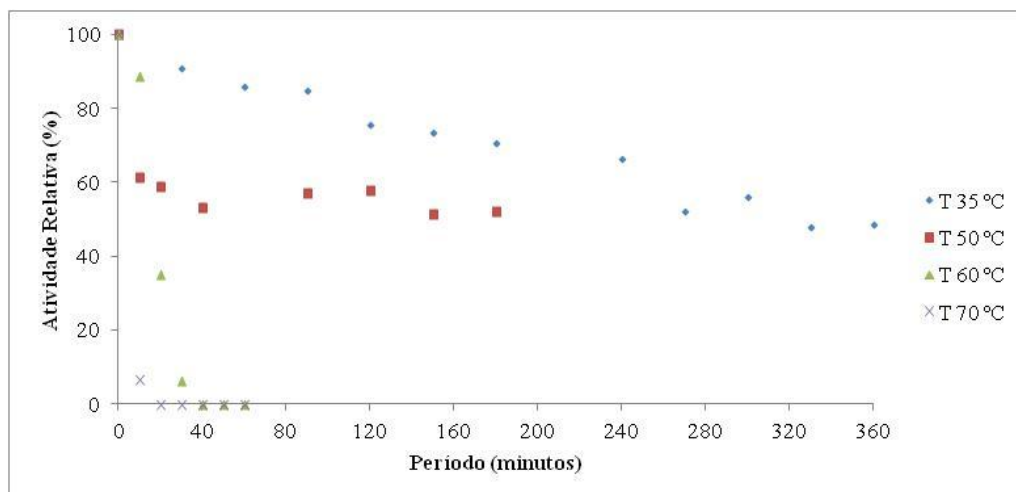


Figura 19. Efeito da temperatura na estabilidade térmica da MTGase produzida por *Streptosporangium roseum*V02

5.6.3 Determinação da estabilidade a estocagem em refrigeração e congelamento

A manutenção da enzima durante sua estocagem se faz necessária para a viabilidade do bioproduto como produto comercial. Assim, estudar a capacidade da enzima de manter sua atividade por períodos prolongados, em refrigeração e/ou congelamento, traz informações indispensáveis quanto à condução e ao período de vida-útil do produto.

Em refrigeração, o extrato enzimático liofilizado, solubilizado a 5 %, manteve sua capacidade catalítica praticamente sem perdas por 12 semanas, o que demonstra boa estabilidade para armazenamento a 4 °C. O extrato enzimático poderá ser armazenado sob essas condições pelo menos por esse período sem perdas de sua atividade catalítica.

Quanto ao armazenamento a -18 °C, o mesmo também não apresentou perda de atividade catalítica no mesmo período, demonstrando também estabilidade ao armazenamento para essa condição de temperatura.

Em seu trabalho de caracterização de MTGase produzida por *Bacillus circulans*, Souza et al. (2011) apresentaram a estabilidade ao armazenamento dessa enzima, a qual não foi observado perda de atividade catalítica por 30 dias a 4 °C e 6 meses a -18 °C.

5.6.4 Concentração do extrato enzimático por liofilização

Com base nos resultados de produção de MTGase por *S. roseum* V02, tanto por FS como FES, verificou-se que os níveis enzimáticos são baixos para aplicação industrial. Portanto, existe a necessidade de utilizar técnicas para concentração do extrato enzimático. Nesse trabalho, foi escolhida a técnica de liofilização para concentrar o extrato enzimático produzido por FES. Nas Tabelas 39 e 40 estão apresentados os dados de liofilização do extrato enzimático de *S. roseum* V02, avaliando-se a ação de sacarose e maltodextrina como crioprotetores da enzima.

Após liofilização, os extratos foram solubilizados, porém em volume 10 vezes menor em relação ao volume inicial (anterior ao processo). Por isso, a atividade máxima proporcional esperada seria 10 vezes o valor da atividade inicial, ou seja, 0,94 U/mL. Assumindo-se esse valor como referência para um processo eficiente (eficiência de 100 %) foi possível avaliar o processo e os agentes adicionados ao extrato enzimático.

Tabela 39. Avaliação de crioprotetores para liofilização da MTGase *S. roseum* V02

| | Atividade MTGase (U/mL) | Eficiência da Liofilização (%) |
|-------------------------|------------------------------------|---|
| Enzima não liofilizada | 0,094 ± 0,006 | |
| Liofilizado sem aditivo | 0,044 ± 0,002 | 5 |
| 2,5 % de sacarose | 0,018 ± 0,009 | 2 |
| 5 % de sacarose | 0,202 ± 0,019 | 21 |
| 2,5 % maltodextrina | 0,011 ± 0,002 | 1 |

Verificou-se que o processo de liofilização foi muito agressivo para a MTGase de *S. roseum* V02, pois sem adição do crioprotetor, a enzima perdeu mais de 50 % da atividade esperada (0,94 U/mL) após a concentração, mantendo-se com uma atividade de 0,44 U/mL (Tabela 39). Além disso, os crioprotetores sacarose e maltodextrina na concentração de 2,5 % não atuaram conforme o esperado (Tabela 39), que seria criar uma matriz de estabilização da enzima. Pelo contrário, houve perda de mais de 80 % da atividade inicial da enzima ao usar 2,5 % de sacarose e 2,5 % de maltodextrina, ou seja, foi mantida uma atividade enzimática no extrato concentrado, correspondente a apenas 2 % e 1 %, respectivamente, em relação ao predito, considerando-se a eficiência de concentração em 100%.

A adição de 5 % de sacarose foi a que apresentou melhor resultado no processo, embora tenha obtido eficiência de apenas 21 %.

Como o uso da sacarose na concentração de 5% como crioprotetor apresentou melhor resultado, foi realizado um ensaio com este aditivo e nesta concentração, afim de comprovar seu efeito na crioproteção. Para este ensaio foram feitas 7 replicatas no processo.

Neste ensaio, solubilizou-se o extrato liofilizado com mínimo volume possível de água destilada, com o propósito de obter um extrato na forma líquida contendo uma maior atividade possível da enzima.

Como resultado, o processo apresentou eficiência média de 19 ± 3 %. O extrato liofilizado apresentou atividade de MTGase de $0,16 \pm 0,03$ U/mL quando solubilizado, e a concentração volumétrica resultante do extrato (2,74 vezes) não foi acompanhada pela atividade da enzima (Tabela 40).

Verificou-se que o processo de concentração por liofilização nas condições estabelecidas não foi eficiente para a MTGase produzida pela linhagem *S. roseum* V02. Em trabalhos futuros outras substâncias devem ser investigadas e avaliadas como agentes crioprotetores.

Tabela 40. Liofilização da MTGase *S. roseum* V02 utilizando sacarose a 5 %

| Liofilização com 5 % de sacarose | Concentração do extrato solubilizado a volume mínimo | Atividade MTGase (U/mL) |
|---|---|------------------------------------|
| 1 | 2,76 | 0,21 |
| 2 | 2,76 | 0,15 |
| 3 | 2,76 | 0,14 |
| 4 | 2,72 | 0,14 |
| 5 | 2,74 | 0,20 |
| 6 | 2,77 | 0,13 |
| 7 | 2,69 | 0,14 |
| Média | $2,74 \pm 0,03$ | $0,16 \pm 0,03$ |

As etapas prévias de descongelamento e congelamento lento do extrato enzimático podem ter contribuído para a perda de atividade. Além disso, a formação de cristais durante a

nucleação das estruturas proteicas, provavelmente, foi impactada de forma negativa pelo fenômeno de colapso durante a concentração no processo, que geralmente influencia na estabilidade de proteínas (KASPER; WINTER; FRIESS, 2013).

Ao final desta etapa obteve-se um extrato com atividade de 2,00 U/g de extrato e com atividade específica de 368,4 U/g de proteína.

Oliveira e Maugeri (2013) avaliaram 20 aditivos como crioprotetores em frutossiltransferase já imobilizada previamente. Seus resultados mais promissores foram com a utilização de carboximetilcelulose (CMC), sorbitol, inositol e trealose (todos a 2,5 %, p/v), que foram capazes de preservar a atividade da enzima por 6 meses. Embora todos tenham apresentado efeito positivo sobre o processo, o que apresentou melhor crioproteção quando testados individualmente foi o CMC, com extrato liofilizado apresentando atividade enzimática 1,75 vezes maior em relação ao não liofilizado. Porém, quando os autores avaliaram o efeito crioprotetor desses aditivos combinados (1,25 % + 1,25 % cada) entre si, obtiveram aumento da atividade enzimática em uma razão em torno de 51 vezes.

Após purificação por precipitação alcoólica, Soares e colaboradores (2012) concentraram um extrato enzimático de bromelina por liofilização. Sem a adição de um crioprotetor, o extrato perdeu atividade. Entretanto, ao adicionar 10 % de glicose, o mesmo preservou 90 % de sua atividade enzimática inicial.

Comparando os resultados do presente trabalho aos citados, fica evidenciada a importância da adição de um ou mais componentes que possa(m) atuar como crioprotetor(es) durante a liofilização do extrato enzimático. Contudo, um trabalho de seleção e combinação de compostos com essa finalidade mostra-se essencial, também para a enzima MTGase de *S. roseum*.

5.6.5 Aplicação em massa de pão sem-glúten

Diversas farinhas como de arroz, de milho, de soja, mandioca e batata são utilizadas em panificação com o objetivo de substituição às farinhas contendo glúten. Porém, as mesmas não conseguem reter o CO₂ formado durante a fermentação da massa, função esta atribuída ao glúten, responsável também pelas características estruturais e propriedades viscoelásticas da massa.

A adição de MTGase visa utilizar seu potencial de polimerização sobre as proteínas presentes nas massas para pães sem glúten, para retenção do CO₂ formado .

O principal mecanismo envolvido nas reações catalisadas pela MTGase são desaminação e polimerização, alterando a hidrofobicidade proteica e a formação de uma estrutura polimérica de alto peso molecular. Essas variáveis interferem na solubilidade das proteínas, as quais são estreitamente relacionadas às propriedades emulsificantes, formação de espuma, geleificação, viscosidade e capacidade de retenção aquosa, e conseqüentemente ao desenvolvimento de textura do alimento (GASPAR; GÓES-FAVONI, 2015).

Aplicando-se a MTGase *S. roseum* V02, a sua funcionalidade foi avaliada no processo e comparada a atuação dessa enzima com uma MTGase comercial. As Figuras 20 e 21 apresentam o pão produzido no experimento com aplicação dessas enzimas, na qual a primeira possibilita a avaliação visual quanto à uniformidade celular na estrutura da massa, e a segunda a avaliação visual quanto à presença de rachaduras.

A estrutura celular da massa reflete a produção e retenção de gás CO₂ na mesma durante a fermentação. Essa estrutura depende, dentre outros fatores, das características reológicas da massa. A rede formada pela ação polimerizante de MTGase além de outros polímeros, como polissacarídeos, formarão uma estrutura interagida que auxiliarão na retenção do gás formado durante a fermentação. Como observado (Figura 20), a massa dos

ensaios utilizando as enzimas apresentaram bolhas pequenas, assim como no controle, o que representa baixa retenção de gás produzido durante a etapa de fermentação.

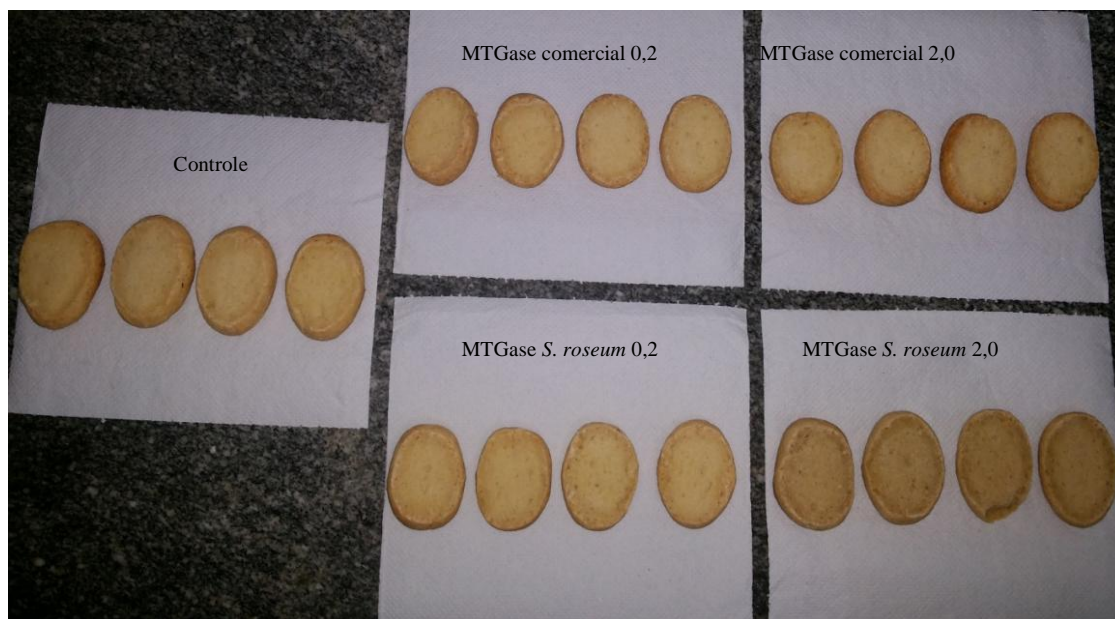


Figura 20. Avaliação do pão sem-glúten quanto à uniformidade da estrutura celular

Durante a etapa de fermentação, há o aumento de volume na massa pela produção e retenção de CO₂. Esse volume deve ser mantido pela rede proteica durante o forneamento até o momento de formação da casca nesta etapa. A presença de rachaduras mostra a dificuldade da rede polimérica proteica em reter o CO₂ durante o forneamento, o que impediria o pão de manter seu volume.



Figura 21. Avaliação do pão sem-glúten quanto à presença de rachaduras

A Tabela 41 apresenta os resultados da adição dessas enzimas na massa de pão sem-glúten sobre o volume específico da massa, e sobre a dureza do pão, representada pela força aplicada no pão avaliada pelo texturômetro. Para avaliar a influência das enzimas foram realizados os testes de Tukey (letras minúsculas), que possibilitam avaliar o efeito dos diferentes tratamentos entre si, e o teste de Dunnett (letras maiúsculas), que verifica a influência das variáveis (enzimas) em relação a um controle (sem enzima).

Tabela 41. Avaliação dos efeitos da aplicação de MTGase em pão sem glúten

| Ensaio | Volume Específico (mL/g) | Força (N) |
|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Controle sem MTGase | 1,72 ± 0,04 ^{b,A} | 35,05 ± 0,17 ^{b,A} |
| MTGase comercial 0,2 U | 1,72 ± 0,07 ^{b,A} | 44,80 ± 0,23 ^{ab,A} |
| MTGase comercial 2,0 U | 1,90 ± 0,02 ^{a,B} | 51,03 ± 0,25 ^{ab,B} |
| MTGase <i>S. roseum</i> V02 0,2 U | 1,93 ± 0,01 ^{a,B} | 56,92 ± 0,15 ^{a,B} |
| MTGase <i>S. roseum</i> V02 2,0 U | 1,82 ± 0,02 ^{ab,A} | 59,60 ± 0,13 ^{a,B} |

Letras diferentes representam efeito significativo. Letras iguais representam efeitos não significativos

Quando comparada à enzima comercial nas proporções entre 0,2 e 2,0 U /100 g (base farinha) foi possível observar que, a dosagem de MTGase *S. roseum* V02 de 0,2 U/100 g de massa favoreceu o aumento de 13 % no volume específico do pão em relação ao controle. Para obter aumento próximo, foi necessário aplicar 2,0 U/100 g (base farinha) de MTGase comercial, ou seja, para obter um resultado semelhante foi necessária uma quantidade dez vezes maior de enzima comercial do que da enzima produzida neste trabalho.

O aumento da concentração da enzima comercial de 0,2 para 2,0 U/100 g de massa ocasionou aumento significativo no volume do pão em relação ao controle (Tabela 41), resultado contrário ao obtido para MTGase *S. roseum* V02. O aumento da enzima MTGase *S. roseum* V02 aplicada à massa de 0,2 para 2,0 U/100g (base farinha) causou aumento de apenas 6 % no volume específico do pão comparado ao controle.

Estas observações podem ser reforçadas ao observar os testes de Tukey e Dunnett, onde a enzima MTGase *S. roseum* V02, em menor concentração apresenta influência significativa sobre o volume específico do pão, quando comparada ao controle (sem enzima) e também quando comparada à enzima comercial na mesma concentração. Porém, quando a MTGase *S. roseum* V02 foi aplicada na concentração maior, não houve uma diferença significativa quando comparada ao controle (sem enzima) e à enzima comercial em ambas concentrações.

É importante ressaltar que o parâmetro volume do pão está diretamente relacionado à retenção de CO₂ pela estrutura proteica polimerizada pela MTGase, a qual substitui a rede de glúten com esta finalidade.

Ao avaliar a dureza do pão (Força) foi observado efeito gradativo e negativo em relação ao esperado. O aumento das concentrações das duas enzimas, comercial e MTGase *S. roseum* V02, aumentaram a dureza do produto, proporcionalmente ao aumento da concentração da enzima utilizada.

É importante ressaltar que, em relação à dureza do pão, a enzima MTGase *S. roseum* V02 influencia de maneira significativa sobre o controle (sem enzima) em ambas as concentrações avaliadas, enquanto que a influência da enzima comercial é significativa apenas quando a mesma é aplicada na concentração de 2,0 U/ 100 g (base farinha).

A explicação pode estar relacionada à polimerização das enzimas MTGase sobre as proteínas da massa. No caso da MTGase *S. roseum* V02, pode-se observar que o aumento de sua concentração reduziu o volume específico do pão, ao mesmo tempo que aumentou a dureza do mesmo. É possível que para o perfil proteico da massa utilizada, a polimerização tenha sido mais intensa quando comparada à comercial, porém a estrutura formada não foi capaz de reter o CO₂ de maneira eficiente. Outra hipótese para estes resultados está no fato de que como o extrato enzimático produzido por *S. roseum* V02 não foi purificado, contém enzimas amilases, com atividade de 1,8 U/g de extrato liofilizado. As amilases podem estar agindo sobre a rede de amido presente na massa do pão, hidrolisando essa rede, mesmo que parcialmente, o que seria suficiente para comprometer a interação do amido com a proteína da massa, pois a rede de amido também colabora interagindo com a estrutura proteica

aumentando a retenção do CO₂. Durante a etapa de fermentação da massa, a estrutura proteica do glúten, geralmente, tem a função de reter o CO₂ formado durante o metabolismo da levedura. Porém, ao utilizar ingredientes com propósito de substituir o complexo de glúten na massa de pão, a função de reter o CO₂ gerado passa a ser da rede proteica e também da rede de amido presentes na massa sem-glúten. A enzima MTGase apresenta grande importância ao reagir com as proteínas presentes e promovendo um fenômeno de polimerização proteica, colaborando assim, junto a essa rede proteica e à de amido, na função de retenção do CO₂. A presença de enzimas hidrolíticas do tipo amilases nesse momento, apresentaria uma ação prejudicial à formação dessa estrutura polimérica ao agir sobre o substrato amido.

Damodaran e Agyare (2103) estudaram o efeito da aplicação da MTGase em isolado proteico de soro de leite tratado termicamente. Seus estudos revelaram que o tratamento térmico (70 °C/10 min) da proteína antes do tratamento com MTGase melhorou a suscetibilidade da proteína do soro à catálise da enzima, aumentando as ligações cruzadas. Assim como as ligações cruzadas da MTGase melhoraram de forma significativa a estabilidade térmica da proteína, essa melhoria da estabilidade térmica poderá ser explorada na utilização desse isolado proteico de soro em aplicações de processos a temperaturas elevadas. Assim, de maneira análoga, um estudo avaliando o efeito de tratamentos térmicos sobre diferentes proteínas na composição de massas de pão sem-glúten, previamente à etapa de adição de MTGase avaliaria uma possibilidade de melhoria da ação da MTGase sobre essas proteínas.

Renzetti et al. (2012) investigaram as mudanças nas propriedades de proteína de farinha de arroz “castanho” e informações a respeito da formação do complexo proteico. Após o tratamento com MTGase (10 U/g de proteína), os autores observaram indícios de uma polimerização proteica (glutelina) em um amplo complexo insolúvel dessas proteínas, formando uma estrutura de alto peso molecular. Concluíram que este amplo complexo proteico era oriundo dessa polimerização (glutelina), o qual se caracterizou em interações fortemente hidrofóbicas, resultando na melhoria das propriedades texturais dos pães sem-glúten tratados com MTGase.

Em trabalho anterior (Renzetti et al., 2008), já haviam demonstrado que o tratamento da farinha de arroz com MTGase melhorava a consistência e a elasticidade da massa dessa farinha, aumentando a qualidade textural de pães livres de glúten ao utilizar a enzima, e relacionaram esse efeito à formação de um amplo agregado proteico.

Kim et al. (2014) consideraram uma melhoria nas propriedades da massa de macarrão talharim sem-glúten, ao combinar tratamento de MTGase e isolado proteico de arroz, o qual aumentou a viscosidade da massa, aumentou o tempo de desenvolvimento e maciez da mesma.

Storck et al. (2009) verificaram o efeito da MTGase em diferentes concentrações nas características tecnológicas de pães elaborados com farinha de arroz com alta amilose. A adição de MTGase aumentou a viscosidade da pasta, e a dureza, adesividade, gomosidade e mastigabilidade da massa. Adicionada a 1,5 %, a enzima contribuiu no aumento do volume específico dos pães, e a perda de peso dos pães no forneamento não foi influenciada. Ao ser adicionada 0,5 % de MTGase, houve diminuição da firmeza e aumento da adesividade da massa, não afetando sua dureza. Maiores concentrações da enzima não afetaram a textura da massa.

Storck et al. (2103) avaliaram os efeitos do enriquecimento proteico e adição de MTGase sobre as propriedades texturais de pão sem glúten. A adição da enzima promoveu ligações cruzadas, enquanto que, o isolado proteico modificou a geleificação da farinha, reduzindo a viscosidade da massa. A adição de caseína e MTGase afetaram as propriedades texturais. O uso combinado de MTGase (1,35 U/g de farinha), ovo-albumina (0,67 g/100 g de

farinha) e caseína (0,67 g/100 g de farinha) aumentou o volume específico do produto, e reduziu a dureza do farelo.

Pongjaruvat et al. (2014) investigaram as características de pão sem glúten, composto por arroz de Jasmin, e a possível melhoria ao adicionar amido pré-geleificado de tapioca e MTGase à massa. Ao adicionar entre 0,1 e 1 % de MTGase (base farinha) aumentaram o volume do pão e reduziram sua dureza. Entretanto, concentrações acima mostraram tendência à inversão dessas propriedades.

Comparando-se os resultados desse trabalho aos citados da literatura, percebe-se que a estrutura polimérica proteica catalisada pela MTGase depende estreitamente do perfil proteico da massa, ou seja, esse perfil está relacionado diretamente aos ingredientes que visam substituir as proteínas do glúten. Além disso, como a presença de uma rede amilácea também mostra importância relevante, a atividade amilolítica no extrato produzido pela linhagem *S. roseum* V02, poderia ser suficiente para comprometer a rede amilácea da massa utilizada no experimento. Pois, foi observado que, após a fermentação da pasta (esponja) a viscosidade da mesma aumentou visualmente ao utilizar a maior concentração do extrato, isso provavelmente devido à degradação do amido presente na massa por efeito de amilases do extrato enzimático liofilizado, as quais foram quantificadas previamente (1,8 U/g de extrato liofilizado).

6 CONCLUSÕES

Uma linhagem identificada como *Streptosporangium roseum* V02 foi selecionada, apresentando características promissoras para produção de MTGase.

Em condições adequadas para Fermentação Submersa, a linhagem alcançou produção máxima de MTGase de 0,2 U/mL em 4 dias de fermentação. Para a Fermentação em Estado Sólido, a linhagem alcançou produção máxima de MTGase de 0,8 U/g_{ms} em 8 dias de fermentação.

Embora os resultados obtidos nesse trabalho tenham sido inferiores aos reportados na literatura, a produção da enzima foi realizada utilizando-se meios de cultivos para FS e FES com custo relativamente baixos, pois os mesmos utilizaram coprodutos em sua composição .

Os valores ótimos de pH ($6,6 \pm 0,4$) e de temperatura (45 ± 5 °C) encontrados para MTGase produzida pela linhagem de *Streptosporangium roseum* V02 situam-se dentro da faixa de temperatura e pH de outras MTGases encontradas na literatura.

A MTGase produzida pela linhagem *Streptosporangium roseum* V02 apresenta estabilidade térmica muito próxima a MTGase de outras espécies microbianas. A 35 °C a enzima apresentou boa estabilidade durante os primeiros 30 min de incubação, com perda de 10 % de sua capacidade catalítica. Levando em torno 270 min para apresentar perda de 50 % de sua capacidade catalítica. A 50 °C a enzima apresentou perda de aproximadamente 50 % de sua capacidade catalítica em torno de 30 min de incubação. A enzima não apresentou estabilidade em 60 e 70 °C.

A liofilização mostrou-se um processo muito agressivo sobre a atividade catalítica da MTGase *S. roseum* V02, necessitando da adição de crioprotetores no processo. A adição de sacarose como crioprotetor na concentração de 5 % (m/m) no extrato enzimático, possibilitou uma eficiência apenas de 21 % no processo de liofilização.

A enzima apresentou boa estabilidade durante estocagem em refrigeração e sob congelamento. Em refrigeração (4 °C), manteve sua capacidade catalítica praticamente sem perdas por 12 semanas. Quanto ao armazenamento sob congelamento (-18 °C), o mesmo também não apresentou perda de atividade catalítica neste mesmo período.

A enzima MTGase *S. roseum* V02 mostrou-se promissora para a aplicação em processos de produção de pão sem glúten. Quando aplicada na concentração de 0,2 U/ 100 g (base farinha), a MTGase *S. roseum* V02 (ATCC 12428) mostrou melhores resultados em relação ao volume específico e à dureza do miolo na massa quando comparada à enzima comercial.

7 SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

Este trabalho de tese aponta para a necessidade de estudos mais aprofundados que virão a contribuir para uma maior produção da enzima pela linhagem *S. roseum* V02, assim como suas aplicações. Dentre eles, um melhoramento genético na linhagem para a produção de MTGase seria imprescindível para uma produção considerada expressiva, quando comparada às demais linhagens descritas na literatura.

Quanto ao processo de liofilização da enzima, outras substâncias devem ser testadas como crioprotetoras, assim como a combinação dessas substâncias devem ser investigadas e avaliadas.

Quanto à aplicação da enzima à massa para panificação, outros ingredientes com diferentes perfis proteicos devem ser testados, avaliando a atuação da MTGase *S. roseum* V02 na formação da rede polimérica nessas massas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abip - Associação Brasileira da Indústria da Panificação e Confeitaria – Disponível em: < http://www.abip.org.br/noticias_internas.aspx?cod=164 > Acesso: 20 de outubro de 2014.

AGGELOPOULOS, T.; KATSIERIS, K.; BEKATOROU, A.; PANDEY, A.; BANAT, I. M.; KOUTINAS, A. A. Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. **Food Chemistry**, v. 145, p. 710–716, 2014.

ANDO, H.; ADACHI, M.; UMEDA, K.; MATSUURA, A. NONAKA, M. UCHIO, R.; TANAKA, H.; MOTOKI, M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 2613-2617, 1989.

ANISHA, G.S.; ROJAN, P.J.; NICEMOL, J.; NILADEVI, K.N.; PREMA, P. Production and characterization of partially purified thermostable α -galactosidases from *Streptomyces griseoloalbus* for food industrial applications. **Food Chemistry**, v. 111, p. 631–635, 2008.

ANVISA. “Regulamento Técnico sobre Enzimas e Preparações Enzimáticas para Uso na Produção de Alimentos Destinados ao Consumo Humano”. Resolução RDC n.º 205, de 14 novembro de 2006. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso: 01/10/2014.

ARRIZUBIETA, M. J. Transglutaminase. In: POLAINA, J.; MacCABE, A. P. **Industrial Enzymes – Structure, Functions and Applications**. Ed. Springer, 2007. Chapter 32. p. 567-581.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of Analysis of the Association of Official Agriculture Chemists. Washington, 2005.

AWAD, G. E.A.; HELAL, M. M. I.; DANIAL, E. N.; ESAWY, M. A. Optimization of phytase production by *Penicillium purpurogenum* GE1 under solid state fermentation by using Box–Behnken design. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 1, p. 81-88, 2014.

BAGAGLI, M. P.; SATO, H. H. Two-staged temperature and agitation strategy for the production of transglutaminase from a *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian soils. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 5, p. 1057-1065, 2013.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 175–185, 2012.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. v. 4, 2nd edition, Published by Williams & Wilkins, USA, 1989, 440p.

BINOD, P.; PALKHIWALA, P.; GAIKAIWARI, R.; NAMPOOTHIRI, K. M.; DUGGAL, A.; DEY, K.; PANDEY, A. Industrial Enzymes – Present status and future perspectives for India. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 72, p. 271-286, 2013.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial – Fundamentos** v. 1, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda. 2ª Reimpressão. 2007, 254p.

BOUDJELLAA, H.; BOUTIA, K.; ZITOUNIA, A.; MATHIEUB, F.; LEBRIHIB, A.; SABAOU, N. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. **Microbiological Research**, v. 161, p. 288-298, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

CAUVAIN, S. P.; YOUNG, L. S. Tecnologia da panificação. 2ª edição. Tradução de: Carlos David Szlak. Barueri, SP: Manole, 2009. 418p.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M.; A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal Biological Chemistry**, v. 170, n. 23, p.501-505, 1947.

CHEN, H. Z.; Advances in solid-state fermentation. **Research and Application of Microbiology**, v. 3, p. 7–10, 1992.

CHEN, H.; ZHAO, Z.; LI, H. The effect of gas double-dynamic on mass distribution in solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 58–59, p. 14–21, 2014.

COUSSONS P.J., PRICE N.C., KELLY S.M., SMITH B., SAWYER L. Factors that govern the specificity of transglutaminase-catalysed modification of proteins and peptides. **Biochemistry Journal**, v. 282, p. 929–930, 1992.

COUTO, S. R.; SANROMAN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291–302, 2006.

CUI, L.; DU, G.; ZHANG, D.; LIU, H.; CHEN, J. Purification and Characterization of Transglutaminase from a Newly Isolated *Streptomyces hygroscopicus*. **Food Chemistry**, v. 105, p. 612–618, 2007.

DAMASO, M. C. T.; VALADÃO, R. C; COURI, S.; VERMELHO, A. B. Assay Method for Transglutaminase Activity. In: VERMELHO, A. B., COURI, S. **Methods to Determine Enzymatic Activity**. Ed. Bentham Science Publishers, 2013. Chapter 9. p. 208-225.

DAMODARAN, S.; AGYARE, K. K. Effect of microbial transglutaminase treatment on thermal stability and pH-solubility of heat-shocked whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**. v. 30, p. 12-18, 2013.

DATE, M.; YOKOYAMA, K.; UMEZAWA, Y.; MATSUI, H.; KIKUCHI, Y. High level expression of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum* using a chimeric pro-region from *Streptomyces cinnamoneus* transglutaminase. **Journal of Biotechnology**, v. 110, p. 219-224, 2004.

DONDERO, M.; FIGUEROA, V.; MORALES, X.; CUROTTO, E. Transglutaminase effects on gelation capacity of thermally induced beef protein gels, **Food Chemistry**, v. 99, p. 546-554, 2006.

FACCHIANO, A.; FACCHIANO, F. Transglutaminases and their substrates in biology and human diseases: 50 years of growing. **Amino Acids**, v. 36, p. 599–614, 2009.

GASPAR, A. L. C.; GÓES-FAVONI, S. P. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review. **Food Chemistry**, v. 171, p. 315–322, 2015.

GERBER, U.; JUCKNISCHKE, U.; PUTZIEN, S.; FUCHSBAUER, H-L. A rapid and simple method for the purification of transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. **Biochemistry Journal**, v. 299, p. 825-829, 1994.

GILISSEN, L. J. W. J.; van deer VAN DER MEER, I. M.; SMULDERS, M. J. M. Reducing the incidence of allergy and intolerance to cereals. **Journal of Cereal Science**, v. 59, p.337-353, 2014.

GOMES, C. A. O. Produção de enzimas despolimerizantes por fermentação em meio semi-sólido por *Aspergillus niger* 3T5B8. **Dissertação de Mestrado**, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 78 p, 1995.

GROSSOWICZ, N.; WAINFAN, E.; BOREK, E.; WAELSCH, H. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 187, p. 111-125, 1950.

GUERRA-RODRÍGUEZ, E.; VÁZQUEZ, M. Evaluation of a novel low-cost culture medium containing exclusively milk, potato and glycerol for microbial transglutaminase production by *Streptomyces mobaraensis*. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, p. 784–791, 2014.

GUJRAL, H. S.; ROSELL, C. M. Functionality of rice flour modified with a microbial transglutaminase. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 225-230, 2004.

GUO, J.; ZHANG, Y.; YANG, X. A novel enzyme cross-linked gelation method for preparing food globular protein-based transparent hydrogel. **Food Hydrocolloids**, v. 26, p. 277-285, 2012.

HERNÁNDEZ-ALMANZA, A.; MONTAÑEZ-SÁENZ, J.; MARTÍNEZ-ÁVILA, C.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. Carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* YB-252 in solid-state fermentation. **Food Bioscience**, v. 7, p. 31–36, 2014.

IUBMB - International Union of Biochemistry and Molecular Biology – Disponível em: < <http://www.enzyme-database.org/query.php?name=transglutaminase> > Acesso: 08 de outubro de 2014.

JAROS, D.; PARTSCHEFELD, C.; HENLE, T.; ROHM, H. Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications. **Journal of Texture Studies**, v. 37, n. 2, p. 113-155, 2006.

JIANG, X.; CHEN, D.; HONG, S.; WANG, W.; CHEN, S.; ZOU, S. Identification, characterization and functional analysis of a GH-18 chitinase from *Streptomyces roseolus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2409 – 2415, 2012.

JING, D. Improving the simultaneous production of laccase and lignin peroxidase from *Streptomyces lavendulae* by medium optimization. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7592–7597, 2010.

JUNQUA, M.; DURAN, R.; GANCET, C.; GOULAS, P. Optimization of microbial transglutaminase production using experimental designs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, p.730-734, 1997.

KASPER, J. C.; WINTER, G.; FRIESS, W. Recent advances and further challenges in lyophilization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85 p. 162–169, 2013.

KOBAYASHI, K.; SUZUKI, S.; IZAWA, Y.; YOKOZEKI, K.; MIWA, K.; YAMANAKA, S. Transglutaminase in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. **Journal of General Applied Microbiology**, v. 44, p. 85-91, 1998.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 4ª edição, São Paulo: Sarvier, 2006. 1202p.

LIMA, A. L. G.; NASCIMENTO, R. P., BOM, E. P. S.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 272-277, 2005.

LIN, S.; HSIEH, Y.; LAI, L.; CHAO, M.; CHU, W. Characterization and Large-scale Production of Recombinant *Streptovorticillum platensis* Transglutaminase. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p.981–990, 2008.

LIN, Y.; CHAO, M.; LIU, C.; TSENG, M.; CHU, W. Cloning of the gene coding for transglutaminase from *Streptomyces platensis* and its expression in *Streptomyces lividans*, **Process Biochemistry**, v. 41, p. 519-524, 2006.

LINDFORS, K.; LÄHDEAHO, M. L.; KALLIOKOSKI, S.; KURPPA, K.; COLLIN, P.; MÄKI, M.; KAUKINEN, K. Future treatment strategies for celiac disease. **Expert Opinion Therapeutic Targets**, v. 16, p. 665-675, 2012.

LORAND, L. Transglutaminase - Remembering Heinrich Waelsch. **Neurochemistry International**, v. 40, p. 7–12, 2002.

LORENZEN, P. C.; NEVE, H.; MAUTNER, A.; SCHLIMME, E. Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**, v. 55, n. 3, p. 152-157, 2002.

LU, S.; ZHOU, N.; TIAN, Y.; LI, H.; CHEN, J. Purification and properties of transglutaminase from *Streptovorticillum mobaraense*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 27, p. 109–125, 2003.

MACEDO, J. A.; SETTE, L. D.; SATO, H. H. Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces* sp. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n.(4, p. 618-626, 2007.

MAHMOOD, W. A. Production of Transglutaminase by a Local *Streptomyces* Isolate Using Wheat Bran. **Jordan Journal of Agricultural Sciences**, v. 9, n. 1, p. 33-42, 2013.

MEIYING, Z.; GUOCHENG, D.; JIAN, C. pH control strategy of batch microbial transglutaminase production with *Streptoverticillium mobaraense*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 477–481, 2002.

MOTOKI, M; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 204-210, 1998.

NAGY, V.; SZAKACS, G. Production of transglutaminase by *Streptomyces* isolates in solid-state fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p.122–127, 2008.

NEVES, M. C. P.; GAVA, C. A. T. Actinomicetos no solo. **Portal do Agronegócio**. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=12352>. Acesso: 10 de maio de 2010.

NIELSEN, P. M. Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents. **Food Biotechnology**, v. 9, n.3, p. 119-156, 1995.

NIGAM, P. S.; PANDEY, A. Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization. Utilization of Agro-Residues. **Springer Science+Business Media B.V.** ISBN 978-1-4020-9941-0, e-ISBN 978-1-4020-9942-7, 466p, 2009.

NOLAN, M.; SIKORSKI, J.; JANDO, M.; LUCAS, S.; LAPIDUS, A.; DEL RIO, T. G.; CHEN, F.; TICE, H.; PITLUCK, S.; CHENG, J.; CHERTKOV, O.; SIMS, D.; MEINCKE, L.; BRETTIN, T.; HAN, C.; DETTER, J. C.; BRUCE, D.; GOODWIN, L.; LAND, M.; HAUSER, L.; CHANG, Y.; JEFFRIES, C. D.; IVANOVA, N.; MAVROMATIS, K.; MIKHAILOVA, N.; CHEN, M.; PALA-NIAPPAN, K.; CHAIN, P.; ROHDE, M.; GÖKER, M.; BRISTOW, J.; EI-SEN, J. A.; MARKOWITZ, V.; HUGENHOLTZ, P.; KYRPIDES, N. C.; KLENK, H. Complete genome sequence of *Streptosporangium roseum* type strain (NI 9100T). **Standards in Genomic Sciences**, v. 2, p. 29-37, 2010.

OLIVEIRA, E. A.; MAUGERI, F. Effects of lyophilization on catalytic properties of immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. LEB-V10. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 609–616, 2013.

PAYNE, T. Propriedades Básicas da Transglutaminase. In: **Ajinomoto corporation** Folder. 2000.

PFEFFERLE, C.; THEOBALD, U.; GURTLER, H.; FIEDLER, H. Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. **Journal of Biotechnology**, v. 80, p. 135–142, 2000.

- PIPER J.L., GRAY G.M., KHOSLA C. High selectivity of human tissue transglutaminase for immunoactive gliadin peptides: implications for celiac sprue. **Biochemistry**, v. 41(1), p.386–393, 2002.
- PLATAS, G.; PELÁEZ, F.; COLLADO, J.; MARTINEZ, H.; DiEZ, M. T. Nutritional preferences of a group of *Streptosporangium* soil isolates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 3, p. 269-275, 1999.
- PONGJARUVAT, W.; METHACANON, P.; SEETAPAN, N.; FUONGFUCHAT, A.; GAMONPILAS, C. Influence of pregelatinised tapioca starch and transglutaminase on dough rheology and quality of gluten-free jasmine rice breads. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 143-150, 2014.
- PORTILLA-RIVERA, O. M., TÉLLEZ-LUIS, S. J., LEÓN, J. A. R. Production of Microbial Transglutaminase on Media Made from Sugar Cane Molasses and Glycerol. **Food Technology Biotechnology**. v. 47, n. 1, p. 19–26, 2009.
- QUEIROZ, M; LOPES, J. D. S. **Curso básico de panificação**. Viçosa, MG: CPT – Centro de Produções Técnicas, 2008, 194p.
- RAMOS, P. S. R. Influência de Emulsificantes e da Enzima Transglutaminase no Desenvolvimento de Pães Modeláveis Sem Glúten. **Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos (PCTA-IFRJ)**, RJ, 78p, 2013.
- RENZETTI, S.; BEHR, J.; VOGEL, R. F.; BARBIROLI, A.; IAMETTI, S; BONOMI, F.; ARENDT, E. K. Transglutaminase treatment of brown rice flour: A chromatographic, electrophoretic and spectroscopic study of protein modifications. **Food Chemistry** v. 131,p. 1076–1085, 2012.
- RENZETTI, S.; BEHR, J.; VOGEL, R.; ARENDT, E. K. Transglutaminase polymerisation of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) proteins. **Journal of Cereal Science**, v. 48, p.747–754, 2008.
- RIBOTTA, P. D.; COLOMBO, A.; ROSELL, C. M. Enzymatic modifications of pea protein and its application in protein cassava and corn starch gels. **Food Hydrocolloids**. v. 27, p. 185-190, 2012.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2ª. Ed. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009, 618p.
- SALGADO, J. M.; MAX, B.; RODRÍGUEZ-SOLANA, R.; DOMÍNGUEZ, J. M. Purification of ferulic acid solubilized from agroindustrial wastes and further conversion into 4-vinyl guaiacol by *Streptomyces setonii* using solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 39, p. 52– 61, 2012.
- SANTOS, T. C.; GOMES, D. P. P.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Optimization of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1299–1304, 2012.

SARITHA, M.; ARORA, A.; SINGH, S.; NAIN, L. *Streptomyces griseorubens* mediated delignification of paddy straw for improved enzymatic saccharification yields. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 12–17, 2013.

SCHIMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**. v. 2, São Paulo: Edgar Blucher, 2007, 541p.

SEBESS, P. **Técnicas de padaria profissional**. Tradução de: Renato Freire. Rio de Janeiro, RJ: Senac Nacional, 320p, 2010.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 16, n. 3, p. 313-340, 1966.

SOARES, P. A. G.; VAZ, A. F. M.; CORREIAS, M. T. S.; PESSOA JR., A.; CUNHA, M. G. C. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 389–395, 2012.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination, **Journal of Biological Chemistry**, v.195, p. 267-272, 1952.

SOUZA, C. F. D.; FLORES, S. H.; AYUB, M. A. Z. Optimization of medium composition for the production of transglutaminase by *Bacillus circulans* BL32 using statistical experimental methods. **Process Biochemistry**, v. 41, n.5, p. 1186-1192, 2006.

SOUZA, C. F. V.; MATOS, G. S.; FLORES, S. H.; AYUB, M. A. Environmental effects on transglutaminase production and cell sporulation in submerged cultivation of *Bacillus circulans*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, p. 302–312, 2009b.

SOUZA, C. F. V.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Effects of Oxygen Volumetric Mass Transfer Coefficient on Transglutaminase Production by *Bacillus circulans* BL32, **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 571-576, 2009a.

SOUZA, C. F. V.; RODRIGUES, R. C.; HECK, J. X.; AYUB, M. A. Optimization of transglutaminase extraction produced by *Bacillus circulans* BL32 on solid-state cultivation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 1306–1313, 2008.

SOUZA, C. F. V.; VENZKE, J. G.; FLORES, S. H.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic Properties of Transglutaminase Produced by a New Strain of *Bacillus circulans* BL32 and its Action Over Food Proteins. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n.2, p. 443-450, 2011.

STEFFOLANI, M. E.; RIBOTTA, P. D.; PEREZ, G. T.; PUPPO, M. C.; LEÓN, A. E. Use of Enzymes to Minimize Dough Freezing Damage. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 2242-2255, 2012.

STORCK, C. R.; PEREIRA, J. M.; PEREIRA, G. W.; RODRIGUES, A. O.; GULARTE, M. A.; DIAS, A. R. G. Características tecnológicas de pães elaborados com farinha de arroz e transglutaminase. **Brazilian Journal of Food Technology**, II SSA, janeiro, p. 71-77, 2009.

STORCK, C. R.; ZAVAREZE, E. R.; GULARTE, M. A.; ELIAS, M. C.; ROSELL, C. M.; DIAS, A. R. G. Protein enrichment and its effects on gluten-free bread characteristics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, p. 346-354, 2013.

SUZUKI, S.; IZAWA, Y.; KOBAYASHI, K.; ETO, Y.; YAMANAKA, S.; KUBOTA, K.; YOKOZEKI, K. Purification and Characterization of Novel Transglutaminase from *Bacillus subtilis* Spores. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, n.11, p. 2344-51, 2000.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146– 161, 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6ª edição, Editora Artes Médicas Sul, Porto Alegre, 2000, 827p.

WASKMAN, S. A. Species concept among the actinomycetes with special reference to the genus *Streptomyces*. **Bacteriology Review**, v. 21, p. 1-29, 1957.

XIAO, Y.; XING, G.; RUI, X.; LI, W.; CHEN, X.; JIANG, M.; DONG, M. Enhancement of the antioxidant capacity of chickpeas by solid state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 210-222, 2014.

YAN, G.; DU, G.; LI, Y.; CHEN, J.; ZHONG, J. Enhancement of microbial transglutaminase production by *Streptovercillium mobaraense*: application of a two-stage agitation speed control strategy. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 963-968, 2005.

YANG KIM, JUN ILL KEE, SUYONG LEE, SANG-HO YOO. Quality improvement of rice noodle restructured with rice protein isolate and transglutaminase. **Food Chemistry**, v. 145, 409–416, 2014.

ZHANG, L.; HAN, X.; DU, M.; ZHANG, Y.; FENG, Z.; YI, H. Enhancement of transglutaminase production in *Streptomyces mobaraensis* as achieved by treatment with excessive MgCl₂. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n.6, p. 2335-2343, 2012.

ZHU, Y.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; BOL, J. Microbial trasglutaminase – a review of its production and application in food processing. **Applied Microbiological Biotecnology**, v. 44, p. 277-282, 1995.

9 ANEXOS

Tabela 42. Relação de reagentes usados durante o trabalho de tese

| REAGENTES | MARCA |
|---|---------------|
| Ácido L-glutâmico- γ -monohidroxamato G2253 | Sigma-Aldrich |
| Ácido Tricloro-acético (TCA) | VETEC |
| Ágar-ágar | ISOFAR |
| Albumina | Sigma-Aldrich |
| Amido Solúvel | ÊXODO |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | ISOFAR |
| Cloreto Férrico Hexa-hidratado | ISOFAR |
| Extrato de Levedura | HIMEDIA |
| Extrato de Malte | OXOID |
| Glutaciona reduzida | Sigma-Aldrich |
| HCl | PROQUIMICOS |
| Hidroxilamina | Sigma-Aldrich |
| K ₂ HPO ₄ | NUCLEAR |
| KH ₂ PO ₄ ·H ₂ O | PROQUIMICOS |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | NUCLEAR |
| Na ₂ HPO ₄ | PROQUIMICOS |
| NaH ₂ PO ₄ ·7H ₂ O | ISOFAR |
| NaOH | NUCLEAR |
| N-carbobenzoxy-L-glutaminyl-glycine | Sigma-Aldrich |
| Peptona | MICROMED |
| Solução Tampão pH 4,0 | VETEC |
| Solução Tampão pH 7,0 | VETEC |
| Tampão Tris Base | Fluka |

Tabela 43. Relação de equipamentos usados durante o trabalho de tese

| NOME | MARCA | MODELO |
|-------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| B.O.D. | SOLAB | SL -200/370 |
| Balança | Bel Engineering | MARK S2202 |
| Balança | Marte | AL 500C |
| Balança | ACCULAB | ALC – 210.4 |
| Banho Maria | TECNAL | TE-056 |
| Banho | TECNAL | TE – 2005 |
| Termostatizado | | |
| Centrífuga | International Equip ment co. | Modelo K ¾ HP |
| Centrífuga com | B. Braun Biotech | CERTOMAT BS -1 |
| Agitação Orbital | International | |
| Cubeta para | | 1,0 mL |
| espectrofotômetro | | |
| Espectrofotômetro | Bel Photonics | Bel Photonics 1105 |
| Estufa Termostato | Med Clave | Modelo 3 |
| Forno | BRASFORNO | |
| Frascos de Roux | | |
| Geladeira | Consul | Biplex CRM 45 frost free |
| Incubadora | BRASFORNO | |
| Liofilizador | LIOTOP | L101 |
| Batedeira orbital | SKYMPSEN | BPS-05-N |
| Micro-Centrífuga | Sigma | 2K15 |
| com refrigeração | Laborzentrifugen | |
| Micropipeta | HTL/LABMATE | (2-20 µL) |
| Micropipeta | HTL/LABMATE | (100-1000 µL) |
| Micropipeta | HTL/LABMATE | (1-5 mL) |
| pH-metro | PHTEK | PHS-3B |
| Placas de Petri | | |
| Tubo Falcon | | 50 mL |
| Tubo Falcon | | 15 mL |
| Tubos para | | 2,0 mL |
| microcentrífugas | | |

Tabela 44. Acompanhamento da produção de MTGase durante a segunda etapa de seleção pelas linhagens selecionadas na primeira etapa

| Linhagens | Atividade TGase (U/mL) | | | | | |
|-----------|------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 dia | 2 dias | 3 dias | 4 dias | 5 dias | 7 dias |
| FOP33 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,05 | 0,08 | 0,08 |
| V02 | 0,01 | 0,08 | 0,13 | 0,11 | 0,15 | 0,08 |
| P19 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 |
| 594 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,02 | 0,03 |
| Cel43 | 0,01 | 0,05 | 0,06 | 0,06 | 0,04 | 0,02 |
| CG08 | 0,00 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 |

Tabela 45. Perfil cinético da produção de MTGase pela linhagem V02 utilizando o meio proposto e nas condições consideradas adequadas para Fermentação Submersa

| | Atividade MTGase (U/mL) | | | | | | |
|---------------|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 dia | 2 dias | 3 dias | 4 dias | 5 dias | 6 dias | 7 dias |
| Replicata1 | 0,00 | 0,02 | 0,15 | 0,20 | 0,02 | 0,01 | 0,01 |
| Replicata1 | 0,01 | 0,02 | 0,15 | 0,19 | 0,02 | 0,01 | 0,00 |
| Replicata2 | 0,01 | 0,01 | 0,16 | 0,21 | 0,03 | 0,01 | 0,01 |
| Replicata2 | 0,02 | 0,01 | 0,15 | 0,20 | 0,03 | 0,01 | 0,00 |
| Replicata3 | 0,01 | 0,01 | 0,15 | 0,19 | 0,03 | 0,01 | 0,01 |
| Replicata3 | 0,01 | 0,01 | 0,14 | 0,19 | 0,03 | 0,00 | 0,01 |
| Replicata4 | 0,00 | 0,01 | 0,18 | 0,21 | 0,03 | 0,03 | 0,00 |
| Replicata4 | 0,00 | 0,02 | 0,16 | 0,21 | 0,03 | 0,01 | 0,00 |
| Media | 0,01 | 0,01 | 0,16 | 0,20 | 0,03 | 0,01 | 0,01 |
| Desvio Padrão | 0,007 | 0,005 | 0,012 | 0,009 | 0,005 | 0,008 | 0,005 |