

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**CARACTERIZAÇÃO DA CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE DO
Bacillus firmus n° 324 ALCALOFÍLICO - PRODUÇÃO DE
CICLODEXTRINAS RAMIFICADAS**

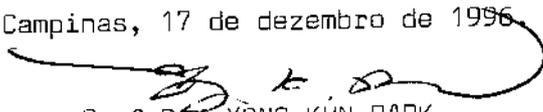
DONG KOO YIM

Orientador: Prof. Dr Yong Kun, Park.

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por DONG KOO YIM e aprovada pela Comissão Julgadora em 17.12.96.

Campinas, 17 de dezembro de 1996


Prof. DR. YONG KUN PARK

Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Ciência de Alimentos

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

Y57c

Yim, Dong Koo

Caracterização da ciclodextrina glicosiltransferase do *Bacillus firmus* n° 324 alcalofílico-produção de ciclodextrinas ramificadas / Dong Koo Yim.-- Campinas, SP: [s.n.], 1996.

Orientador: Yong Kun Park
Tese (doutorado)-Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

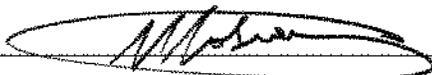
1.Amido. 2.Ciclodextrinas. I.Park, Yong Kun. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Yong Kun Park

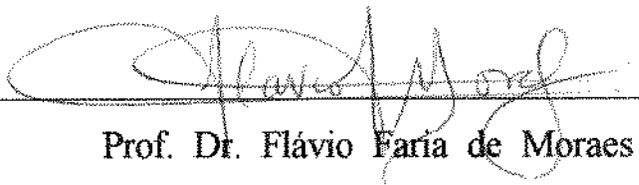
ORIENTADOR



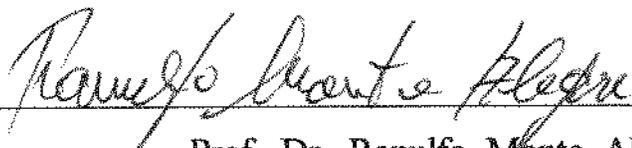
Prof. Dr. José Geraldo Sabioni



Profª Dra. Gisela Maria Zanin



Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes



Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

Profª Dra. Hélia Harumi Sato

Profª Dra. Gláucia Maria Pastore

Campinas, de Novembro de 1996.

Quando cheguei ao Brasil, em fevereiro de 1992, estava cheio de idéias. O aeroporto era uma porta para minhas realizações. Apesar de ter pouco conhecimento sobre o Brasil e sobre os brasileiros, minha expectativa era grande. Sabia que teria que passar 4 ou 5 anos aqui, mas não imaginava como isto seria. Muitas dúvidas estavam em minha mente. “Quem são os brasileiros? Que valores regem suas atividades pessoais e profissionais? Serei bem recebido ou tido como invasor?”

Tive que reaprender tudo...

Mais que vencer as barreiras naturais, foi necessário lutar contra meu orgulho próprio. O tempo me ajudou e, apesar de ainda tropeçar no português, consegui concluir meu doutorado.

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as oportunidades que tive na vida e por ter me ajudado nos momentos de solidão e sofrimento.

Aos meus familiares, pelo carinho, suporte e palavras de apoio através dos telefonemas. Este contato foi o mais perto que cheguei de meu país, a Coréia. Nestes momentos, conseguia resgatar minha origem, ao mesmo tempo que a saudade parecia crescer, doendo profundamente.

Trabalhar com os brasileiros e entender seus diferentes pontos-de-vista, para juntos desenvolvermos qualquer atividade, foi um grande desafio. Agradeço ao professor Yong K. Park, pelo convite de vir para o Brasil e pela orientação. Ao governo brasileiro, pela bolsa de estudos (CNPq). À FEA e à equipe do laboratório de bioquímica. Aos amigos coreanos, que enviaram materiais, facilitando meu trabalho. A todas as famílias coreanas que me apoiaram na cidade de Campinas.

Segundo a tradição coreana, respeita-se o irmão mais velho. Seu pedido é uma ordem. À professora Hélia H. Sato, a quem tive como irmã mais velha, agradeço o carinho dispensado. Não tenho palavras para agradecer sua ajuda: muito obrigado.

Por muitas vezes me senti improdutivo, meu trabalho se perdia. Se não fosse a forte personalidade e a motivação da professora Gláucia Maria Pastore, teria sido difícil continuar; obrigado.

Obrigado, aos amigos Aparício, Carlos, Bonel e Sidnei. Vocês foram as respostas às minhas orações, através da confiança e exemplar receptividade brasileira. Agradeço também Marina e Marcolino pela amizade e apoio no decorrer do trabalho.

Finalizando, estou feliz por ter concluído este trabalho. Sou grato a Deus por tudo e espero poder contar com todos para realizações futuras.

Muito obrigado

ÍNDICE GERAL

	páginas
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 - Ciclodextrina e sua produção.....	4
2.2 - Microrganismos produtores de CGTase.....	9
2.3 - Separação e purificação das ciclodextrinas.....	15
2.4 - Aplicações das ciclodextrinas.....	21
2.5 - Ciclodextrinas ramificadas.....	22
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 - Isolamento de microrganismos produtores de CGTase.....	31
3.1.1 - Isolamento de microrganismos.....	31
3.1.2 - Seleção de microrganismos produtores de CGTase.....	32
3.2 - Métodos de determinação da atividade da CGTase.....	33
3.2.1 - Determinação da atividade da CGTase pelo método de ciclodextrina-tricloroetileno (CD-TCE).....	33
3.2.2 - Determinação da atividade da CGTase pelo método da atividade dextrinizante	34

3.2.3 - Determinação da atividade da CGTase pela quantificação de ciclodextrinas por CLAE.....	35
3.3 - Estudo taxonômico dos microrganismos isolados.....	36
3.3.1 - Estudo morfológico, bioquímico e fisiológico dos microrganismos selecionados.....	36
3.3.2 - Determinação de menaquinona dos microrganismos selecionados.....	36
3.4 - Produção de CGTase pela linhagem de <i>Bacillus</i> sp. n° 324 em diferentes meios de cultura.....	37
3.5 - Otimização do meio de cultura para produção de CGTase.....	38
3.6 - Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento celular e produção de CGTase pela linhagem de <i>Bacillus firmus</i> n° 324 a 35° e 40° C	39
3.6.1 - Preparação do inóculo.....	39
3.6.2 - Fermentação.....	40
3.6.3 - Determinação do crescimento microbiano.....	40
3.7 - Produção e purificação da CGTase.....	41
3.7.1 - Obtenção da enzima bruta.....	41
3.7.2 - Concentração da CGTase por ultrafiltração em membrana.....	41
3.7.3 - Cromatografia da CGTase em coluna de DEAE-Sephadex A-50.....	41
3.7.4 - Cromatografia da CGTase em coluna de DEAE-Sepharose CL-6B.....	42
3.7.5 - Obtenção da enzima purificada.....	43
3.8 - Caracterização bioquímica da CGTase purificada.....	43
3.8.1 - Efeito do pH na atividade da CGTase.....	44
3.8.2 - Efeito do pH na estabilidade da CGTase.....	44
3.8.3 - Efeito da temperatura na atividade da CGTase.....	45

3.8.4 - Efeito da temperatura na estabilidade da CGTase.....	46
3.8.5 - Efeito da presença de sais minerais na atividade da CGTase.....	47
3.8.6 - Efeito da presença de inibidores na atividade da CGTase.....	48
3.8.7 - Determinação do peso molecular da CGTase.....	48
3.9 - Estudo da produção de ciclodextrina.....	50
3.9.1 - Estudo da produção de α , β e γ -ciclodextrina a partir do amido utilizando-se a CGTase de <i>Bacillus firmus</i> n° 324.....	50
3.9.2 - Efeito da concentração de substrato e tempo de reação na produção de ciclodextrina.....	50
3.9.3 - Efeito do tempo de reação na formação de ciclodextrina pela CGTase de <i>Bacillus firmus</i> n° 324 a partir de 5 % de amido solúvel	51
3.10 - Estudo da formação de ciclodextrinas ramificadas.....	51
3.10.1 - Produção da enzima pululanase de <i>Klebsiella</i> sp. 192.....	51
3.10.2 - Determinação da atividade da pululanase.....	53
3.10.3 - Produção da enzima isoamilase de <i>Flavobacterium</i> sp.....	53
3.10.4 - Determinação da atividade da isoamilase.....	54
3.10.5 - Estudo da utilização das enzimas amilolíticas pululanase e isoamilase na formação de maltosil (α -1,6) ciclodextrina.....	54
3.10.6 - Análise das ciclodextrinas ramificadas.....	55
3.10.7 - Efeito da concentração da pululanase na formação de maltosil (α -1,6) ciclodextrinas.....	56
3.10.8 - Efeito do tempo de reação na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina.....	56
3.10.9 - Estudo do pH ótimo de formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina.....	57

3.10.10 - Estudo da temperatura ótima de formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina.....	57
3.10.11 - Estudo da concentração ótima de substrato para a formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina.....	58
3.10.12 - Relação entre a proporção de maltose : β -ciclodextrina na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina.....	58
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1 - Isolamento e seleção de microrganismos alcalofílicos produtores de CGTase.....	60
4.2 - Identificação das linhagens de microrganismos produtores de CGTase.....	61
4.3 - Otimização da produção de CGTase pela linhagem de <i>Bacillus firmus</i> n° 324.....	64
4.4 - Relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo e produção de enzima CGTase pela linhagem de <i>Bacillus firmus</i> n° 324 a 30° e 40°C.....	65
4.5 - Produção e purificação da CGTase.....	68
4.6 - Caracterização da CGTase purificada.....	71
4.6.1 - Efeito do pH na atividade e estabilidade da CGTase.....	71
4.6.2 - Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da CGTase.....	73
4.6.3 - Efeito da presença de sais minerais na atividade enzimática.....	79
4.6.4 - Efeito da presença de inibidores na atividade enzimática.....	80
4.6.5 - Determinação do peso molecular da CGTase	82
4.7 - Estudo da produção de ciclodextrina a partir de amido.....	85

4.7.1 - Produção de α , β e γ -ciclodextrinas a partir de amido utilizando-se a CGTase de <i>Bacillus firmus</i> n° 324.....	85
4.7.2 - Estudo da concentração de substrato e do tempo de reação na produção de ciclodextrina.....	87
4.7.3 - Efeito do tempo de reação na produção de ciclodextrina a partir de amido solúvel a 5 %.....	89
4.8.1 - Estudo da utilização das enzimas amilolíticas pululanase e isoamilase na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina.....	91
4.8.2 - Efeito da concentração de pululanase na formação de maltosil (α -1,6) ciclodextrinas.....	92
4.8.3 - Efeito do tempo de reação na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina utilizando-se pululanase.....	93
4.8.4 - Estudo do efeito do pH na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina utilizando-se pululanase.....	95
4.8.5 - Estudo do efeito da temperatura na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina utilizando-se pululanase.....	96
4.8.6 - Efeito da concentração ótima de substrato na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina utilizando-se pululanase.....	97
4.8.7 - Relação entre a proporção de maltose : β -ciclodextrina e a formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina.....	99
5 - CONCLUSÕES.....	101
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos meios de cultura para isolamento de microrganismos alcalofílicos e produção de CGTase.....	32
Tabela 2 - Otimização do meio cultura para a produção de CGTase.....	39
Tabela 3 - Composição dos meios de cultura para produção de enzimas amilolíticas desramificantes.....	52
Tabela 4 - Proporção molar de maltose e β -ciclodextrina para produção de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina.....	59
Tabela 5 - Linhagens de microrganismos selecionados, atividade de CGTase pelo método de CD-TCE e proporção de ciclodextrinas produzidos.....	60
Tabela 6 - Características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas dos isolados alcalofílicos que apresentaram maior produção de CGTase.....	62
Tabela 7 - Purificação da CGTase de <i>Bacillus firmus</i> n° 324.....	71
Tabela 8 - Características das CGTases produzidas por vários microrganismos.....	78
Tabela 9 - Efeito da presença de sais minerais na atividade dextrinizante e de formação de ciclodextrina pela CGTase do <i>Bacillus firmus</i> n° 324.....	80
Tabela 10 - Efeito da presença de inibidores na atividade de CGTase do <i>Bacillus firmus</i> n° 324.....	81
Tabela 11 - Formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina utilizando-se pululanase e isoamilase.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Cromatografia em camada delgada de fase reversa das menaquinonas das linhagens selecionadas de <i>Bacillus</i> sp.....	63
Figura 2 - Seleção do meio de cultura para a produção de CGTase de <i>Bacillus firmus</i> n° 324.....	64
Figura 3 - Crescimento celular e produção de CGTase pelo <i>Bacillus firmus</i> n° 324 a 35 °C	67
Figura 4 - Crescimento celular e produção de CGTase pelo <i>Bacillus firmus</i> n° 324 a 40 °C	67
Figura 5 - Fluxograma de produção e purificação da CGTase de <i>Bacillus firmus</i> n° 324.....	68
Figura 6 - Cromatograma da CGTase em coluna de DEAE-Sephadex A-50.....	70
Figura 7 - Cromatograma da CGTase em coluna de DEAE-Sepharose CL-6B.....	70
Figura 8 - Efeito do pH na atividade da CGTase de <i>Bacillus firmus</i> n° 324.....	72
Figura 9 - Efeito do pH na estabilidade da CGTase de <i>Bacillus firmus</i> n° 324.....	73
Figura 10 - Efeito da temperatura na atividade da CGTase de <i>Bacillus firmus</i> n° 324.....	74
Figura 11 - Efeito da temperatura na estabilidade da CGTase de <i>Bacillus firmus</i> n° 324.....	76
Figura 12 - Efeito do CaCl ₂ sobre a estabilidade térmica da CGTase de <i>Bacillus firmus</i> n° 324.....	77
Figura 13 - Eletroforese da CGTase purificada em gel de SDS-poliacrilamida.....	83
Figura 14 - Determinação do peso molecular da CGTase purificada por eletroforese SDS-PAGE.....	84
Figura 15 - Cromatograma(CLAE) ilustrando a produção de α , β e γ ciclodextrina a partir de amido solúvel, utilizando-se CGTase de <i>Bacillus firmus</i> n° 324.....	86
Figura 16 - Efeito da concentração de amido solúvel e do tempo de reação na formação de ciclodextrina pela CGTase de <i>Bacillus firmus</i> n° 324.....	88

Figura 17 - Efeito do tempo de reação na formação de ciclodextrinas a partir de amido solúvel 5 % utilizando-se CGTase de <i>Bacillus firmus</i> n° 324	90
Figura 18 - Efeito da concentração de pululanase na formação de maltosil (α -1,6) α , β e γ -ciclodextrinas.....	93
Figura 19 - Efeito do tempo de reação na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina utilizando-se pululanase.....	94
Figura 20 - Efeito do pH na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina utilizando-se pululanase.....	95
Figura 21 - Efeito da temperatura na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina utilizando-se pululanase.....	97
Figura 22 - Efeito da concentração de substrato na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina utilizando-se pululanase.....	98
Figura 23 - Cromatograma(CLAE) ilustrando a formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina a partir de 70 % de maltose : β -ciclodextrina na proporção molar 18,8 : 1, catalisada pela pululanase	99
Figura 24 - Efeito da proporção molar de maltose e β -ciclodextrina na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina utilizando-se pululanase.....	100

RESUMO

Quinhentos e sessenta linhagens de microrganismos foram isoladas de amostras de solo brasileiro em meio alcalofílico. Oito linhagens apresentaram alta atividade enzimática de CGTase. Dentre estas, uma linhagem identificada como *Bacillus firmus* n° 324 apresentou alta produtividade de ciclodextrina glicosiltransferase (E.C. 2.4.1.19).

A produção ótima da enzima CGTase de *Bacillus firmus* n° 324 foi obtida em meio de cultura composto de 1 % de amido solúvel, 5 % de água de maceração de milho (AMM), 0,1 de % K_2HPO_4 , 0,02 % de $MgSO_4$ e 1% de $CaCO_3$, a 40 °C após 16 horas de fermentação. A CGTase foi purificada até homogeneidade através de ultrafiltração em membrana de 30.000 daltons, cromatografia em colunas de DEAE-Sephadex e DEAE-Sepharose CL-6B. A CGTase de *Bacillus firmus* n° 324 apresenta atividade ótima de formação de ciclodextrina a 65 °C na faixa de pH 7,5-8,5. A enzima mostrou-se estável na faixa de pH 6,0-9,5 e a 55 °C. Na presença de $CaCl_2$ 1 mM a enzima permaneceu estável após 30 minutos de tratamento a 70 °C.

A atividade enzimática não foi afetada por $MgSO_4$, e KCl porém foi fortemente inibida por $HgCl_2$ e $ZnSO_4$ na concentração 1 mM de sal em relação ao volume final da mistura de reação. Os reagentes EDTA, p-hidróximercuribenzoato, β -mercaptoetanol e N-bromosuccinimida não inibiram a atividade de CGTase na concentração de 5 mM em relação ao volume final da mistura de reação.

O peso molecular da enzima foi estimado em 75.000 daltons através SDS-PAGE electroforese.

A CGTase produziu α , β e γ -ciclodextrinas a partir de amido na proporção de 1:11:5 respectivamente. O rendimento de α , β e γ -ciclodextrina a partir de 5 % de amido solúvel foi 50 %. O rendimento de β e γ -ciclodextrina a partir de 5 % de amido solúvel foi de 32 e 15 %, respectivamente.

Maltosil (α -1,6) α , β e γ -ciclodextrina foram sintetizadas a partir de maltose e α , β e γ -ciclodextrinas, respectivamente, utilizando-se pululanase de *Klebsiella* sp (E.C. 3.2.1.41). Verificou-se que a pululanase de *Klebsiella* sp. produziu 50,4 % de maltosil (α -1,6) α -ciclodextrina, 35 % de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina e 55,4 % de maltosil (α -1,6) γ -ciclodextrina, após 24 horas de reação.

O pH e temperatura ótima para a formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina foram 5 e 50 °C, respectivamente. Observou-se que a concentração total de substrato de 70 % e a proporção molar de 18,8 : 1 de maltose : β -ciclodextrina foram as condições mais adequadas para a formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina.

ABSTRACT

Five hundred and sixty strains of microorganisms were isolated from soil of Brazil using alkalophilic culture medium. Eight strains of bacteria produced high activity of cyclodextrin glycosyltransferase (E.C. 2.4.1.19). One of these was classified as *Bacillus firmus* n° 324, and it demonstrated the highest CGTase activity.

Highest yield of the enzyme of *Bacillus firmus* n° 324 was obtained by using the following medium 1 % soluble starch, 5 % corn steep liquor(w/v), 0,1 % K_2HPO_4 , 0,02 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and 1 % Na_2CO_3 at 40° C for 16 hours incubation.

The enzyme was purified to electrophoretical homogeneity by ultrafiltration membrane, DEAE-Sephadex and DEAE-Sepharose CL-6B. The CGTase of *Bacillus firmus* n° 324 showed optimum activity for formation of cyclodextrins at 65 °C and range at pH 7,5-8,5. The enzyme was stable in the range of pH 6,0-9,5 and at temperature 55 °C, and at 70 °C in the presence of $CaCl_2$ (1 mM) after 30 min treatment.

The enzyme activity was not affected by $MgSO_4$ and KCl but it was strongly inhibited by $HgCl_2$ and $ZnSO_4$ in the final reaction concentration in 1 mM. A concentration of 5 mM of the EDTA, p-hydroxymercuribenzoate, β -mercaptoethanol and N-bromosuccinimide in the final reaction volume not inhibited the CGTase activity.

The molecular weight of the purified enzyme was estimated to be 75.000 daltons by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

This enzyme produced α , β and γ -cyclodextrin in the ratio 1:11:5 respectively. The yield of α - β and γ -cyclodextrin using 5 % starch solution(w/v) was 50 %. The yield of β and γ -cyclodextrin were 32 and 15 % respectively.

Maltosyl (α -1,6) α - β and γ -cyclodextrin was synthesized from maltose and α , β and γ -cyclodextrin, respectively, using *Klebsiella* sp. pullulanase.(EC 3.2.1.41). It was found that *Klebsiella* sp. pullulanase produced 50,4 % maltosyl (α -1,6) α -cyclodextrin, 35,0 % maltosyl (α -1,6) β -cyclodextrin and 55,4 % maltosyl (α -1,6) γ -cyclodextrin per ml of reaction mixture during 24 hours reaction.

The optimum pH and temperature for formation of maltosyl (α -1,6) β -cyclodextrin were 5 and 50 °C respectively. It was observed that the total substrate concentration of 70 %(w/v) and maltose: β -cyclodextrin molar ratio of 18,8:1 are the most suitable conditions for the formation of maltosyl (α -1,6) β -cyclodextrin.

1- INTRODUÇÃO

As ciclodextrinas, que constituem um grupo de oligossacarídeos cíclicos, não redutores, formadas por unidades de glicose unidas entre si por ligação glicosídica do tipo α -1,4, são obtidas a partir de amido através da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase).

As ciclodextrinas são formadas por 6, 7 e 8 unidades de glicose denominadas de α , β , e γ - ciclodextrinas, respectivamente.

Estes compostos têm sido de grande interesse devido ao fato de produzirem inclusões moleculares alterando as características físico-químicas das moléculas encapsuladas. Esta habilidade oferece inúmeras aplicações nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos.

Esta característica notável das ciclodextrinas de encapsular diversos compostos formando complexos de inclusão foi descrita por HORIKOSHI (1979).

As ciclodextrinas são utilizadas para estabilizar emulsões, espumas, materiais que são sensíveis à luz, ao oxigênio e calor, bem como para encapsular aromas, controlar a volatilidade de compostos voláteis, modificar a cor, o sabor e também aumentar a solubilidade de fármacos em água.

A adição de β -ciclodextrinas reduz sensivelmente o sabor amargo conferido pelas naringinas e limoninas em sucos cítricos (KONNO et alii, 1981). As β -ciclodextrinas eliminam o sabor amargo de hidrolisado proteico de caseína (SZEJTLI, 1982).

As primeiras pesquisas relatadas para formação de ciclodextrina a partir do amido foram feitas utilizando CGTase de *Bacillus macerans* (TINDEN & HUDSON, 1939).

Atualmente, as ciclodextrinas são obtidas a partir do amido de milho ou de batata, utilizando-se a CGTase obtida de várias espécies de *Bacillus*, em especial *B. circulans* E192 (BOVETTO et alii, 1992), *B. stearothermophilus* (KITAHATA & OKADA 1974), *B. megaterium* (KITAHATA & OKADA 1982) e *Bacillus* sp alcalofílico (NAKAMURA & HORIKOSHI 1976a).

A principal dificuldade na utilização industrial das ciclodextrinas, em especial a β -ciclodextrina é devido a sua baixa solubilidade em água. A solubilidade da β -ciclodextrina é de 1,85g/100ml de água a 25°C comparada a α e γ -ciclodextrina que apresentam 14,5g/100ml e 23,2g/100ml a 25°C, respectivamente. Este problema tem sido contornado através da reação de condensação das ciclodextrinas com maltose ou malto-oligossacarídeos originando as ciclodextrinas ramificadas.

A síntese de ciclodextrinas ramificadas, em especial a maltosil (α 1-6) β -ciclodextrina resulta em aumento da solubilidade em água de 151,6g/100ml a 25°C. Comparando a solubilidade de ciclodextrina ramificadas (KOIZUMI, et alii, 1987), verificaram que a maltosil e glicosil ciclodextrinas são respectivamente, 70 a 50 vezes mais solúveis que a β -ciclodextrina não ramificada. Vários métodos de síntese da β -ciclodextrina ramificada, em altas concentrações de substrato e enzima, através da reação de condensação reversa das enzimas isoamilase (ABE et alii. 1986) e pululanase (SAKANO et alii. 1985) têm sido descritos. A escolha da β -ciclodextrina para ser ramificada deve-se ao seu custo de produção ser inferior à α e γ -ciclodextrinas.

As ciclodextrinas ramificadas de maior solubilidade apresentam uso potencial nas indústrias farmacêuticas, cosméticos e de alimentos. A fixação de aromas em perfumes, aumento da solubilidade de fármacos atividade hemolítica e outras substâncias hidrofóbicas tem sido mencionados (HARADA et alii, 1985 e OKADA et alii, 1988).

A possibilidade das ciclodextrinas ramificadas de formar complexos de inclusão com drogas insolúveis em água, tais como: digoxina, digitoxina, estriol, nitrazepam e vitaminas D, E e K, permite a aplicação destas drogas na forma injetável. O complexo droga-glicosil β -ciclodextrina (ramificada) apresentou solubilidade marcadamente maior que o correspondente complexo droga - β -ciclodextrina (não ramificada). Os complexos de inclusão formados com as ciclodextrinas ramificadas também mostraram baixa atividade hemolítica em eritrócitos humanos; sendo observado menor atividade hemolítica para maltosil ciclodextrina em relação a glicosil ciclodextrina (KOIZUMI et alii, 1987).

O objetivo desse trabalho é isolar uma linhagem microbiana alcalifílica produtora da CGTase, estudar suas características bioquímicas e as condições ótimas de produção dessa enzima e das ciclodextrinas a partir do amido solúvel. Também se pesquisará a formação de ciclodextrinas ramificadas pela condensação de maltose e ciclodextrinas através de ação de pululanase de *Klebsiella* sp.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1-Ciclodextrinas e sua produção

As ciclodextrinas (CDs), também denominadas dextrinas Schardinger, cicloamiloses ou cicloglucanas, são uma série de oligossacarídeos produzidos pela ação de amilases de linhagens de *Bacillus* sp. em amido e compostos afins. Embora as ciclodextrinas tenham sido descobertas por VILLERS em 1891, a primeira descrição detalhada de sua preparação e isolamento foi feita por SCHARDINGER (1904).

FREUDENBERG citado por FRENCH (1942) afirma que as dextrinas de Schardinger obtidas pela hidrólise enzimática do amido pelo *Bacillus macerans* são compostas somente de resíduos de glicose. A determinação do peso molecular desses compostos cristalinos de alto peso molecular foi feita pela difração em raio X combinada com a medição da densidade do cristal. Através deste método, descobriu-se que a α -dextrina de Schardinger contém seis resíduos de glicose por molécula e a β -dextrina sete resíduos de glicose por molécula, sendo proposto que a α -dextrina de Schardinger seja denominada ciclohexamilose e a β -dextrina cicloheptamilose.

Segundo McCLENAHAN et alii (1942) a ação da enzima purificada de *Bacillus macerans*, em substratos de amido procedeu com um rápido decréscimo da viscosidade e uma redução gradual na rotação ótica. A dextrina de Schardinger foi preparada a partir do amido de batata através da amilase de *B. macerans* com rendimento máximo de 55%.

FRENCH et alii (1948) sugeriram que a ação da amilase de *Bacillus macerans* seria de trocar a ligação glicosídica do amido por uma ligação correspondente na molécula cíclica da dextrina de Schardinger. Em situações em que o ΔF é pequeno espera-se que a reação seja reversível. Esta reação reversível foi testada com substratos cristalinos, tendo-se verificado que a amilase de *B. macerans*, possui tanto uma ação sintetizadora quanto degradativa. Resultados apontam uma ação de síntese similar à da amilase de *B. macerans* para ciclohexamilose que utiliza glicose, α -metilglicosídeo, sacarose, celobiose ou ácido maltobiônico como co-substratos e também para cicloheptamilose com maltose ou glicose como co-substratos.

Uma característica distinta das dextrinas de Schardinger, que facilita sua separação do amido hidrolisado pela CGTase, é sua habilidade em formar complexos cristalinos insolúveis com muitos líquidos principalmente hidrocarbonetos e hidrocarbonetos halogenados. A solubilidade das dextrinas puras em água e propanol aquoso, bem como de acetatos de dextrinas em alguns solventes selecionados foram mensurados. A α -ciclodextrina está presente em somente 2 à 5% da mistura de carboidrato e forma cristais hexagonais negro-azulados quando a solução contém cerca de 0,1N de iodo em 0,1M de iodeto de potássio e deixa-se evaporar em lâmina microscópica. Não foi observada a formação de complexos de iodo com a β - ou γ - ciclodextrinas. Quando as dextrinas são cristalizadas em 60% de álcool propílico, cristais de cada complexo podem ser prontamente identificados. A solubilidade das α , β e γ dextrinas em água foram determinadas através da medição de sua rotação: 14,5g/100ml; 1,85g/100ml e 23,2g/100ml, respectivamente (FRENCH et alii, 1949).

A análise de γ -ciclodextrina, por processo cristalográfico, indicou que a gama dextrina é composta de oito resíduos de glicose simetricamente arranjados em um anel e ligados mutuamente por ligações α -1,4-glicosídicas (FRENCH et alii, 1950).

NORBERG & FRENCH (1950) atribuem a formação das dextrinas de Schardinger, a partir do amido e de dextrinas glicosídicas lineares, a uma ação do tipo "troca glicosídica". A amilase de *B. macerans* é aparentemente capaz de produzir a troca de energia de uma ligação glicosídica de uma α -1,4 cadeia linear para uma nova ligação α -1,4 glicosídica numa dextrina cíclica. Esta ação é reversível. A amilase de *B. macerans* mostrou ser capaz de efetuar a redistribuição entre oligossacarídeos lineares concomitantemente com reações envolvendo as dextrinas cíclicas de Schardinger.

FRENCH et alii (1954) demonstraram que a amilase de *B. macerans* ligada à molécula de cicloamilose é simultaneamente aberta e ligada a uma molécula de co-substrato de tal forma que haja a formação de um fragmento de amilose linear terminal na extremidade redutora, através de um grupo característico do co-substrato usado, com subseqüentes reações de redistribuição que levam à formação de uma série homóloga de compostos. Estas séries incluem o co-substrato e compostos contendo unidades adicionais de D-glicose ligadas entre si e ao co-substrato por ligações α -1,4-D-glicosídicas.

FRENCH et alii.(1965) estudaram a enzima de *B. macerans* que converte amido em dextrinas de Schardinger, produzindo ao mesmo tempo pequenas quantidades de dextrinas de alto peso molecular. Estas dextrinas foram

separadas por cromatografia em coluna de celulose em alta temperatura e designadas δ , ϵ , ξ , η , e θ -dextrinas. A diálise, ultracentrifugação, rotação ótica e análise de fragmentação indicam que a δ -dextrina é um homólogo maior que as α -, β -, γ -dextrinas. As frações maiores são misturas de moléculas puras cíclicas unidas através de ligações α -1,4 com moléculas cíclicas ramificadas e dextrinas com cadeia aberta ramificada.

MATZUZAWA et alii (1975) estudaram a formação da β -ciclodextrina de Schardinger a partir do amido por *Bacillus* sp. alcalofílico (ATCC 21783). Fatores que influenciam a produção das ciclodextrinas incluem o tipo, concentração, dispersão do amido, o tempo de hidrólise e a quantidade de enzima utilizada. Um método para a preparação da β -ciclodextrina de Schardinger em escala industrial, sem o uso de precipitantes, foi pesquisado, tendo sido observado um rendimento final de β -ciclodextrina de 3,5 kg a partir de 15 kg de amido de batata.

SHIRAISHI et alii (1989a) estudaram a influência da adição de etanol na formação de ciclodextrinas utilizando CGTase de *Bacillus macerans*. A produção de ciclodextrinas, após longo período de reação, foi independente da concentração inicial de amido (5-50g/l) em ambos os sistemas. A produção de α -ciclodextrina foi aumentada cerca de 1,8-1,9 vezes na presença de etanol, enquanto a produção de β -ciclodextrina diminuiu se comparada à produção de α -ciclodextrina. O aumento da concentração de etanol tem influência no início da formação das ciclodextrinas, diminuem, principalmente as α -ciclodextrinas. É sabido que a produção de ciclodextrinas é fortemente afetada pela adição de solventes orgânicos, compostos como surfactantes, álcoois, éter e acetona. Isso

está diretamente relacionado com as mudanças na produção e na proporção de α -, β - e γ -ciclodextrinas.

TOMITA et al (1990) estudaram alguns fatores que afetam a formação de γ -ciclodextrina a partir de amido de batata, usando CGTase de *Bacillus* sp. AL-6. Verificaram que a utilização de etanol e tampões são fatores importantes na estabilidade da γ -ciclodextrina. A produção máxima de 35% de γ -CD foi obtida utilizando 100 mM de tampão fosfato pH 8,0 com concentração de etanol de 30 %. Acredita-se que o aumento da produção de γ -CD foi devido a repressão da degradação desse produto devido à presença do etanol. Um fato descoberto foi que a γ -ciclodextrina age como inibidor da sua formação.

LEE & KIM (1991) isolaram uma linhagem de *Bacillus* sp. BE101, a partir de amostras do solo, e verificaram que produzia principalmente β -CD a partir de amido solúvel. A proporção de α , β e γ -ciclodextrinas (CDs) foi de 1:7:2. A enzima apresentou atividade ótima em pH 6,0-6,5 e a temperatura de 45°C. Foi observado aumento na produção de ciclodextrinas após a adição de solventes orgânicos como acetona, propanol e etanol na mistura de reação. Foi obtido aumento de 100% no rendimento após adição de 10 % de etanol. Os autores sugeriram que esse aumento é devido à maior atividade de hidólise da CGTase na presença de etanol. Além disso, a adição de etanol pode evitar a contaminação microbiana durante a produção de CDs.

SABIONI & PARK (1992) isolaram, a partir de amostras do solo, um microrganismo alcalofílico identificado como *Bacillus lentus*, que produzia alta atividade de CGTase. A temperatura e o pH ótimo para a formação de ciclodextrinas foram 45-55°C e 6,5-8,5, respectivamente. A estabilidade térmica

da enzima foi aumentada com a adição de íons cálcio. A conversão máxima do amido para ciclodextrinas foi de 65%. A CGTase foi totalmente inibida na presença de $ZnSO_4$, $HgSO_4$, $CuSO_4$ e $FeSO_4$ na concentração de 5mM. A proporção de α , β e γ -ciclodextrinas formada, após 24 horas de reação, foi de 1:67:1,6, respectivamente.

2.2- Microrganismos produtores de CGTase

TINDEN & HUDSON (1942) isolaram várias culturas de *Bacillus macerans* do solo e de batatas. Tais linhagens cresceram em infusão de 10 a 20 gramas de batata em 100 ml de água, mas o meio de infusão de beterraba, peptona e água não foi favorável à produção da enzima de *Bacillus macerans*. A produção da enzima foi rápida na faixa de 37,5 a 40°C. A enzima permaneceu estável e nenhuma inativação significativa ocorreu a 50°C.

KITAHATA et alii (1974) relataram a obtenção de CGTase uma linhagem de *Bacillus* (linhagem N° 5). A enzima foi purificada através de adsorção em amido de milho, precipitação com sulfato de amônio, cromatografia em coluna de DEAE-celulose e filtração em gel Sephadex G-100. A preparação enzimática foi separada em duas frações em eletroforese de disco e que possuíam habilidade para formar ciclodextrina. Enzimas da linhagem N° 5 diferiam das enzimas de *Bacillus macerans* (BMA) quanto à ação em amido. As enzimas da linhagem N° 5 produziam principalmente cicloheptamilose (β -CD) a partir do amido ao contrário das enzimas de BMA que produzem ciclohexamilose (α -CD).

Segundo KITAHATA & OKADA (1974) a quantidade de α -, β - e γ -ciclodextrinas (CDs) produzidas pela ação das enzimas de *Bacillus megaterium* (nº.5) e *Bacillus macerans* (BMA) em amido C¹⁴ foram determinadas através do cálculo da radioatividade. Ambas as frações da enzima nº 5 produziram a α -, β - e γ -CDs na proporção de 1:2,4:1, ao contrário da enzima de BMA produziu as ciclodextrinas na proporção de 2,7:1:1, respectivamente.

KITAHATA & OKADA (1975) pesquisaram a reação de transglicosilação da ciclodextrina glicosiltransferase do *Bacillus megaterium* (nº 5) e *Bacillus macerans* (BMA) e verificaram que a enzima da linhagem Nº 5 era mais eficiente na reação de transglicosilação que a enzima de BMA para cada acceptor empregado. A ordem de eficiência dos aceptores para a enzima da linhagem N.º 5 foram maltose (G₂), glicose (G₁), maltotriose (G₃) e sacarose (GF), ao contrário do que foi observado para a enzima de BMA: G₁, G₂, GF e G₃. Os produtos de transglicosilação, para a glicose formada pela ação da enzima de linhagem Nº 5 no amido, foram G₂, G₃, maltotetraose (G₄), maltohexaose (G₆) e maltoheptaose (G₇), dispostos em ordem de suas quantidades. O maior produto da transglicosilação para a sacarose, formada pela ação da enzima da linhagem Nº 5 no amido, foi a maltosilfrutose, tendo sido sugerido que a ciclodextrina glicosiltransferase poderia transferir resíduos de glicose a um acceptor diretamente a partir do amido, bem como através da ciclodextrina.

NAKAMURA & HORIKOSHI (1976a) isolaram, a partir de amostras de solo, uma bactéria, identificada como *Bacillus* sp., altamente produtora de CGTase, em meio de cultura alcalina contendo 1% de Na₂CO₃. A maior produção da enzima foi obtida utilizando-se como meio de cultura 1% (p/v) de

amido solúvel , 5% (p/v) água de maceração de milho (AMM), 0,1% (p/v) de K_2HPO_4 , 0,2% (p/v) de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 1% (p/v) de $NaCO_3$. A enzima bruta mostrou atividade em ampla faixa de pH apresentando dois picos de atividade máxima entre 5,0- 5,4 e 7,5-8,5 a 45°C.

HORIKOSHI (1979), sabendo das dificuldades na obtenção e separação de ciclodextrinas (CDs) utilizando solventes orgânicos, caros, perigosos e prejudiciais à saúde, desenvolveu um sistema de produção de CDs utilizando CGTase de *Bacillus* sp. N° 38-2 alcalofílico que produz uma grande quantidade de β -ciclodextrina (CD) a partir de amido. Através desta enzima, β -CD cristalina e uma mistura de dextrinas cíclicas e não-cíclicas podem ser produzidas em escala industrial , sem o uso de solventes orgânicos.

NONOMOTO et alii (1984) isolaram a partir de amostras de solo de Taiwan, uma linhagem de microrganismo alcalofílico, classificado como *Bacillus* sp. HA 3-2-2. A linhagem mostrou ser altamente produtora de β -ciclodextrina. A enzima bruta apresentou maior formação de ciclodextrinas em pH 6,0 e no método de iodo apresentou pH ótimo em 4,5 .A CGTase de *Bacillus* sp. HA 3-2-2 apresentou atividade temperatura ótima a 55 °C, e estabilidade na faixa de pH 6,0-11,0 e estabilidade térmica 60 °C.

NOMOTO (1986) estudaram uma linhagem de bactéria alcalofílica, *Bacillus* sp. HA 303-2 , que produz grande quantidade de CGTase. A enzima foi fracionada em sulfato de amônia e apresentou apenas uma banda simples quando aplicada em SDS-PAGE em disco. A enzima purificada apresentou ótimo pH e temperatura para a formação de CD na faixa de 6,5-8,0 e 60 °C, respectivamente, e estabilidade entre pH 6,0-11,0. A enzima não foi inibida

pelos inibidores típicos como fluoreto (PMSF), p-cloromercuribenzoato (PCMB) e etilenodiaminotetraacético (EDTA).

TAKANO et alii (1986) estudaram a clonagem do gene de CGTase de *Bacillus macerans* em bacteriófago de *Escherichia coli* λ D69. A sequência de nucleotídeos apresentou ter 2142 pares de base, que correspondem a 714 aminoácidos. Essa sequência revela que a enzima é composta de duas subunidades idênticas com peso molecular estimado em 145.000 daltons por filtração em gel. Verificou-se através de eletroforese em gel SDS-poliacrilamida que a enzima é composta de suas subunidades idênticas de peso molecular de 74.000 daltons.

PONSWASDI & YAGISAWA (1987) isolaram uma linhagem de microrganismo produtor de CGTase, denominada C31, que foi identificada como *B. circulans* de acordo com as características bioquímicas e morfológicas. O conteúdo de G+C da linhagem C-31 foi de 34,4% enquanto o conteúdo de G+C da linhagem tipo foi 35%. A CGTase da linhagem C31 catalisa a formação de ciclodextrinas na proporção β : γ -Ciclodextrinas na proporção 10:5 respectivamente enquanto que a CGTase de *B. macerans* produz α : β : γ -ciclodextrinas na proporção de 2,7:1:1, *B. megaterium* na proporção de 1:2,4:1 e a CGTase da linhagem alcalofílico N° 38-2 na proporção de 1:11,5:1,5.

YU (1988) estudou a CGTase da linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* AL35 e verificou, que devido a sua estabilidade térmica e em pH alcalino, o processo de produção de ciclodextrinas podia ser desenvolvido a 60°C e pH 9,0. A CGTase convertia amido gelatinizado predominantemente para α -CD, esta última correspondia a cerca de 95% do total de ciclodextrinas produzidas.

PARK et alii (1989) desenvolveram um novo método para selecionar linhagens de microrganismos alcalofílicos produtores de ciclodextrinas, especificamente detectado em meio sólido em placa de petri contendo fenolftaleína. Os microrganismos inoculados em placa que produziram ciclodextrinas, formaram um halo incolor e a atividade de CGTase foi determinada de acordo com a intensidade da redução da cor da fenolftaleína em condições alcalinas.

MORI et alii (1995) estudaram as condições de reação para produção de γ - ciclodextrina (CD) utilizando CGTase de *Brevibacterium* sp 9065. O pH ótimo e a temperatura ótima para produção de γ -CD foram 7,0 e 50 °C, respectivamente. A adição de íons Ca^{++} aumentou a estabilidade térmica e a formação de ciclodextrinas foi afetada pela concentração desses íons. Um outro fator que levou a um aumento da produção de γ -CD foi a adição de etanol.

YAMADA et alii (1976) analisaram o sistema de menaquinona (MK) de vinte-e-seis culturas de cocos aeróbios gram-positivos. *Sporosarcina ureae* apresentou o sistema MK-7 que é consistente com aquele do gênero *Bacillus*. No gênero *Planococcus* foi encontrado o único sistema composto de MK-8(MK-7). O gênero *Staphylococcus* foi dividido em dois grupos de acordo com o sistema MK: MK-8 (MK-7) para o *St. aureus* e MK-7 para o *St. epidermidis* e *St. saprophyticus*. O sistema de menaquinona do gênero *Micrococcus* mostrou ser o mais complexo, possuindo o MK-8 (MK-7), MK-8 (H2) e MK-9 (H2) no *M. luteus*, MK-9 (H2) no *M. agilis* e MK-7 (H2) no *M. varians*. Quinonas isoprenóides são importantes no funcionamento do sistema de transporte de elétrons durante a respiração. Vários tipos de quinona são encontradas nas células bacterianas, com a maioria das bactérias aeróbias possuindo

menaquinona e/ou ubiquinona isoprenóide. Quinonas incomuns são também encontradas em algumas bactérias. A composição da quinona isoprenóide é típica para a classificação do gênero da bactéria. Não somente a variedade de quinonas, mas também o número de unidades de isoprenos da cadeia e o grau de hidrogenação das duplas ligações na cadeia isoprenica são úteis na sistemática bacteriana.

HESS et alii (1979) analisaram as quinonas respiratórias para 73 linhagens de bactérias gram positivas, incluindo bastonetes formadores de esporos, bactérias lácticas e actinomicetes. Menaquinonas com sete unidades isoprenóides (MK-7) foram os principais tipos de quinona encontrados como representativos do gênero *Bacillus* e também em linhagens de *Sporolactobacillus*. Contudo uma linhagem de *B. thuringiensis* produtora de MK-8 além de MK-7, enquanto que linhagens de *Bacillus lentus* e *Bacillus pantothenicus* parecem produzir MK-9 e MK-8, respectivamente. As quinonas não foram encontradas em clostrídios e em bactérias lácticas, exceto em *Pediococcus cerevisiae* e *Lactobacillus casei*, subespécie *rhamnosus*, que continham menaquinonas.

COLLINS & JONES (1981) elucidaram a composição de uma mistura natural de ubiquinonas utilizando método cromatográfico semi-qualitativo de fase reversa (TLC) baseado na separação dos componentes de acordo com suas propriedades físicas, representadas por uma fase estacionária não volátil e uma fase móvel corrida em placas de sílica gel com misturas polares de acetona-água ou dimetilformaldeído-água. Os autores observaram a separação entre Q6, Q7, Q8, Q9 e Q10 em cromatografia ascendente.

KOMAGATA & SUZUKI (1987) realizaram análises dos lipídeos e componentes da parede celular para classificar e identificar bactérias. O ácido micólico, ácidos graxos, lipídeos polares e quinonas isoprenóides foram utilizados nas análises como suporte na sistemática bacteriana. Os autores relataram um método de extração de quinona, separação em placa de sílica gel e observaram em luz UV. Para a extração, a massa celular (100-300 mg) foi suspensa em solução 2:1 (v/v) de clorofórmio-metanol e incubada por uma noite a 25 °C. Após a filtração a amostra foi evaporada e em seguida dissolvida em acetona. Esta solução foi aplicada em placa de sílica gel e a cromatografia desenvolvida com solvente benzeno por 40 minutos. As quinonas e ubiquinonas apresentaram Rf 0,7 e Rf 0,4, respectivamente. Para separação os compostos foram extraídos da placa de sílica, eluídos com acetona e aplicados com um tubo capilar em placa de cromatografia em camada de fase reversa com solventes específicos. Para a separação de menaquinona foi utilizada um sistema de solvente acetona-água na proporção 99:1 (v/v) e para ubiquinona o sistema de solvente acetona : acetonitrila 80:20 (v/v). O tempo de desenvolvimento foi 15 minutos e as quinonas foram visualizadas sob luz UV (254 nm).

2.3- Separação e purificação das ciclodextrinas

LAMMERS (1969) analisou as ciclodextrinas em coluna de celulose, obtendo bons resultados, contudo o autor não obteve boa reprodutibilidade do método. Um método mais seguro foi desenvolvido usando gradiente de eluição em carvão. A amostra consistiu de 5 ml de solução aquosa de α - e β -ciclodextrina (3% de α -CD e 3% de β -CD) que era aplicada à coluna. Após a

amostra ser adsorvida na coluna, a eluição foi iniciada com 7% Isobutanol. Utilizando-se fluxo de 130-170 ml/h a separação da α - e β -ciclodextrinas foi completada com 12 h. Quando o carvão que sofreu flotação foi utilizado, a velocidade do fluxo foi quase constante e muito maior do que quando se usou carvão que não foi submetido à flotação.

Segundo CARTER & LEE (1971) as α - e β - ciclodextrinas e as dextrinas de Schardinger ramificadas apresentam um comportamento anômalo em cromatografia em coluna de Sephadex G-15 onde elas são retardadas além dos volumes de eluição esperados. Isto sugeria que eram adsorvidas durante a cromatografia de peneira molecular. Outros oligossacarídeos não-cíclicos não exibem efeitos de adsorção quando fracionados em gel Sephadex.

ZSADON et alii (1978) verificaram o comportamento cromatográfico das α -, β - e γ - ciclodextrinas em coluna de dextrana. Observaram que as CDs ligam-se fortemente ao gel de dextrana e a γ -ciclodextrina é eluída em primeiro lugar, seguido da α -ciclodextrina e por último a β -ciclodextrina; esta sequência está de acordo com diminuição de solubilidade. A retenção de α - e β -ciclodextrinas depende significativamente da temperatura, ao contrário das γ -ciclodextrina. O efeito da adsorção influencia a separação cromatográfica das α - e β -ciclodextrinas. O tipo do gel de Dextrana, Sephadex ou Molselect G-15 e a combinação de G-15 com G-25 provou ser muito útil para completa separação e produção de CDs com alto grau de pureza.

NAKAMURA & HORIKOSHI (1976b) purificaram a CGTase extracelular de *Bacillus* sp. alcalofílico (ATCC 21783) por eletroforese em disco de gel de poliacrilamida e ultracentrifugação, e determinaram que a

enzima apresentava uma banda simples e homogênea de proteína. O peso molecular por eletroforese em disco de SDS-poliacrilamida e o ponto isoelétrico da proteína foram 88.000 e pH 5,4, respectivamente. O pH ótimo de atividade variou entre 4,5-4,7. A enzima converteu 73% de amido, 65% de amilopectina, 45% de glicogênio e 25% de β -limite dextrina de amilopectina em ciclodextrinas.

KOBAYASHI et alii (1978) purificaram a CGTase de *Bacillus macerans*, utilizando técnicas de cromatografia em coluna de adsorção em amido e DEAE-celulose, e uma posterior cristalização em solução de sulfato de amônia. Os cristais de enzima eram em forma de bastão e apresentavam uma banda simples em gel de eletroforese em disco. A enzima purificada foi dissociada em duas subunidades por eletroforese em disco de SDS-PAGE. As subunidades não apresentaram atividade. A enzima apresentou alta atividade em pH 6,0 e estabilidade na faixa de 5,5-9,5. A temperatura ótima foi de 60°C e a estabilidade abaixo de 50°C.

KITAHATA et alii (1978) desenvolveram um novo método para análise de CDs por CLAE, utilizando coluna de Bondapak carbohydrate (4x300mm) e sistema de solvente acetonitrila-água (65:35 (v/v)), fluxo de 1ml/min. Utilizando esse método puderam detectar uma quantidade muito baixa de ciclodextrinas (5 μ g) com um erro experimental de 10%. Pode-se ainda utilizar este método para separação de vários outros oligossacarídeos como amido hidrolizado e açúcares tratados com glicoamilase e sacarases.

KITAHATA & OKADA (1982) purificaram a CGTase de *Bacillus stearothermophilus* TC-60 por adsorção em amido, coluna de DEAE-Sephadex

e filtração em gel Biogel P-150. O peso molecular da subunidade da enzima purificada foi estimado em 68.000 por SDS-PAGE. A enzima apresentou ponto isoelétrico pH 4,5, maior atividade em pH 6,0 e a 70°C e estabilidade térmica a 50°C em pH 7,0. A CGTase mostrou estabilidade na faixa de pH 7,0-9,2 após duas horas de incubação a 40°C. Os resultados dos testes de tricloroetileno e Tilden-Hudson sugerem que a enzima estudada apresenta produção de ciclodextrinas em diferentes proporções comparadas com a produção de CD pelas enzimas de *Bacillus megaterium* e *Bacillus macerans* IFO 3490.

SATO et alii (1985) utilizaram coluna empacotada Shodex RS pak DC-613, medindo 6x150mm, eluente acetonitrila:água (65:35(v/v)) com fluxo de 1,5ml/min., temperatura da coluna 60°C, para separação e quantificação de maltodextrinas e ciclodextrinas sem a utilização de glicoamilase. Segundo os autores, os métodos para determinação de ciclodextrinas descritos até então eram realizados de modo indireto, como reações colorimétricas (FUWA, 1954), método de Tilden-Hudson (TILDEN & HUDSON, 1942) e método utilizando glicoamilase (KOBAYASHI, 1974).

PONSAWASDI & YAGISAWA (1988) purificaram a CGTase de *B. circulans* C31 através de duas etapas utilizando coluna de amido e biogel. A enzima foi purificada 90 vezes com 30% de rendimento e o peso molecular foi estimado em 103.000 daltons. A enzima apresentou atividade ótima em pH 5,5 e 60 °C, estabilidade na faixa de pH 5,5-9,0 e em temperaturas inferiores a 50°C.

FUGITA et al (1990) purificaram a CGTase de *Bacillus* sp. AL-6 utilizando coluna de adsorção de amido e troca iônica de DEAE-Sephadex A-50. A proteína apresentou ser monomérica, com peso molecular de 74.000

daltons, determinado por filtração em gel e SDS-PAGE. Em sistema de reação contendo amido, a enzima apresentou grande produção de γ -ciclodextrina e β -ciclodextrina. Na fase inicial da reação houve maior produção de γ -ciclodextrina e a quantidade de β -ciclodextrina foi aumentando com o passar do tempo de reação. O pH e a temperatura ótima para a produção de γ -ciclodextrina foram de 7,0-10,0 e 60°C, respectivamente. A adição de etanol aumentou a produção de γ -CD. Quando foi utilizado 4,4% de amido solúvel como substrato com 20% de etanol, a produção máxima de γ -CD foi cerca de 22% em comparação a 8% na ausência de etanol. Utilizando-se 1,8% de amido de batata e 20 % de etanol obtiveram a produção máxima de 25% de γ -CD.

BOVETTO et alii (1992) purificaram a CGTase de *Bacillus circulans* E192 utilizando fracionamento com sulfato de amônia, DEAE Trisacril M, Q Fast Flow e cromatografia de afinidade de β -CD-Sepharose 4B. Duas isoenzimas foram separadas por HPLC em coluna de Mono Q. Seus pontos isoelétricos foram estimados em 6,7-6,9 e representam 13 e 87% da atividade inicial, respectivamente. Os peso molecular, pH e temperatura ótima foram estimados em 78.000 daltons, 5,5 e 60°C, respectivamente. Os valores aparentes de $V_{\text{máx}}$ e K_m para o amido solúvel, foram 43 μmol de β -ciclodextrina /min/mg de proteína e 0,57% (v/v), respectivamente. Embora não apresentasse boa estabilidade térmica, essa desvantagem era parcialmente compensada com a adição de íons cálcio. A proporção de α , β e γ -ciclodextrinas no início da reação foi de 1:7:2 e no equilíbrio obtiveram 3:3:1 respectivamente.

MORI et alii (1994) purificaram a CGTase de *Brevibacterium* sp. 9065 em coluna cromatográfica de butil-Toyopearl 650M, γ -ciclodextrinas-Sepharose 4B e Toyopearl HWSS-S. O peso molecular da enzima foi estimado

em 75.000 daltons por SDS-PAGE. A temperatura e pH ótimos de atividade da enzima foram 45°C e 6-8, respectivamente. O ponto isoelétrico da enzima foi de pH 2,8. A enzima apresentou-se estável na faixa de pH entre 6-8 . Na parte inicial da reação houve uma maior produção de γ -ciclodextrina, com aumento gradual de β -ciclodextrina com o decorrer do tempo de reação. A enzima foi fortemente inibida por HgCl₂, CdCl₂, CuCl₂, AgNO₃ e ZnCl₂.

ABILAN et alii (1995) estudaram pela primeira vez a CGTase produzida por um *Bacillus* sp. halofílico. A enzima foi purificada utilizando Sephadex G-100 e o peso molecular foi estimado em 71.000 daltons. A CGTase apresentou atividade ótima na faixa de pH 5,0-9,5 e a 50 °C. O rendimento de ciclodextrinas, a partir de suspensão de 10% de amido, foi 27% e na presença de 1 % de tolueno e 1% de TCE foi obtido 52% de rendimento.

GOL & NENE (1995) isolaram uma linhagem de *B. firmus* que produz CGTase que atuava sobre o amido intacto. O meio de cultura para produção de CGTase era composto de 10g/l de amido solúvel, 5g/l de peptona, 5g/l de extrato de levedura, 1g/l de K₂HPO₄, 0,2 g/l de MgSO₄.7H₂O, 10 g/l de NaCO₃. Os autores testaram diferentes fontes de amido e observaram que a maior produção de ciclodextrinas foi obtida utilizando amido de mandioca, seguido de batata e milho. Os autores sugeriram que resultado estava relacionado com a estrutura do grão de amido. Cerca de 49% do amido de mandioca foi convertido para β -ciclodextrina (40%) e γ -ciclodextrina.

YAN & LIN (1995) estudaram a CGTase do *Bacillus* sp. 563 alcalofílico. A enzima foi purificada 64 vezes, com rendimento de 32%, através de fracionamento em sulfato de amônia, cromatografia em coluna de DEAE-

Sephadex A-50 e filtração em gel Sephacril S-300S. O peso molecular foi estimado em 170.000 daltons por filtração em gel e 82.000 SDS-PAGE indicando a presença de subunidades. A enzima apresentou ponto isoelétrico em pH 7,2 e atividade ótima em pH 7,0 e 65 °C. A CGTase mostrou-se estável na faixa de pH 7,0-11,0 e em temperaturas inferiores a 70 °C.

2.4- Aplicações das ciclodextrinas

SZEJTLI & SEBESTYIN (1979) estudaram o efeito toxicológico da β -ciclodextrina (CD) em ratos e cachorros. Com doses diárias maciças, que variaram de 200 a 600 mg/Kg, de peso corporal, verificaram que não houve mudanças clínicas e bioquímicas significativas. Os estudos patológicos e histopatológicos foram realizados após 6 meses de tratamento, mas também não foram observadas mudanças. A β -CD não teve qualquer efeito sobre os embriões e não apresentou atividade teratogênica. Testes cromossômicos foram realizados nos ratos após 6 meses de administração da β -CD e observaram que não ocorria nenhum tipo de aberração ou mutação devido ao consumo de β -CD. Os autores concluíram que somente uma quantidade β -CD pode ser absorvida, sem sofrer mudanças, no trato intestinal.

KONNO et alii (1981) estudaram maneiras alternativas para a retirada de compostos amargos de sucos de frutas cítricas. Os componentes que conferem sabor amargo são principalmente as naringinas e limoninas. Utilizando β -ciclodextrina (CD) a uma concentração de 0,3% (v/v) , o suco foi aquecido a 95°C por 10 minutos e em seguida, resfriado à temperatura ambiente. Os autores verificaram em teste de painel sensorial que até 0,1% (v/v) de β -CD era

suficiente para eliminar os compostos amargos e, à medida que aumentava a concentração de β -CD, diminuía ainda mais a sensação de amargor do suco.

SHAW et alii (1984) estudaram a aplicação de β -ciclodextrina (CD) para remoção de compostos amargos de sucos de laranja tais como naringina, limonina e homilina. Utilizando polímeros de β -CD juntamente com o suco (1g/50 ml de suco) em processo contínuo ou batelada, verificaram a diminuição de até 50% dos compostos amargos. Por outro lado, não houve significativa alteração nos níveis de ácido ascórbico, ácidos totais, mas apenas a redução dos níveis de óleo em até 40%. O polímero era regenerado com etanol e reutilizado.

SHAW et alii (1986) prepararam vários polímeros a partir de α -, β - e γ -CDs, utilizando agentes de ligação cruzada e compararam a capacidade de remover compostos amargos com os monômeros de CDs. Eles verificaram a remoção de naringina e limonina em suco de "grapefruit". Concluíram que os polímeros de CDs possuem cerca de 10 vezes a capacidade de formar complexos de inclusão com esses compostos amargos em relação aos monômeros.

2.5- Ciclodextrinas ramificadas

Segundo KAINUMA et alii (1978) a isoamilase de *Pseudomonas* (EC 3.2.1.68) hidrolisa as ligações glicosídicas α -1-6 da amilopectina, glicogênio, de várias dextrinas ramificadas e oligossacarídeos. A isoamilase de *Pseudomonas*, bem como a pululanase, são incapazes de clivar as cadeias curtas de D-glicosil dos sacarídeos ramificados. A isoamilase de *Pseudomonas* difere

da pululanase nas seguintes características: (1) a isoamilase de *Pseudomonas* atua preferencialmente sobre polissacarídeos de alto peso molecular. A maioria dos oligossacarídeos ramificados examinados foram hidrolisados numa velocidade menor, cerca de 10% ou menos, da velocidade de hidrólise da amilopectina, (2) ramificações de maltosil são hidrolisadas muito lentamente pela isoamilase de *Pseudomonas* em comparação com as ramificações de maltotriosil, e (3) a isoamilase de *Pseudomonas* requer um mínimo de três resíduos de glicose na cadeia B ou C.

ABE et alii (1984), demonstraram que derivados da ciclomaltoose têm uma D-glicose ou uma ramificação α -1,4-D-glucana ligada à estrutura cíclica principal através de uma ligação α -1-6. Eles obtiveram uma mistura destas glicosilciclomaltoses a partir do tratamento com glicoamilase, para hidrolisar dextrina não-cíclicas, oligossacarídeos, e para encurtar as ramificações das ciclomaltoses ramificadas. O material remanescente foi submetido a cromatografia em coluna com Sephadex G-15 para remoção das dextrinas cíclicas e ciclomaltoheptaose (cG_7). As ciclomaltohexaose (cG_6) foram então separadas das ciclomaltoses ramificadas através da cromatografia com Toyopearl HW-40S. A glicosil- β -ciclodextrina (GcG_7) foi hidrolisada com amilo-1,6 glicosidase e os produtos finais foram D-glicose e cG_7 na proporção molar 1:1,01 analisados por CLAE. A solubilidade da GcG_7 é maior que a cG_7 (18,5 mg/ml à temperatura ambiente) e a solução concentrada de GcG_7 (150 mg/ml) não produziu cristais a 0 °C.

KOIZUI & UTAMURA (1986) separaram três ciclodextrinas ramificadas através de CLAE, a partir de meios de fermentação em grande escala, de ciclodextrinas não-ramificadas pela ação da CGTase de *Bacillus ohbensis*.

Diferentes métodos de separação como: espectroscopia em ressonância magnética nuclear C-13, análise de fragmentos, análise de metilação e espectrometria de massa indicaram que estes compostos eram 6-o- α -D-glicopiranosilciclomatohexaose, 6-o- α -D-glicopiranosilciclomaltoheptaose e 6,6'-di-o- α -D-glicopiranosilciclomaltoheptaose. O terceiro composto apresentava duas D-glicoses ramificadas na molécula.

ABE et alii (1986) relataram que ciclodextrinas ramificadas foram isoladas a partir de xarope de amido preparado com CGTase. Contudo este processo era de baixo rendimento, e um novo método para síntese de ciclodextrinas ramificadas, através da reação reversa da isoamilase de *Pseudomonas* com ciclodextrinas, maltose e maltotriose foi apresentado. A mistura da reação (80 ml) foi incubada a 45°C com G3 (40,3 g), cG₇ (7,3g) e isoamilase (694 U) em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 3,5) por 48 horas e aquecida por 15 minutos a 100°C para inativar a enzima. As ciclodextrinas ramificadas foram purificadas através da centrifugação, cromatografia líquida e cromatografia em colunas de Sephadex G-15 e Bio-gel P2. Outras ciclodextrinas ramificadas foram preparadas por processos semelhantes. A velocidade da reação foi maior com a maltotriose do que com a maltose havendo um aumento na cadeia das ciclodextrinas (cG₆ < cG₇ < cG₈). A estrutura das ciclodextrinas foi determinada através de análise química, enzimática e espectrometria de ressonância magnética nuclear.

KITAHATA et alii (1987) afirmaram que ciclomalto-oligossacarídeos ramificados são formados quando a pululanase de *Bacillus acidopullulyticus* é incubada com fluoreto de α -maltosil (α -G₂F), como substrato, na presença de ciclomalto-oligossacarídeos como acceptor. As estruturas destas ciclodextrinas

ramificadas são 6-o- α -maltosilciclomaltohexaose (G_2 -c G_6), 6,6-di-o- α -maltosilciclomaltohexaose [$(G_2)_2$ -c G_6], 6-o- α -maltosilcicloheptaose (G_2 -c G_7), 6,6'-di-o- α -maltosilciclomaltoheptaose [$(G_2)_2$ -c G_7], e 6,6',6''-tri-o- α -maltosilciclomaltoheptaose [$(G_2)_3$ -c G_7]. A formação ótima de 12 mM de G_2 -c G_6 foi obtida utilizando-se 2,8 u/ml de pululanase, 40 mM de α - G_2 F como substrato e 90 mM de ciclomaltosilhexaose (c G_6) como aceptor, por 1 hora a 60°C. O rendimento da G_2 -c G_6 , como principal produto de transferência, foi de vinte vezes ao da condensação de c G_6 com alfa-maltose na presença de pululanase.

KOIZUMI et alii (1987) estudaram a habilidade de três glicosil-ciclodextrinas (CDs): 6-o- α -D-glicosil- α -CD (G- α -CD), 6-o- α -D-glicosil- β -CD (G- β -CD) e 6,6-di-o- α -D-glicosil- β -CD (2G- β -CD) para formação de complexos de inclusão com drogas levemente solúveis ou insolúveis em água e no estado sólido, através do método da solubilidade, espectroscopia em ultravioleta e método colorimétrico diferencial. Estas glicosil-CDs eram capazes de formar complexos de inclusão com compostos que podem formar complexos com ciclodextrinas não-ramificadas. O aumento na solubilidade de drogas pouco solúveis em água, pela utilização das glicosil- β -CDs, foi muito mais significativa do que com a β -CD. A atividade hemolítica da glicosil-CD foi menor em relação a cada ciclodextrina não ramificada. O complexo estriol-glicosil- β -CD pode ser praticamente aplicável em preparações injetáveis devido a sua alta solubilidade em água e baixa atividade hemolítica.

ABE & HIZUKURI (1988) identificaram dois e três derivados da ciclomaltoheptaose (β -ciclodextrina) entre os produtos de ação da isoamilase de *Pseudomonas* usando maltose e maltotriose, respectivamente. Foram

identificados os produtos 6^A,6^D-di-o- α -maltosil-cG₇ e 6-o- α -(6²-o- α -maltosil) maltosil-cG₇ e 6^A,6^D-di-o- α -maltotriosil e 6-O- α -(6³-O - α -maltotriosil)maltotriosil-cG₇, e 6-O- α -(6²-O- α -maltotriosil)maltotriosil-cG₇. A temperatura e pH ótimos, para a reação de condensação, com a isoamilase, foram de 60°C pH 4,2. As concentrações ótimas de G₃ e cG₇, para a reação, foram de 1,6 M e 65 mM, respectivamente. Concentrações maiores de maltotriose causaram um rápido decréscimo no rendimento. A produção de ciclodextrina ramificada ocorreu rapidamente durante as primeiras 24 horas e depois tornou-se lenta, atingindo aparentemente o equilíbrio em 36 horas.

OKADA et alii (1988) sintetizaram maltosil (G₂) e maltotriosil (G₃) ciclodextrinas a partir da maltose ou maltotriose e α -, β -,ou γ -CDs com isoamilase de *Pseudomonas* ou pululanase de *Klebsiella aerogenes*. As ciclodextrinas ramificadas foram purificadas através da cromatografia líquida de alta eficiência. Os autores estudaram a solubilidade das ciclodextrinas ramificadas em água e em várias concentrações de metanol em água, rotação ótica e a atividade hemolítica. As ciclodextrinas ramificadas maltosil (G₂) e maltotriosil (G₃) bem como a glicosil (G₁)-CDs foram muito mais solúveis do que as ciclodextrinas não ramificadas tanto em água como em solução aquosa de metanol. As atividades hemolíticas das ciclodextrinas ramificadas diminuíram com o aumento no comprimento da cadeia: CD>G₁-CD>G₂-CD>G₃-CD. Os autores estudaram a inclusão de CDs ramificadas com drogas levemente solúveis ou insolúveis em solução aquosa e no estado sólido. A habilidade de complexação da G₁-, G₂-, G₃-CD e suas ciclodextrinas não ramificadas em série parecem ser quase a mesma, e a estabilidade dos complexos em água foram praticamente inalterados pelo comprimento da cadeia lateral. Contudo, o aumento na solubilidade das drogas pouco solúveis

em água pelas ciclodextrinas ramificadas, foi muito mais marcante do que pelas ciclodextrinas não ramificadas.

HIZUKURI et alii (1989a) pesquisaram as condições ótimas para a reação de condensação da pululanase de *Klebsiella aerogenes* utilizando maltose e ciclomaltooctaose (G-ciclodextrina, cG₈) como substratos. A concentração ótima de maltose para a formação de 6-o- α -maltosil-cG₈ em 0,3, 0,4 e 0,5M de cG₈ foram de 2,0, 1,8 e 1,2 M respectivamente, com 21,6 U de pululanase, para um volume final de 1 ml, em tampão acetato de sódio 10 mM, pH 6,0 e 55 °C por 24 horas, tendo sido observado um decréscimo da concentração de maltose com o aumento da concentração de cG₈. Os produtos 6-o- α -maltosil-cG₈ e o novo composto, 6,6-di-o- α -maltosil-cG₈, foram identificados pela análise enzimática, NMR ¹³C e espectrometria de massa. Através da condensação de duas maltoses, a 6¹-o- α -maltosil-maltose e 6²-o- α -maltosil-maltose foram produzidas na proporção de aproximadamente 1:15. A reação de condensação foi investigada em termos do tamanho das ciclomaltaoses (ciclodextrinas, cG_n) e oligossacarídeos, tendo sido descoberto que as cG_n eram melhores substratos na seguinte ordem: cG₈>cG₆>cG₇ e que a maltose e maltotriose foram igualmente efetivas com cG₇ e cG₈, porém a maltose foi bem menos efetiva que a maltotriose com a cG₆. A especificidade deste substrato na reação de condensação difere da isoamilase de *Pseudomonas*.

HIZUKURI et alii (1989b) estudaram a ação da isoamilase de *Pseudomonas* nas ciclomaltohexaoses ramificadas (α -ciclodextrinas, cG_{6s}) com cadeias laterais de vários comprimentos, bem como a reação de condensação reversa entre malto-oligossacarídeos (G₂-G₇) e cG₆. As velocidades de reação para liberação e ligação da maltotriose, foram máximas

em ambas as reações de hidrólise e condensação e a atividade diminuiu com o aumento no comprimento da cadeia lateral. A mistura da reação consistiu de 275 mM de cG₆, 605mM de oligossacarídeos e 8,2 U/ml de isoamilase em tampão acetato 50mM, pH 4,2 , incubados por 48 horas a 58°C. Neste experimento, a maltose e maltotriose, foram os substratos menos e mais efetivos, respectivamente. A maltotetraose foi menos efectiva que a maltotriose como substrato; e em relação aos malto-oligossacarídeos de maior peso molecular a enzima apresentou uma atividade inferior a metade da atividade da maltotetraose. As cG₆s ramificadas foram caracterizadas por intermédio de análises enzimáticas, ¹³C-NMR e espectrometria de massa. As ciclodextrinas ramificadas G₃-, G₄- e G₅-cG₆ em soluções diluídas foram hidrolisadas pela isoamilase em quantidades equimoleculares de seus respectivos malto-oligossacarídeos e cG₆. Maltosil a maltopentaosil- α -ciclodextrina (G₂ a G₅-cG₆) produziram 1-4 mol/mol de glicose com glicoamilase e uma quantidade equimolecular de G-cG₆, respectivamente. A atividade hemolítica da cG₆ em eritrócitos humanos, que é intermediária entre a cG₇ e cG₈, foi consideravelmente reduzida quando ligada a cadeias laterais longas.

SHIRAISHI et alii (1989b) sintetizaram maltosil (α -1-6) α -, β - ou γ -ciclodextrinas a partir da maltose e α -, β - ou γ -ciclodextrina, respectivamente, utilizando pululanase de *Bacillus acidopullulyticus* (EC 3.2.1.41). Mais que 40% de cada substrato da CD foi convertido a sua correspondente maltosil (α -1-6) ciclodextrinas sob as seguintes condições: a concentração combinada de maltose e CD foi de 70-75 % (p/v), a proporção molar de maltose para CD foi de 9:18 e a quantidade de pululanase foi de 100-200 unidades/g de CD. A formação de maltosil-CDs foi ótima na faixa de pH 4,0-4,5 e 60-70 °C. Cada maltosil CD produzida foi separada dos sacarídeos não cíclicos e da maltose e

tetraose ramificadas através da precipitação com metanol e etanol. As maltosil CDs foram posteriormente, purificadas por filtração em gel em coluna de Toyopear HW 40 °C e cristalização da solução aquosa de maltosil (α -1,6) α -CD ou solução metanólica de maltosil (α -1,6) β -CD. A partir de cada 10 gramas da ciclodextrina correspondente, a produção de maltosil α -, β - ou γ -CDs foi 3,0-3,6g, 2,5-2,8g e 2,2-2,5g, respectivamente. A identificação das maltosil ciclodextrinas foi feita através da hidrólise com pululanase de *Klebsiella pneumoniae*, análise de metilação e análise com ^{13}C -NMR.

HISAMATSU & YAMADA (1989) imobilizaram a pululanase termoestável de *Bacillus acidopullulyticus* em quitina (PDAC-35), parcialmente diacetilada com gliceraldeído. A enzima imobilizada mostrou ser capaz de produzir maltosil β -CD através da ação reversa de uma mistura de reação contendo alta concentração de maltose (75 g/85 ml) e β -CD (10 g/85 ml). Um sistema de biorreator contendo a enzima imobilizada poderia produzir ciclodextrina ramificada mais eficientemente que a enzima nativa. A mistura de reação foi aplicada em uma coluna de carvão, para remoção de grandes quantidades de maltose, e as ciclodextrinas adsorvidas na coluna foram eluídas com solução de etanol. As β -CD, maltosil- β -o-CD e dimaltosil β -CD foram separadas através das colunas ODS ou GPS.

KOIZUMI et alii (1991a) prepararam uma mistura de maltosilciclomaltoheptaose (maltosil- β -ciclodextrina, G_2 - β -CDs) a partir da maltose e β -CD, através da ação reversa da pululanase de *Klebsiella pneumoniae*. Três isômeros de posição da dimaltosil- β -CD na mistura foram separados através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em coluna de fase reversa e em coluna de carbono grafitizado. Seus pesos

moleculares foram determinados através da espectrometria de massa e a estrutura foi estabelecida através das análises de metilação, ressonância magnética nuclear ^{13}C e hidrólise com glicoamilase a compostos conhecidos.

KOIZUMI et alii (1991b) pesquisaram também o comportamento cromatográfico de vários mono e dissacarídeos e ciclomaltoses em coluna de carbono grafitizado. Ciclomaltohexaose (α -CD), ciclomaltoheptaose (β -CD), ciclomaltooctaose (γ -CD) e seus derivados glicosil foram analisados através da utilização de 13-15% de solução aquosa de acetonitrila como eluente. Os autores observaram que os tempos de retenção dos compostos aumentaram com o aumento da temperatura e que a largura dos picos também diminuíram melhorando a separação.

MURAMATSU et alii (1993) estudaram algumas características cinéticas, bem como a ação da α -amilase maltogênica de *T. viridis* (TVA) em várias ciclodextrinas para aplicação na produção de CDs ramificadas. A TVA clivou primeiro o anel de maltosil- β -CD, e os monossacarídeos ramificados formados foram imediatamente decompostos para formação de hexa e pentassacarídeos, com produção simultânea de sacarídeos menores não ramificados. Em uma ação menor, a enzima liberou uma molécula de glicose a partir da cadeia lateral de maltosil- β -CD para produzir glicosil- β -CD, que foi prontamente hidrolisada em sacarídeos menores. A enzima apresentou habilidade para hidrolisar preferencialmente, ciclodextrinas não ramificadas na presença de quantidades significativas de ciclodextrinas ramificadas. Estas características da enzima são consistentes com seu uso potencial na indústria para produção de ciclodextrinas ramificadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Isolamento de microrganismos alcalofílicos produtores de CGTase

3.1.1- Isolamento de microrganismos

Para o isolamento dos microrganismos produtores de CGTase foram analisadas 600 amostras de solo de cultivo de mandioca, milho, feijão, batata e de matas virgens de diversos locais do Brasil.

As amostras (0,5g) foram adicionadas em tubos contendo 10 ml de água destilada esterilizada e 0,1 ml da diluição foi inoculada superficialmente com alça de níquel-cromo em placas contendo o meio de cultura meio 1 (PARK et alii 1989). As placas foram incubadas a 37°C por até 4 dias. As colônias com halo amarelo, supostamente CGTase positivas, foram inoculadas em tubos inclinados de meio 2 contendo 1,5 % de agar (NAKAMURA % HORIKOSHI, 1976a) a 37 °C, e posteriormente armazenadas em geladeira (4 °C). A composição dos meios de cultura está apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura para isolamento de microrganismos alcalofílicos e produção de CGTase

	meio 1 ref. 34	meio 2 ref. 28	meio 3 ref. 27	meio 4 ref. 30	meio 5 ref. 27	meio 6 ref. 28
amido solúvel	1 %	1 %	1 %	1 %	2 %	1 %
peptona	0,5 %	0,5 %			0,5 %	0,5 %
extrato de levedura	0,5 %	0,5 %		0,2 %	0,5 %	0,5 %
extrato de carne				0,5 %		
*AMM			5 %			
polipeptona				1 %		
NaCl				0,2 %		
K ₂ HPO ₄	0,1 %	0,1 %	0,1 %		0,1 %	0,1 %
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,02 %	0,02 %	0,02 %		0,02 %	0,02 %
Na ₂ CO ₃	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	
fenolftaleína	0,03 %					
alaranjado de metila	0,01%					
agar	1,5 %					
pH	10,5	10,5	9,0	10,4	10,4	7,5

*AMM-água de maceração de milho

3.1.2- Seleção de microrganismos produtores de CGTase

Os microrganismos isolados no item 3.1.1. foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 50 ml contendo 20 ml do meio 2 durante 48 horas, a 37 °C, sob agitação (150 rpm). Em seguida, o meio fermentado foi centrifugado (10.000 x g por 10 minutos a 4 °C) em centrífuga Beckman J-

21B, e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade da CGTase.

3.2 - Métodos de determinação da atividade da CGTase

A atividade enzimática da CGTase foi determinada pelos métodos de ciclodextrina-TCE (CD-TCE), descrito por NOMOTO et alii (1984), e pela medida da atividade dextrinizante da enzima, descrito por FUWA (1954) modificado por SABIONI & PARK (1992).

A determinação da proporção de ciclodextrinas (α , β e γ) foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), baseada no método de SATO et alii (1985). Os métodos estão descritos a seguir.

3.2.1- Determinação da atividade da CGTase pelo método de Ciclodextrina-Tricloroetileno (CD-TCE)

O método baseia-se na precipitação de ciclodextrina pelo tricloroetileno. A enzima bruta em solução foi diluída com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, de modo a obter fatores de diluição de 2^1 , 2^2 , 2^3 , 2^4 , ..., 2^9 . Um mililitro (1 ml) da solução de enzima diluída foi adicionado a 5 ml de amido solúvel 2%, preparado com o mesmo tampão, e a mistura incubada a 65 °C por 24 horas. Após a incubação, adicionou-se 2,5 ml de tricloroetileno (TCE) à mistura, os tubos foram submetidos a forte agitação, seguido de repouso por 12 horas em temperatura ambiente. A formação de precipitado do complexo CD-TCE nos tubos de ensaio

determina a atividade da enzima CGTase. O último fator de diluição com precipitação representa o limite de diluição da atividade de CGTase ainda capaz de formar CDs em quantidade suficiente para precipitar. Sob estas condições, a atividade de formação de ciclodextrinas pode ser expressa pelo limite do fator de diluição (2^n).

3.2.2- Determinação da atividade da CGTase pelo método da atividade dextrinizante

Foi adicionado 0,1 ml da solução de enzima convenientemente diluída (5U/ml) em 0,2ml de amido solúvel 0,2% (p/v), ambos preparados em tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0. Após incubação a 65 °C por 10 minutos, a reação foi paralisada com a adição de 4 ml de HCl 0,2M. Em seguida, foi adicionado 0,5 ml de reagente de iodo (0,2% de KI e 0,02% de I_2) e a solução foi completada para 10 ml com água destilada. A absorbância foi determinada a 700 nm em espectrofotômetro Beckman DU-70. No controle, a enzima foi adicionada após a adição do HCl.

Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir em 10% por minuto a intensidade da cor azul do complexo iodo-amido (FUWA, 1954, modificado por SABIONI & PARK, 1992).

O número de unidades da enzima por mililitro da solução (U/ml), foi calculado pela seguinte equação:

$$U/ml = \frac{A_0 - A}{A} \times 100 \div 10$$

A₀=Absorbância do tubo controle (enzima inativa)

A=Absorbância do tubo teste (enzima ativa)

3.2.3- Determinação da atividade de CGTase pela quantificação de ciclodextrinas por CLAE

A mistura de 0,1ml da solução de enzima bruta (300U/ml) e 0,9 ml de suspensão de amido solúvel a 2% (p/v) em tampão Tris-HCl 50mM (pH 8,0) foi incubada a 65 °C por 1 hora, e a reação paralisada com 0,1 ml de HCl 0,5N. Em seguida, a mistura foi filtrada em membrana Millipore HA (poros com 0,45 µm) e analisada em cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo CG 480C (coluna YMC-Pack Polymine II a 30 °C; fase móvel: mistura de acetonitrila:água na proporção 65:35; velocidade do fluxo: 1ml/min), acoplado a um detector refratométrico diferencial CG-410 (temperatura do detector: 30° C). A identificação dos tipos de ciclodextrina foi realizada por comparação direta do tempo de retenção (t_R) com os padrões de α-, β- e γ-ciclodextrina (Sigma).

3.3- Estudo taxonômico dos microrganismos isolados

3.3.1- Estudo morfológico, bioquímico e fisiológico dos microrganismos selecionados

Os microrganismos isolados que apresentaram alta atividade de CGTase, determinada de acordo com o item 3.2.2 e/ou produção de maior quantidade de α -, β - e γ -ciclodextrinas, como descrito no item 3.2.3, foram submetidos a estudo morfológico, bioquímico e fisiológico para classificação taxonômica.

Considerando que os microrganismos eram alcalofílicos, os meios de cultura descritos por SNEATH (1986) foram modificados com a adição de 1% (p/v) Na_2CO_3 (pH 10,4), para que a leitura da prova não fosse alterada pelo pH alcalino.

3.3.2- Determinação de menaquinona dos microrganismos selecionados

Para a identificação das linhagens de *Bacillus* a nível de espécie foi estudado o tipo de menaquinona produzido. Os microrganismos foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml de meio líquido 2 (Tabela 1) e incubados sob agitação a 37 °C, por 48 horas a 180 rpm. Após a incubação os meios de cultura foram centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos a 5 °C. Os sobrenadantes dos meios de cultura foram descartados e as massas celulares foram lavadas seis vezes com água destilada e liofilizadas para determinação de menaquinona. A extração da

menaquinona foi realizada conforme método descrito por KOMAGATA (1987). Pesou-se 300 mg da massa celular liofilizada e adicionou-se 30 ml de uma mistura composta de metanol:cloroformio 1:1 (v/v). As amostras foram incubadas a 35 °C em agitador recíproco com 100 oscilações por minuto por uma noite para a extração de menaquinonas. Em seguida, a solução foi filtrada em papel de filtro Whatman nº 2. A solução filtrada foi concentrada em evaporador rotatório a 40°C até obtenção de volume final de 3 ml. Em seguida a amostra foi concentrada até um volume final aproximado de 300 µl utilizando-se gás nitrogênio. As amostras foram armazenadas em freezer. Após a extração a amostra foi aplicada em placas de cromatografia de camada delgada (Merck-gel 60 F254, 20x20 cm). A cromatografia foi desenvolvida com benzeno por 40 minutos e visualizada sob luz UV a 254 nm. A menaquinona foi identificada comparando-se o Rf com o padrão de vitamina K. A região correspondente à menaquinona foi raspada e suspensa em acetona. Após a evaporação do solvente, a amostra foi aplicada em placa de cromatografia de camada delgada (Merck HPTLC RP-18F254, 10x10 cm), desenvolvida em sistema de solvente composto de acetona-água (99:1, v/v) por 15 minutos e visualizada sob luz UV a 254 nm (COLLINS & JONES, 1981).

3.4- Produção de CGTase pela linhagem de *Bacillus* sp. nº 324 em diferentes meios de cultura

Para o estudo da produção de CGTase pela linhagem de *Bacillus* sp. nº 324, foram testados os meios de cultura 3, 4, 5 e 6 descritos na Tabela 1. Os frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio de

cultura previamente esterilizados, foram inoculados com 1ml da suspensão homogênea, em água destilada, da cultura de 24 horas do *Bacillus* sp. 324 em tubos inclinados de meio 2 contendo 1,5 % de agar (Tabela 1) e incubados em agitador rotatório a 200 rpm a 37 °C. Foram retiradas amostras a cada 24 horas até completar 72 horas de fermentação. As amostras foram centrifugadas a 10.000 x g durante 10 minutos a 5°C e a atividade de CGTase no sobrenadante determinada como descrito no item 3.2.1.

3.5- Otimização do meio de cultura para produção de CGTase

Para o estudo da otimização do meio de cultura para produção de CGTase utilizou-se o meio 3 (Tabela 1) selecionado de acordo com o item anterior variando-se as concentrações de amido, água de maceração de milho (AMM) e Na₂CO₃, conforme ilustra a Tabela 2 e mantendo-se as concentrações de K₂HPO₄ e MgSO₄.7H₂O como demonstra a Tabela 1.

Os frascos Erlenmeyer de 250 ml, contendo 50 ml dos diferentes meios de cultura, citados na Tabela 2, foram esterilizados e inoculados com 1ml da suspensão homogênea, em água destilada, da cultura de 24 horas do microrganismo em tubos inclinados de meio 2, contendo 1,5 % de agar. Em seguida os Erlenmeyers foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm a 37 °C. Após 24 horas de fermentação as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g durante 10 minutos a 5 °C e a atividade de CGTase no sobrenadante determinada como descrito no item 3.2.1.

Tabela 2. Otimização do meio cultura para produção de CGTase.

	Meio de Cultura						
	meio 3	meio 7	meio 8	meio 9	meio 10	meio 11	meio 12
Amido Solúvel	1 %	2 %	2 %	1%	1%	1%	1%
AMM*	5 %	5 %	5 %	5%	5%	3%	7%
Na ₂ CO ₃	1 %	1 %	0,5 %	0,5%	1,5%	1%	1%

*AMM- água de maceração de milho

3.6- Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento celular e produção de CGTase pela linhagem de *Bacillus firmus* n° 324 a 35° e 40 °C

Para o estudo dos parâmetros cinéticos da fermentação foi utilizado o meio 3 contendo 1 % (p/v) de amido solúvel, 5 % (p/v) de AMM (p/v), 1 % (p/v) de Na₂CO₃, 0,1 % (p/v) de K₂HPO₄, 0,02 % (p/v) de MgSO₄.7H₂O em pH 9,0 e a linhagem de *Bacillus* sp. n° 324.

3.6.1- Preparação do inóculo

Para a preparação do inóculo, 100 ml do meio de cultura meio 3, selecionado no item 3.1.2, contido em frasco Erlenmeyer de 250 ml foi

inoculado com a linhagem *Bacillus* sp. n° 324 e incubado a 35 °C e a 40 °C em agitador rotatório a 200 rpm por 24 horas.

3.6.2- Fermentação

A fermentação foi realizada em mini-fermentador de 2l. Adicionou-se, assepticamente, 100 ml de inóculo preparado de acordo com o item 3.6.1 e 2 ml de óleo de soja estéril, como antiespumante, ao frasco de cultura contendo 900 ml de meio 3 previamente esterilizado. A fermentação foi realizada a 35° e a 40°C, mantendo-se a aeração de 1vvm (volume/volume/minuto) e agitação constante. Foram retiradas amostras em intervalos de tempo variados, para a determinação dos seguintes parâmetros: crescimento do microrganismo de acordo com o no item 3.6.3. e atividade enzimática de acordo com o descrito no item 3.2.3.

3.6.3- Determinação do crescimento microbiano

O crescimento do microrganismo foi determinado espectrofotometricamente pela leitura da absorbância a 660 nm. Amostras de 10 ml do meio de cultura foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos a 5 °C. O sobrenadante foi armazenado a 10 °C e a massa celular submetida a três lavagens sucessivas com 10 ml de água destilada. A leitura da absorbância das amostras foi realizada contra água destilada a 660 nm.

3.7- Produção e purificação de CGTase

3.7.1- Obtenção da enzima bruta

A linhagem de *Bacillus* sp. nº 324 foi cultivada em frasco Erlenmeyer contendo 100 ml do meio 3 por 15 horas a 40 °C, sob agitação de 200 rpm. Esse inóculo foi transferido para fermentador New Brunswick Scientific, modelo Biofilo II, contendo 1250 ml de meio 3 e incubados por 24 horas a 40 °C, sob aeração de 1 vvm (volume/volume/minuto), para obtenção da enzima bruta.

3.7.2- Concentração da CGTase por ultrafiltração em membrana

O meio fermentado obtido no item 3.7.1 foi centrifugado a 11.000 x g, por 10 minutos a 4 °C. A massa celular foi descartada. O sobrenadante (1300 ml) foi concentrado através de ultrafiltração em Micro-Thin Channel Ultrafiltration System - modelo TCF2A (Amicon Co.), em membrana de 30.000 Da., até obter um volume de 200 ml, o qual foi dializado contra água deionizada por 48 horas a 5 °C, e posteriormente, contra tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0 a 5 °C por 24 horas.

3.7.3- Cromatografia da CGTase em coluna de DEAE - Sephadex A-50

Primeiramente, a resina DEAE-Sephadex A-50 foi equilibrada em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0 e empacotada em coluna de 100 cm de

comprimento e 2,5 cm de diâmetro. Uma alíquota de 70 ml de solução enzimática de CGTase, obtida no item 3.7.2, foi aplicada na coluna. A amostra foi eluída da coluna pela aplicação de 300 ml de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 e quantidades de 50 ml de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 contendo concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; e 0,6 M de NaCl, consecutivamente. Frações de 5 ml foram coletadas em coletor de frações Foxy 200 a cada 30 minutos. O curso de eluição das proteínas foi acompanhado pela medida de absorbância a 280 nm. A atividade enzimática das frações foi determinada de acordo com o descrito no item 3.2.2.

3.7.4- Cromatografia da CGTase em coluna de DEAE - Sepharose CL-6B

A resina DEAE-Sepharose CL-6B foi equilibrada em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 e empacotada em coluna de 40 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro. Uma alíquota de 50 ml de solução enzimática de CGTase obtida no item 3.7.3, foi aplicada na coluna. A amostra foi eluída da coluna pela aplicação de 50 ml de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0, e quantidades de 150 ml de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 contendo concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; e 0,6 M de NaCl, consecutivamente. Frações de 5 ml foram coletadas em coletor de frações Foxy 200 a cada 30 minutos. O curso de eluição das proteínas foi acompanhado pela medida de absorbância a 280 nm. A atividade enzimática das frações foi determinada de acordo com o apresentado no item 3.2.2.

3.7.5- Obtenção da enzima purificada

As frações obtidas nos itens anteriores (3.7.3 e 3.7.4), que continham maior atividade enzimática, foram reunidas e submetidas à diálise contra água deionizada por 24 horas a 5 °C, sendo em seguida equilibrada em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0. Esta solução enzimática foi utilizada posteriormente para caracterização da enzima CGTase.

A determinação de proteína foi realizada pelo método colorimétrico de LOWRY et alii (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

3.8- Caracterização bioquímica da CGTase purificada

A atividade da enzima purificada foi acompanhada pela atividade dextrinizante (SABIONI & PARK, 1992) e pela formação de ciclodextrinas através do método de SATO et alii (1985). Para o estudo das características bioquímicas da CGTase avaliada pela atividade dextrinizante e pela atividade de formação das ciclodextrinas utilizou-se solução CGTase purificada contendo 5 U/ml e 300 U/ml de atividade dextrinizante, respectivamente.

3.8.1- Efeito do pH na atividade da CGTase

O efeito do pH na atividade dextrinizante e na formação de ciclodextrinas pela CGTase foi estudado na faixa de pH de 3,0 a 10,5. Foram utilizados os sistemas - tampão acetato pH 3,6 a 5,5 , fosfato pH 6,0 a 7,0, Tris-HCl pH 7,5 a 8,5, borato-ácido bórico pH 9,0 e borato-NaOH pH 9,5 a 11,0 na concentração 0,05 M.

Para o estudo da determinação do pH ótimo de atividade dextrinizante, alíquotas de 100 µl de uma solução de CGTase purificada (5 U/ml) foram adicionadas em tubos de ensaio com rosca contendo 0,3 ml de solução 0,2 % amido solúvel preparados em tampão 50 mM de diferentes pH, incubados a 65 °C por 10 minutos. A atividade foi determinada de acordo com o item 3.2.2.

Para a determinação do pH ótimo de formação de ciclodextrina alíquotas de 100 µl de uma solução de CGTase purificada (300 U/ml) foram adicionadas em tubos Eppendorf contendo 0,9 ml de solução 2% amido solúvel preparados em tampão 50 mM de diferentes pH. Os tubos foram incubados a 65 °C por 60 minutos e a reação foi paralizada com 0,1 ml de HCl 0,5 N. A atividade foi determinada de acordo com o descrito no item 3.2.3.

3.8.2- Efeito do pH na estabilidade da CGTase

O efeito do pH na estabilidade da atividade dextrinizante e na formação de ciclodextrinas pela CGTase foi estudado na faixa de pH 3,0 a

11,0. Aliquotas da enzima CGTase (5 U/ml de atividade dextrinizante ou 300 U/ml de CGTase purificada) diluídas em tampões 50 mM de diferentes valores de pH foram adicionados em tubos de ensaio com rosca e pré-incubadas a 30°C por 60 minutos.

Para o estudo do efeito do pH de estabilidade da atividade dextrinizante, alíquotas de 100 µl de enzima pré-incubada em diferentes pH foram transferidas para tubos de ensaio contendo 300 µl de solução 0,2 % de amido solúvel em tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0. A atividade enzimática residual foi determinada de acordo com o item 3.2.2.

Para o estudo do efeito do pH de estabilidade na formação de ciclodextrina, alíquotas de 100 µl de enzima pré-incubada em diferentes pH foram transferidas para tubos de Eppendorf contendo 900 µl de solução 2 % de amido solúvel com tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0. A atividade enzimática residual de CGTase foi determinada de acordo com o descrito no item 3.2.3.

3.8.3- Efeito da temperatura na atividade da CGTase

Para a determinação da temperatura ótima na atividade dextrinizante, alíquotas de 100 µl da solução da CGTase purificada (5 U/ml) foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 0,3 ml de solução 0,2 % de amido solúvel preparado em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0). Os tubos de ensaio foram incubados nas temperaturas de 45, 50, 55, 60, 65 e 70 °C por 10 minutos. A atividade enzimática residual foi determinada de acordo com o item 3.2.2.

Para a determinação da temperatura ótima de formação de ciclodextrina, alíquotas de 100 µl de solução de CGTase purificada (300 U/ml) foram adicionadas em tubos contendo 900 µl de solução 2 % de amido solúvel em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) e os tubos foram incubados nas temperaturas de 45, 50, 55, 60, 65 e 70 °C por 60 minutos. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o descrito no item 3.2.3.

3.8.4- Efeito da temperatura na estabilidade da CGTase

Para o estudo da estabilidade térmica de CGTase, baseado na atividade dextrinizante, a mistura de 50 µl de CGTase purificada (10 U/ml) e 50 µl de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, foi pré-incubada, em tubos de microcentrífuga, em diferentes temperaturas (45, 50, 55, 60, 65 e 70 °C) por 30 minutos. Após incubação os tubos foram transferidos para banho de gelo. A atividade dextrinizante residual foi determinada adicionando-se 300 µl de solução 0,2 % de amido solúvel em tampão Tris-HCl 0,5 mM pH 8,0, aos tubos contendo a enzima pré incubada a diferentes temperaturas. A atividade enzimática residual da CGTase foi determinada de acordo com o descrito no item 3.2.2.

Para o estudo de estabilidade térmica da CGTase, baseado na formação de ciclodextrina, a mistura contendo 50 µl de CGTase purificada e 50 µl de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 foi pré-incubada em tubos de microcentrífuga em diferentes temperaturas (45, 50, 55, 60, 65 e 70 °C) por 30 minutos. Após incubação os tubos foram transferidos para banho de gelo. A atividade residual de formação de ciclodextrinas foi determinada

adicionando-se 900 µl de solução 2 % de amido solúvel em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o descrito no item 3.2.3.

3.8.5- Efeito da presença de sais minerais na atividade da CGTase

O efeito dos íons sais minerais HgCl₂, KCl, MgSO₄, CoCl₂, MnSO₄, CuSO₄, FeSO₄ e CaCl₂ na atividade enzimática da CGTase purificada (5 U/ml) foi testado utilizando-se diferentes concentrações finais desses sais minerais (1 e 10 mM). Para a determinação da influência dos sais minerais na atividade dextrinizante alíquotas de 100 µl da solução da CGTase purificada (5 U/ml) foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 300 µl de solução 0,2 % de amido solúvel preparado em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0, contendo 1 ou 10 mM de sal mineral. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o descrito no item 3.2.2. Para o estudo da presença de sais minerais na atividade de formação de ciclodextrina alíquotas de 100 µl de solução de CGTase purificada (300 U/ml) foram adicionadas em tubos contendo 900 µl de solução 2 % de amido solúvel em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0, contendo 1 mM ou 10 mM de sal mineral. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o descrito no item 3.2.3.

3.8.6- Efeito da presença de inibidores na atividade da CGTase

O efeito de substâncias químicas inibidoras (ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), bissulfito de sódio, L-cisteína, azida de sódio, β -mercaptoetanol, N-bromosuccinimida, p-hidróxido mercuribenzenato e arseniato de sódio) na atividade enzimática da CGTase purificada (300 U/ml) foi testado pelo método de formação de ciclodextrinas descrito por SATO et alii (1985) utilizando-se diferentes concentrações finais desses inibidores (1 e 5 mM). Aliquotas de 100 μ l de solução de CGTase purificada (300 U/ml) foram adicionadas em tubos contendo 900 μ l de solução 2 % de amido solúvel em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0, contendo 1 ou 5 mM de inibidor. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o descrito no item 3.2.3.

3.8.7 - Determinação do peso molecular da CGTase

O peso molecular da enzima CGTase de *Bacillus* sp. n^o 324 foi determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme método descrito por WEBER & OSBORN (1969) modificado, usando-se Kit de calibração para eletroforese para determinação de peso molecular da Pharmacia LKB. Para a preparação do gel 10 % poliacrilamida (p/v), 2,5 g de acrilamida e 0,1 g de metilenobisacrilamida foram dissolvidos em água destilada para um volume final de 10 ml. O tampão do gel consistiu de 3 g de Tris e 14,5 g de glicina em 100 ml de água destilada. Uma alíquota de 1,1 ml do tampão

(pH 8,3) do gel foram misturados com 4,0 ml da solução de acrilamida, 6,7 ml de água destilada, 90 µl de solução de persulfato de amônio (1g/10ml) e 9 µl de N, N, N', N'-tetrametiletenodiamino, sendo imediatamente colocados na placa do gel. O tampão do gel foi diluído 1:10 com água destilada e usado para encher os dois compartimentos do aparelho de eletroforese. Em seguida, foram aplicados 5 µl da amostra (item 3.7.5). As soluções das proteínas padrões, utilizadas na determinação de peso molecular, foram da Pharmacia LKB (fosforilase B - 94.000 Da., albumina de soro bovino - 67.000 Da., ovoalbumina - 43.000 Da., anidrase carbônica - 30.000 Da., inibidor de tripsina - 20.100 Da e α-lactoalbumina 14.400 Da.). Uma alíquota de 10 µl de solução de padrão contendo 100 µg de cada proteína/ 100 µl foram aplicadas no gel. A eletroforese se desenvolveu sob corrente constante de 30 mA por 90 minutos. O gel foi fixado em azul de Coomassie 0,25 % (p/v) por 1 hora, e descorado com ácido acético-metanol-água (1:3:6, v/v, respectivamente) por 12 horas. A mobilidade da proteína foi determinada pela equação:

$$\text{Mobilidade} = \frac{\text{distância de migração da proteína X comprimento antes de corar}}{\text{comprimento do gel após descorado X distância de migração do corante}}$$

As mobilidades foram plotadas em função dos pesos moleculares das proteínas padrões expressos em escala logarítmica.

3.9- Estudo da produção de ciclodextrina

3.9.1- Estudo da produção de α , β e γ -ciclodextrina a partir do amido utilizando-se a CGTase de *Bacillus firmus* n° 324

A mistura de 100 μ l de CGTase bruta (300 U/ml) e 900 μ l de solução 4 % (p/v) de amido solúvel em tampão Tris-HCl 50 mM pH8,0 foi incubada por 1 hora a 65 °C. Os produtos da reação foram analisados por CLAE através do método descrito no item 3.2.3.

3.9.2- Efeito da concentração de substrato e tempo de reação na produção de ciclodextrina

Para o estudo do efeito da concentração de substrato na produção de ciclodextrina, os sistemas de reação foram constituídos de 100 μ l de enzima bruta (300U/ml) e 900 μ l de solução de amido solúvel em diferentes concentrações (1 a 6 %, p/v) em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0. As misturas de reação foram incubadas a 65 °C durante 1, 2, 3, 5, 7 e 9 horas. A reação foi paralizada pela adição de 0,1 ml de HCl 0,5 M. Os produtos da reação foram analisados por CLAE de acordo com o descrito no item 3.2.3.

3.9.3- Efeito do tempo de reação na formação de ciclodextrina pela CGTase de *Bacillus firmus* n° 324 a partir de 5 % de amido solúvel

Para o estudo do efeito do tempo de reação na produção de ciclodextrina, os sistemas de reação foram constituídos de 100 µl de enzima bruta (300U/ml) e 900 µl de solução de amido solúvel a 5% em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0. As misturas de reação foram incubadas a 65 °C durante 1, 2, 3, 5, 7, 9, 16 e 24 horas. A reação foi paralizada pela adição de 0,1 ml de HCl 0,5 M. Os produtos da reação foram analisados por CLAE de acordo com o descrito no item 3.2.3.

3.10- Estudo da produção de ciclodextrinas ramificadas (maltosil-ciclodextrinas)

Para a produção de ciclodextrinas ramificadas testou-se as enzimas desramificantes pululanase de *Klebsiella* sp. 192 e isoamilase de *Flavobacterium* sp. produzidas como descrito a seguir.

3.10.1- Produção da enzima pululanase de *Klebsiella* sp. 192

Para a produção de inóculo, 70 ml do meio de cultura 13 apresentado na Tabela 3, contido em frasco de 250 ml foi inoculado com a linhagem de *Klebsiella* sp. 192 e incubado a 30 °C em agitador rotatório a 200 rpm por 15 horas. Em seguida o pré-inóculo foi adicionado em

fermentador New Brunswick Scientific, modelo Bioflo II, contendo 700 ml do meio 13, ajustado para pH 7,0 e incubado a 30 °C por 76 horas, a 200 rpm. Após incubação, o meio fermentado foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos, a 4 °C, em centrífuga Beckman J-21B. A massa celular foi descartada e o sobrenadante obtido foi concentrado através de ultrafiltração em Micro-Thin Channel Ultrafiltration System - modelo TCF2A (Amicon Co.), em membrana de 30.000 Da., sendo, primeiramente dialisado contra água deionizada por 48 horas, a 5 °C e posteriormente contra tampão fosfato 0,05 M pH 6,0, a 5 °C por 24 horas. A preparação enzimática obtida foi utilizada como fonte de enzima bruta.

Tabela 3. Composição dos meios de cultura para produção de enzimas amilolíticas desramificantes.

	Meio 13 (ref. 42)	Meio 14 (ref. 41)
amilopectina	2%	
Peptona		0,2%
Extrato de Levedura		0,1%
Glutamato de Sódio	0,4%	
Maltose		0,5%
K ₂ HPO ₄	0,1%	
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,05%	
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,15%	
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,001%	
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,001%	
NaCl ₂	0,001%	
pH	7,0	7,0

3.10.2- Determinação da atividade da pululanase

A atividade da pululanase da preparação enzimática bruta obtida no item 3.10.2 foi determinada pelo método descrito por TAKASAKI (1976), com modificações. Uma amostra de 0,5 ml da solução a 0,7 % de pululana em tampão fosfato 0,1 M pH 6.0 foi adicionada em tubo de ensaio, contendo 0,5 ml de solução da enzima. A mistura da reação foi incubada a 40°C durante 30 minutos. Os açúcares redutores formados foram determinados pelo método de SOMOGYI-NELSON (1944), utilizando-se como padrão a maltotriose. Uma unidade de atividade da enzima foi definida como a quantidade de enzima que libera açúcares redutores expressos como µg maltotriose/minuto/ml de enzima a partir da pululana sob as condições descritas acima.

3.10.3- Produção da enzima isoamilase de *Flavobacterium* sp.

Preparou-se um inóculo da linhagem de *Flavobacterium* sp. em frasco Erlenmeyer contendo 70 ml de meio 14, apresentado na Tabela 3 ajustado para pH 7.0. Após incubação em agitador rotatório a 200 rpm, a 28°C durante 15 horas, o pré-inóculo foi adicionado em fermentador New Brunswick Scientific, modelo Bioflo II, contendo 700 ml de meio 14, pH 7,0 e incubado a 28 °C por 48 horas, a 200 rpm. Após incubação, o meio fermentado foi centrifugado a 10.000 x g, por 10 minutos, a 4 °C em centrífuga Beckman J-21B. O sobrenadante foi concentrado, através de ultrafiltração em Micro Thin Channel Ultrafiltration System - modelo TCF2A (Amicon Co.) em membrana 30.000 Da., sendo em seguida

dialisado contra água deionizada e tampão citrato fosfato 0,05 M pH 6,3 a 5 °C, por 48 horas e 24 horas, respectivamente. Este dialisado foi utilizado como preparação da enzima bruta.

3.10.4- Determinação da atividade da isoamilase

A atividade da isoamilase, na preparação bruta obtida no item 3.10.4 foi determinada de acordo com o método descrito por KOBAYASHI (1955). A mistura de 5 ml de solução a 1 % (p/v) de amilopectina de milho ceroso em água destilada e 1 ml de solução tampão fosfato 0,5 M pH 6,3 foi incubada em banho de água a 40 °C. A seguir 1 ml de solução enzimática foi adicionada à mistura de reação. Após 1 hora de incubação, uma alíquota de 0,5 ml da mistura de reação foi transferida para um tubo de ensaio contendo 0,5 ml de solução de Iodo-KI 0,01 N e a solução final diluída para 25 ml com água destilada. A absorvância da solução foi medida em espectrofotômetro Beckman DU-70, utilizando-se como branco a mistura da reação no tempo zero.

Uma unidade de atividade foi definida como o aumento de 0,01 na absorvância a 620 nm/ml de enzima nas condições do ensaio.

3.10.5- Estudo da utilização das enzimas amilolíticas pululanase e isoamilase na formação de maltosil (α -1,6)-ciclodextrina

Para o estudo da formação de maltosil (α -1,6)-ciclodextrina a atividade enzimática de pululanase e de isoamilase foram determinadas de

acordo com o item 3.10.4 utilizando como substrato a amilopectina. A mistura de 600 mg de maltose, 100 mg de cada ciclodextrina (α -, β -ou γ -CD), e pululanase de *Klebsiella* (44 U/ml) ou isoamilase de *Flavobacterium* (44 U/ml) foram dissolvidas em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 4,0 para um volume final de 1 ml. As misturas foram incubadas a 50 °C com agitação por 24 horas. Após incubação as amostras foram analisadas através da CLAE como descrito no item 3.10.6.

3.10.6- Análise das ciclodextrinas ramificadas

Alíquotas de 1ml das misturas de reação obtidas no item 3.10.5 foram filtradas em membrana Millipore HA (poros com 0,45 μ m) e analisadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo CG 480C (coluna YMC-Pack Polymine II a 30 °C; fase móvel: mistura de acetonitrila:água na proporção 65:35; velocidade do fluxo: 1,5 ml/min), acoplado a um detector refratométrico diferencial CG-410 (temperatura do detector: 30 °C). A identificação das ciclodextrinas foi realizada por comparação direta do tempo de retenção (tR) com os padrões de α , β e γ -ciclodextrina (Sigma) e maltosil β -ciclodextrina (Ensuiko Sugar Refining co.).

3.10.7- Efeito da concentração da pululanase na formação de maltosil (α -1,6) -ciclodextrina

Para o estudo do efeito da concentração de pululanase na formação de maltosil (α -1,6) -ciclodextrinas, as misturas de reação de 600 mg de maltose, 100 mg de cada ciclodextrina (α , β ou γ) e pululanase nas concentrações 1, 3,5, 5, 7,5, 10, 13 unidade/ml foram incubadas a 50°C durante 24 horas. Neste experimento a atividade de pululanase foi determinada de acordo com o apresentado no item 3.10.2.

3.10.8- Efeito do tempo de reação na formação da maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina

Para o estudo do efeito do tempo de reação na formação da maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina, a mistura de reação foi constituída de 100 mg de β -ciclodextrina e 600 mg de maltose, pululanase de *Klebsiella* sp. (10 U/100 mg de β -CD) para um volume final de 1 ml em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 5,0, a 50 °C. Neste estudo a atividade de pululanase foi determinada de acordo com o descrito no item 3.10.2. As amostras foram retiradas a cada 5 horas, por um período de 30 horas, para a análise dos produtos formados como descrito no item 3.10.6.

3.10.9- Estudo do pH ótimo de formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina

Para o estudo do efeito do pH ótimo de formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina, as misturas de 600 mg de maltose, 100 mg de β -CD e pululanase de *Klebsiella* (10 U/100 mg de β -CD) em tampão citrato-fosfato 50 mM, em pH 3,0 , 3,5 , 4,0 , 4,5 , 5,0 , 6,0 ou 7,0, para um volume final de 1 ml, foram incubadas a 50 °C com agitação por 24 horas. Após incubação, as amostras foram analisadas por CLAE como descrito no item 3.10.6.

3.10.10- Estudo da temperatura ótima de formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina

Para o estudo do efeito da temperatura ótima na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina, as misturas de 600 mg de maltose, 100 mg de β -CD e pululanase de *Klebsiella* (10 U/ 100 mg de β -CD) em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 5,0, para um volume final de 1 ml, foram incubadas em diferentes temperaturas (40, 45, 50 e 55 °C) com agitação por 24 horas. Após incubação, as amostras foram analisadas por CLAE como descrito no item 3.10.6.

3.10.11- Estudo da concentração ótima de substrato para a formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina

Para o estudo do efeito da concentração ótima de substrato na formação de maltosil (α -1,6)- β -ciclodextrina, as misturas de reação foram constituídas de 10 unidades de pululanase de *Klebsiella sp.* e de maltose : β -ciclodextrina (proporção molar 18,8 : 1) em concentrações variáveis entre 40 a 80 % para um volume final de 1 ml em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 5,0. As misturas de reação foram incubadas a 50 °C durante 24 horas e a formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina foi verificada de acordo com o apresentado no item 3.10.6.

3.10.12- Relação entre a proporção molar de maltose : β -ciclodextrina na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina

No estudo do efeito da proporção molar de maltose : β -ciclodextrina na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina, a concentração de substrato (maltose : β -ciclodextrina) foi mantida fixa em 70% e a proporção molar do substrato foi variável como ilustra a Tabela 4.

As misturas de reação, constituídas de 10 unidades de pululanase de *Klebsiella sp.* e 70 % de substrato maltose : β -ciclodextrina , em proporções variáveis, em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 5,0 para um volume final de 1 ml, foram incubadas a 50 °C por 24 horas com agitação. Após incubação a formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina foi analisada de acordo com o descrito no item 3.10.6.

Tabela 4 : Proporção molar de maltose e β -CD para a produção de maltosil
(α -1,6) β -ciclodextrina

Maltose (mg)	β -ciclodextrina (mg)	Proporção molar
600	100	18,9:1
550	150	11,6:1
500	200	7,9:1
400	300	4,27:1
350	350	3,2:1
300	400	2,37:1

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Isolamento e seleção de microrganismos alcalofílicos produtores de CGTase

O isolamento e seleção de microrganismos alcalofílicos produtores de CGTase foi realizado de acordo com o apresentado no item 3.1.1.

Das 560 linhagens de microrganismos alcalofílicos isoladas de 600 amostras de solo brasileiro em meio alcalofílico, oito linhagens foram selecionadas por apresentarem alta atividade enzimática de CGTase determinada pelo método de precipitação com tricloroetileno descrito no item 3.2.1.

Tabela 5. Linhagens de microrganismos selecionadas, Atividade de CGTase pelo método de CD-TCE e produção de ciclodextrinas.

linhagem número	Fonte do microrganismo	Atividade de CGTase pelo método de CD-TCE	Produção de CDs(µg/20µl)		
			α	β	γ
	solo de cultivo de	2 ⁷ 2 ⁸ 2 ⁹			
207	mandioca (Ubatuba)	+ + -	5,0	70	17
324	milho (Campo Grande)	+ + ±	6,2	78	30
341	milho (Porto Seguro)	+ + -	4,2	72	20
348	feijão (Itatiaia)	+ + -	4,2	68	18
428	mandioca (Piracicaba)	+ + -	4,5	71	21
431	milho (São Pedro)	+ + -	4,5	73	20
434	milho (Lages)	+ + -	5,0	68	23
437	batata (Porto Alegre)	+ + -	4,2	72	21

Todas as linhagens selecionadas produziram β -ciclodextrina em maior quantidade em relação a α - e γ -ciclodextrina como demonstra a Tabela 5. A utilização do meio 1 descrito na Tabela 1 favoreceu a obtenção de microrganismos alcalofílicos produtores de alta quantidade de β -ciclodextrina (68-78 $\mu\text{g}/20\mu\text{l}$), conforme já observado por NOMOTO et alii (1986) e SABIONI & PARK (1992).

4.2- Identificação das linhagens de microrganismos produtores de CGTase

De acordo com as características, morfológicas e bioquímicas (item 3.3.1) verificou-se que as oito linhagens produtoras de CGTase pertencem ao gênero *Bacillus sp.* (Tabela 6). GORDON & HYDE (1982), após conduzirem estudos taxonômicos com 174 linhagens de *Bacillus* alcalofílicos que se desenvolveram em uma faixa de pH entre 7,5 a 10,5, constataram que mais de 50 % das linhagens eram da espécie *Bacillus lentus* e 30 % da espécie de *Bacillus firmus*. De acordo com o Manual Bergey's (SNEATH, 1986), as características fisiológicas e morfológicas das linhagens selecionadas são similares às descritas para a espécie *Bacillus firmus*. Para uma confirmação definitiva foram realizados testes de quimiotaixonomia, de acordo com o método descrito no item 3.3.2. Observou-se que as oito linhagens isoladas apresentaram menaquinona MK-7 (Figura 1). Segundo HESS et alii (1979), a maioria dos microrganismos pertencentes ao gênero *Bacillus* apresentam, menaquinona do tipo MK-7, exceto *B. thuringiensis* e *B. lentus* que possuem MK-8 e MK-9, respectivamente. Portanto, todas as linhagens isoladas pertencem à espécie *Bacillus firmus*.

Entre as linhagens selecionadas, a linhagem *Bacillus firmus* n° 324 foi a que apresentou maior atividade de CD-TCE e maior produção de γ -ciclodextrina e por isso foi escolhida para os estudos de produção e caracterização da CGTase.

Tabela 6. Características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas dos isolados alcalofílicos que apresentaram maior produção de CGTase

		n° do isolado							
		207	324	341	348	428	431	434	437
Coloração de Gram		+	+	+	+	+	+	+	+
Forma de endosporo		+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidade		+	+	+	+	+	+	+	+
Temperatura de crescimento	5°C	-	-	-	-	-	-	-	-
	10°C	+	+	+	+	+	+	+	+
	40°C	+	+	+	+	+	+	+	+
	45°C	-	+	-	-	-	-	-	-
	50°C	-	-	-	-	-	-	-	-
Crescimento em NaCl 7%		+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólise da gelatina		+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólise da caseína		+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólise do amido		+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase		+	+	+	+	+	+	+	+
Produção de Ácido de glicose		+	+	+	+	+	+	+	+
Produção de Ácido de manitol		+	+	+	+	+	+	+	+
Produção de Ácido de xilose		-	-	-	-	-	-	-	-
Produção de Ácido de arabinose		-	-	-	-	-	-	-	-
Tipos de menaquinona(MK-)		7	7	7	7	7	7	7	7

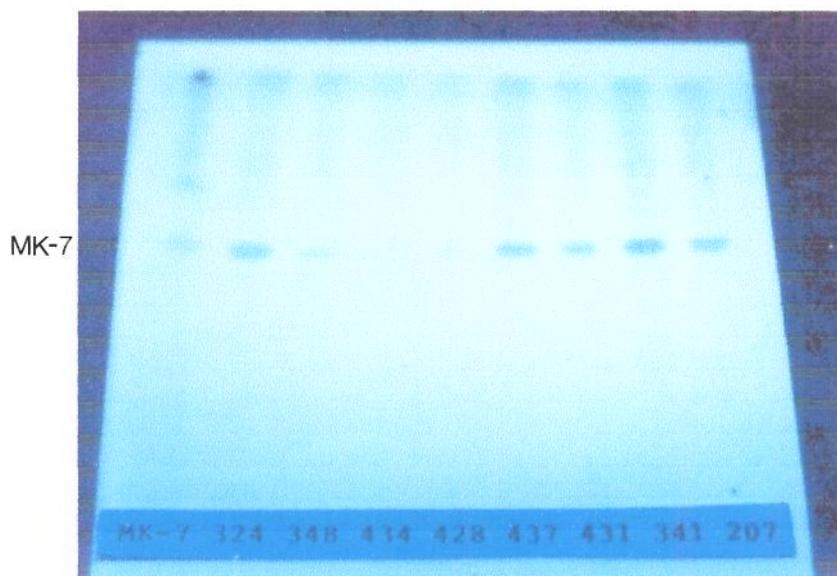


Figura 1 : Cromatografia em camada delgada de fase reversa das menaquinonas das linhagens selecionadas de *Bacillus* sp.(Merck HPTLC RP F254 10x10 cm): padrão de Menaquinona (MK-7), *Bacillus* sp. n° 324, n° 348, n° 434, n° 428, n° 437, n° 431, n° 207, respectivamente. Solvente: acetona - água (99 : 1, v/v), tempo de corrida:15 minutos, visualizada sob UV a 254nm.

4.3- Otimização da produção de CGTase pela linhagem de *Bacillus firmus* n° 324

Na primeira etapa foram testados diferentes meios de cultura como descrito no item 3.4. Entre os meios de cultura testados foi obtido maior atividade de CGTase utilizando-se o meio de cultura 3 composto de 1% de amido solúvel, 5 % de água de maceração de milho e 1 % de Na_2CO_3 . O resultado pode ser visualizado na Figura 2.

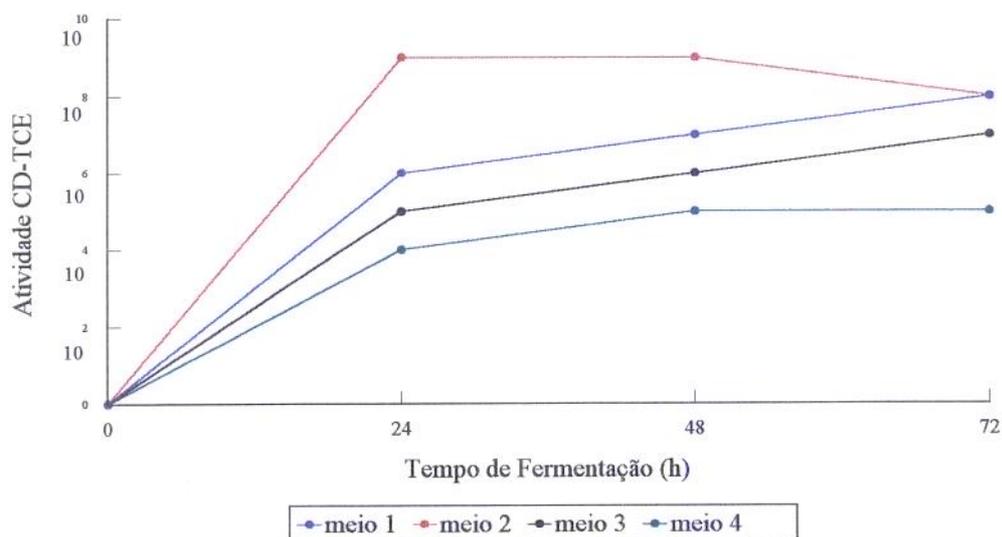


Figura 2 : Seleção do meio de cultura para a produção de CGTase de *Bacillus firmus* n°324.

Como pode-se observar, o meio de cultura 3 apresentou um rápido aumento da atividade de CD-TCE atingindo o valor 2^9 após 24 horas de fermentação, enquanto com os outros meios de cultura, a atividade máxima variou entre 2^6 a 2^8 .

Após a seleção do meio de cultura que apresentou maior atividade de CGTase, realizou-se estudos para a otimização deste meio de cultura variando-se a concentração dos seus componentes como descrito no item 3.5.

Neste estudo verificou-se que o meio de cultura 3, coincidentemente, foi o melhor meio de cultura para produção de CGTase. Este resultado está de acordo com o trabalho realizado por NAKAMURA & HORIKOSHI (1976a), que obtiveram maior produção de CGTase de *Bacillus* sp. utilizando este mesmo meio de cultura.

4.4- Relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo e produção de enzima CGTase pela linhagem de *Bacillus firmus* n° 324 a 35° e 40° C

O estudo do crescimento do microrganismo e produção de CGTase pela linhagem de *Bacillus firmus* n° 324 foi realizado de acordo com o método descrito no item 3.6.

As Figuras 3 e 4 ilustram, respectivamente, a relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo e produção de CGTase a 35 °C e 40 °C

Na fermentação a 35 °C (Figura 3), verificou-se que a enzima CGTase foi produzida na fase exponencial de crescimento atingindo a atividade máxima de 2 μmol de β -ciclodextrina/min/ml após 24 horas de fermentação.

Na fermentação a 40 °C (Figura 4), observou-se que a enzima CGTase foi produzida na fase exponencial, alcançando a atividade máxima de 3,8 μmol de β -ciclodextrina/min/ml após 16 horas de fermentação. Considerando o tempo de fermentação de 16 horas foi observado que a produção de enzima na fermentação a 40 °C foi aproximadamente duas vezes maior em relação à fermentação a 35°C.

SABIONE & PARK (1992) no estudo da produção de CGTase pela linhagem de *Bacillus lentus* n° 42 a 40 °C, verificou-se que a enzima era produzida somente na fase estacionária, após 96 horas de fermentação, atingindo atividade no valor de 2⁸ no método CD-TCE. Comparando-se a produção de CGTase pela linhagem de *Bacillus lentus* n° 42 e a linhagem de *Bacillus firmus* n° 324 deste estudo verificou-se que esta última apresentou maior produção de enzima em menor tempo de fermentação. O valor de atividade de CGTase de 3,8 µmol de β-ciclodextrina /min/ml obtido após 16 horas de fermentação a 40 °C corresponde ao valor de diluição 2⁹ no método CD-TCE utilizado por SABIONE (1991) para a determinação de CGTase.

YU et alii (1988), utilizando fermentador de 10 L ou 400 L, obtiveram produção máxima de CGTase (145 U/ml), pela linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* AL 35 a 37 °C, no meio 5 (Tabela 1). Neste estudo os autores utilizaram o método de NAKAMURA & HORIKOSHI (1976a) para a determinação da atividade de CGTase que é baseado na capacidade da enzima em hidrolisar a α-ciclodextrina. O método estima os açúcares redutores formados após hidrólise da α-ciclodextrina pela CGTase e amiloglicosidase.

GOEL & NENE (1995) utilizando a linhagem de *Bacillus firmus* obtiveram produção máxima de CGTase após 18 horas de fermentação. Os autores estimaram a atividade de CGTase pela capacidade da ciclodextrina formada encapsular fenolftaleína. Neste método a produção de β-ciclodextrina foi estimada pela determinação da absorbância a 540 nm, ou seja, encapsulação da fenolftaleína em meio alcalino e diminuição da coloração rosa.

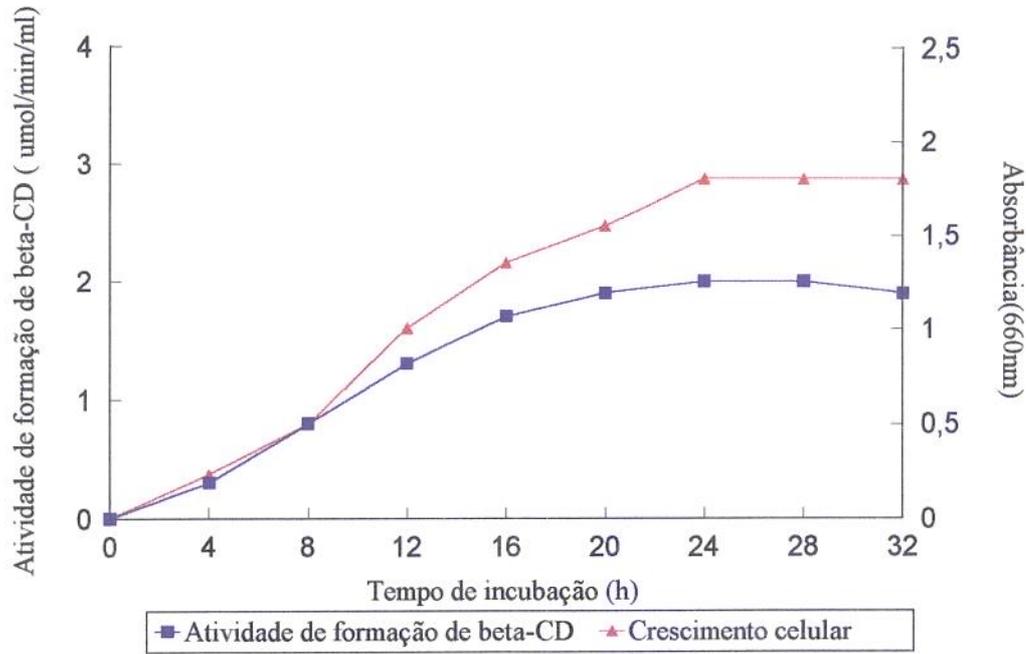


Figura 3: Crescimento celular e produção de CGTase pelo *Bacillus firmus* n° 324 a 35°C.

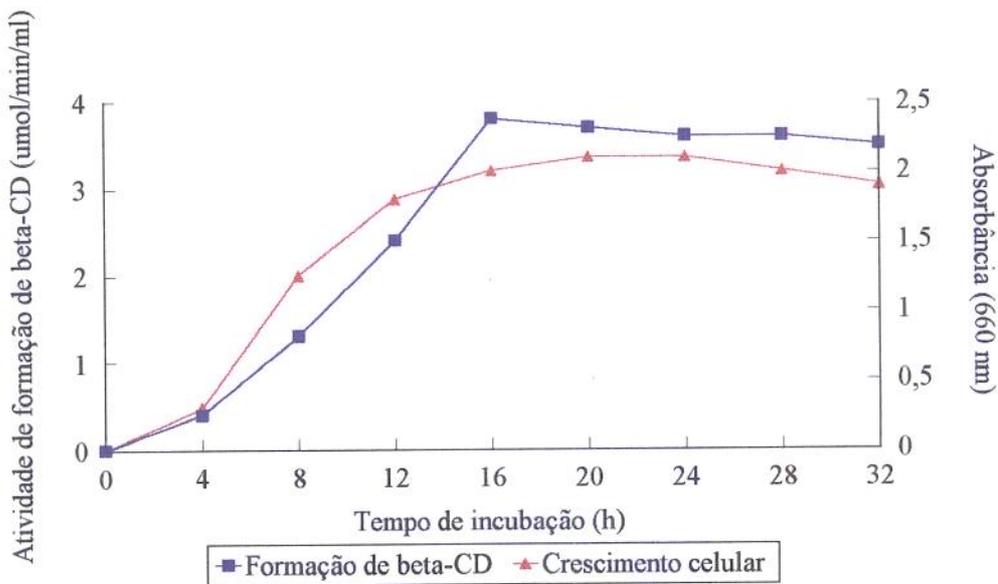


Figura 4: Crescimento celular e produção de CGTase pelo *Bacillus firmus* n° 324 a 40°C.

4.5- Produção e purificação da CGTase

A produção e purificação da CGTase foi realizada de acordo com o método descrito no item 3.7. O fluxograma de produção e purificação da CGTase de *Bacillus firmus* n° 324 está apresentado na Figura 5.

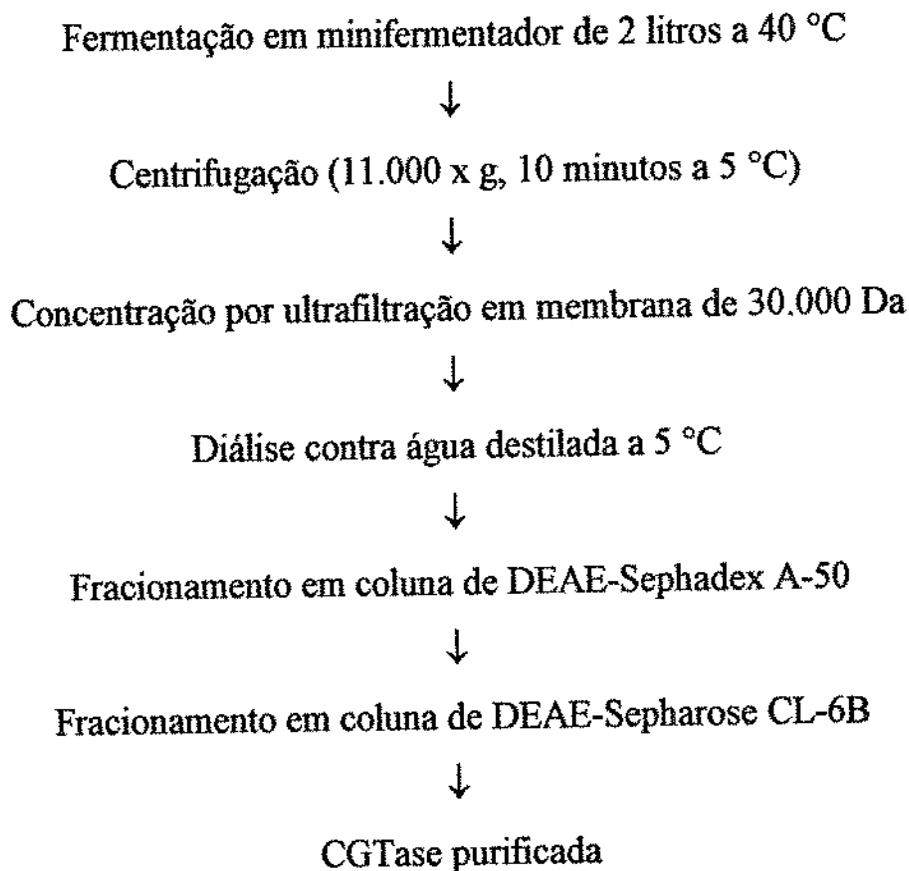


Figura 5 : Fluxograma de produção e purificação da CGTase de *Bacillus firmus* n° 324.

No fracionamento sucessivo da preparação bruta de CGTase aplicada em colunas de DEAE-Sephadex A-50 e DEAE Sepharose CL-6B equilibradas em

tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0, a enzima CGTase adsorvida na resina foi eluída das colunas com tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 contendo 0,2 M NaCl. As Figuras 6 e 7 ilustram, respectivamente, o fracionamento da CGTase em coluna de DEAE-Sephadex A-50 e DEAE-Sepharose CL-6B. A enzima foi purificada 89,4 vezes após concentração da preparação bruta por ultrafiltração em membrana de 30.000 Da., cromatografia em colunas de DEAE-Sephadex A-50 e DEAE Sepharose CL-6B. A enzima purificada apresentou 8836 unidades de atividade/ mg de proteína com rendimento de 26,6 %. A Tabela 7 ilustra os resultados.

Em 1986 NOMOTO et alii, relataram a purificação de CGTase da linhagem de *Bacillus* sp. HA3-3-2 através do fracionamento com sulfato de amônio 30-50 %, cromatografia em coluna de Shephadex G-100 e três colunas de DEAE-celulose. Os autores purificaram a enzima 83,3 vezes com 7 % de rendimento.

PONGSAWADI & YAGISAWA (1988) purificaram a CGTase de *Bacillus circulans* C31 em duas etapas sucessivas utilizando adsorção em amido e cromatografia em Biogel A-50. A enzima foi purificada 91 vezes com 30 % de rendimento. A CGTase apresentou 6623,4 unidades de atividade/ mg de proteína.

FUGITA et alii em 1990, purificaram a CGTase de *Bacillus* sp. AL até obtenção da proteína homogênea usando fracionamento em sulfato de amônio, adsorção em amido e cromatografia em duas colunas de DEAE-Sephadex A-50. A enzima foi purificada 230 vezes com rendimento de 14,4 %. A CGTase apresentou 877,9 unidades de atividade/mg de proteína

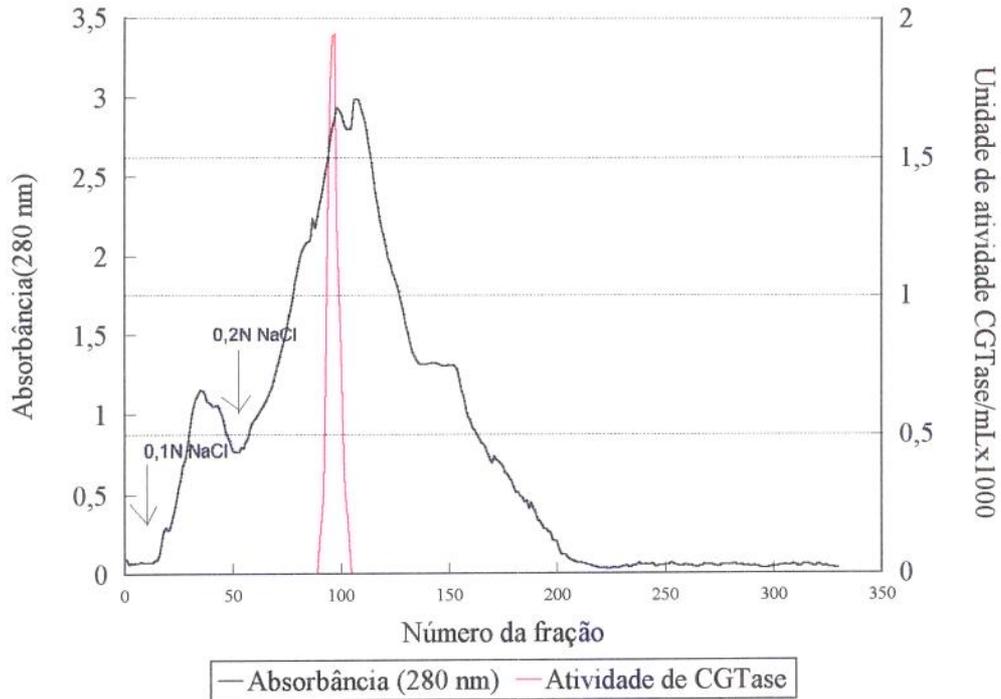


Figura 6 : Cromatografia da CGTase em coluna de DEAE-Sephadex A-50.

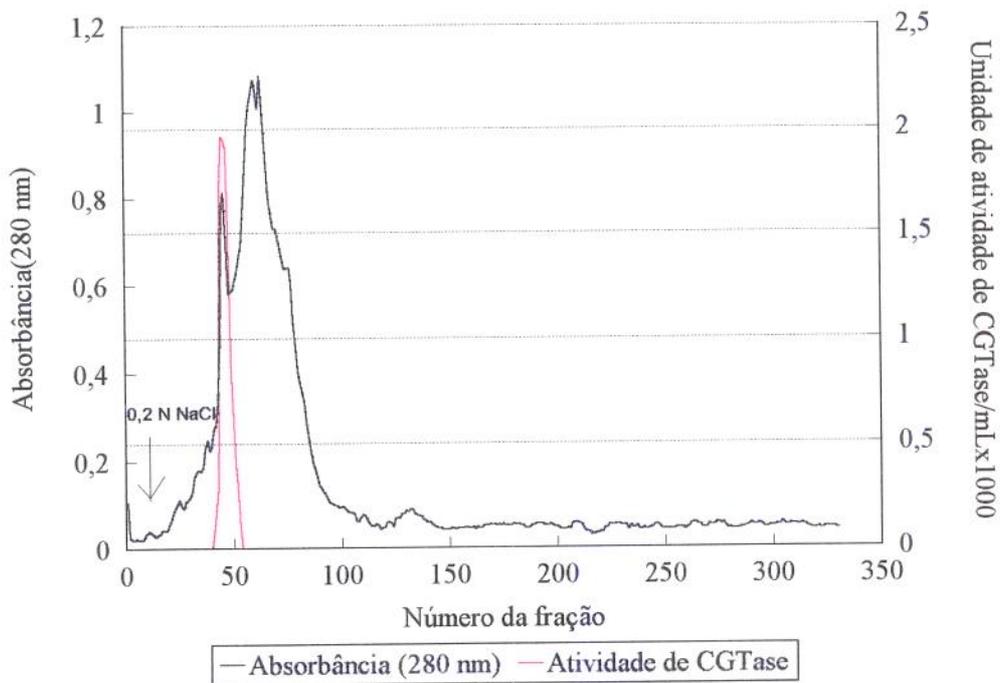


Figura 7 : Cromatografia da CGTase em coluna de DEAE-Sepharose CL-6B.

Tabela 7: Purificação da CGTase de *Bacillus firmus* n° 324

etapa de procedimento	volume (ml)	atividade total (Unidade)	proteína total (mg)	atividade específica (U/mg prot.)	rendimento (%)
sobrenadante do meio de cultura	385	205.590	2.080	98,8	100
concentração por ultrafiltração em membrana	70	146.300	317	462	71
Cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex	50	102.500	54	1.898	49,8
Cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose CL-6B	12,8	54.784	6,2	8.836	26,6

4.6. Caracterização da CGTase purificada

As características bioquímicas da CGTase de *Bacillus firmus* n° 324, foram determinadas como descrito no item 3.8.

4.6.1 - Efeito do pH na atividade e estabilidade da CGTase

O efeito do pH na atividade da CGTase está representado na Figura 8, e foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.8.1. A enzima de *Bacillus firmus* n° 324 apresentou maior atividade de formação de ciclodextrinas na faixa de pH de 7,5 a 8,5, enquanto a maior atividade dextrinizante determinada pela diminuição da intensidade da cor azul do complexo iodo-amido ocorreu entre os valores de pH de 7,0 a 8,5.

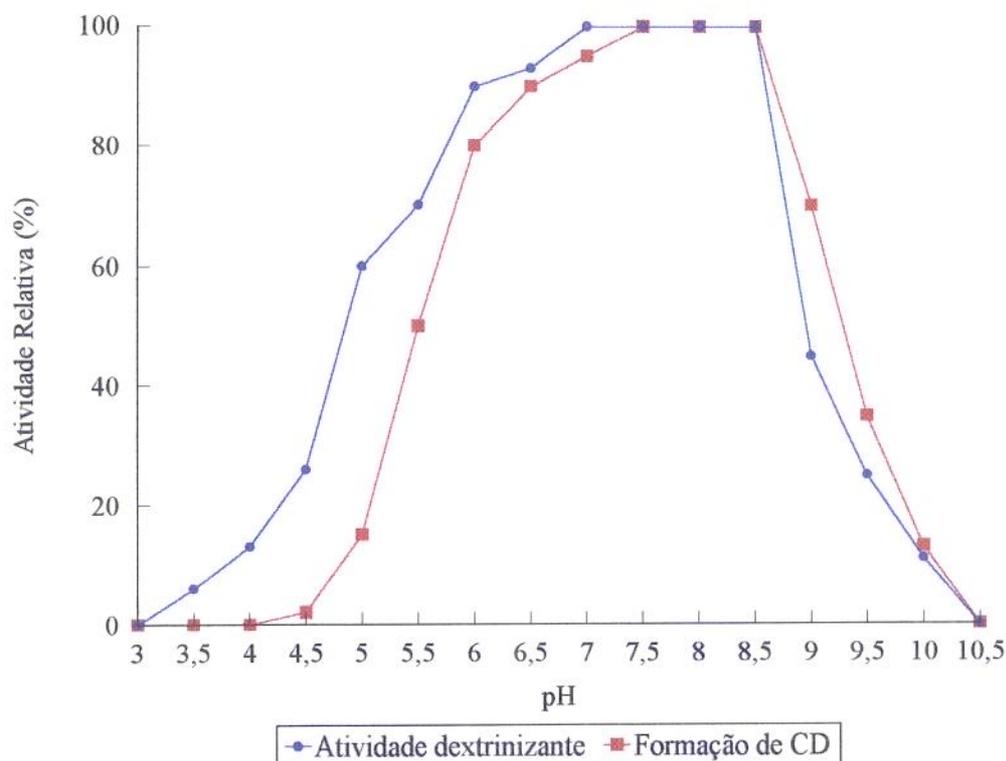


Figura 8 : Efeito do pH na atividade da CGTase de *Bacillus firmus* n° 324.

Esta diferença encontrada no pH ótimo de formação de ciclodextrinas e da atividade dextrinizante, confirma que o pH ótimo de atividade dextrinizante pode não ser o mesmo que o pH ótimo de formação de ciclodextrinas, conforme já foi relatado por NOMOTO et alii (1986) e SABIONI & PARK (1992).

A Figura 9 ilustra a influência do pH na estabilidade enzimática (item 3.8.2), onde observa-se que a CGTase de *Bacillus firmus* apresentou estabilidade na faixa de pH 6,5 a 9,0, determinada pelo método de formação de ciclodextrina e estabilidade na faixa de 7,9 a 9,0, determinada pelo método da atividade dextrinizante.

NOMOTO et alii (1986), verificaram que o pH de estabilidade enzimática da CGTase de *Bacillus* HA 3-3-2, determinado através do método da CD-TCE (Ciclodextrina-Tricloroetileno), encontrava-se na faixa de pH 6,0 a

11,0, enquanto pelo método da atividade dextrinizante a faixa observada era de pH 7,0 a 10,0.

FUJITA et alii (1990) verificaram que o pH de estabilidade da CGTase de *Bacillus* sp. AL-6 foi de 5,0 a 8,0 após incubação a 40°C por 3 horas , como demonstrado a Tabela 8.

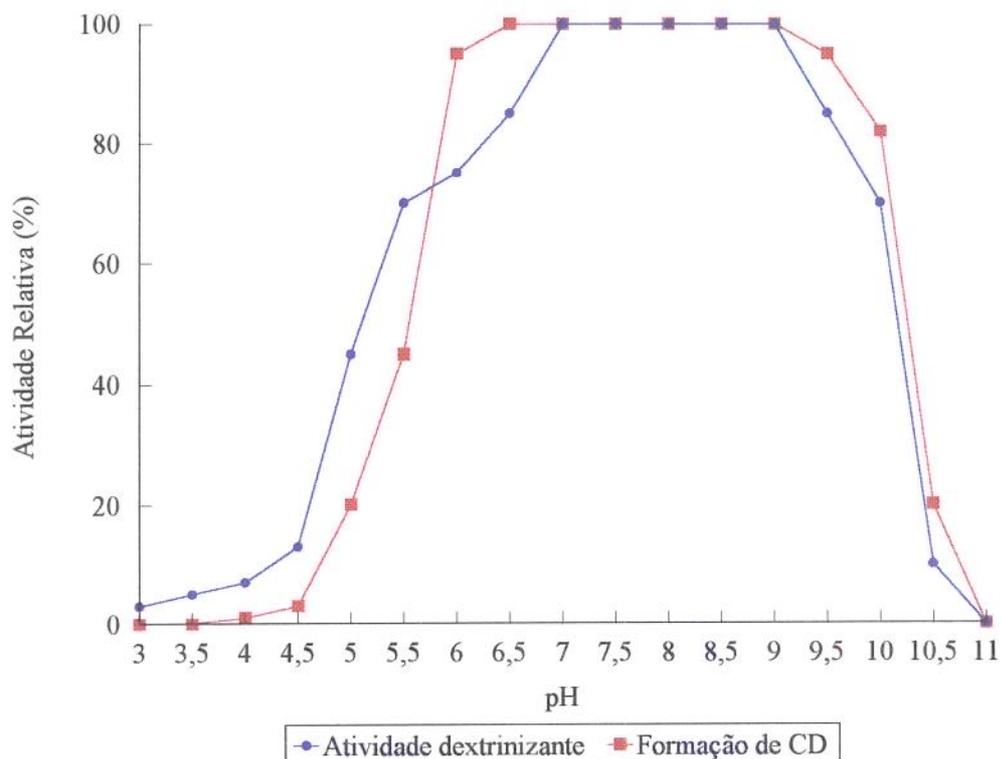


Figura 9 : Efeito do pH na estabilidade da CGTase de *Bacillus firmus* n° 324.

4.6.2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da CGTase

O efeito da temperatura ótima de atividade da CGTase está representado na Figura 10, tendo sido determinado de acordo com o método descrito no item 3.8.3. A enzima de *Bacillus firmus* n° 324 apresentou maior atividade de formação de CDs e atividade dextrinizante a 65 °C. NOMOTO et alii (1986), estudando a CGTase de *Bacillus alcalofílico*, verificaram que a temperatura ótima

para a formação de CDs (método CD-TCE) e da atividade dextrinizante foram, respectivamente, 60° e 70 °C.

FUGITA et alii (1990) verificaram que a temperatura ótima para a formação de CDs pela CGTase de *Bacillus* sp. AL-6 por CLAE foi de 60 °C e para a atividade dextrinizante da enzima foi de 55 °C. SABIONI (1991) constatou que a temperatura ótima para a atividade dextrinizante da CGTase de *Bacillus lentus* foi de 55°C, enquanto que a temperatura ótima da enzima estimada pelo método CD-TCE variou na faixa de 45° a 55 °C.

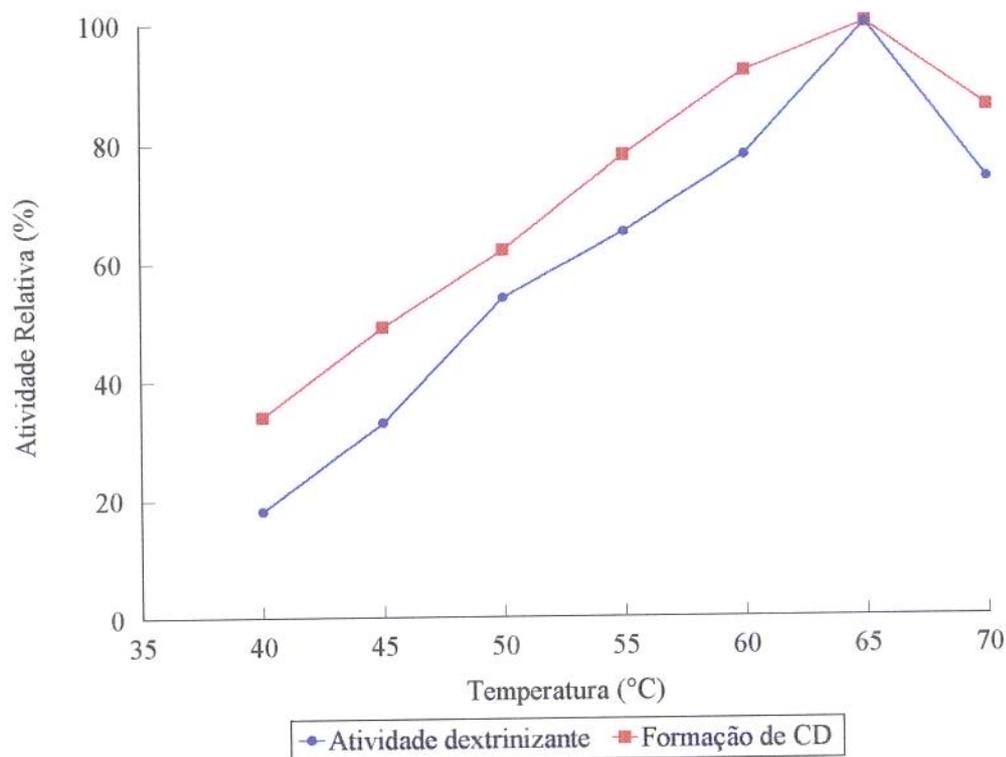


Figura 10: Efeito da temperatura na atividade da CGTase de *Bacillus firmus* n° 324.

O estudo da influência da temperatura na estabilidade enzimática da CGTase de *Bacillus firmus* n° 324 foi determinado como descrito no item 3.8.4.

A Figura 11 ilustra que a CGTase de *Bacillus firmus* n° 324 é inativada em temperaturas superiores a 55° C após 30 minutos de tratamento térmico.

NOMOTO et alii (1986) verificaram que a CGTase de *Bacillus* sp. HA 3-3-2 apresentou estabilidade térmica a 70° C, após 30 minutos de tratamento em pH 8,5, determinado pelo método de precipitação de ciclodextrina (CD-TCE), e a 60 °C determinado pela atividade dextrinizante.

FUJITA et alii (1990) estudaram a estabilidade térmica da CGTase da linhagem de *Bacillus* sp. AL-6, após tratamento da enzima purificada em pH 7,5 por 30 minutos, e verificaram através da determinação da atividade dextrinizante e formação de ciclodextrina por CLAE, que a enzima era estável em temperaturas inferiores a 40 °C.

SABIONI (1991) verificou que a estabilidade térmica da CGTase de *Bacillus lentus* determinada pelo método CD-TCE e atividade dextrinizante, foram 55 °C e 35 °C, respectivamente, após tratamento térmico por 30 minutos em pH 7,5.

MORI et alii (1994) estudaram a estabilidade térmica da CGTase de *Brevibacterium* sp. pela atividade dextrinizante, e verificaram que após 10 minutos de tratamento em pH 8,0 a enzima apresentou-se estável em temperaturas inferiores a 30 °C.

O efeito da adição de CaCl₂ sobre a estabilidade térmica da CGTase de *Bacillus firmus* n° 324 está ilustrado na Figura 12. Na ausência de CaCl₂ a enzima manteve-se estável até 55 °C após 30 minutos de tratamento térmico. Entretanto, com a adição de CaCl₂ na concentração 10 mM a enzima permaneceu estável até 65 °C. Na presença de CaCl₂ 10 mM a CGTase manteve 95 % de atividade após 30 minutos de tratamento a 70 °C. A adição de íons cálcio aumentou a estabilidade térmica da enzima.

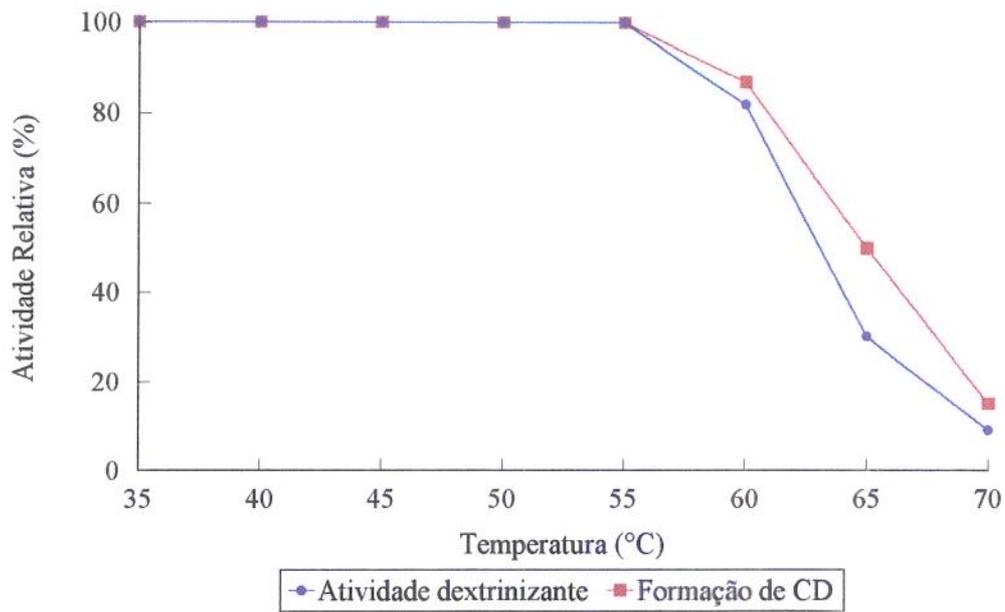


Figura 11 : Efeito da temperatura na estabilidade da CGTase de *Bacillus firmus* n° 324.

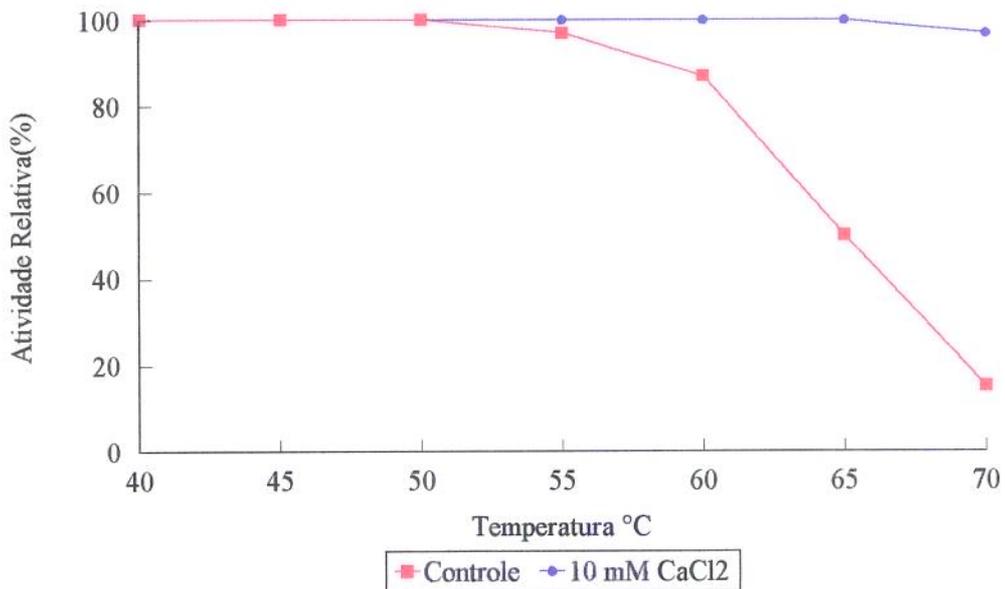


Figura 12 : Efeito do CaCl_2 sobre a estabilidade térmica na atividade da CGTase de *Bacillus firmus* n° 324.

MORI et alii (1994) relataram que a adição de CaCl_2 na concentração 10 mM aumentou a estabilidade térmica da enzima CGTase de *Brevibacterium* de 30 °C para 55 °C.

Estudos realizados por SABIONI & PARK (1992) verificaram que a CGTase de *Bacillus lentus* na presença de CaCl_2 5 mM manteve-se ativa após 150 minutos de tratamento térmico a 55 °C enquanto que na ausência de CaCl_2 a atividade decaiu 50 % no mesmo intervalo de tempo e na mesma temperatura.

A Tabela 8 apresenta um resumo das características das CGTases produzidas por vários microrganismos.

Tabela 8. Características das CGTases produzidas por vários microrganismos

Microorganismo	pH ótimo de atividade	pH de estabilidade	Temperatura ótima(°C)	Temperatura de estabilidade (°C)	Peso molecular daltons	Principal CD produzida	Referências
<i>Bacillus macerans</i>	5,2-5,7	8-11	55	55	75.000	α	KITAHATA & OKADA(1982)
<i>Bacillus megaterium</i>	5,2-6,2	7-10	55	55	75.000	β	KITAHATA & OKADA(1982)
<i>Bacillus sp. alcalofílico</i>	4,5-4,7	6-10	45	65	88.000	β	NAKAMURA & HORIKOSHI(1976b)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	6	7,0-9,2	70	50	68.000	α	KITAHATA & OKADA (1982)
<i>Bacillus sp. HA3-3-2 alcalofílico</i>	6,5-8,5	6-11	60	70	68.000	-	NOMOTO et alii (1986)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	6	8-10	70	60	-	α	YU et alii (1988)
<i>Bacillus circulans</i>	5,5	5,5-9	60	50	103.000	β	PONGSAWADI & YAGISAWA(1988)
<i>Bacillus sp. AL-6</i>	8	5-8	60	40	74.000	β, γ	FUJITA et alii (1990)
<i>Bacillus lentus</i>	6,5-7,5	6-8	55	55	33.000	β	SABIONI (1991)
<i>Brevibacterium sp. No. 9605</i>	10	6-8	45	30	75.000	β, γ	MOKI et alii (1994)

4.6.3- Efeito da presença de sais minerais na atividade enzimática

O efeito dos sais minerais na atividade da CGTase foi testado de acordo com as condições descritas no item 3.8.5. A Tabela 9 ilustra os resultados.

Verificou-se que a presença de $MgSO_4$, KCl e $CaCl_2$, na concentração 1mM e 10mM, em relação ao volume final da mistura de reação não afetaram significativamente a atividade dextrinizante da CGTase da linhagem de *Bacillus firmus* n° 324, porém foi fortemente inibida na presença de $ZnSO_4$ e $HgCl_2$, na concentração 1mM, em relação ao volume final de reação.

Para a atividade de formação de ciclodextrinas, as substâncias $MgSO_4$, KCl e $CaCl_2$ não apresentaram efeito inibidor na concentração de 10 mM, mas foi fortemente inibida na presença de $HgCl_2$ e $ZnSO_4$ na concentração de 1 mM com atividade residual de 10 e 20 %, respectivamente. A presença de $FeSO_4$ na concentração 1 mM não afetou a atividade de formação de ciclodextrina estimada por CLAE. Verificou-se que $FeSO_4$ interferiu no método de determinação da atividade dextrinizante de CGTase.

Em 1986 NOMOTO et alii verificaram que a atividade dextrinizante da CGTase de *Bacillus* sp. HA3-3-2 foi fortemente inibida por Mg^{2+} , mas a atividade dextrinizante da CGTase de *Bacillus firmus* n° 324 perdeu apenas 15% da atividade, na concentração de 10 mM de $MgSO_4$.

A CGTase da linhagem de *Bacillus lentus* estudada por SABIONI (1991) não sofreu nenhuma inibição da atividade de precipitação de ciclodextrinas método CD-TCE, na presença de Mg^{2+} , mas perdeu 95 % dessa atividade na presença de 5mM de $FeSO_4$.

FUJITA et alii (1990) relataram que $ZnSO_4$ e $FeSO_4$, na concentração 4 mM, inibiram a atividade dextrinizante da CGTase de *Bacillus* sp AL-6, no entanto, $CaCl_2$, KCl , $HgCl_2$ e $MgSO_4$ na concentração de 4 mM não afetaram significativamente a atividade de CGTase.

MORI et alii (1994) verificaram que HgCl_2 e CdCl_2 atuaram como fortes inibidores na concentração de 1 mM, sendo que MnCl_2 , FeCl_3 , BaCl_2 , CoCl_2 , CaCl_2 e MgCl_2 não inibiram a atividade dextrinizante.

Tabela 9. Efeito da presença de sais minerais na atividade dextrinizante e de formação de ciclodextrina pela CGTase do *Bacillus firmus* n° 324

Tratamento	Atividade relativa (%) (Atividade dextrinizante de CGTase)		Atividade relativa (%) (Atividade de CGTase na formação de ciclodextrina)	
	1 mM	10 mM	1 mM	10 mM
controle	100	100	100	100
CoCl_2	85	0	60	35
MgSO_4	96	85	100	100
ZnSO_4	25	0	20	14
MnSO_4	80	57	91	63
HgCl_2	20	0	10	0
CuSO_4	90	0	80	14
KCl	100	100	100	100
FeSO_4	0	0	100	67
CaCl_2	100	100	100	100

4.6.4.- Efeito da presença de inibidores na atividade enzimática

O efeito da presença de inibidores na atividade da CGTase de *Bacillus firmus* n° 324 foi testado de acordo com o método descrito no item 3.8.6. A Tabela 10 ilustra os resultados. Verificou-se que os reagentes, na concentração

de 5 mM em relação ao volume final da mistura de reação, não afetaram significativamente a atividade da CGTase na formação de CDs.

Tabela 10. Efeito da presença de inibidores na atividade da CGTase de *Bacillus firmus* n° 324

Reagente	Atividade relativa (%) (Atividade formação de ciclodextrina)	
	1 mM	5 mM
controle	100	100
EDTA	100	100
p-Hidróximercuribenzoato	100	100
Bissulfito de sódio	100	100
L-Cisteína	100	100
Azida de sódio	100	100
β -Mercaptoetanol	100	100
N-Bromosuccinimida	100	100
Arseniato de sódio	100	100

NOMOTO et alii (1986) e FUJITA et alii (1990) verificaram que o p-cloromercuribenzoato e o ácido etilenodiaminotetracético não inibiram a atividade de CGTase baseada na precipitação ou ciclodextrina (método CD-TCE) de CDs e nem a atividade dextrinizante.

SABIONE (1991) verificou que 5mM de iodoacetamida e 0,1 mM e 0,5 mM de p-cloromercuribenzoato não atuaram como inibidores da atividade da CGTase de *Bacillus lentus* determinada pelo método de precipitação de ciclodextrinas (método CD-TCE).

4.6.5- Determinação do peso molecular da CGTase

O peso molecular da CGTase purificada de *Bacillus firmus* n° 324 foi estimado por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS conforme descrito no item 3.8.7. A CGTase purificada de *Bacillus firmus* n° 324 mostrou uma única banda de proteína (Figura 13) com peso molecular de 75.000 daltons (Figura 14).

KITAHATA & OKADA (1982) e MORI et alii (1994) estimaram respectivamente, o peso molecular das CGTases de *Bacillus macerans* e de *Brevibacterium* sp. n° 9065 em 75.000 daltons através de eletroforese em gel de SDS-PAGE.

NAKAMURA & HORIKOSHI (1976b) e NOMOTO et alii (1986) observaram, respectivamente, que os pesos moleculares das CGTases de *Bacillus* sp. ATCC 21783 e *Bacillus* sp. HA 3-3-2 foram de 88.000 e 68.000 daltons, por eletroforese em gel de SDS-PAGE.

Segundo FUJITA et alii (1990), o peso molecular da CGTase de *Bacillus* sp. AL 6 foi estimado em 74.000 daltons por eletroforese SDS-PAGE.

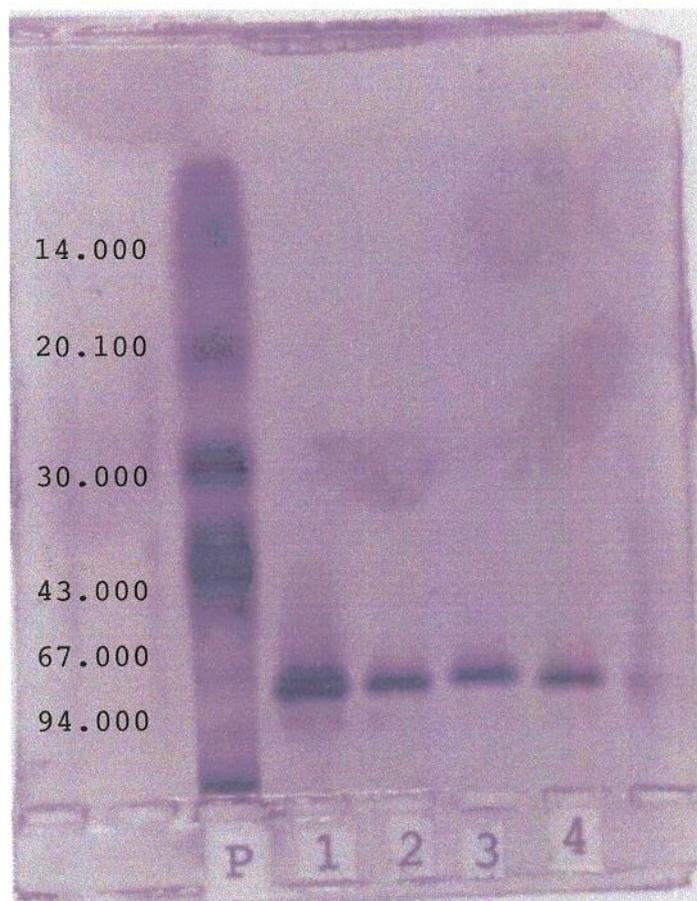


Figura 13 : Eletroforese de CGTase purificada em gel de SDS-poliacrilamida.

P: padrões de proteína : α -Lactoalbumina (14.400 Da.); Inibidor de tripsina (20.100 Da.); Anidrase carbônica (30.000 Da.); Albumina de ovo (43.000 Da.); Albumina de soro bovino (67.000 Da.); Fosforilase b (94.000 Da.).

1,2,3,4 : CGTase purificada de *Bacillus firmus* n° 324

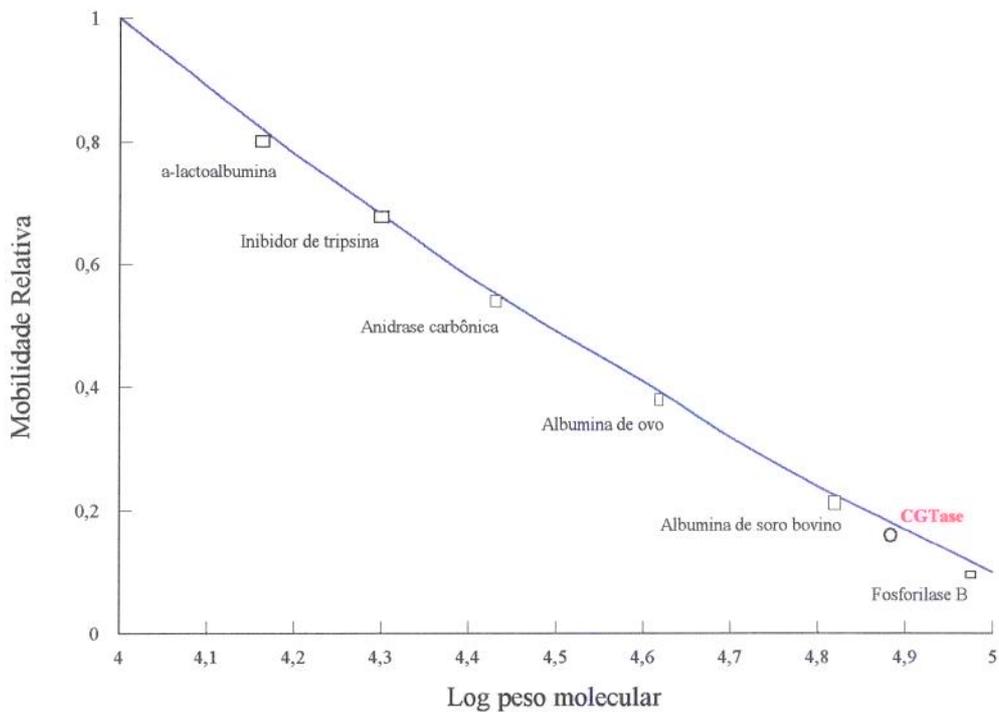


Figura 14 : Determinação do peso molecular da CGTase purificada por eletroforese SDS-PAGE. : α -Lactoalbumina (14.400 Da.); Inibidor de tripsina (20.100 Da.); Anidrase carbônica (30.000 Da.); Albumina de ovo (43.000 Da.); Albumina de soro bovino(67.000 Da.); Fosforilase b (94.000 Da.).

4.7- Estudo da produção de ciclodextrina a partir de amido

4.7.1- Produção de α , β e γ -ciclodextrinas a partir de amido utilizando-se a CGTase de *Bacillus firmus* n° 324

A produção de α , β e γ -ciclodextrinas, a partir de amido, pela CGTase foi estudada de acordo com o descrito no item 3.9.1. A Figura 15 ilustra a produção de α , β e γ -ciclodextrinas na proporção 1:11:5, respectivamente, a partir de amido catalisada pela CGTase de *Bacillus firmus* 324.

KITAHATA & OKADA (1974) relataram que as CGTases das linhagens de *Bacillus megaterium* n° 5 e *Bacillus macerans* IFO 3490 produzem α , β e γ -ciclodextrinas na proporções de 1:2,4:1 e 2,8:1:1, respectivamente.

A enzima CGTase de *Bacillus lentus* descrita por SABIONI & PARK (1992) produziu α , β e γ -ciclodextrinas na proporção de 1:67:1,6, enquanto a linhagem de *Bacillus circullans* estudada por PONGSAWASDI & YAGISAWA (1987) produziu ciclodextrinas na proporção de 1:10,5:0, respectivamente.

A CGTase de *Bacillus firmus* produz γ -ciclodextrina em maior proporção que α e β -ciclodextrinas comparada com as enzimas CGTase produzidas pelas linhagens citadas na literatura. Esta característica é importante por que a γ -ciclodextrina apresenta maior solubilidade em água, e também capacidade de encapsular substâncias de maior tamanho do que em relação a α e β -ciclodextrina.

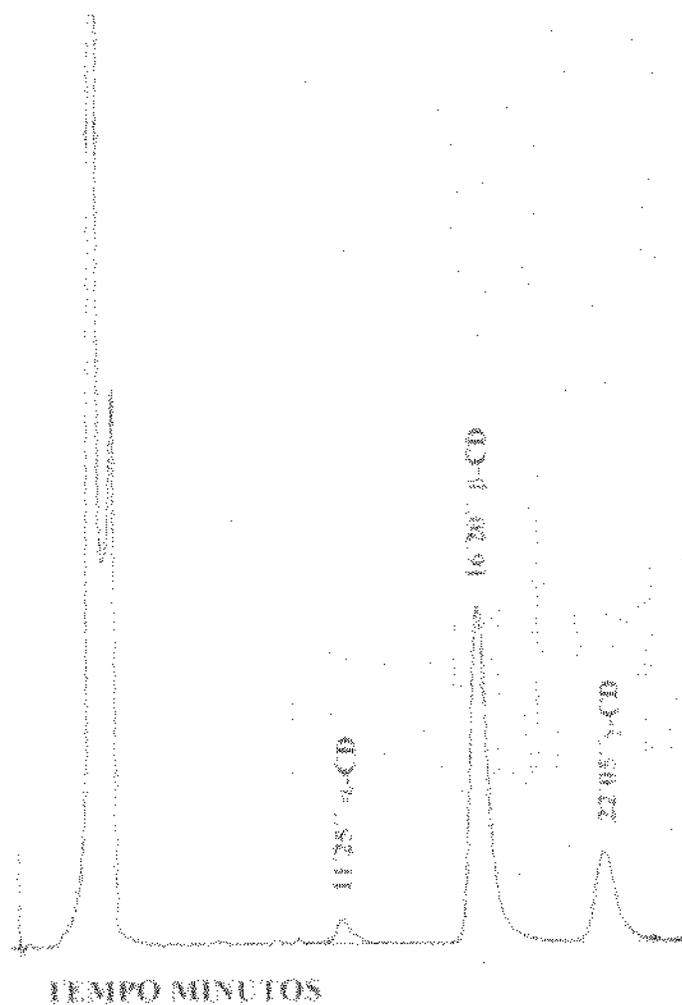


Figura 15 : Cromatograma (CLAE) ilustrando a produção de α , β e γ ciclodextrina a partir de solução 4% de amido solúvel utilizando-se CGTase de *Bacillus firmus* n^o 324.

4.7.2- Estudo do efeito da concentração de substrato e do tempo de reação na produção de ciclodextrina

O efeito da concentração de substrato e do tempo de reação na produção de ciclodextrina foi determinado de acordo com as condições descritas no item 3.9.2. As Figuras 16A, 16B e 16C ilustram, respectivamente a produção de α , β e γ -ciclodextrina em diferentes concentrações de amido solúvel a 65 °C, durante o período de 1 a 9 horas de incubação. Observa-se na Figura 16A que o aumento da concentração de substrato não aumenta significativamente o rendimento de α -ciclodextrina. As Figuras 16B e 16C ilustram, respectivamente, que a produção de β -ciclodextrina (17 mg/ml) e γ -ciclodextrina (7,5 mg/ml) foi máxima utilizando-se 5 % de substrato, amido solúvel, após 7 horas de reação.

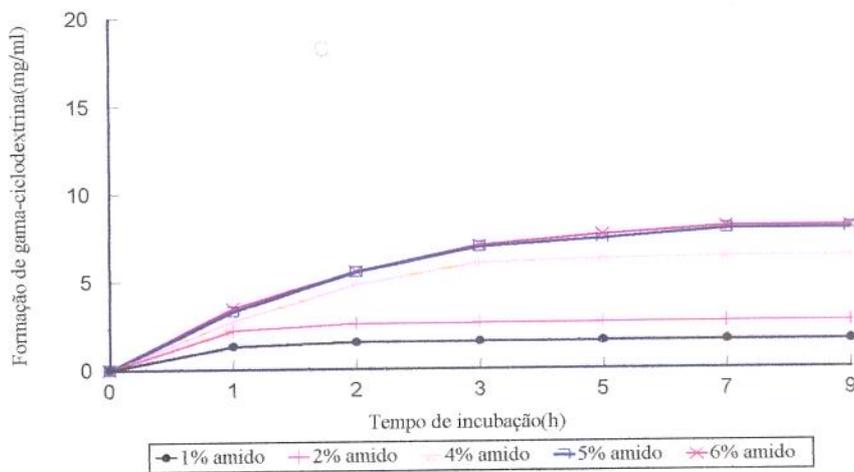
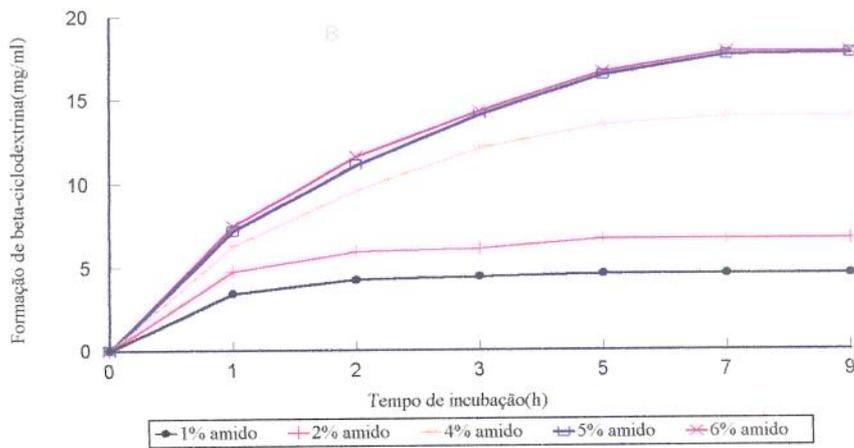
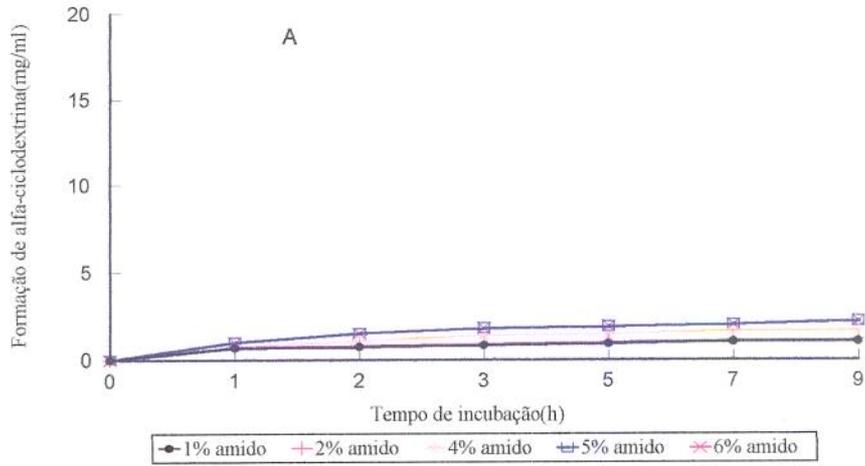


Figura 16 : Efeito da concentração de amido solúvel e do tempo de reação na formação de ciclodextrinas pela CGTase de *Bacillus firmus* n° 324.

4.7.3- Efeito do tempo de reação na produção de ciclodextrinas a partir de amido solúvel a 5%

O efeito do tempo de reação na produção de ciclodextrinas a partir de amido solúvel a 5% (p/v) foi estudado de acordo com o apresentado no item 3.9.3. Observa-se na Figura 17 que a formação de α -ciclodextrina aumentou lentamente com o aumento do tempo de reação atingindo 2 mg/ml após 24 horas de reação, enquanto a formação de β -ciclodextrina atingiu o máximo (17 mg/ml) após 7 horas de reação permanecendo constante até 24 horas de incubação.

O rendimento máximo de β -ciclodextrina a partir de de amido solúvel 5% utilizando-se CGTase *Bacillus firmus* n° 324 foi igual a 32%.

Verificou-se que a formação de γ -ciclodextrina foi máxima (7,5 mg/ml) após 7 horas de incubação diminuindo lentamente após 24 horas de incubação . O rendimento máximo de γ -ciclodextrina a partir de amido solúvel 5% utilizando CGTase do *Bacillus firmus* n° 324 foi 15 %.

Mori et alii (1994) relataram que a produção de γ -ciclodextrina a partir de substrato, 10 % de amido, é industrialmente viável se a mistura de reação contém 10 % de γ -ciclodextrina.

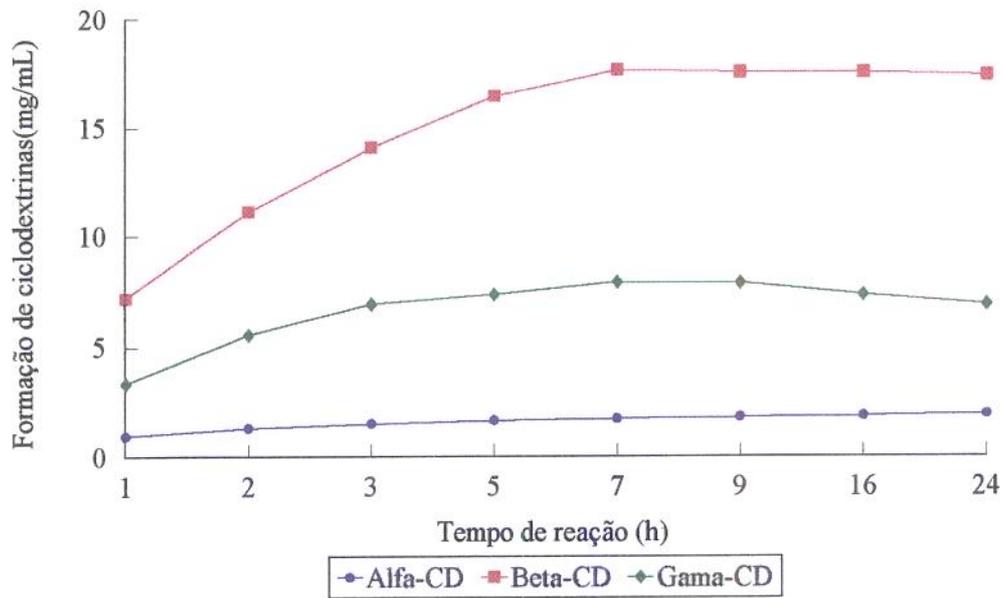


Figura 17 : Efeito de tempo de reação na formação de ciclodextrinas a partir de amido solúvel 5% utilizando-se CGTase de *Bacillus firmus* n° 324.

4.8.1- Estudo da utilização das enzimas amilolíticas, pululanase e isoamilase na produção de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina

A aplicação das enzimas pululanase e isoamilase, na formação de ciclodextrinas ramificadas, foi estudada de acordo com o descrito no item 3.10.5. A Tabela 11 ilustra os resultados obtidos.

Tabela 11. Formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrinas utilizando-se pululanase e isoamilase

Enzima	maltosil- α -CD (mg/ml)	maltosil- β -CD (mg/ml)	maltosil- γ -CD (mg/ml)
pululanase (44 U/ml)	50,4	35	55,8
Isoamilase (44 U/ml)	3,5	2,3	4,3

Observou-se que a pululanase apresenta maior atividade de transferência de unidades maltosil para as ciclodextrinas do que a isoamilase. A adição de resíduos maltosil em α , β e γ -ciclodextrinas catalisada pela pululanase de *Klebsiella* sp. 192 foi maior na seguinte ordem γ , α e β ciclodextrina, estando de acordo com os resultados descritos por HIZUKURI et alii (1989a).

4.8.2- Efeito da concentração de pululanase na formação maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina

O efeito da concentração de pululanase na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina foi determinado de acordo com o apresentado no item 3.10.7. A concentração ótima de pululanase para a formação de ciclodextrinas ramificadas foi 10U/100mg de CD. A Figura 18 ilustra o efeito da concentração de pululanase na formação de ciclodextrinas ramificadas. Foram obtidos 50,4 % , 35 % , e 55,5 % de conversão de α , β , γ -CDs em ciclodextrinas ramificadas usando-se 70 % de substratos maltose : ciclodextrinas na proporção 6:1, respectivamente em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 4,0 após 24 horas de incubação a 50 °C.

ABE et alii (1986) obtiveram formação de maltosil- γ -CD (140 μ mol/min/mg de proteína), maltosil- β -CD (56 μ mol/min/mg de proteína) e maltosil- α -CD (5,7 μ mol/min/mg de proteína) usando 40 mM de cGn, 570 mM de maltose e 8,7 U de isoamilase de *Pseudomonas* para um volume final de 1 ml em tampão acetato 50 mM pH 3,5 após 48 horas de reação a 45 °C.

HIZUKURI et alii (1989a) obtiveram formação máxima de maltosil- γ -CD (230 μ mol/min/mg de proteína), maltosil- α -CD (90 μ mol/min/mg de proteína) e maltosil- β -CD (52 μ mol/min/mg de proteína) usando 40 mM de cGn, 570 mM de maltose e 10,8 U de pululanase de *Klebsiella aerogenes* para um volume final de 1 ml em tampão acetato 50 mM, pH 6,0 a 45°C.

SHIRAISHI et alii (1989c) utilizando pululanase de *Bacillus acidopullulyticus* obtiveram 40% de rendimento de maltosil (α -1,6) α , β e γ -ciclodextrinas a partir de 70 % de substrato maltose: α , β e γ -ciclodextrina

na proporção 15,8 : 1, respectivamente, após 70 horas de incubação em tampão acetato 20 mM pH 4,0 a 60 °C.

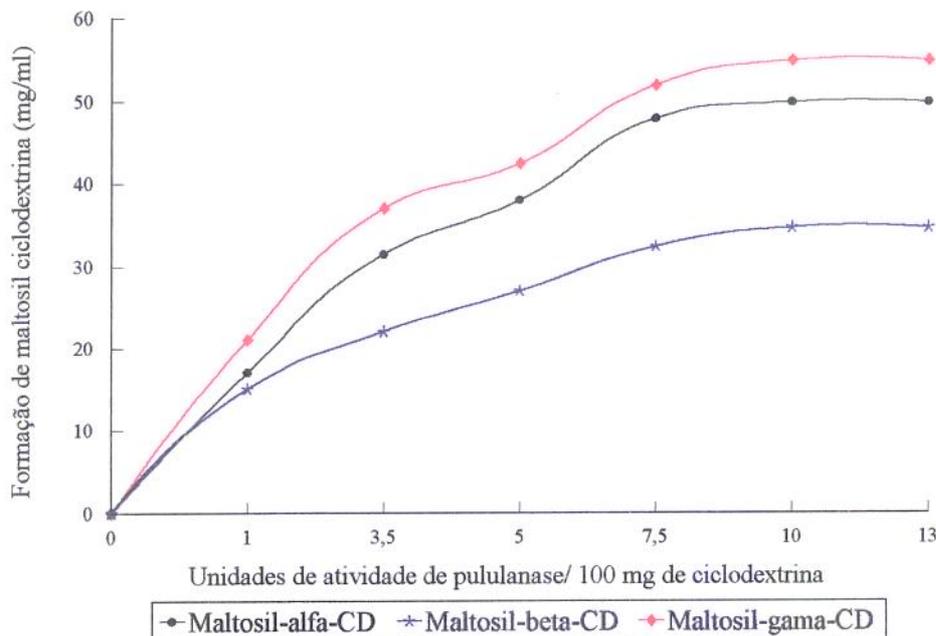


Figura 18 : Efeito da concentração de pululanase na formação de maltosil (α -1,6) α -, β - e γ -ciclodextrinas.

4.8.3- Efeito do tempo de reação na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina utilizando-se pululanase

Para o estudo do efeito do tempo de reação na formação de maltosil- β -CD, utilizou-se a metodologia descrita no item 3.10.8. Verificou-se que a produção máxima de maltosil- β -CD foi atingida após 24 horas de reação, conforme demonstra a Figura 19, onde se obteve aproximadamente 35,5 mg/ml (35,5 %).

HIZUKURI et alii (1989a) constataram maior produção de maltosil- γ -ciclodextrina (29,6 %) usando 0,5 M de γ -ciclodextrina e 1,2 M

de maltose e utilizando 21,6 U de pululanase de *Klebsiella aerogenes* para um volume final de 1 ml em tampão acetato pH 6,0 a 55 °C por 24 horas .

SHIRAIISHI et alii (1989c) observaram produção máxima de maltosil- β -ciclodextrina após 72 horas de reação, utilizando pululanase (100 U/g de CD) de *Bacillus acidopullulyticus* em pH 4,0-4,5 e a 60-70 °C. O rendimento de maltosil- β -CD a partir de substrato 70% de maltose: β -ciclodextrina na proporção 15,8:1 foi 45 %.

Constatou-se, portanto, que o tempo de reação de 24 horas para a produção máxima de maltosil- β -ciclodextrina, obtida neste trabalho, para a pululanase de *Klebsiella* sp., foi menor que os observados na literatura.

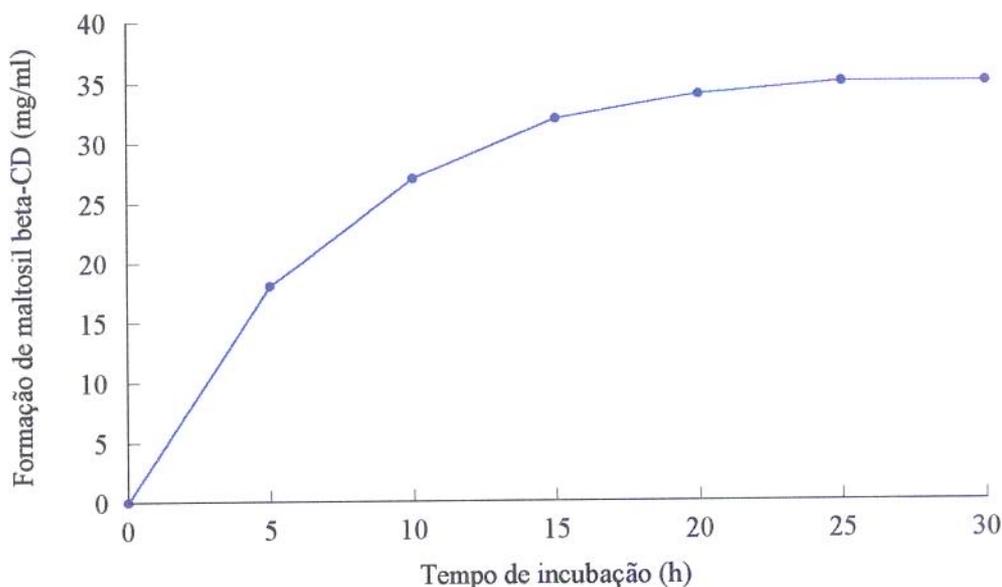


Figura 19 : Efeito do tempo de reação na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina utilizando-se pululanase.

4.8.4- Estudo do efeito do pH na formação da maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina utilizando-se pululanase

Para o estudo do efeito do pH na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina utilizou-se a metodologia descrita no item 3.10.9. Observou-se que a produção máxima de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina catalisada pela atividade de síntese da pululanase foi alcançada em pH 5,0, em tampão citrato-fosfato 50mM, a temperatura de 50 °C, conforme mostra a Figura 20, tendo-se obtido 35,4 % de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina.

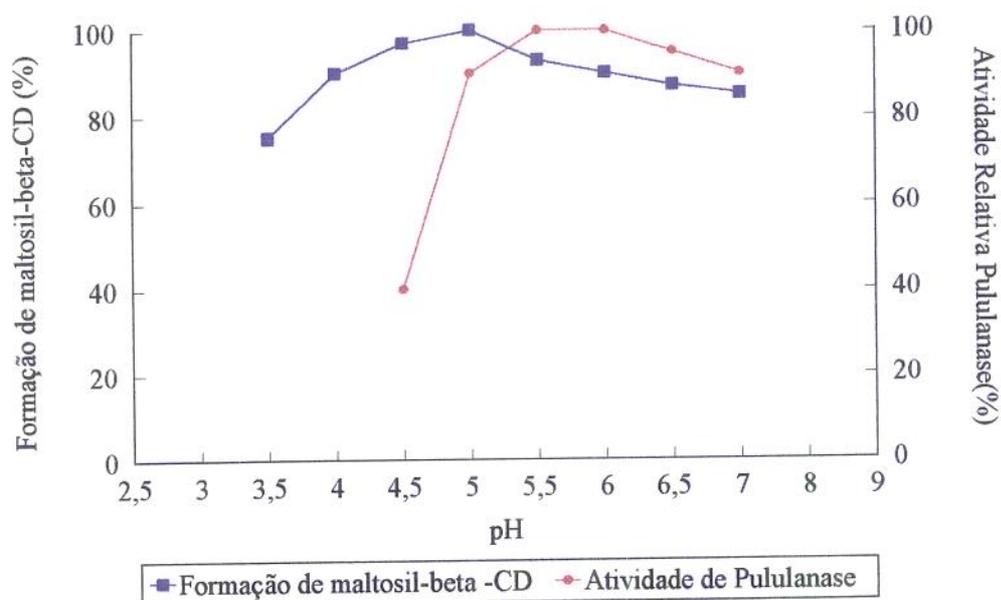


Figura 20 : Efeito do pH na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina utilizando-se pululanase.

ABE et alii (1988) sintetisaram as ciclodextrinas ramificadas através da reação reversa da isoamilase de *Pseudomonas* com ciclodextrinas e maltotriose. Os autores constataram que o pH ótimo para a produção de

maltotriosil (α -1,6) β -ciclodextrina foi na faixa de pH 3,5 a 4,5 após 10 horas de reação a 45 °C. A enzima isoamilase apresentou atividade ótima de hidrólise em pH 3,5.

SHIRAISHI et alii (1989b) constataram que o pH ótimo de formação da maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina, usando a pululanase de *Bacillus acidopullulyticus*, foi na faixa de pH 3,5 a 4,0 após 55 horas de reação a 65°C. Enquanto que a enzima apresentou atividade ótima de hidrólise em pH 5,0.

4.8.5- Estudo do efeito da temperatura na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina utilizando-se pululanase

O estudo do efeito da temperatura na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina foi realizado de acordo com o apresentado no item 3.10.10. Verificou-se que a temperatura ótima de formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina catalizada pela pululanase de *Klebsiella* sp. foi 50 °C e pH 5,0, em tampão citrato-fosfato 50 mM, conforme demonstra a Figura 21.

HIZUKURI et alii (1989a) e SHIRAISHI et alii (1989c) observaram que as temperaturas ótimas de formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina pelas pululanases de *Klebsiella aerogenes* e de *Bacillus acidopullulyticus* foram, respectivamente, de 55 °C e 60-70 °C, enquanto as temperaturas ótimas de atividade de hidrólise foram, respectivamente 50 °C e 65 °C.

ABE et alii (1986) observaram que a temperatura ótima de formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina pela isoamilase de

Pseudomonas foi 60 °C, enquanto que a atividade ótima de hidólise ocorreu a 50 °C.

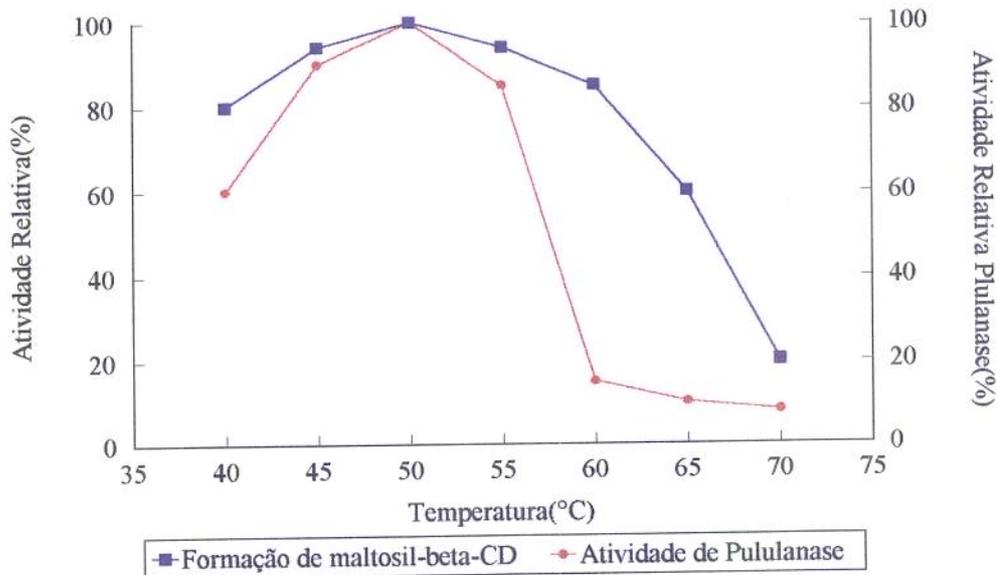


Figura 21 : Efeito da temperatura na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina utilizando-se pululanase.

4.8.6- Efeito da concentração ótima de substrato na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina utilizando-se pululanase

Para o estudo do efeito da concentração ótima de substrato para a formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina, utilizou-se a metodologia descrita no item 3.10.11. Verificou-se que a concentração ótima de substrato para a formação máxima de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina, foi de 70 %, conforme demonstra a Figura 22, tendo-se obtido 35,7 mg/ml de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina.

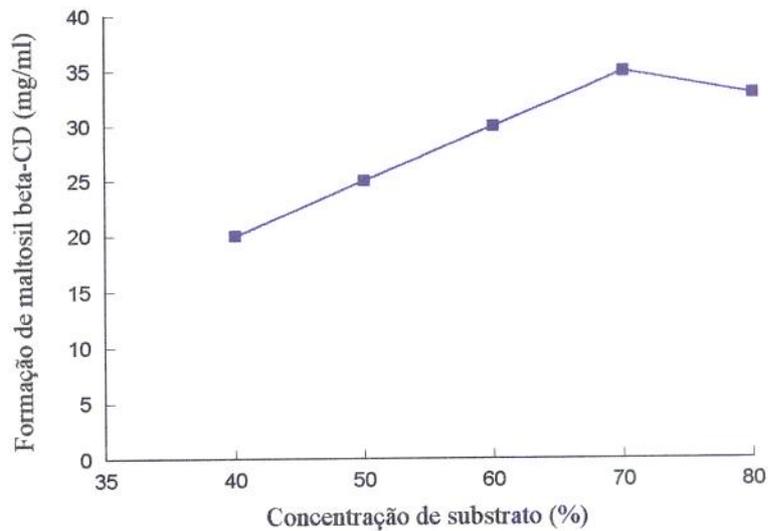


Figura 22 : Efeito da concentração de substrato na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina utilizando-se pululanase.

A figura 23 ilustra a formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina, a partir de 70 % de substrato maltose : β -ciclodextrina, na proporção molar 18,8 : 1, catalisada pela pululanase de *Klebsiella* sp.

SHIRAIISHI et alii (1989c) encontraram que a concentração ótima de substrato, para a produção de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina, foi de 70 a 75 %, utilizando pululanase (100 U/g de β -CD) de *Bacillus acidopullulyticus* a 60°C, durante 72 horas.

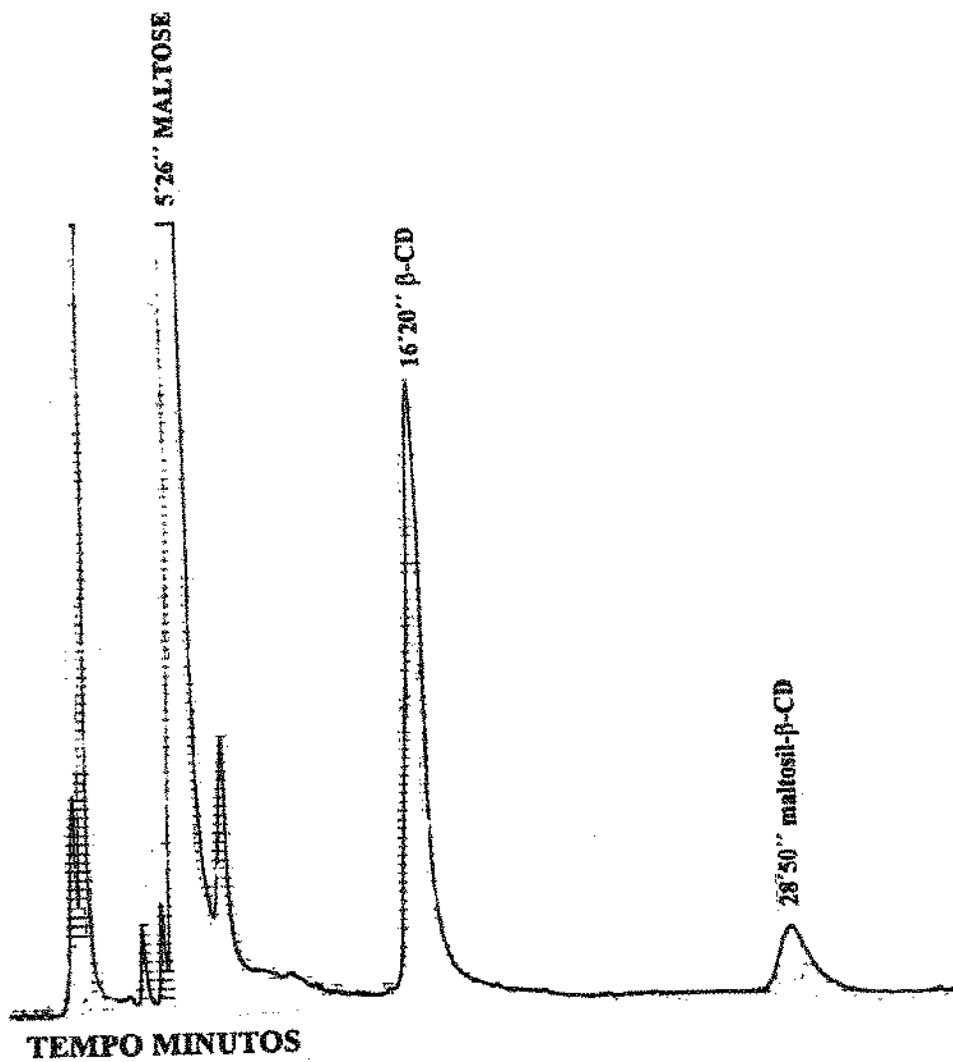


Figura 23 : Cromatograma (CLAE) ilustrando a formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina a partir de 70 % de maltose : β -ciclodextrina na proporção molar 18,8 : 1, catalisada pela pululanase.

4.8.7- Relação entre a proporção molar de maltose : β -ciclodextrina e a formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina

Utilizando-se a concentração ótima de substrato de 70 % conforme resultado obtido no item 4.3.6, procedeu-se o estudo da relação entre a

proporção molar de maltose e β -ciclodextrina na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina, de acordo com a metodologia descrita no item 3.10.12.

Verificou-se que a proporção molar ótima de maltose : β -ciclodextrina foi de 18,8 : 1, que corresponde a 600 mg de maltose e 100 mg de β -ciclodextrina conforme mostra a Figura 24. Utilizando-se de substratos esta proporção foi obtido 35,5 mg de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina.

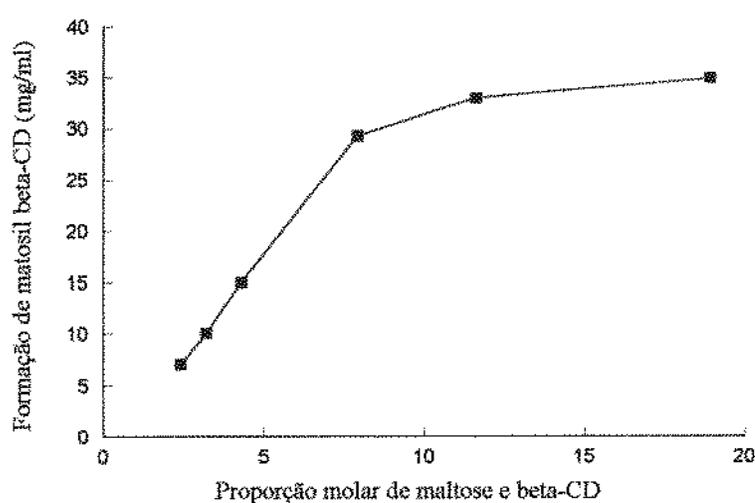


Figura 24 : Efeito da proporção molar de maltose e β -CD na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina utilizando-se pululanase.

As misturas de 70 % de substrato maltose/ β -CD em diferentes proporções molares, 10 unidades de pululanase em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 5,0 foram incubadas a 50 °C por 24 horas.

SHIRAIISHI et alii (1989c) obtiveram uma proporção molar ótima de maltose : β -ciclodextrina que variou de 15,8 : 1 a 20 : 1 na formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina, utilizando-se pululanase (100 U/g de β -CD) de *Bacillus acidopullulyticus* a 60 °C, por 72 horas.

5. CONCLUSÕES

- 1) O microrganismo alcalofílico produtor de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) isolado do solo de cultivo de milho, estudado neste trabalho foi identificado como *Bacillus firmus*.
- 2) A produção máxima de CGTase de *Bacillus firmus* n° 324 em meio de cultura composto de 1 % amido solúvel, 5 % água de maceração de milho (p/v), 0,1 % K_2HPO_4 , 0,02 % $MgSO_4$, 1 % $CaCO_3$, foi obtida após 16 horas de fermentação a 40 °C.
- 3) A CGTase foi purificada 90 vezes através de ultrafiltração em membrana (30.000 daltons), cromatografia em colunas de DEAE-Sephadex e DEAE-Sepharose CL-6B.
- 4) A CGTase purificada apresentou atividade ótima de formação de ciclodextrinas na faixa de pH 7,5-8,5 em tampão Tris-HCl (0,05M) a 65 °C.
- 5) A formação máxima de ciclodextrina utilizando CGTase de *Bacillus firmus* n° 324 foi obtida a partir de amido solúvel 5 % em pH 8,0 a 40 °C após 7 horas de reação.
- 6) A atividade da CGTase não foi afetada pela presença de $MgSO_4$, KCl e $CaCl_2$, porém foi fortemente inibida pelos sais $HgCl_2$ e $ZnSO_4$ na concentração 1 mM em relação ao volume final da mistura de reação. Os reagentes EDTA, p-hidroximercuribenzoato, β -mercaptoetanol e bromosuccinimida na concentração 5 mM não inibiram a atividade da CGTase para a produção de ciclodextrina.

- 7) O peso molecular da CGTase foi estimado em 75.000 daltons através da técnica de eletroforese SDS-PAGE.
- 8) A CGTase de *Bacillus firmus* n° 324 produziu α , β e γ -ciclodextrinas na proporção de 1:11:5, respectivamente.
- 9) A formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina a partir de maltose e β -ciclodextrina, utilizando-se a pululanase foi ótima em pH 5,0 e a 50 °C após 24 horas de reação.
- 10) A formação de maltosil (α -1,6) β -ciclodextrina foi ótima utilizando-se substratos na concentração 70 % e na proporção molar de maltose : β -ciclodextrina 18.8 : 1, respectivamente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABE, J. I. ; TAKEDA, Y. ; HIZUKURI, S. ; YAMASHITA, K. ; IDE, N. Isolation and characterisation of 6- α -D-glucosylcyclomaltoheptaose. **Carbohydrate Research**, v. 131, p. 175-179, 1984.
2. ABE, J. I. ; MIZOWAKI, N. ; HIZUKURI, S. Synthesis of branched cyclomalto-oligosaccharides using *Pseudomonas* isoamylase. **Carbohydrate Research**, v. 154, p. 81-92, 1986.
3. ABE, J. ; HIZUKURI, S. Enzymic synthesis of doubly branched cyclomaltoheptaose through the reverse action of *Pseudomonas* isoamylase. **Carbohydrate Research**, v. 176, p. 87-95, 1988.
4. ABELYAN, V. A. ; CHU, D. C. ; YAMAMOTO, T. Production of cyclodextrins from rice bran. **Applied Biochemistry and microbiology**, V. 31 (4), p. 453-457, 1995.
5. BOVETTO, L. J. ; VILLETTE, J. R. ; FONTAINE, I. F. ; SICARD, P. J. ; BOUQUELET, S. J. L. Cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* E 192. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 5, p. 59-68, 1992.
6. CARTER, J. H. ; LEE, E. Y. Adsorption chromatography of Schardinger dextrins on Sephadex G-15. **Analytical Biochemistry**, v. 39, p. 521-542, 1971.

7. COLLINS, M. D. ; JONES, D. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. **Microbiological Reviews**, v. 45 (2), p. 316-354, 1981.
8. FRENCH, D. ; RUNDLE, R. E. The molecular weights of the Schardinger alpha and beta dextrins. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 64, p. 1651-1653, 1942.
9. FRENCH, D. ; PAZUR, J. ; LEVINE, M. L. ; NORBERG, E. Reversible action of macerans amylase. **THIS JOURNAL**, v. 70 p. 3145, 1948.
10. FRENCH, D. ; LEVINE, M. L. ; PAZUR, J. H. ; NORBERG, E. Studies on the schardinger dextrins. The preparation and solubility characteristics of alpha, beta e gamma dextrins. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 71, p. 353-358, 1949.
11. FRENCH, D. ; KNAPP, D. W. ; PAZUR, J. H. Studies on the Schardinger dextrin. VI. The molecular size and structure of the γ -dextrin. **J. Am. Chem. Soc.**, v.72, p. 5150-5152, 1950.
12. FRENCH, D. ; LEVINE, M. L. ; NORBERG, E. ; NORDIN, P. ; PAZUR, J. H. ; WILD, G. M. Studies on the Schardinger dextrins. VII. Co-substrate specificity in coupling reactions of *Macerans* amylase. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 76, p. 2387-2390, 1954.
13. FRENCH, D.; PULLEY, A.O.; EFFENBERGER, J.A.; ROUGVIE, M.A.; ABDULLAH, M. Studies on Schardinger dextrins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 111, p. 153-160, 1965.

14. FUJITA, Y. ; TSUBOUCHI, H. ; INAGI, Y. ; TOMITA, K. ; OZAKI, A. ; NAKANISHI, K. Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus* sp. AL-6. **J. Fermentation and Bioengineering**, v. 70 p. 150-154 1990.
15. FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. **J. Biochem.**, v. 41, p. 583-603, 1954.
16. GOEL, A. ; NENE, S. A novel cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus* that degrades raw starch. **Biotechnology Letters**, v. 17 (4), p. 411-416, 1995.
17. GORDON, R. E. ; HYDE, J. L. The *Bacillus firmus*-*Bacillus lentus* complex and pH 7,0 variants of some alkalophilic strains. **J. Gen. Microbiology**, v. 128, p. 1109-1116, 1982.
18. HARA, K. ; FUJITA, K. ; KUWAHARA, N. ; TANIMOTO, T. ; HASHIMOYO, H. ; KOIZUMI, K. ; KITAHATA, S. Galactosylation of cyclodextrins and branched cyclodextrins by α -galactosidases. **Biosic. Biotech. Biochem.**, v. 58, p. 652-659, 1994.
19. HARADA, S. ; OKADA, J. ; TAKEDA, M. ; YAMAZAKI, T. Inclusion compounds of lamkacidin-group antibiotics with cyclodextrins. **The Journal of Antibiotics**, v. p. 877-885, 1985.

20. HESS, A. ; HOLLANDER, R. ; MANNHEIM, W. Lipoquinones of some spore-forming rods, lactic-acid bacteria and actinomycetes. **J. Gen. Microbiology**, **SHORT COMMUNICATION**, P.247-252, 1979.
21. HISAMATSU, M. ; YAMADA, T. Production of maltosil β -cyclodextrin by a bioreactor system with pullulanase immobilized on partially deacetylated chitin. **Starch/stärke**, v. 6, p. 239-242, 1989.
22. HIZUKURI, S.; KAWANO, S.; ABE, J. I. ; KOIZUMI, K. ; TANIMOTO, T. Production of branched cyclomaltooctaoses through the reverse action of *Klebsiella aerogenes* pullulanase. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 11, p. 60-73, 1989a.
23. HIZUKURI, S. ; ABE, J. ; KOIZUMI, K. ; OKADA, Y. ; KUBOTA, Y. Hydrolysis and synthesis of branched cyclomaltohexaoses with *Pseudomonas* isoamylase. **Carbohydrate Research**, v. 185, p. 191-198, 1989b.
24. HORIKOSHI, K. Production and industrial application of β -cyclodextrin. **Process Biochemistry**, v. 14 p. 26-30, 1979.
25. KAINURA, K. ; KOBAYASHI, S. ; HARADA, T. Action of *Pseudomonas* isoamylase on various branched oligo- and polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 61, p. 345-357, 1978.
26. KITAHATA, S. ; TSUYAMA, N. ; OKADA, S. Purification and some properties of cyclodextrin glycosyltransferase from a strain of *Bacillus* species. **Agric. Biol. Chem.**, v. 38, p. 387-393, 1974.

27. KITAHATA, S. ; OKADA, S. Action of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus megaterium* strain n°5 on starch **Agric. Biol. Chem.**, v. 38, p. 2413-2417, 1974.
28. KITAHATA, S. ; OKADA, S. Transfer action of cyclodextrin glycotransferase on starch. **Agric. Biol. Chem.**, v. 39, p. 2185-2191, 1975.
29. KITAHATA, S.; OKADA, S. ; FUKUI, T. Acceptor specificity of the transglycosylation catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase. **Agric. Biol. Chem.**, v. 42, p. 2369-2374, 1978.
30. KITAHATA, S. ; OKADA, S. Purification and some properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* TC-60. **J. Jap. Soc. Starch Sci.**, v. 29, p. 7-12, 1982.
31. KITAHATA, S. ; YOSHIMURA, Y. ; OKADA, S. Formation of 6-o- α -maltosylcyclomalto-oligosaccharides from α -maltosyl fluoride and cyclomalto-oligo-saccharides by pullulanase. **Carbohydrate Research**, v. 159, p. 303-313, 1987.
32. KOBAYASHI, S. ; KAINUMA, K. ; SUZUKI, S. Purification and some properties of *Bacillus macerans* cycloamylose (cyclodextrin) glucanotransferase. **Carbohydrate Research**, v.61 p.229-238, 1978.
33. KOIZUMI, K. ; UTAMURA, T. ; SATO, M. ; YAGI, Y. Isolation and characterization of branched cyclodextrins. **Carbohydrate Research**, v. 153, p. 55-67, 1986.

34. KOIZUMI, K. ; OKADA, Y. ; KUBOTA, Y. ; UTAMURA, T. Inclusion complexes of poorly water-soluble drugs with glucosyl-cyclodextrins. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 35, p. 3413-3418, 1987.
35. KOIZUMI, K. ; OKADA, Y. ; FUJIMOTO, E. ; TAKAGI, Y. ; ISHIGAMI, H. ; ARA, K. ; HASHIMOTO, H. Separation and characterization of three positional isomers of dimaltosyl-cyclomaltoheptaose (dimaltosyl- β -cyclodextrin). **Chem. Pharm. Bull.**, v. 39 (8) p. 2143-2145, 1991.
36. KOMAGATA, K. & SUZUKI, K. I. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. In:COLWELL, R. R. & GRIGOROVA, R. **Methods in Microbiology.**, v. 19, Academic Press, London, p. 161-207, 1987.
37. KONNO, A. ; MIYAWAKI, M. ; MISAKI, M. ; YASUMATSU, K. Bitterness reduction of citrus fruits by β -cyclodextrin **Agric. Biol. Chem.**, v. 45, p. 2341-2342, 1981.
38. LAMMERS, J. N. J. J. Reproducible separation of α - and β -cyclodextrin on charcoal columns. **J. Chromatog.**, v. 41 p.462-466, 1969.
39. LEE, Y. D. ; KIM, H. S. Enhancement of enzymatic production of cyclodextrins by organic solvents. **Enzyme Microb.**, v. 13, p. 499-503, 1991.

40. LOWRY, O. H. ; ROSEBROUGH, N. J. ; FARR, A. L. ; Randall, R. J.
Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 93, p. 265-275, 1951.
41. MATZUZAWA, M. ; KAWANO, M. ; NAHAMURA, N. ; HORIKOSHI, K.
An improved method for the the schrdinger β -dextrin on a industrial scale by cyclodextrin glycosyl transferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. (ATCC 21783). **Die Stärke**, v. 12, p. 410-413, 1975.
42. McCLENAHAN, W. S. ; TILDEN, E. B. ; HUDSON, C. S. A study of the products obtained from starch by the action of the amylase of *Bacillus macerans*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 64, p. 2139-2144, 1942.
43. MORI, S. ; HIROSE, S., OYA, T. ; KITAHATA, S. Purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp. n° 9605. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 58, p. 1968-1972, 1994.
44. MORI, S. ; GOTO, M. ; mASE, T. ; MATSUURA, A. ; OYA, T. ; KITAHATA, S. Reaction conditions for the production of γ -cyclodextrin by cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp. n° 9605. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 59 (6), p. 1012-1015, 1995.
45. MURAMATSU, Y. ; TAKAHASHI, K. ; NAKAMURA, N. Characterization of a maltogenic amylase of *Thermommonospora viridis* and application in branched cyclodextrin producton. **Starch**, v. 45, p. 99-103, 1993.

46. NAKAMURA, N. ; HORIKOSHI, K. Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase-producing alkalophilic *Bacillus* sp.. **Agric. Biol. Chem.**, v. 40, p. 753-757, 1976a.
47. NAKAMURA, N. ; HORIKOSHI, K. Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp.. **Agric. Biol. Chem.**, v. 40, p. 935-941, 1976b.
48. NOMOTO, M. ; SHEW, D.-C. ; CHEN, S.-J. ; YEN, T.-M. ; LIAO, C.-W. ; YANG, C.-P. Cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic bacteria of Taiwan. **Agric. Biol. Chem.**, v. 48, p. 1337-1338, 1984.
49. NOMOTO, M. ; CHEN, C. C. ; SHEU, D. C. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic bacterium of Taiwan. **Agric. Biol. Chem.**, v. 50, p. 2701-2707, 1986.
50. NORBERG, E. ; FRENCH, D. Studies on the Schardinger dextrans. III. Redistribution reactions of *Macerans* amylase. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 72, p. 1202-1205, 1950.
51. OKADA, Y. ; KUBOTA, Y. ; KOIZUMI, K. ; HIZUKURI, S. ; OHFUJI, T. ; OGATA, K. Some properties and the inclusion behavior of branched cyclodextrins. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 36, p. 2176-2185, 1988.
52. OKADA, Y. ; KOIZUMI, K. ; KITAHATA, S. Separation and characterization of five positional isomers of trimaltosyl-cyclomaltoheptaose. **Carbohydrate Research**, v. 254, p. 1-13, 1994.

53. PARK, C. S. ; PARK, K. H. ; KIM, S. H. A rapid screening method for alkaline β -cyclodextrin glucanotransferase using phenolphthalein-methyl orange-containing-solid medium. **Agric. Biol. Chem.**, v. 53, p. 1167-1169, 1989.
54. PONGSAWASDI, P. ; YAGISAWA, M. Screening and identification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing bacteria. **J. Ferment. Technol.**, v. 65, p. 463-467, 1987.
55. PONGSAWASDI, P. ; YAGISAWA, M. Purification and some properties of cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans*. **Agric. Biol. Chem.**, v. 52, p. 1099-11003, 1988.
56. PSZCZOLA, D. E. Production and potencial food applications of cyclodextrins. **Food technology**, v. 42, p. 96-100, 1988.
57. SABIONI, J. G. Produção e caracterização da ciclodextrina glicosiltransferase do *Bacillus lentus* alcalofilico. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1991.
58. SABIONI, J. G. ; PARK, Y. K. Production and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus lentus*. **Starch/Stärke**, v. 44, p. 225-229, 1992.
59. SAKANO, Y. ; SANO, M. ; KOBAYASHI, K. Preparation and enzymatic hydrolysis of maltosyl- α -cyclodextrin. **Agric. Biol. Chem.**, v. 49, p. 3391-3398, 1985.

60. SATO, H. H. Produção, purificação e estudos das propriedades da isoamilase de *Flavobacterium* sp.. Tese (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1979.
61. SATO, H. H. ; PARK, Y. K. Purification and characterization of extracellular isoamilase from *Flavobacterium* sp. **Starch**, v. 32 p. 132-136, 1980.
62. SATO, H. H. Estudo das características bioquímicas da pululanase de *Klebsiella* sp. e sua aplicação. Tese. (Doutorado em Ciências dos Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1991.
63. SATO, M. ; YAGI, Y.; NAGANO, H.; ISHIKURA, T. Determination of CGTase from *Bacillus ohbensis* and its optimum pH using HPLC. **Agric. Biol. Chem.**, v. 49, p. 1189-1191, 1985.
64. SCHARDINGER, F. *Bacillus mascerans*, ein acetone bildender rottebacillus. **Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskrankh. Hyg. Abt. v. 14**, p. 772, 1904.
65. SHAW, P. ; Tatum, J. H. ; WILSON, C. W. Improved flavor of navel orange and grapefruit juice by removal of bitter components with β -cyclodextrin polymer. **J. Agric. Food Chem.**, v.32, p.832-836, 1984.
66. SHAW, P. ; WILSON C. Reduction of bitterness in grapefruit juice with β -cyclodextrin polymer in a continuous-flow process. **J. Food Science**, v. 50, p. 1205-1207, 1985.

67. SHAW, P. E. ; BUSLIG, B. Selective removal of bitter compounds from grapefruit juice and from aqueous solution with cyclodextrin polymers and with amberlite. *J. Agric. Food Chem.*, v. 34, p. 837-840, 1986.
68. SHIRAISHI, F. ; KAWAKAMI, K. ; MARUSHIMA, H. ; KUSUNOKI, K. Effect of ethanol on formation of cyclodextrin from soluble starch by *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase. *Starch*, v. 41, p. 151-155, 1989a.
69. SHIRAISHI, T. ; FUJIMOTO, D. ; SAKANO, Y. Synthesis of branched α -cyclodextrin carrying a side chain longer than maltose using *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase. *Agric. Biol. Chem.*, v. 53, p. 3093-3095, 1989b.
70. SHIRAISHI, T. ; KUSANO, S. ; TSUMURAYA, Y. ; SAKANO, Y. Synthesis of maltosyl (α , 1-6) cyclodextrins through the reverse reaction of thermostable *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase. *Agric. Biol. Chem.*, v. 53, p. 2181-2188, 1989c.
71. SNEATH, P. A. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. in: SNEATH P. H. ; MAIR, N. S. ; SHARPE, M. E. ; HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, v. 12, p. 1104-1141, 1986.
72. SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, v. 160, p. 61-68, 1945
73. STARNES, R. L. Industrial potential of cyclodextrin glycosyl transferases. *Cereal Foods World*, v. 35, p. 1094-1099, 1990.

74. SZEJTLI, J. ; SEBESTYÉN, G. Resorption, metabolism and toxicity studies on the peroral application of beta-cyclodextrin. *Starch*, v. 31, p. 385-389, 1979.
75. SZEJTLI, J. Cyclodextrins in food, cosmetics and toiletries. *Starch/stärke*, v.34, p.379-385, 1982.
76. TAKANO, T. ; FUKUDA, M. ; MONMA, M. ; KOBAYASHI, S. ; KAINUMA, K. ; YAMANE, K. Molecular cloning, DNA nucleotide sequencing, and expression in *Bacillus subtilis* cells of the *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase gene. *J. Bacteriol.*, v. 166 (3), p. 1118-1122, 1986.
77. TAKASAKI, Y. Productions and utilizations of β -amilase and pullulanase from *Bacillus cereus var. mycoides*. *Agric. Biol. Chem.*, vol. 40(8), p. 1515-1522, 1976.
78. TINDEN, E. B. ; HUDSON, C. S. Preparation and properties of teh amylases produced by *Bacillus macerans* and *Bacillus polumixa*. *J. Bacteriol.*, v. 43 p. 527-544.
79. TOMITA, K. ; TANAKA, T. ; FUJITA, Y. ; NAKANISHI, K. Some factors affecting the formation of γ -cyclodextrin using cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus* sp. AL-6. *J. Fermentation and Bioengineering*, v. 70 (3), p. 190-192, 1990.

80. UEDA, S. ; OHBA, R. Purification, crystallization and some properties of extracellular pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. *Agric. Biol. Chem.*, v. 36, p. 2381-2391, 1972.
81. WEBER, K. ; OSBORN, M. J. The reability of molecular weight determination by dodecyl sulphate-polyacrilamida gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, v. 244, p. 4406-4412, 1969.
82. YAMADA, Y. ; INOUYE, G. ; TAHARA, Y. ; KONDO, K. The menaquinone system in the classification of aerobic gram-positive cocci in the genera *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Planococcus*, and *Sporosarcina*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, v, 22, p. 227-236.
83. YOSHIMURA, Y. ; KITAGATA, S. ; OKADA, S. Effects of temperature on 6-O- α -maltosyl cyclodextrin production from α -maltosylfluoride and cyclodextrins. *Agric. Biol. Chem.*, v.52(7), p.1655-1659, 1988.
84. YU, E. K. C.; AOKI, H. ; MISAWA, M. Specific alpha-cyclodextrin production by a novel thermostable cyclodextrin glycosyltransferase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 28, p. 377-379, 1988.
85. YU, E. K. C. Novel decaffeination process using cyclodextrins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 28, p. 546-552, 1988.
86. ZSADON, B. ; SZILASI, M. ; SZEJTLI, J. ; SERES, S. ; TUDOS, T. Chromatography of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrin on dextran gel columns. *Starch*, v. 30, p. 276-279, 1978.