

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA CICLODEXTRINA
GLICOSILTRANSFERASE DO BACILLUS LENTUS ALCALOFÍLICO

Por: JOSÉ GERALDO SABIONI

Orientador: Prof. Dr. YONG KUN PARK †

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

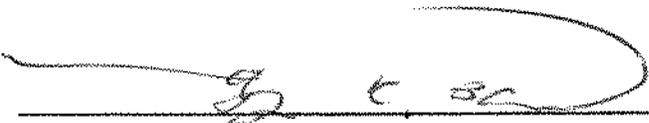
Parecer

Este exemplar corresponde a *recolha final*
da tese defendida CAMPINAS - S.P.
por José Geraldo Sabioni 1991
e aprovada pela Comissão
Julgadora em 26.09.91.

[Assinatura]

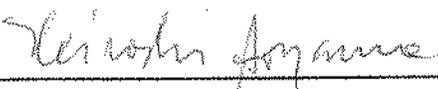
26.09.91

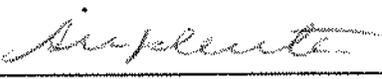
BANCA EXAMINADORA

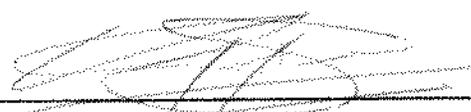

Prof. Dr. YONG KUN PARK
(orientador)

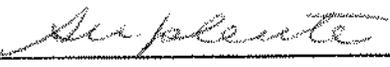

Profª Dra. LÚCIA REGINA DURRANT
(membro)


Profª Dra. IRACEMA DE OLIVEIRA MORAES
(membro)


Prof. Dr. HIROSHI AOYAMA
(membro)


Prof. Dr. CÉSAR FRANCISCO CIACCO
(membro)


Prof. Dr. FRANCISCO MAUGERI FILHO
(membro)


Prof. Dr. TOBIAS JOSÉ BARRETO DE MENEZES
(membro)

Campinas, 26 de setembro de 1991

AGRADECIMENTOS

Aos professores do Depto de Nutrição da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto(UFOP), que assumiram minhas atividades, permitindo meu afastamento para a realização deste curso.

Ao Prof. Yong Kun Park, pelos ensinamentos e a orientação dedicada.

Ao Depto de Ciência dos Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, pela oportunidade de realizar este curso.

À CAPES - PICD, pela bolsa de estudo.

À Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos - ABIA, pelo fornecimento das cópias desta tese.

A todos os funcionários e professores da FEA, do Laboratório de Bioquímica, e aos colegas de Pós-graduação, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

À memória de meu pai
à minha querida mãe
à memória do meu irmão Gustavo
aos demais irmãos, esposa e filho
a todos os meus amigos
dedico este trabalho.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xi
1) INTRODUÇÃO.....	1
2) REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1) Ciclodextrinas: definição e histórico.....	3
2.2) Características químicas e físicas das ciclodextrinas.....	5
2.3) Mecanismo de ação da CGTase.....	11
2.4) Características de CGTases e dos microrganismos produtores.....	15
2.5) Efeito do cálcio.....	20
2.6) Fatores que afetam a produção de ciclodextrinas.....	20
2.7) Procedimentos para formação e dissociação dos complexos de inclusão.....	22
2.8) Metabolismo e toxicidade das ciclodextrinas.....	22
2.9) Aplicações das ciclodextrinas.....	24
3) MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1) Isolamento do microrganismo alcalofílico produtor de CGTase.....	30

3.2) Métodos de determinação da atividade de CGTase.....	31
3.3) Produção e quantificação da CGTase dos microrganismos isolados.....	33
3.4) Avaliação da capacidade de produção de CGTase em pH 7,2.....	34
3.5) Estudos taxonômicos dos microrganismos isolados.....	35
3.6) Efeito da temperatura sobre o crescimento microbiano e produção da CGTase.....	35
3.7) Estudo do efeito de diversas fontes de carbono e nitro- gênio sobre a produção de CGTase.....	36
3.8) Produção e fracionamento da CGTase.....	37
3.8.1) Produção da CGTase.....	37
3.8.2) Fracionamento com sulfato de amônio.....	39
3.8.3) Fracionamento em coluna de DEAE-celulose.....	39
3.8.4) Fracionamento em coluna de CM-celulose.....	40
3.9) Caracterização bioquímica da CGTase purificada.....	40
3.9.1) Efeito do pH.....	41
3.9.2) Estabilidade ao pH.....	42
3.9.3) Efeito da temperatura na atividade enzimática.....	43
3.9.4) Estabilidade térmica.....	43
3.9.5) Efeito do CaCl_2 e EDTA na termoestabilidade da atividade dextrinizante e formação de ciclodextrinas da enzima CGTase.....	44
3.9.6) Efeito de íons e inibidores.....	45
3.9.7) Determinação do peso molecular da CGTase.....	45
3.10) Efeito da concentração da CGTase na formação de ciclodextrinas.....	45

3.11)	Determinação da proporção entre os tipos de ciclo- dextrinas formadas durante a hidrólise do amido pela enzima CGTase.....	47
3.12)	Efeito do tipo de carboidrato sobre a formação de ciclodextrinas.....	48
3.13)	Efeito de co-substratos sobre a atividade dextrinizan- te e formação de ciclodextrinas.....	48
3.14)	Obtenção da CGTase bruta em meio de cultura industrial.....	49
3.15)	Efeito da concentração da CGTase bruta na produção de ciclodextrinas.....	50
4)	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1)	Isolamento e caracterização dos microrganismos CGTases positivos.....	51
4.2)	Efeito da temperatura sobre a produção de CGTase.....	60
4.3)	Efeitos das fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção da CGTase.....	60
4.4)	Purificação da CGTase.....	66
4.4.1)	Precipitação com sulfato de amônio.....	66
4.4.2)	Cromatografia da CGTase em coluna de DEAE-celulose.....	67
4.4.3)	Cromatografia da CGTase em coluna de CM-celulose.....	67
4.5)	Características gerais da enzima purificada.....	70
4.5.1)	Efeito do pH.....	70
4.5.2)	Efeito da temperatura.....	72
4.5.3)	Efeito do CaCl_2 e do EDTA.....	76
4.5.4)	Efeito de íons e inibidores.....	80

4.6) Efeito da concentração da CGTase na formação de ciclodextrinas.....	81
4.7) Proporção de formação de ciclodextrinas pela CGTase.....	84
4.8) Formação de ciclodextrinas a partir de vários carboidratos.....	86
4.9) Efeito de co-substratos.....	88
4.10) Peso molecular da CGTase.....	89
4.11) Estudo da produção da CGTase em meio de cultura industrial.....	91
4.12) Produção de ciclodextrinas com a CGTase bruta.....	91
5) CONCLUSÕES.....	93
6) LITERATURA CITADA.....	95

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela		Página
1	Propriedades físicas das ciclodextrinas.....	5
2	Variações das fontes de carbono introduzidas no Meio A.....	37
3	Variações das fontes de nitrogênio introduzidas no Meio A.....	38
4	Frequência de microrganismos alcalofílicos CGTases positivos, de acordo com a origem da amostra analisada.....	52
5	Frequência de microrganismos alcalofílicos CGTases positivos, em relação à população total de microrganismos alcalofílicos.....	53
6	Avaliação da capacidade de produção de CGTase dos isolados alcalofílicos, através do método CD-TCE (NOMOTO e col., 1984).....	56
7	Repetição da avaliação da capacidade de produção de CGTase, pelos isolados alcalofílicos que apresentaram atividade enzimática em diluição maior ou igual a 2^7 , pelo método CD-TCE (NOMOTO e col., 1984).	57
8	Isolamento de linhagens variantes dos alcalofílicos com capacidade de crescimento em PH 7,2.....	57

9	Verificação da capacidade das linhagens variantes produzirem a CGTase em pH 7,2, pelo método CD-TCE (NOMOTO e col., 1984, 1986).....	58
10	Características morfológicas e bioquímicas dos isolados alcalofílicos que apresentaram maior produção de CGTase.....	59
11	Efeito da fonte de carbono sobre a produção de CGTase pelo <i>Bacillus lentus</i>	64
12	Efeito da fonte de nitrogênio sobre a produção de CGTase pelo <i>Bacillus lentus</i>	65
13	Sumário da purificação da CGTase do <i>Bacillus lentus</i> ..	70
14	Características de CGTases produzidas por <i>Bacillus</i> ..	73
15	Efeito do EDTA e do CaCl ₂ sobre a estabilidade térmica da formação de ciclodextrinas pela CGTase do <i>Bacillus lentus</i>	79
16	Efeito de íons e inibidores na atividade de formação de ciclodextrinas da CGTase do <i>Bacillus lentus</i>	81
17	Efeito de co-substratos sobre a atividade dextrinizante e formação de ciclodextrinas pela CGTase do <i>Bacillus lentus</i>	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Moléculas de ciclodextrinas obtidas por computação gráfica.....	9
2	Estrutura química da β -CD, com enumeração dos átomos.	9
3	Representação da β -Ciclodextrina encapsulando uma molécula de um esteroi, obtida por computação gráfica..	10
4	Ação reversível da amilase do <i>Bacillus macerans</i>	13
5	Colônia produtora de CGTase com halo amarelo, sobre o meio de cultivo de PARK e col. (1989).....	54
6	Ilustração da determinação da atividade de CGTase pelo método CD-TCE (NOMOTO e col., 1984).....	54
7	Crescimento celular e produção de CGTase pelo <i>Bacillus lentus</i> , a 30°C.....	61
8	Crescimento celular e produção de CGTase pelo <i>Bacillus lentus</i> , a 37°C.....	62
9	Crescimento celular e produção de CGTase pelo <i>Bacillus lentus</i> , a 40°C.....	63
10	Purificação da CGTase do <i>Bacillus lentus</i> por cromatografia em DEAE-celulose.....	68

Figura	Página
11 Purificação da CGTase do <i>Bacillus lentus</i> por cromatografia em CM-celulose.....	69
12 Efeito do pH sobre a CGTase do <i>Bacillus lentus</i> , medido pela atividade dextrinizante e formação de ciclodextrinas.....	71
13 Estabilidade da CGTase do <i>Bacillus lentus</i> ao pH, medido pela atividade dextrinizante e formação de ciclodextrinas residual.....	74
14 Efeito da temperatura sobre a atividade dextrinizante e formação de ciclodextrinas, pela CGTase do <i>Bacillus lentus</i>	75
15 Estabilidade térmica da CGTase do <i>Bacillus lentus</i> , medida pela atividade dextrinizante e formação de ciclodextrinas residual.....	77
16 Efeito do CaCl ₂ e EDTA sobre a estabilidade térmica da atividade dextrinizante da CGTase do <i>Bacillus lentus</i>	78
17 Conversão do amido solúvel 1% em ciclodextrinas, em função da concentração da CGTase do <i>Bacillus lentus</i> e do tempo de incubação a 55°C.....	82
18 Conversão do amido solúvel 1% em ciclodextrinas, em função da concentração da CGTase do <i>Bacillus lentus</i> e do tempo de incubação a 55°C.....	83
19 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de ciclodextrinas.....	85
20 Efeito do tipo de carboidrato sobre a produção de ciclodextrinas pela CGTase do <i>Bacillus lentus</i>	87
21 Determinação do peso molecular da CGTase do <i>Bacillus lentus</i> , em SEPHADEX-G200.....	90

22	Efeito da concentração da preparação bruta desidratada da CGTase do <i>Bacillus lentus</i> ($\cong 15.000U/g$), sobre a produção de ciclodextrinas, a partir de substrato amido solúvel 10%.....	92
----	--	----

RESUMO

Uma linhagem de *Bacillus lentus*, contendo alta atividade de ciclodextrina glicosiltransferase (E.C. 2.4.1.19) extracelular, foi obtida de uma coleção de microrganismos isolados de amostras de solos de Campinas(SP), usando-se um meio de cultivo alcalino. A enzima foi produzida cultivando-se o *Bacillus lentus* em meio líquido (pH 10,3) a 37°C por 4 dias, em aerobiose. A ciclodextrina glicosiltransferase foi purificada por fracionamento com sulfato de amônio, seguido de cromatografia em DEAE e CM-celulose. A enzima foi purificada 378 vezes. O pH ótimo da enzima purificada ficou entre 5,8 a 6,2 para a atividade dextrinizante, e entre 6,5 a 7,5 para a formação de ciclodextrinas. A temperatura ótima para formação de ciclodextrinas situou-se entre 45 e 55°C. A enzima permanecia estável até 55°C por 30min de aquecimento em pH 7,5, e a estabilidade térmica era aumentada mediante a adição de 10mM de CaCl₂. O peso molecular foi estimado em 33.000, por filtração em gel SEPHADEX G-200. A análise das ciclodextrinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), mostrou uma proporção de 1:67:1,6 para α , β e γ -ciclodextrina, respectivamente.

SUMMARY

One strain of *Bacillus lentus*, having the highest extracellular cyclodextrin glycosyltransferase (E.C. 2.4.1.19) activity, was selected after a screening of microorganisms obtained from soil of the Campinas(SP) area, using alkalophilic culture medium. The enzyme was produced from *Bacillus lentus* in a liquid culture medium after 4 days at pH 10.3, at 37°C, under aeration. The extracellular cyclodextrin glycosyltransferase was purified through ammonium sulfate fractionation, followed by DEAE and CM cellulose column chromatography. A 378-fold purified enzyme was obtained. The optimum pH ranges for the purified enzyme were 5.8 to 6.2 and 6.5 to 7.5 considering dextrinizing activity and cyclodextrin formation, respectively. The optimum temperature range for the formation of cyclodextrin was from 45 to 55°C. The enzyme was stable for 30min. at 55°C at pH 7.5, and the stability was increased further by addition of 10mM CaCl₂. A molecular weight of 33.000 for the purified enzyme was obtained by Sephadex G-200 gel filtration. Analysis of cyclodextrins by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) showed the presence of α , β and γ forms in the ratio 1:67:1.6.

1) INTRODUÇÃO.

As ciclodextrinas, que constituem um grupo de oligossacarídeos cíclicos semelhantes, são obtidas pela hidrólise do amido com a enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). Estes compostos têm despertado o interesse dos químicos de carboidratos, devido ao fato de produzirem inclusões moleculares, alterando as características físicas e químicas das moléculas encapsuladas. A inclusão molecular tem sido muito estudada, e alguns estudos mostraram o grande potencial das ciclodextrinas no que diz respeito ao seu uso em indústrias alimentícias e farmacêuticas. As ciclodextrinas podem ser utilizadas para estabilizar emulsões e materiais que são sensíveis à luz, ao oxigênio e ao calor; controlar a volatilidade; aumentar a solubilidade de substâncias hidrofóbicas; modificar a cor, o sabor, a textura, o aroma, etc.

As ciclodextrinas são conhecidas há quase um século, desde 1891, e atualmente existem mais de 600 artigos publicados, discutindo a inclusão molecular. Esta significativa quantidade de pesquisas, somada ao constante aumento do número de patentes nos últimos 20 anos, reflete o crescente interesse nas ciclodextrinas, que vai desde uma curiosidade científica até uma efetiva aplicação na área industrial.

A capacidade de formar inclusão das ciclodextrinas é conhecida há mais de 50 anos. Mas, somente a partir da década de 70 é que as

ciclodextrinas começaram a ser aproveitadas pelas indústrias de alimentos do Japão e da Hungria, e atualmente em indústrias de diversos países europeus. Duas foram as razões apontadas para a tardia utilização das ciclodextrinas pelas indústrias: (1ª) a inexistência de um processo para produzi-las em escala industrial, o que as tornava um produto caro; (2ª) o fato de haverem estudos que as consideravam produtos tóxicos. Entretanto, estas barreiras foram sendo gradualmente removidas. Novos estudos vêm demonstrando que o consumo oral de ciclodextrinas não representa nenhum perigo à saúde, e com os avanços tecnológicos o custo de sua produção tem sido reduzido.

O grande passo para a produção a nível industrial das ciclodextrinas aconteceu em 1969, com a descoberta feita por HORIKOSHI, que isolou uma linhagem de *Bacillus* produtor de uma CGTase que convertia o amido em ciclodextrinas com grande rendimento. Desde então, iniciaram-se as pesquisas sobre microrganismos potencialmente produtores de CGTases, e que apresentassem maior especificidade durante a conversão do amido, ou seja, produzir principalmente a α , β ou γ -ciclodextrina.

Até o momento, nenhum estudo sobre microrganismos produtores de CGTase no Brasil foi divulgado.

O presente trabalho teve como principal objetivo, pesquisar um novo microrganismo com alta capacidade de produção de CGTase, bem como estudar as condições de produção da enzima e caracterizá-la.

2) REVISÃO DE LITERATURA

2.1) Ciclodextrinas: definição e histórico

Ciclodextrinas, Schardinger dextrinas, cicloamiloses, CDs, cG são $\alpha(1-4)$ malto-oligossacarídeos cíclicos, não redutores, contendo de seis até doze unidades de glicose (FRENCH, 1957; YU e col., 1988; HORIKOSHI, 1979; BENDER, 1983). Elas são produtos da hidrólise do amido com a enzima atualmente conhecida como Ciclodextrina Glicosil Transferase (CGTase, EC 2.4.1.19), produzida por algumas espécies de microrganismos (TILDEN e HUDSON, 1939; KITAHATA e OKADA, 1976; BENDER, 1977, 1983; NOMOTO e col., 1984). A existência de ciclodextrinas ramificadas tem sido mencionada (KOIZUMI e UTAMURA, 1986; SHIRAISHI e col., 1989; HISAMATSU e TSU, 1989). As CDs mais comuns são: α (ciclohexamilose), β (cicloheptamilose) e γ (ciclooctamilose) (YU e col., 1988).

FRENCH (1957) em uma extensa revisão, cobriu os acontecimentos históricos referentes às ciclodextrinas, desde 1891 até 1956. Segundo este autor, o primeiro relato da existência de ciclodextrinas foi de Villiers em 1891. Usando técnicas primitivas e provavelmente culturas impuras, Villiers obteve uma pequena quantidade de material cristalino, após a hidrólise do amido com *Bacillus amylobacter* (*Clostridium butyricum*), o qual ele denominou de celulosina.

Conforme citação de FRENCH(1957), Schardinger, em 1903, observou que uma linhagem chamada II, isolada de alimento deteriorado, era resistente ao calor e tinha a capacidade de fermentar o amido com produção de duas dextrinas cristalinas. Uma delas (A) era formada por cristais hexagonais; a outra(B), por cristais prismáticos. Estas dextrinas não apresentavam poder redutor. Schardinger observou que a dextrina B era semelhante à celulosina de Villiers. Em 1904, Schardinger isolou a linhagem do *Bacillus macerans*. Este microrganismo quando cultivado em meio contendo amido, produzia grandes quantidades das dextrinas cristalinas A e B, as quais Schardinger passou a denominar dextrina cristalizada α e β .

Segundo FRENCH (1957), após a última publicação de Schardinger em 1911, os 24 anos seguintes não foram muitos frutíferos no campo da pesquisa sobre a química das dextrinas cristalinas. Neste período, destacaram-se os pesquisadores Pringsheim e Karrer. A literatura é extensa, mas muito repetitiva, cheia de controvérsias e baseadas em conceitos errôneos (FRENCH, 1957). O período de 1935 a 1950 foi considerado por FRENCH (1957) como o período da maturação, destacando-se o trabalho de Freudenberg e seu grupo. Em 1938 eles confirmaram a estrutura cíclica das dextrinas de Schardinger e a capacidade de formar a inclusão molecular (SAENGER, 1980).

TILDEN e HUDSON (1939) descobriram uma amilase do *Bacillus macerans* que produzia as ciclodextrinas, separadamente da bactéria.

Através da difração com raio-X, FRENCH e RUNDLE (1942) estabeleceram o peso molecular e o número de unidades de glicose para as ciclodextrinas α e β . No período de 1945 a 1950, Freudenberg e Cramer (citado por FRENCH, 1957) e FRENCH e col. (1950), estabeleceram o peso molecular e o número de unidades de glicose para a γ -CD.

No final dos anos 60, a maior refinadora de milho americana abandonou a produção de CDs, devido aos altos custos de produção. Desde então, numerosas opções para a produção de CDs por hidrólise enzimática do amido têm sido propostas na literatura, e os processos de purificação têm sido aprimorados (PSZCZOLA, 1988). HORIKOSHI (1979) apresentou um processo de obtenção de CDs com baixo custo, utilizando a CGTase do *Bacillus* 38-2, alcalofílico. A empresa japonesa Nihon Shokuhin Kako Co. (NSKK), produz as CDs em escala industrial, sob a denominação de CELDEX (NSKK, 1983). No Japão, a produção industrial de CDs atinge 600T/ano, e a maior parte do produto tem sido utilizada pela indústria alimentícia (SHIRAISHI, 1989).

2.2) Características químicas e físicas das ciclodextrinas

A Tabela 1 é um sumário de algumas características das ciclodextrinas (FRENCH, 1957; BENDER e KOMIYAMA, 1978).

Tabela 1. Propriedades físicas das ciclodextrinas.

Ciclodextrinas	α	β	γ	δ
Nº de unidades de glicose	6	7	8	9
Peso molecular (daltons)	973	1135	1297	1495
Diâmetro da cavidade (Å)	4,5	≈ 7	≈ 8,5	-
Profundidade da cavidade (Å)	7-8	7-8	7-8	-
$(\alpha)_D^{20}$ (H ₂ O 1%)	+150,5°	+162,5°	+177,4°	+191°
Solubilidade em água (%), a 25°C	14,5	1,85	23,2	grande

Dentre as ciclodextrinas, a β -CD tem a menor solubilidade em água (FRENCH, 1957; BENDER e KOMIYAMA, 1978), o que pode representar

uma limitação para sua utilização. Como alternativa, estudos vem sendo conduzidos para obtenção da β -CD ramificada, a maltosil β -CD, cuja solubilidade em água é de 151,6%, a 25°C (HISAMATSU e TSU, 1989; ABE e col., 1986; SANKANO e col., 1985).

Solventes orgânicos como o tolueno, o bromobenzeno, o tricloroetileno e o tetracloroetileno entre outros, reduzem substancialmente a solubilidade das CDs em solução aquosa, tanto que freqüentemente são utilizados como precipitantes (FRENCH, 1949).

As moléculas de CDs são moderadamente estáveis em solução alcalina, mas muito instáveis em soluções ácidas. Por exemplo, a constante de hidrólise da β -CD em pH 0,13 a 40°C era $1 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$, e a 100°C era $4,8 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, correspondendo a uma meia vida de 48 dias no primeiro caso e de 14min no segundo. A energia de ativação para a ruptura das ligações glicosídicas da β -CD é de 34,2 Kcal/mol, enquanto a da maltose, uma molécula linear, é de 30,5 Kcal/mol (BENDER e KOMIYAMA, 1978).

A CD tem sabor doce. Uma solução de 2,5% de β -CD é tão doce quanto uma solução 1,7% de sacarose. Portanto, quando a β -CD for utilizada em processamento de alimentos, seu poder adoçante não pode ser ignorado (SZEJTLI, 1984).

Outra interessante característica da ciclodextrina, observada por Schardinger e citada por FRENCH (1957), é a sua resistência à hidrólise pelas enzimas que degradam o amido. Tem sido constantemente dito que as ciclodextrinas são completamente resistentes a ação da beta-amilase. Esta resistência é baseada no mecanismo de ação desta amilase, que inicia a hidrólise do amido a partir do terminal não redutor da cadeia, removendo unidades de glicose aos pares, como maltose, até atingir as proximidades da ramificação. Como as CDs são

cíclicas, não apresentam grupos não redutores, sendo portanto, imunes à beta-amilase (FRENCH, 1957). As amilases do *Aspergillus oryzae*, *Pseudomonas*, *Bacillus macerans* (CGTase) e *Bacillus 38-2* (CGTase) podem degradar a β -CD. Mas a amilase do *Bacillus subtilis* (tipo liquidificante) e a amilase salivar não hidrolisam (HORIKOSHI, 1979). DePINTO E CAMPBELL (1968) isolaram uma enzima intracelular de *Bacillus macerans*, denominada ciclodextrinase, que é capaz de hidrolisar ciclodextrinas sem sintetizá-las. Alguns microrganismos como *Bacillus macerans*, *Bacillus polymixa*, *Bacillus 38-2*, e algumas linhagens de *Klebsiella* podem utilizar a β -CD como fonte de carbono. Outros microrganismos, como *Escherichia*, *Aerobacter*, *Salmonella* e *Saccharomyces*, não a utilizam como fonte de carbono (HORIKOSHI, 1979).

A característica mais notável das CDs é a capacidade de formar complexos com grande número de compostos orgânicos, através de um processo conhecido como inclusão ou encapsulação molecular (FRENCH, 1957; HORIKOSHI, 1979; YU e col. 1988,). Esta capacidade de formar inclusão molecular é resultante da cavidade central das moléculas de CDs. A Figura 1 exibe as estruturas da α , β e γ -CDs, obtidas por computação gráfica de modo que as cavidades podem ser facilmente visualizadas (PSZCZOLA, 1980).

As ciclodextrinas têm a forma de uma rosquinha (confeitaria), formada por unidades de glicose, as quais não apresentam distorção de sua conformação em cadeira (BENDER e KOMIYAMA, 1978). A Figura 2 mostra um modelo molecular para a β -CD (SAENGER, 1980). Esta estrutura requer um arranjo especial dos grupos funcionais, responsável por uma variedade de características peculiares das CDs. Assim, os grupos hidroxilas dos átomos de carbono C_2 e C_3 da unidade de glicose estão localizados numa lateral da molécula da ciclodextrina, já os grupos

hidroxilas dos átomos C_6 localizam-se do lado oposto. O interior da molécula consiste de grupos de C-H e oxigênio glicosídico. Portanto, o interior das CDs é relativamente apolar. As cavidades internas das CDs tem formato de um "V", com a hidroxila do C_3 mais aberta do que a do C_2 . A hidroxila do C_2 pode girar livremente e bloquear parcialmente a cavidade, enquanto a do C_3 é relativamente rígida, não apresentando rotação (BENDER e KOMIYAMA, 1978).

Enquanto a superfície externa possui natureza hidrofílica, a cavidade interna apresenta uma alta densidade eletrônica, devido aos hidrogênios e oxigênios glicosídicos orientados para o interior (YU e col., 1988; BENDER e KOMIYAMA, 1978). Graças à natureza hidrofóbica da cavidade, moléculas de tamanho, forma e hidrofobicidade adequada, são capazes de interagir de forma não covalente, para formar um complexo estável, por inclusão molecular (HORIKOSHI, 1979; HIRAI e col., 1981; TAGUCHI, 1986; YU e col., 1988). A Figura 3, obtida computação por gráfica, mostra a encapsulação molecular de um esteroI pela β -CD.

Segundo TABUSHI e col. (1978), as CDs exibem um comportamento semelhante ao de uma enzima, em relação ao substrato ligante, sugerindo que existe uma interação específica entre a ciclodextrina e a molécula hóspede. Pontes de hidrogênio (CRAMER e KAMPLE, 1965), interações de van der Waals (CRAMER, 1967) ou interações hidrofóbicas (NEMETHY e SCHERAGA, 1962), têm sido propostas como forças de interação. TABUSHI e col. (1978) dizem que ainda existem muitas dúvidas a serem esclarecidas, tais como a natureza da força de ligação, a natureza da estrutura da água em torno ou próxima do complexo de inclusão, a dinâmica molecular da inclusão entre outras. Estes autores, pesquisando o tipo de interação na encapsulação molecular, concluíram que as interações de van der Waals, a energia de

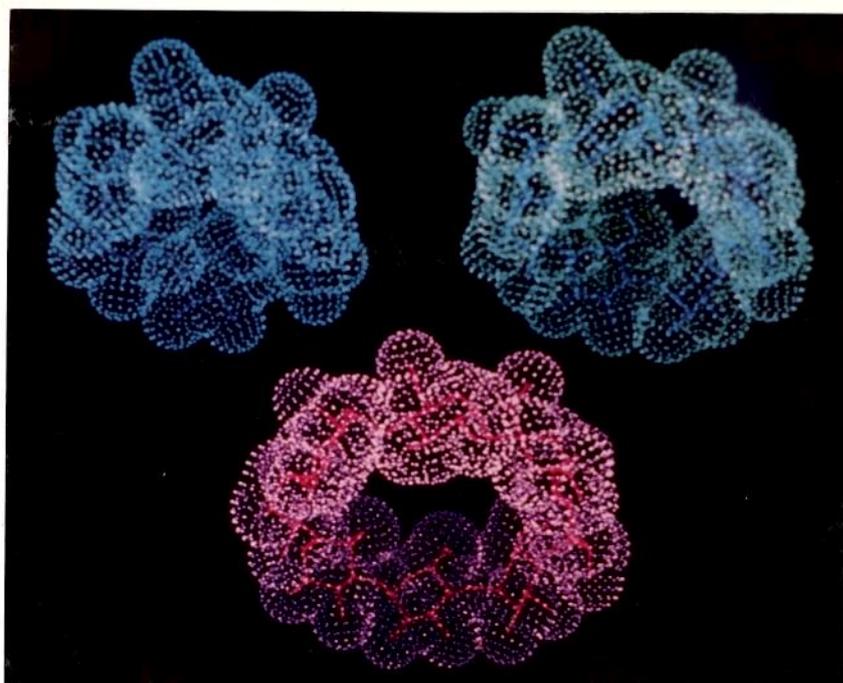


Figura 1. Moléculas de ciclodextrinas obtidas por computação gráfica. (α -ciclodextrina, acima à esquerda; β -ciclodextrina, acima à direita, γ -ciclodextrina, abaixo).

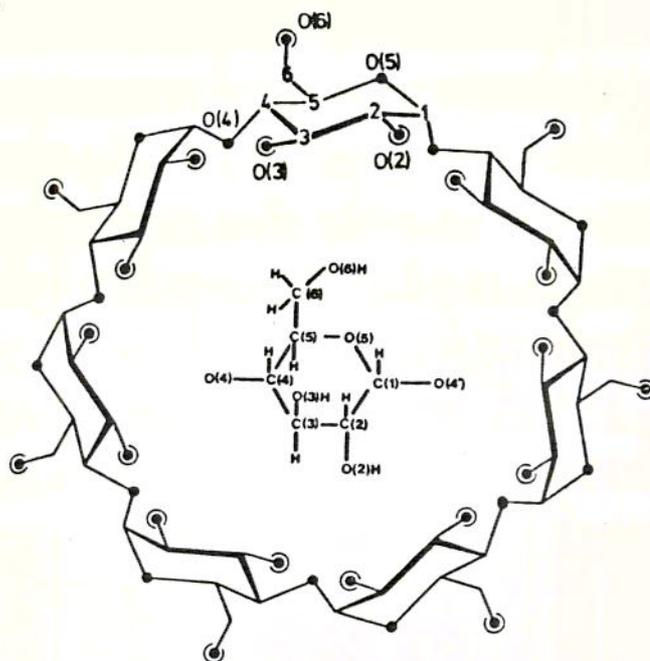


Figura 2. Estrutura química da β -CD, com enumeração dos átomos.
 • átomos de oxigênio, ⊕ grupos hidroxilas.

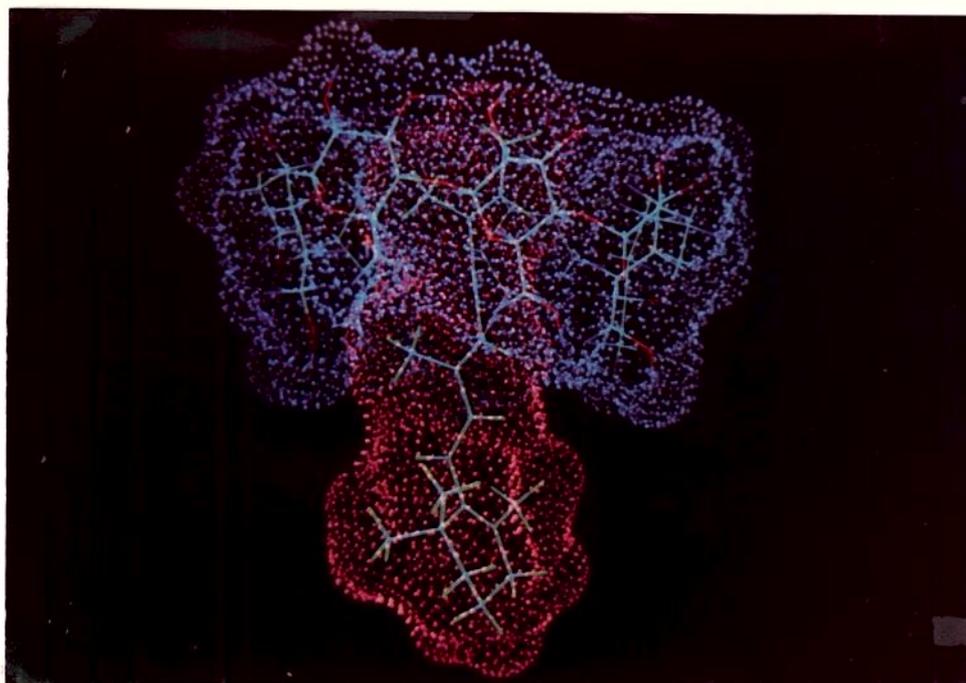
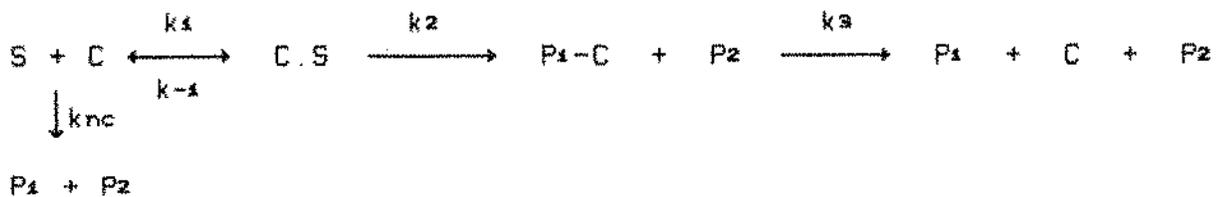


Figura 3. Representação da β -ciclodextrina encapsulando uma molécula de um esteroi, obtida por computação gráfica.

conformação e os grupamentos de água governam o processo de inclusão.

Outro fenômeno que tem sido muito estudado é o da participação das CDs na catálise de reações, por elas apresentarem um comportamento típico de enzimas, o que demonstra que as CDs servem como bons modelos de enzimas (SAENGER, 1980). As catálises podem ser divididas em dois grupos, de acordo com a formação ou não, pelas ciclodextrinas, de intermediários covalentemente ligados. No primeiro grupo, as reações podem ser representadas do seguinte modo (van ETTEN e col., 1967a, 1967b):



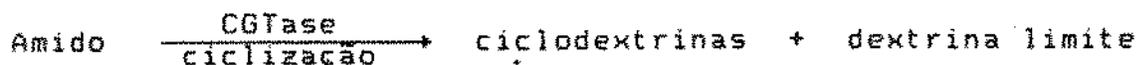
k_{nc} é a constante para a reação sem a ciclodextrina (C); k_1 reflete a constante de formação do complexo "enzima substrato" (C.S); e k_2 descreve a formação do complexo intermediário P_1-C , o qual é hidrolisado de acordo com k_3 para formar a ciclodextrina e o produto final. No segundo grupo, a catálise resulta de um efeito "microsolvente" das microcavidades heterogêneas dentro da ciclodextrina. Não existe o intermediário P_1-C , mas todos os outros passos da reação são análogos. Como o substrato reage para formar o complexo de inclusão (C.S), a reação deve assintoticamente se aproximar de um valor limite com o aumento da concentração da ciclodextrina. A inibição também pode ocorrer com a adição de uma molécula inerte, que possa competir com o substrato para ocupar a cavidade da CD (van ETEN e col., 1967a). A hidrólise de fenil-ésteres por ciclodextrinas foi estudada detalhadamente por van ETEN e col. (1967a, 1967b). GRIFFITHS e BENDER (1967) publicaram uma revisão de literatura tratando as ciclodextrinas como catalizadores.

2.3) Mecanismo de ação da CGTase

Nos primeiros estudos, considerou-se que a ação da amilase do *Bacillus macerans* (CGTase) era, essencialmente, a de degradar o amido, formando as Schardinger dextrinas, do mesmo modo que a beta-amilase produz a maltose (FRENCH, 1957). Atualmente são conhecidos três tipos de reações catalizadas pela CGTase: ciclização, acoplamento e desproporcionamento (FRENCH, 1957; PONGSAWASDI e YAGISAWA, 1987).

a) Ciclização

É através desta catálise que as CGTases produzem as CDs. Esse processo hidrolítico é conhecido como ciclização, atividade dextrinizante (FUWA, 1954; KDBAYASHI e col., 1986) ou transglicosilação intramolecular (KITAHATA e col., 1978; KITAHATA e OKADA, 1982a e 1982b). A CGTase ao degradar o amido produz uma redução da cor azul do complexo iodo-amido. Baseando-se neste princípio, FUWA(1954) elaborou um método para determinar a atividade de enzimas amilolíticas, conhecido como atividade dextrinizante. Esta técnica pode ser empregada para determinar a atividade enzimática ou específica da CGTase, desde que o microrganismo em estudo não produza outras enzimas amilolíticas além da CGTase (PONGSAWASDI e YAGISAWA, 1987; NAKAMURA e HORIKOSHI, 1976a, 1976b, 1976d). A reação é apresentada a seguir:



b) Acoplamento (coupling)

Levine em 1947, citado em FRENCH(1957), observou que a amilase da *Bacillus macerans* convertia α -CD em β -CD na presença de certos co-substratos como glicose, maltose, sacarose, etc. Estas observações permitiram concluir que a ação da CGTase era reversível (FRENCH e col., 1948; FRENCH, 1957). Esta reação é representada pela Figura 4 e pelas seguintes equações:

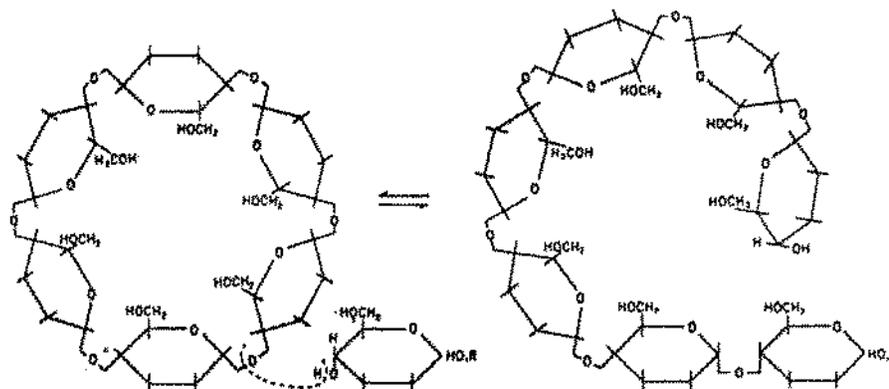
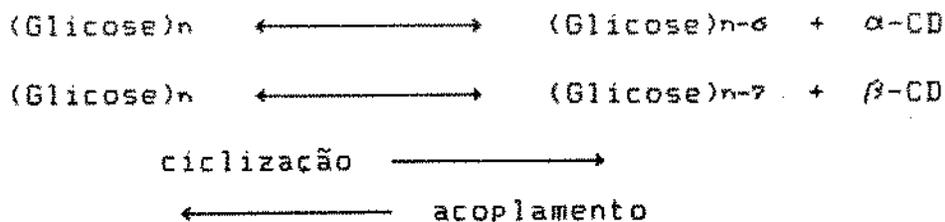


Figura 4. Ação reversível da amilase do *Bacillus macerans*. Compostos lineares e cíclicos são interconvertidos através das reações de transglicosilação intermolecular. O grupo R pode ser qualquer um de uma variedade de açúcares redutores ou não.

A ocorrência desta reação reversível, também conhecida como transglicosilação intermolecular (FRENCH, 1957; KITAHATA e col., 1978; KITAHATA e OKADA, 1982a, 1982b), foi comprovada por FRENCH e col. (1954), através do isolamento dos compostos acoplados. Algumas CGTases são mais eficientes na reação de transglicosilação intermolecular (KITAHATA e OKADA, 1975). A D-glicose, a D-xilose e a L-sorbose mostraram-se mais eficientes como receptores para as CGTases do *Bacillus macerans* e *Bacillus megaterium*. KITAHATA e OKADA (1982b) conduziram estudos comparando as reações de transglicosilação intermolecular entre as CGTases produzidas pelos microrganismos *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus macerans*. Glicose e sacarose foram os receptores mais eficientes para a enzima do *Bacillus stearothermophilus*, seguidos por

maltose e maltotriose. No caso das CGTases dos *Bacillus megaterium* e *Bacillus circulans* os receptores, quanto à eficiência, eram: maltose, glicose, maltotriose e sacarose, nesta ordem. Para a enzima do *Bacillus macerans*, a ordem era glicose, maltose, sacarose, e maltotriose.

c) Reação de desproporcionação

NORBERG e FRENCH (1950) observaram que, em presença da amilase do *Bacillus macerans*, dextrinas lineares eram capazes de reagir entre si, apresentando um efeito de redistribuição de resíduos de glicose entre as dextrinas. Esta reação denominada pelos autores como "homologizing" ou "disproportionation" é apresentada a seguir:



Onde G representa os oligossacarídeos; m e n as unidades de glicose, e x, o número de unidades de glicose transferidas.

NAKAMURA e HORIKOSHI (1976c), estudando a conversão de glicose, maltose e maltotriose em ciclodextrinas pela CGTase do *Bacillus* sp, ATCC 21783, concluíram que a enzima era capaz de converter 18% da maltotriose e 7% da maltose em CDs, enquanto que a glicose não era convertida. Os resultados mostraram que a enzima somente utilizava como substrato maltooligossacarídeos com duas ou mais unidades de glicose.

Na produção das Schardinger dextrinas, a partir do amido, a amilase do *Bacillus macerans* assemelha-se à beta-amilase, pois a sua ação se inicia no terminal não redutor da cadeia do amido, produzindo as ciclodextrinas (ou maltose com beta-amilase). A formação do produto

é interrompida quando a enzima chega ao final da cadeia ou no ponto de ramificação. A amilase do *Bacillus macerans* apresenta uma outra atividade, também semelhante à alfa-amilase, detectada pela redução da viscosidade do substrato ou pela rápida redução da cor azul do complexo amido-iodo.

Norberg (citado por FRENCH, 1957) em experimentos não divulgados, mostrou que a ação da amilase do *Bacillus macerans* sobre o amido, reduz rapidamente a viscosidade, sem a formação de quantidades apreciáveis de açúcares redutores. Nenhuma quantidade detectável de ciclodextrinas foi produzida.

2.4) Características de CGTases e dos microrganismos produtores

O primeiro microrganismo descrito na literatura como produtor de CGTase foi o *Bacillus amylobacter* (*Clostridium butyricum*), com o qual Villiers produziu as primeiras dextrinas de Schardinger (FRENCH, 1957). Mas na realidade, o *Bacillus macerans*, isolado em 1904 por Schardinger, foi o primeiro microrganismo que teve a sua CGTase estudada por TILDEN e HUDSON, em 1939. Este mesmos pesquisadores comprovaram que as ciclodextrinas não eram produtos sintetizados durante o metabolismo microbiano, e sim, resultantes da ação de uma enzima extracelular produzida pelo microrganismo, que hidrolisava amido e compostos relacionados.

TILDEN e HUDSON (1942) estudaram 11 linhagens de *Bacillus macerans*, e concluíram que todas elas produziam uma única amilase capaz de converter o amido em dextrinas de Schardinger. A enzima permanecia relativamente estável ao calor, sendo que uma desprezível inativação ocorria durante 1h a 50°C. A maior atividade enzimática ocorria entre os pH 5 e 6, a 40°C.

Segundo DePINTO e CAMPBELL (1968), incubações prolongadas do *Bacillus macerans*, por uma semana ou mais, favoreciam o aparecimento da enzima no meio de cultivo, mas em quantidades insuficientes para purificação, o que limitou os estudos de outros pesquisadores. A purificação da CGTase tornou-se possível com a demonstração de que a amilase do *Bacillus macerans* podia ser produzida em meio contendo amido, caseína e extrato de levedura. A enzima era produzida em maior proporção na forma intracelular do que na extracelular (DePINTO e CAMPBELL, 1964). Em 1968, eles obtiveram a CGTase do *Bacillus macerans* numa preparação homogênea por eletroforese de disco, purificada 140 vezes. A enzima tinha peso molecular de 139.300 e pH ótimo entre 6,1 e 6,2. Os estudos revelaram que a composição de aminoácidos da enzima CGTase era similar à α -amilase do *Bacillus subtilis*, e à amilase salivar, exceto pelos teores mais elevados de treonina, valina e ausência total de cistina.

KOBAYASHI e col. (1978) obtiveram a CGTase do *Bacillus macerans* na forma cristalizada. A enzima dissociava-se em duas subunidades, pela eletroforese em disco contendo o dodecil sulfato de sódio, as quais não tinham atividade enzimática. O seu pH ótimo era 6 e o pH de estabilidade entre 5,5 e 9,5. Esta CGTase tinha maior atividade a 60°C, mas sua estabilidade térmica era inferior a 50°C. KITAHATA e col. (1974) disseram que a amilase do *Bacillus macerans* tinha pH ótimo entre 5 e 5,7 e estabilidade ao pH entre 8 e 10. A temperatura ótima era 55°C, com estabilidade térmica em temperaturas inferiores a 60°C.

Para KITAHATA e col. (1974), desde que TILDEN e HUDSON (1939) divulgaram a descoberta de que preparações livres de células de *Bacillus macerans* eram capazes de produzir ciclodextrinas a partir do amido, não se conhecia outro microrganismo produtor de CGTase.

KITAHATA e col. (1974) divulgaram uma nova espécie de *Bacillus* nº 5, que era diferente do *Bacillus macerans*, e que produzia uma CGTase extracelular. A enzima foi separada em duas frações durante a eletroforese em disco. O pH ótimo das duas frações variava de 5 a 5,7, e a estabilidade ao pH situava-se entre 7 e 10. Ambas as frações tinham temperatura ótima e estabilidade térmica a 55°C. Esta CGTase produzia principalmente β -CD a partir do amido, enquanto que a do *Bacillus macerans* produzia a α -CD. Em outro trabalho, KITAHATA e OKADA (1974) identificaram a linhagem como *Bacillus megaterium*, e observaram que a enzima produzia α , β e γ -CD numa proporção de 1:2,4:1, enquanto a CGTase do *Bacillus macerans* mantinha a proporção de 2,7:1:1. Outros trabalhos sobre a CGTase em questão foram publicados, envolvendo estudos de especificidade de receptores nas reacções de acoplamento (KITAHATA e OKADA, 1974, 1975, 1976, 1982b; KITAHATA e col., 1978).

Em 1974, Okada e Kitahata (citados por KITAHATA e OKADA, 1982a) estudaram a CGTase produzida pelo *Bacillus circulans* ATCC 9995. A enzima foi fracionada em duas subunidades com pontos isoelétricos 5,8 e 6,6. O pH ótimo variava entre 7 e 9, a temperatura ótima e a de estabilidade térmica eram 55°C.

HORIKOSHI (1971), diz que em 1969 iniciou uma pesquisa sobre a produção de enzimas por microrganismos alcalofílicos, isolados do solo em meio alcalino. Uma das bactérias alcalofílicas estudadas produzia preferencialmente β -CD a partir do amido, em quantidade superior às demais CGTases citadas na literatura. Esta linhagem denominada *Bacillus* nº 3B-2, foi posteriormente catalogada como *Bacillus* sp ATCC 21783. A CGTase produzida por este microrganismo foi estudada em uma série de trabalhos por NAKAMURA e HORIKOSHI (1974a, 1974b, 1974c, 1974d), e é considerada como a melhor linhagem produtora de

CGTase(NOMOTO, 1984). A enzima bruta mostrava atividade numa ampla faixa de pH, com duas faixas de pH ótimos entre 4,5 e 5 e 7,5 e 8,5. Os autores concluíram que mais de uma CGTase poderia estar presente no filtrado da cultura (NAKAMURA e HORIKOSHI, 1976c). Em outro trabalho, NAKAMURA e HORIKOSHI (1976d) conseguiram obter duas frações da CGTase através da eletroforese em gel de poliacrilamida. Uma fração tinha pH ótimo em meio ácido, a outra em pH neutro. A CGTase neutra, com peso molecular 85.000, tinha pH 7 como ótimo, e o de estabilidade entre 6 e 9. A temperatura ótima era 50°C, com estabilidade térmica a 60°C em pH 7. A adição de 10mM CaCl₂ aumentava a estabilidade térmica. A CGTase ácida era mais ativa em pH 4,5 a 5, a 45°C (NAKAMURA e HORIKOSHI, 1976b). A enzima era capaz de converter 70% do amido de batata 1% em ciclodextrinas, produzindo principalmente a β-CD (NAKAMURA e HORIKOSHI, 1976b, 1976d; MATZUZAWA e col., 1976), e não era inibida pelo produto. A concentração ótima para a produção industrial de ciclodextrinas foi fixada em 15% de amido, com a qual podia ser obtida uma taxa de conversão de 45% em CDs (MATZUZAWA e col., 1975).

BENDER (1977a, 1977b) constatou que uma linhagem de *Klebsiella pneumoniae* crescia muito bem em amido, produzindo, além da pululanase, uma CGTase indutível e extracelular. A enzima, por hidrólise da amilopectina, produzia 47% de α-CD, 29% de β-CD e 10,7% de α-CD ramificada do total de CDs. A temperatura ótima era 45°C e o pH ótimo entre 5,2 e 7,5.

Outro microrganismo alcalofílico produtor de CGTase foi isolado por NOMOTO e col. (1984). A linhagem denominada *Bacillus* HA nº 3-3-2, produzia uma enzima com peso molecular 68.000 e apresentava características diferentes de outras já estudadas. Durante os estudos de caracterização da CGTase, a atividade enzimática foi acompanhada

pela atividade dextrinizante (FUWA, 1954) e pelo método ciclodextrina tricloroetileno(CD-TCE, precipitação das CDs pelo uso de tricloroetileno). A formação de CDs foi maior em pH entre 6,5 e 8, enquanto pela atividade dextrinizante dois foram os picos de pH ótimo, um em 5 e outro em 9. A estabilidade ao pH situava-se entre 6 e 11. A temperatura ótima para a atividade dextrinizante era 70°C, e para a formação de CDs era 60°C. A atividade dextrinizante não apresentou sensibilidade aos inibidores fenilmetilsulfonil fluoreto 0,2mM, p-cloromercuribenzoato(PCMB) 0,1mM ou EDTA 0,1mM. Metais como Zn⁺², Mg⁺², Fe⁺² e Co⁺² eram inibidores eficientes.

SATO e col. (1985) relataram também a produção de CGTase pelo *Bacillus ohbensis*.

Uma linhagem de *Bacillus subtilis* que produzia somente γ -CD, foi estudada por KATO e HORIKOSHI (1986). A CGTase com peso molecular 64.000 e ponto isoelétrico em pH 7,1, era mais ativa em pH 8 e a 65°C, com estabilidade térmica até 50°C, entre os pH 6 e 8.

PONGSAWASDI e YAGISAWA (1987, 1988) purificaram a CGTase do *Bacillus circulans* C-31 através da cromatografia em coluna de amido e de Biogel. A enzima foi purificada 90 vezes com um rendimento de 30%. Com peso molecular 103.000, a enzima convertia 28% do amido solúvel 5% (pH 7) em β -CD. O pH e a temperatura ótimos eram 5,5 e 60°C, respectivamente. A estabilidade ao pH situava-se entre 5,5 e 9, até uma temperatura de 50°C.

O estudo do *Bacillus amyloliquefaciens* AL 35 demonstrou que este também produz uma CGTase extracelular (YU e col.1988). A enzima exibiu uma temperatura ótima de 70°C, o pH ótimo era 6. Segundo os autores, esta CGTase também mostrou uma estabilidade térmica incomum, com menos de 5% de perda de atividade após incubação a 60°C por 15min, e a

adição de cálcio aumentou em 5°C o limite de sua resistência térmica. Ela apresentou também uma estabilidade ao pH alcalino, com menos de 5% de perda após 2h de incubação em pH de 8 a 10. A enzima produzia principalmente α -CD(95% do total de CDs).

2.5) Efeito do cálcio

Todas as α -amilases bacterianas possuem Ca^{+2} ligado à molécula, e a força de ligação entre o íon e a proteína depende da origem da enzima (VALLEE e col., 1959). O cálcio é essencial para a ação catalítica das α -amilases bacterianas, e em sua presença a enzima é mais resistente a valores extremos de pH e temperatura (OGASAHARA e col., 1970).

De maneira semelhante, o cálcio parece ter um importante papel na resistência térmica das CGTases (MATZUZAWA e col., 1975; NAKAMURA e HORIKOSHI, 1976b, 1976d; BENDER, 1977; YU e col., 1988). A presença de EDTA aumentou a sensibilidade térmica da CGTase do *Bacillus* sp ATCC 21783 (NAKAMURA e HORIKOSHI, 1976d).

2.6) Fatores que afetam a produção de ciclodextrinas

Para FRENCH e col. (1963), alguns fatores podem alterar a pureza e o rendimento durante a conversão do amido em CDs pelas CGTases. São eles: o tipo de substrato usado, a concentração do substrato, o método de dispersão do amido, a temperatura de hidrólise, a concentração da enzima e a presença de precipitantes de CDs.

A amilose foi o carboidrato que apresentou maior taxa de conversão (85-90%) em CDs pela CGTase do *Bacillus* sp ATCC 21783. Outros carboidratos apresentaram as seguintes taxas de conversões: o amido de batata(75-80%), a amilopectina(55-60%), o glicogênio(45-50%),

a maltotriose(20-25%) e a maltose(10-15%)(NAKAMURA e HORIKOSHI, 1976d). Resultados semelhantes foram encontrados por NAKAMURA e HORIKOSHI (1976b). Segundo FRENCH e col. (1963), o emprego de amido não modificado resulta em maior rendimento. O emprego de substrato modificado, como o amido solúvel, pode resultar numa redução de até 50% do rendimento.

O aumento da concentração da CGTase, dentro de certos limites, resulta numa maior taxa de conversão. Entretanto, o aumento da concentração do substrato resulta em decréscimo constante da taxa de conversão (MATZUZAWA e col., 1975; SHIRAIISHI e col., 1989).

A presença de precipitantes durante a conversão de amido em CDs, pela CGTase do *Bacillus macerans*, causou um apreciável aumento no rendimento do produto (McCLENAHAN e col., 1942). Segundo os autores, um agente complexante apropriado pode promover a reação, pela remoção de um dos constituintes da mistura em equilíbrio. As reações de ciclização são prontamente reversíveis no caso da α -CD, e mais lentas com a β -CD. Se um precipitante for adicionado, eventualmente uma grande proporção de CDs precipitarão como complexo (FRENCH e col., 1963). SHIRAIISHI e col (1989a, 1989b), afirmam que a produção de CDs é fortemente influenciada pela adição de álcoois, ésteres, éteres e cetona. A presença de etanol a 10%v/v, no meio de reação, aumentou o rendimento em α -CD de 1,6 a 1,9 vezes, enquanto a a β -CD teve seu rendimento diminuído (SHIRAIISHI e col., 1989a). Estes mesmos pesquisadores (1989b), estudaram também o efeito de outros álcoois alifáticos, como n-butanol e n-decanol, sobre a formação de CDs. Em presença de butanol ocorria maior formação de α -CD e um decréscimo na β -CD. Entretanto o n-decanol aumentou o rendimento da α -CD e da β -CD. Isto demonstra que não só a concentração, mas o tipo de álcool

presente afeta o rendimento da conversão. A produção da γ -CD praticamente não foi afetada pela presença dos álcoois. Segundo os autores, os álcoois alifáticos ainda impõem uma restrição às reações de transglicosilação intermolecular da CGTase, as quais convertem α em β -CD, resultando num incremento da produção da α -CD.

BENDER (1983), estudando um meio de aumentar o rendimento da γ -CD com a CGTase da *Klebsiella pneumoniae* M 5 a1, concluiu que em presença de bromobenzeno e acetato de sódio 200mM (pH 6,9), ocorria um incremento de 13,3% na produção da γ -CD, a partir do amido de batata 15%.

2.7) Procedimentos para formação e dissociação dos complexos de inclusão

Os procedimentos são detalhadamente descritos por HORIKOSHI (1979) e por NSKK (1983). Para formação do complexo de inclusão adiciona-se à solução aquosa de CD, o complexante em concentração molar superior, e espera-se que ocorra a precipitação. Se o complexante for insolúvel em água, é necessário agitação. O complexo é lavado com água fria, depois com acetona e éter. O precipitado é seco sob vácuo. Caso o complexo não se precipite, então usa-se o processo de liofilização. Os complexos (CD-molécula hóspede) podem ser dissociados pelos seguintes processos: ebulição, quando o complexante é volátil; extração com metanol ou dimetil sulfoxido; hidrólise ácida (FRENCH e col., 1949a) ou enzimática das CDs, o que libera o complexante.

2.8) Metabolismo e toxicidade das ciclodextrinas

A primeira condição necessária para que um novo produto seja

utilizado pela indústria farmacêutica ou alimentar, é que ele tenha sido estudado detalhadamente quanto ao metabolismo e a toxicidade (SZEJTLI, 1984).

Segundo FRENCH (1957), nos primeiros estudos toxicológicos, a administração das CDs a ratos, resultou em morte dos animais. Embora os experimentos não tenham sido muito conclusivos, levaram a crer que as CDs exibiam um efeito tóxico, possivelmente devido à marcante capacidade de formação de complexos. Naquela época utilizavam-se precipitantes orgânicos para a obtenção das CDs, nos quais poderiam estar presentes contaminantes tóxicos aos animais, resultando em morte (HORIKOSHI, 1979; SZEJTLI, 1979).

De acordo com os estudos de FRANK e col. (1976), a administração intravenosa de α e β -CD produziu toxicidade renal em ratos Sprague-Dawley. A administração de 1400mg de α -CD e 1820mg de β -CD por Kg de peso corporal, resultou na morte de 100% dos animais, após 24h. SZEJTLI e SEBASTYÉN (1979), entretanto, consideraram estas doses elevadas demais para administração de forma intravenosa.

Andersen e col. (1963), citados em SZEJTLI e SEBASTYÉN (1979), administraram oralmente amido e ciclodextrinas radioativas a ratos. Foi observado que a expiração do CO_2 radioativo devido ao amido, ocorria entre 1 e 2h após a ingestão, e a do β -CD entre 8 e 9h. Segundo estes pesquisadores, a β -CD somente era absorvida, após hidrólise, pelas enzimas da microbiota intestinal, sendo em seguida metabolizada pela mesma rota do amido.

A administração oral de um hidrolisado de amido (contendo 38% de β -CD e 2,8% de α -CD) e β -CD cristalina (97% pura), a ratos e cães, em doses diárias de 200, 400 e 600mg por Kg de peso corporal, não causou diferenças significativas em relação ao grupo de animais controle.

segundo os testes clínicos e bioquímicos. Os estudos patológicos e histopatológicos realizados após seis meses, não provaram qualquer alteração dos sistemas digestivo, nervoso central e circulatório. A β -CD não apresentou qualquer efeito embriotóxico ou teratogênico. Os testes de cromossomas desenvolvidos com ratos, após seis meses, não aumentaram a incidência de aberração espontânea, e nenhuma mutação foi observada (SZEJTLI e col., 1978; SZEJTLI e SEBASTYÉN, 1979).

2.9) Aplicações das ciclodextrinas

Para SAENGER (1980), a inclusão molecular representa uma microencapsulação. Assim, as ciclodextrinas podem ser empregadas de diversos modos, devido ao fato de poderem formar complexos com a maioria das pequenas moléculas com diâmetro entre 5 e 8Å. As possibilidades de aplicações práticas das CDs têm aumentado durante os últimos anos, refletindo em crescente número de patentes (SAENGER, 1980).

A utilização dos complexos de ciclodextrinas pelas indústrias tem resultado nos seguintes melhoramentos (HORIKOSHI, 1979; SAENGER, 1980; NSKK, 1983):

I) Estabilização ou prevenção das oxidações e degradações por UV, durante o processamento e a estocagem.

II) Modificação da atividade química da molécula hospedeira:

a- substâncias reativas são protegidas pela inclusão, e podem ser misturadas como outras sem qualquer risco;

b- reações podem ser conduzidas seletivamente pela inclusão de grupos funcionais.

III) Fixação de substâncias muito voláteis:

a- estocagem e manuseio são melhorados, especialmente no caso de

substâncias tóxicas;

b- a quantidade de substância volátil requerida pode ser reduzida, uma vez que pouca ou nenhuma volatilização ocorrerá durante a estocagem;

c- estabilização de flavor em condimentos, especiarias, etc.

IV) Modificação de propriedades físicas e químicas.

a- aumenta a solubilidade de produtos medicinais em água;

b- mascara a mudança de cores e fluorescência;

c- mascara o amargor em produtos alimentares e medicinais.

V) Emulsificação de esteróis, óleos, gorduras e ácidos graxos.

VI) Solidificação de hidrocarbonetos, óleos e ácidos graxos.

Reiners e Birkhang (1970), citados por SZEJTLI (1984), elaboraram um procedimento para remover ácidos graxos livres de óleos vegetais, baseado na formação de complexos com ciclodextrinas. As ciclodextrinas foram dissolvidas em água e emulsificadas com óleo. A fase aquosa era separada posteriormente. Com o aquecimento desta até a ebulição, os complexos CDs-ácidos graxos eram decompostos. Com o resfriamento, os ácidos graxos solidificavam-se na fase superior, enquanto na fase inferior, as CDs cristalizavam-se e podiam ser reutilizadas.

As Cds aumentam a solubilidade de diversos compostos fármacos em água. LACH e COHEN (1963), verificaram que a α e β -CD aumentaram a solubilidade de 19 fármacos em água, entre eles a sulfadiazina, a morfina, o ácido benzóico, a benzocaína, a vanilina, etc. TAKKAR e col. (1972) constataram que a β -CD forma inclusão molecular com barbituratos, aumentando a solubilidade destes em água.

KONNO e col. (1981) observaram que a adição de 0,3% de β -CD aos sucos cítricos reduziu sensivelmente o amargor conferido pela

naringina e limonina.

As ciclodextrinas podem ser polimerizadas com epíclorohidrinas, obtendo-se resinas que podem ser utilizadas em cromatografia em gel. Efeitos especiais de separação puderam ser obtidos durante a cromatografia, devido à inclusão molecular (WIEDENHOF, 1969; SZEJTLI e col., 1978; WIEDENHOF e col., 1969). A aplicação destes polímeros na remoção de componentes responsáveis pelo amargor de sucos cítricos (naringina e limonina), tem sido estudada por diversos pesquisadores (SHAW e col., 1984; SHAW e WILSON, 1985; SHAW e BUSLIG, 1986; WAGNER e col., 1988; WILSON e col., 1989). SZEJTLI (1984) relata que a adição de 10% de β -CD eliminou completamente o sabor amargo em hidrolisado protéico de caseína.

As prostaglandinas são efetivos agentes estimuladores da musculatura lisa, mesmo em diminutas quantidades, entretanto, são muito instáveis. A complexação com ciclodextrinas provou ser um excelente método para estabilizá-las e aumentar a sua solubilidade em água (SZEJTLI, 1984).

A produção de antibióticos do grupo lankacidina foi bastante estimulada pela adição de β -CD ao meio de fermentação. A ciclodextrina não apresentava qualquer efeito sobre o crescimento do *Streptomyces*. A presença de 1,5% de β -CD elevou a produção do antibiótico de 0,4mg/ml para 3,1 mg/ml no meio de cultivo (SAWADA, e col., 1987). BAR e ROKEM (1990) constataram que também a adição de α e β -CD ao meio de cultivo da *Serratia marcescens*, em concentração final de 0,01M, favorecia a produção do antibiótico prodigiosina. A presença da α -CD aumentou o rendimento em 68%, para a β -CD o aumento foi de 92%. A adição de γ -CD, ao contrário, diminuiu a produção do antibiótico.

LINDNER e col. (1981) estudaram a encapsulação de extratos

aromáticos de alho, alecrim, mostarda, cebola entre outros, com 10% de β -CD. Os complexos resultantes eram estáveis por vários anos, sem qualquer perda do aroma, e isentos de impurezas microscópicas e microbiológicas.

O benzaldeído, uma substância carcinostática, é facilmente oxidável, com pungente odor e propriedades irritativas locais. Estes problemas podem ser superados complexando-se o benzaldeído com a β -ciclodextrina, sem qualquer perda da sua propriedade carcinostática (TAKEUCHI e col., 1978).

SAENGER (1980) relata que as piretrinas são muito tóxicas aos insetos e pouco tóxicas aos animais de sangue quente. Elas constituem um óleo amarelado com grande sensibilidade à luz, o que tem dificultado seu emprego como inseticida. Entretanto, a inclusão das piretrinas com a β -CD forma um pó que é facilmente manuseável, muito estável e tóxico aos insetos, após um longo período de aplicação.

Segundo MIKOLAJCZYK e DRABOWICS (1978), as ciclodextrinas podem ser utilizadas na resolução de racematos. As CDs são moléculas óticamente ativas, uma vez que são constituídas de unidades de glicoses óticamente ativas. A inclusão molecular de compostos quirais resulta numa mistura de diastereoisômeros, que são formados em quantidades desiguais, especialmente quando o excesso de compostos quirais são usados. Por esta razão, a estereoespecificidade da inclusão com ciclodextrinas, pode ser aplicada para a resolução de misturas racêmicas. A vantagem deste processo é a resolução sem a necessidade de se adicionar de grupos funcionais básicos ou ácidos, normalmente utilizados pelos processos clássicos.

Outras possibilidades de aplicações das ciclodextrinas, podem ser obtidas nas publicações de GRIFFITHS e BENDER (1967), HORIKOSHI

(1979), SZEJTLI (1982), (1984), SAENGER (1980), NSKK (1983) e PSZCZOLA
(1988).

3) MATERIAL E MÉTODOS

A cultura de *Bacillus lentus* alcalofílico produtora de CGTase estudada neste trabalho, foi isolada durante a execução do experimento.

Reagentes químicos tais como ácidos, bases, sais minerais, solventes, carboidratos e indicadores de pH, comercializados pela Merck, Reagen, Carlo Erba, Riedel, Ecibra ou equivalente, apresentavam pureza analítica desejável. Reagentes específicos como p-cloromercuribenzoato, iodoacetamida, albumina bovina, ácido ascórbico oxidase e ciclodextrinas, eram comercializados pela Sigma.

Ingredientes de meios de cultivos como peptona, agar, extrato de levedura eram da marca Difco ou Merck.

Foram utilizadas as resinas DEAE-celulose (dietilaminoetil celulose, Sigma), CM-celulose (carboximetil celulose, Sigma) e Sephadex G-200 (40-120 μ , Pharmacia Fine Chemicals Inc.).

Equipamentos utilizados:

- Câmara climática, modelo 346 FANEM.
- Estufas bacteriológicas, FANEM.
- Espectrofotômetro Perkin-Elmer, duplo feixe.
- Espectrofotômetro Coleman, modelo 295.
- Banhos de água com temperatura controlada, FANEM.
- Potenciômetro Digimed.
- Centrífuga refrigerada Beckman, modelo J-21B.
- Coletor de frações Buchler, modelo Fractometre Alpha 200.
- Cromatógrafo de alta pressão, marca Waters composto de bomba

6000A, coluna ZORBAX -NH₂ (4,6x250mm, da Dupont), detector de índice de refração U6K e integrador Hp-3390(VDC).

3.1) Isolamento do microrganismo alcalofílico produtor de CGTase

Para o isolamento dos microrganismos produtores de CGTase foram analisadas 156 amostras de diversos locais da cidade de Campinas(SP), tais como: solos de plantações de milho, soja, mandioca, arroz, algodão, solos de terrenos baldios e solos não cultivados. Foram utilizadas também amostras líquidas procedentes de efluentes de fábricas e esgoto doméstico. Um grama(1g) ou um mililitro(1ml) da amostra era diluída em 50ml de água destilada estéril, e 0,1ml da diluição era inoculado superficialmente em placas contendo o meio de cultivo alcalofílico de PARK e col.(1989), descrito no Quadro 1.

Quadro 1. Composição do meio de cultivo de PARK e col. (1989), juntamente com a marca do ingrediente utilizado.

Amido solúvel.....	1% (Reagen).
Polipeptona.....	0,5% (Difco).
Extrato de levedura.....	0,5% (Difco).
K ₂ HPO ₄	0,1% (Merck).
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,02% (May & Baker).
Na ₂ CO ₃	1% (Reagen), adicionado após esterilização.
Fenolftaleína.....	0,03% (Ecibra).
Alaranjado de metila.....	0,01% (Carlo Erba).
Agar.....	1,5% (Difco).
pH final.....	10,3.

As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C por até 5 dias. Após este período, as colônias com halo amarelo, supostamente CGTases positivas, eram inoculadas em tubos inclinados contendo o agar de manutenção alcalofílico de NAKAMURA e HORIKOSHI (1976d), descrito no Quadro 2. Após incubação a 37°C durante uma noite, as culturas foram conservadas em temperatura ambiente, sendo repicadas a cada três meses.

Quadro 2. Composição do meio de manutenção (NAKAMURA e NAKAMURA, 1976d).

Amido solúvel.....	1%
Peptona.....	0,5%
Extrato de levedura.....	0,5%
$K_2 HPO_4$	0,1%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,02%
$Na_2 CO_3$	1%
Agar.....	2%
pH final.....	10,3

3.2) Métodos de determinação da atividade de CGTase

A atividade enzimática da CGTase foi determinada através da capacidade de formação de ciclodextrinas, pelo método ciclodextrina-tricloroetileno (CD-TCE), descrito por NOMOTO e col. (1984), e pela medida da atividade dextrinizante da enzima (FUWA, 1954), com as modificações introduzidas por PONGSAWASDI e YAGISAWA

(1987). A Unidade Enzimática (U) foi expressa pela atividade dextrinizante da CGTase. Tais métodos estão descritos a seguir:

a) Método CD - TCE

A enzima em solução foi diluída sucessivamente, de duas em duas vezes com tampão borato 50mM, pH 8,5 (GOMORI, 1955), de modo a obter fatores de diluição de 2^1 , 2^2 , 2^3 , 2^4 ... 2^n . Um mililitro (1ml) da solução de enzima diluída foi adicionado a 5ml de amido solúvel 2%, preparado com o mesmo tampão, e a mistura incubada a 55°C por 24h para que houvesse a reação de formação de ciclodextrinas. Após a incubação, adicionou-se 2,5ml de tricloroetileno(TCE) à mistura que foi, então, submetida a uma forte agitação, seguida de repouso durante uma noite à temperatura ambiente. Com estes procedimentos, deve ocorrer um abundante precipitado do complexo CD-TCE nos tubos de ensaio, até o fator de diluição que seja seguido de um fator com fraca ou nenhuma precipitação. 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).

b) Atividade dextrinizante e Unidade enzimática (U)

A unidade enzimática foi calculada em função da propriedade dextrinizante da enzima. Para isso, 0,1ml de solução da enzima, convenientemente diluída, foi adicionado a 0,3ml de amido solúvel 0,2%, ambos preparados em tampão acetato 50mM(pH 5,8). Após incubação a 55°C por 10min, a reação foi paralisada com a adição de 4ml de HCl 0,2M. Depois, a solução recebeu meio mililitro do reagente de

iodo(0,2% de KI e 0,02% de I₂) e, a seguir, foi a diluída para 10ml com água destilada. A absorvância foi determinada a 700nm em espectrofotômetro Coleman, modelo 295. No tubo controle, a enzima era colocada após a adição do HCl. Uma unidade enzimática 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; PONSASWADI e YAGISAWA, 1987).

Nas condições anteriores, o número de unidades da enzima por mililitro da solução(U/ml) foi calculado pela seguinte fórmula:

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

Onde: A₀ = absorvância do tubo controle (enzima inativada)

A = absorvância do tubo teste (enzima ativa)

3.3) Produção e quantificação da CGTase dos microrganismos isolados

Na avaliação da capacidade da produção de CGTase, os microrganismos alcalofílicos isolados foram cultivados durante 72h a 37°C sob agitação de 100 ciclos/min, em 20ml do meio líquido alcalofílico (pH 10,3) de HORIKOSHI(1971), descrito no Quadro 3. Este meio de cultivo foi denominado MEIO A. Após a remoção das células por centrifugação(11200xg por 10 min a 5°C), em centrífuga refrigerada Beckman modelo J-21B, a CGTase presente no sobrenadante foi analisada semiquantitativamente pelo método da Ciclodextrina Tricloroetileno(CD-TCE). Os microrganismos que apresentaram atividade da enzima CGTase em diluição maior ou igual a 2⁷ foram considerados bons produtores de CGTase(NOMOTO, 1984), e submetidos a uma repetição do teste CD-TCE para a comprovação dos resultados.

Quadro 3. Meio de cultivo para produção da CGTase (HORIKOSHI, 1971).

Amido solúvel.....	2%
Peptona.....	0,5%
Extrato de levedura.....	0,5%
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,02%
K ₂ HPO ₄	0,1%
Na ₂ CO ₃	1%
pH final.....	10,3.

3.4) Avaliação da capacidade de produção da CGTase em pH 7,2

As culturas alcalofílicas que apresentaram atividade CD-TCE em diluição 2⁸, foram submetidas a estudos para avaliação da capacidade de produção da enzima CGTase em pH 7,2.

Para isso, as culturas alcalofílicas foram cultivadas a 37°C por 18h em tubos contendo o meio de manutenção inclinado (pH 10,3). Após a incubação, as culturas foram repicadas para o mesmo meio com pH 9,0 e incubadas nas condições anteriores. Tal procedimento foi executado sucessivamente, em meios com pH 8,5; 8,0; 7,5 e 7,2. O pH do meio foi ajustado com a adição de solução aquosa de Na₂CO₃ a 5%, estéril. Em pH 7,2 (sem Na₂CO₃), o meio foi suplementado com 1% de NaCl, com a finalidade de suprir as necessidades dos microrganismos para íons Na⁺ (GORDON e HYDE, 1982). As linhagens com capacidade de crescimento em pH 7,2, obtidas desta forma, foram cultivadas a 30°C por 72h sob agitação de 100 ciclos/min em Meio A líquido (sem Na₂CO₃), com pH 7,2, suplementado com 1% de NaCl. Em seguida à incubação, a CGTase foi quantificada pelo método CD-TCE (NOMOTO e col., 1984).

3.5) Estudos taxonômicos dos microrganismos isolados

Os microrganismos isolados que apresentaram atividade enzimática em diluição 2^8 pelo teste CD-TCE foram submetidos a estudos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, para a classificação taxonômica. Estes estudos foram conduzidos de acordo com o Manual de Bergey's (SNEATH, 1986).

Considerando-se que os microrganismos eram alcalofílicos e o fato de não existirem meios de cultivos específicos para estudos taxonômicos, os meios de cultivos descritos por SNEATH (1986) foram suplementados com 1% de Na_2CO_3 (pH 10,3), desde que a leitura da prova bioquímica não fosse alterada pelo pH alcalino. Neste pH foram conduzidos os seguintes testes: coloração de Gram, esporulação, temperatura de crescimento, redução do nitrato, hidrólise da caseína, gelatina, amido, fenilalanina desaminase, tolerância ao cloreto de sódio, Voges Proskauer, crescimento anaeróbico, catalase, indol, motilidade e produção de ácidos a partir de carboidratos. O teste da hidrólise da tirosina foi conduzido em pH 7,2, utilizando-se as linhagens variantes dos alcalofílicos com capacidade de crescimento naquele pH (obtidas no item anterior), de modo semelhante aos estudos de GORDON e HYDE (1982).

A partir dos estudos taxonômicos, a cultura de nº 42, identificada como *Bacillus lentus*, foi escolhida aleatoriamente para estudos de produção e caracterização da CGTase.

3.6) Efeito da temperatura sobre o crescimento microbiano e produção da CGTase

O *Bacillus lentus* foi cultivado, por uma noite a 37°C , em agar de

manutenção. Depois da incubação, preparou-se uma suspensão celular homogênea, usando-se o Meio A líquido como diluente. Meio mililitro da suspensão foi usada como inóculo em 70ml de Meio A líquido (pH 10,3), em erlenmeyer de 250ml. Os frascos foram incubados em temperaturas de 30, 37 e 40°C por 96h, sob agitação de 100 ciclos/min. Durante a incubação, alíquotas de três mililitros eram retiradas e centrifugadas a 11200xg por 10min, a 5°C. No sobrenadante determinou-se a atividade de CGTase pelo método CD - TCE.

O crescimento celular foi avaliado pela medida da Densidade ótica a 640nm (MALLETT, 1969). Para isso, a massa celular sedimentada com a centrifugação anterior foi ressuspenida com 5ml de água destilada, e novamente centrifugada em condições idênticas. Este processo foi repetido por duas vezes. Finalmente, as células foram ressuspenidas com 3ml de água destilada, e a densidade ótica da suspensão foi determinada a 640nm, em espectrofotômetro Coleman modelo 295.

3.7) Estudo do efeito de diversas fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção de CGTase

Procurando seguir os procedimentos de NAKAMURA e HORIKOSHI (1976a), algumas variações sobre as fontes de carbono e nitrogênio foram introduzidas no Meio A, para verificar o efeito sobre a produção da CGTase pelo *Bacillus lentus*. Estes estudos foram conduzidos em forma de tratamentos, os quais estão descritos nas Tabelas 2 e 3. Em frasco erlenmeyer de 250ml foi adicionado, separadamente, 70ml do meio cultivo correspondente a cada tratamento. Após a esterilização (15min/121°C), o pH foi corrigido para 10,3 com Na₂CO₃ 20%, estéril. Cada frasco foi inoculado com o microrganismo. Em seguida à incubação por 72h a 37°C sob agitação de 100 ciclos/min, o

meio foi centrifugado a 11200xg por 5min a 5°C. No sobrenadante determinou-se a atividade enzimática pelos métodos CD-TCE e atividade dextrinizante a 40°C, conforme descrito no item 3.2.

Tabela 2. Variações das fontes de carbono introduzidas no Meio A. (meio de cultivo: 0,5% extrato de levedura, 0,1% K₂HPO₄, 0,02% MgSO₄.7H₂O, 1% Na₂CO₃, pH 10,3, suplementado com os tratamentos indicados)

Tratamentos	Fonte de carbono(2%)	Fonte de nitrogênio(0,5%)
T ₁	nenhuma	peptona
T ₂	glicose	"
T ₃	frutose	"
T ₄	maltose	"
T ₅	dextrina	"
T ₆	amido solúvel	"
T ₇	sacarose	"
T ₈	lactose	"
T ₉	β-ciclodextrina	"
T ₁₀	amilopectina	"

3.8) Produção e fracionamento da CGTase

Para se certificar de que o *Bacillus lentus* não produzia outras amilases além da CGTase, um hidrolisado obtido de uma solução de amido 2% em tampão borato 50mM (pH 8,5), após 48h de incubação a 55°C, foi submetido à cromatografia em papel e à dosagem de açúcares redutores pelo método de SOMOGYI (1945).

3.8.1) Produção da CGTase

Um cultivo do *Bacillus lentus* em meio de manutenção foi inoculado

Tabela 3. Variações das fontes de nitrogênio introduzidas no Meio A. (meio de cultivo: 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% K_2HPO_4 , 1% Na_2CO_3 , pH 10,3, suplementado com os tratamentos indicados)

Tratamentos	Fontes de nitrogênio	Fontes de carbono	Extrato de levedura
T ₁₁	nenhuma	2% amido solúvel	0,5%
T ₁₂	1% farinha de soja	"	"
T ₁₃	1% extrato de carne	"	"
T ₁₄	1% uréia	"	"
T ₁₅	1% ácidos casamínicos	"	"
T ₁₆	1,5% extrato de levedura	"	-
T ₁₇	1% peptona	"	0,5%
T ₁₈	1% sulfato de amônio	"	"
T ₁₉	2% Água de maceração de milho(AMM) ^a	1% amido solúvel	"
T ₂₀	2% AMM	2% amido solúvel	"
T ₂₁	4% AMM	"	- ^b
T ₂₂	2% AMM	"	-
T ₂₃	1% AMM	"	-

a- AMM com 50% de sólidos

b- não adicionado

num frasco erlenmeyer de 250ml contendo 70ml do meio A (pH 10,3) estéril, desprovido de peptona, conforme descrito no tratamento T₄₄ (Tabela 3) do item 3.7. O frasco foi incubado a 37°C durante uma noite, sob agitação de 100 ciclos/min. Um mililitro (1ml) deste cultivo foi utilizado como inóculo para 29 novos frascos contendo o mesmo meio de cultivo. Todos os frascos foram incubados a 37°C por 96h, sob agitação de 100 ciclos/min (condições ótimas de incubação para produção da CGTase). Após a incubação, os conteúdos destes 29 frascos foram reunidos num único volume, e as células foram separadas por centrifugação a 11200xg durante 10min.

3.8.2) Fracionamento com sulfato de amônio

Ao sobrenadante a 5°C, obtido com a centrifugação citada no item anterior, foi adicionado sulfato de amônio sólido até atingir 80% de saturação, e a mistura foi mantida a 5°C durante uma noite. O precipitado assim obtido, foi separado por centrifugação a 11200xg por 10min a 5°C, ressuspenso em tampão borato 50mM (pH 8,5), e dialisado a 5°C por 48h em água destilada. A CGTase foi quantificada pelo método da atividade dextrinizante, a 55°C em tampão acetato 50mM (pH 5,8).

3.8.3) Fracionamento em coluna de DEAE - celulose

O dialisado obtido na etapa anterior foi aplicado em coluna (25 x 450mm) de DEAE-celulose, previamente equilibrada com tampão borato 50mM (pH 8,5). Posteriormente à lavagem da coluna com 500ml do mesmo tampão, as proteínas foram eluídas aplicando-se volumes de 600ml do tampão borato contendo concentrações crescentes de NaCl (0,1 a 1M). As frações coletadas a uma vazão de 10ml por 20min, por meio de coletor de frações Buchler (modelo Fractometre Alpha 200), foram submetidas à

leitura da absorbância a 280nm em aparelho Perkin-Elmer, duplo feixe. Fracções contendo atividade dextrinizante foram reunidas num único volume, o qual foi transferido para um saco de diálise e concentrado por osmose, a 5°C, mediante a adição de Polietilenoglicol (PEG) 6000 (Reagen) sólido, conforme procedimento descrito em NAKAMURA e HORIKOSHI (1976b). O concentrado foi dialisado por 48h em água destilada, a 5°C.

3.8.4) Fracionamento em coluna de CM - Celulose

O efluente da coluna DEAE-celulose, após concentração com PEG-6000, foi aplicado em coluna (25 x 400mm) de CM-celulose, previamente equilibrada com tampão borato 50mM(pH 8,5). Iniciou-se a eluição com 200ml do mesmo tampão numa vazão de 10ml por 30min, seguida de aplicação do mesmo volume de tampão contendo concentrações crescentes de NaCl(0,1 a 1M). As fracções foram submetidas à leitura da absorbância a 280nm, e aquelas que continham atividade dextrinizante foram reunidas e concentradas com PEG-6000. Esta preparação contendo a CGTase, constatada pela atividade CD-TCE(NOMOTO e col, 1986), foi subdividida em pequenas porções, e conservadas em congelador. As porções eram descongeladas de acordo com a necessidade, durante os estudos de caracterização da enzima.

O método de determinação de proteínas de LOWRY e col.(1951) foi utilizado para os cálculos da atividade específica, durante as etapas de purificação da CGTase. A albumina bovina(Sigma) foi usada como proteína padrão.

3.9) Caracterização bioquímica da CGTase purificada

Nos estudos de caracterização bioquímica da CGTase do *Bacillus*

lentus, a atividade da enzima purificada foi acompanhada pela atividade dextrinizante (FUWA 1954), com as modificações introduzidas por PONGSAWASDI e YAGISAWA (1987), e pela formação de ciclodextrinas através do método CD-TCE (NOMOTO e col., 1984), conforme a descrição feita no item 3.2. Foram avaliados os seguintes parâmetros: pH ótimo e de estabilidade, temperatura ótima e de estabilidade, efeito de íons e inibidores, peso molecular, etc.

3.9.1) Efeito do pH

O efeito do pH na atividade dextrinizante e na formação de ciclodextrinas da CGTase, foi estudado numa faixa de pH de 3,5 a 10,2, especificamente em valores de pH 3,5; 4,5; 5,4; 5,8; 6,2; 7,5; 8,5; 9,5 e 10,2. Foram utilizados os seguintes sistemas tampões a 50mM: tampão acetato (pH 3,5 a 5,5), tampão fosfato (pH 5,8 a 7,0), tampão borato-ácido bórico (pH 7,5 a 9,0), tampão borato-NaOH (pH 9,5 a 10,5).

a) Efeito do pH na atividade dextrinizante

Para cada valor de pH estudado, 0,1ml de uma solução da CGTase purificada contendo aproximadamente 6,7U/ml foi adicionado a 0,3ml de amido solúvel 0,2%, ambos preparados em tampão 50mM com o respectivo pH previamente ajustado. A atividade dextrinizante foi então determinada, após incubação por 10min a 55°C.

b) Efeito do pH na formação de ciclodextrinas

Para determinar o efeito de cada valor de pH na formação de ciclodextrinas, cada 0,5ml de uma solução de CGTase contendo 337U/ml foi transferido para um tubo contendo 1ml do tampão a 0,1M, com o respectivo pH em estudo. O volume foi completado para 2ml com água destilada. Para a série de diluições da enzima, necessárias para o método CD-TCE, o tampão foi preparado a 50mM. O substrato, amido

solúvel 2%, também foi preparado em tampão a 50mM. A mistura reagente, contendo 5ml deste substrato e 1ml da enzima diluída, foi incubada a 55°C por 24h. Terminada a incubação, determinou-se a formação de ciclodextrinas pelo método CD-TCE.

3.9.2) Estabilidade ao pH

A estabilidade da CGTase ao pH, medida pela atividade dextrinizante e pela formação de ciclodextrinas, foi estudada tratando-se a enzima com soluções tampões em valores de pH 4,5; 5,5; 5,8; 6,5; 7,5; 8,5; 9,5 e 10,5, utilizando-se os mesmos sistemas de tampões descritos no subitem anterior.

a) Estabilidade da atividade dextrinizante ao pH

A enzima purificada foi diluída a uma concentração final de 6,7U/ml nos sistemas de tampões a 50mM cada qual com o respectivo pH, e submetida a um tratamento térmico a 45°C por 30min. Em seguida, determinou-se a atividade dextrinizante residual em 0,1ml da enzima, utilizando-se como substrato, 0,3 ml de amido solúvel 0,2%, preparado em tampão fosfato 0,4M (pH 5,8).

b) Estabilidade da formação de ciclodextrinas ao pH

Alíquotas de 0,5ml de uma solução da CGTase purificada com 337U/ml, foram transferidas para tubos de ensaio, cada um com um pH específico e contendo 1ml dos sistemas tampões a 0,1M. Os volumes foram completados para 2ml com água destilada. Depois de se submeter os tubos ao tratamento térmico já mencionado, determinou-se a atividade de formação de ciclodextrinas residual. Para a série de diluições da enzima, necessárias para o método CD-TCE, utilizou-se o tampão borato 0,2M (pH 7,5). O substrato, amido solúvel 2%, foi preparado em tampão borato 0,1M (pH 7,5). A mistura reagente, contendo

5ml deste substrato e 1ml da enzima diluída, foi incubada a 55°C por 24h. Após o que determinou-se a formação de ciclodextrinas pelo método CD-TCE.

3.9.3) Efeito da temperatura na atividade enzimática

O efeito da temperatura sobre a atividade da CGTase foi estudado numa faixa de 22 a 70°C, especificamente em temperaturas de 22, 35, 40, 45, 50, 55, 60 e 70°C.

a) Efeito da temperatura na atividade dextrinizante

Alíquotas de 0,1ml de solução da CGTase purificada contendo 6,7U/ml foram transferidas para tubos contendo 0,3ml de amido solúvel 0,2%, ambos preparados em tampão fosfato 50mM (pH 5,8). Após incubação dos tubos nas diversas temperaturas por 10min a 55°C, determinou-se a atividade dextrinizante.

b) Efeito da temperatura na formação de ciclodextrinas

O efeito da temperatura na formação de ciclodextrinas foi estudado com 0,5ml de solução da CGTase purificada contendo 337U/ml, em tampão borato 50mM (pH 7,5), através do método CD-TCE, incubando-se por 24h nas diversas temperaturas.

3.9.4) Estabilidade térmica

A termoestabilidade da atividade dextrinizante e formação de ciclodextrinas da CGTase foi estudada em temperaturas entre 35 e 70°C.

a) Termoestabilidade da atividade dextrinizante

Alíquotas de 2ml de uma solução da CGTase purificada, contendo 6,7U/ml, em tampão borato 50mM (pH 7,5), foram mantidas nas temperaturas de 35, 40, 45, 50, 55, 60 e 70°C por 30min. Em seguida, a atividade dextrinizante residual foi determinada em 0,1ml da enzima tratada termicamente, utilizando-se como substrato 0,3ml de solução de

amido solúvel 0,2%, preparado em tampão fosfato 0,4M(pH 5,8).

b) Termoestabilidade da formação de ciclodextrinas

Em tubos que continham 1ml de tampão borato 0,1M (pH 7,5), foram adicionados 0,5ml de solução da CGTase purificada contendo 337U/ml. Os volumes foram completados para 2ml com água destilada. Os tubos foram mantidos nas temperaturas de 35; 40; 45; 50; 55; 60 e 70°C por 30min. Em seguida, determinou-se a formação de ciclodextrinas residual da CGTase, através do método CD-TCE.

3.9.5) Efeito do CaCl_2 e EDTA na termoestabilidade da atividade dextrinizante e formação de ciclodextrinas da enzima CGTase

O efeito do CaCl_2 e EDTA sobre a termoestabilidade da atividade dextrinizante da CGTase foi estudado em soluções da enzima purificada (6,7 U/ml) em tampão borato 50mM(pH 7,5), contendo respectivamente, concentrações de 5, 10, e 20mM de CaCl_2 , e 1mM de EDTA. Uma solução contendo somente a CGTase, foi usada como controle. Estas soluções, colocadas em tubos, foram incubadas em banho de água a 55°C, e em intervalos de tempo predeterminados (15, 30, 60, 90, 120 e 150min) foram retiradas alíquotas de 0,1ml para a determinação da atividade dextrinizante residual, usando-se como substrato 0,3ml de amido solúvel 0,2% preparado em tampão fosfato 0,4M(pH 5,8).

Para o estudo do efeito do CaCl_2 e EDTA na termoestabilidade da formação de ciclodextrinas da CGTase, foram colocados 0,5ml da solução de enzima purificada (337U/ml) em tubos contendo, cada um, 1ml de tampão borato 0,1M (pH 7,5), CaCl_2 nas concentrações de 5, 10 e 20mM, e EDTA na concentração de 1mM. Um tubo contendo somente a enzima foi usado como controle. O volume de cada tubo foi ajustado para 2ml com água destilada. Após submetê-los a um tratamento térmico a 55°C por

150min, determinou-se a atividade de formação de ciclodextrinas residual da CGTase pelo método CD-TCE.

3.9.6) Efeito de íons e inibidores

O efeito de íons e inibidores sobre a formação de ciclodextrinas da CGTase foi estudado utilizando-se os sais CoCl_2 , MgSO_4 , ZnSO_4 , MnSO_4 , HgCl_2 , CuSO_4 , FeSO_4 e KCl na concentração de 5mM, e os inibidores iodoacetoamida a 5mM e p-cloromercuribenzoato a 0,1 e 0,5mM. Para isto, amostras de 0,5ml da solução de enzima purificada com 337U/ml, foram diluídas até 2^8 , pelo método de NOMOTO e col.(1984) em tampão borato 50mM (pH 7,5) contendo o íon ou o inibidor em estudo. Após 1h de repouso à temperatura ambiente, adicionou-se a cada amostra 5ml do substrato amido solúvel 2%, preparado no mesmo tampão, contendo também o íon ou o inibidor na concentração em estudo. Depois de uma incubação a 55°C por 24h, determinou-se a formação de ciclodextrinas pelo método CD-TCE.

3.9.7) Determinação do peso molecular da CGTase

A enzima teve seu peso molecular determinado em coluna de SEPHADEX G-200 (Pharmacia Fine Chemicals Inc.), conforme a metodologia de ANDREWS (1965). Foram utilizadas como padrões a enzima ácido ascórbico oxidase (PM 140.000, Sigma) e a albumina bovina (PM 65.000, Sigma).

3.10) Efeito da concentração da CGTase na formação de ciclodextrinas

O efeito da concentração da enzima sobre a velocidade de conversão do amido solúvel em ciclodextrinas foi estudado com uma concentração fixa de substrato, 1% de amido solúvel contendo 10mM de

CaCl₂, preparado em tampão borato 50mM (pH 7,5). Cada uma das diferentes concentrações da enzima (0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6ml de uma solução da CGTase contendo 760U/ml) foi, separadamente, adicionada a 100ml do substrato e incubadas a 55°C. Nos tempos de 1, 3, 8, 24, 32 e 48h de incubação, foram retiradas, simultaneamente, alíquotas de 2 e 5ml para a determinação imediata da porcentagem de substrato convertido em ciclodextrinas, através do método da glicoamilase descrito por MATZUZAWA e col.(1975), e por gravimetria, após a precipitação com tricloroetileno (KITAHATA e OKADA, 1975). Tais métodos são descritos adiante:

a) método da glicoamilase

As alíquotas de 2ml foram colocadas em tubos com tampas rosqueáveis e submetidas a um tratamento térmico por 10min em água em ebulição. O pH foi corrigido para 4,5 (pH ótimo da glicoamilase) com a adição de 0,03ml de ácido acético 0,2M. Após a adição de 386 unidades de glicoamilase (atividade dextrinizante a 55°C) de *Aspergillus niger* (NOVO), contidas em 0,2ml de tampão acetato 50mM (pH 4,5), os tubos foram incubados a 55°C por 6h para hidrolisar o amido não convertido em ciclodextrinas. Terminada a incubação, a glicoamilase foi inativada por um tratamento térmico em água em ebulição por 10min. Os açúcares redutores foram quantificados pelo método de SOMOGYI (1945). A quantidade de carboidrato total foi determinado pela técnica de DUBOIS e col. (1956).

A porcentagem de ciclodextrinas foi calculada através da fórmula:

$$\% \text{ ciclodextrinas} = \frac{\text{carboidrato total} - \text{açúcares redutores}}{\text{carboidrato total}} \times 100$$

b) método gravimétrico

As alíquotas de 5ml retiradas durante a incubação foram transferidas para tubos de ensaio, previamente tarados, e submetidas a tratamento térmico (10min em água em ebulição) para a inativação da CGTase. Após seu resfriamento em banho de água com gelo, adicionou-se 2,5ml de tricloroetileno aos tubos e os submeteu-os a uma intensa agitação manual por 1min, objetivando-se a precipitação das ciclodextrinas, a que se seguiu um repouso de uma noite para a sedimentação. Realizada a centrifugação em rotor radial por 10min a 340xg, o sobrenadante (fase aquosa) foi descartado, e o material precipitado nos tubos passou por um processo de secagem de 48h a 65°C, e foi pesado novamente. Alternativamente, a aplicação de vácuo reduziu o tempo de secagem. O rendimento em ciclodextrinas foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ ciclodextrinas} = \frac{\text{ciclodextrinas formadas}}{\text{carboidrato total(em 5ml)}} \times 100$$

3.11) Determinação da proporção entre os tipos de ciclodextrinas formadas durante a hidrólise do amido pela enzima CGTase

A proporção de formação das CDs durante a hidrólise do amido foi avaliada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), seguindo SATO e col. (1985). A 100ml de suspensão de amido solúvel a 1% em tampão borato 50mM (pH 7,5), foi adicionado 0,8ml de uma solução da CGTase (760U/ml) e 10mM de CaCl₂. A mistura foi incubada a 55°C e, após 24 e 48h, retirou-se alíquotas de 2ml, as quais foram tratadas com amiloglicosidase para hidrolisar o amido não convertido em CDs, conforme foi descrito no item 3.10. Em seguida, 10µl da amostra foram

submetidos a CLAE nos aparelhos e nas condições descritos a seguir. Foi utilizado um cromatógrafo marca Waters, composto de bomba modelo 6000A, injetor U6K, detetor de índice de refração R-401, equipado com integrador Hp 3390(VDC) e coluna ZORBAX-NH₂ (4,6x250mm), da Dupont. As amostras foram eluídas com acetonitrila-H₂O(65:35) à temperatura ambiente, numa vazão de 1ml/min. As amostras foram comparadas com padrões α , β e γ -CDs(Sigma), preparados em concentração de 0,4% em água destilada.

3.12) Efeito do tipo de carboidrato sobre a formação de ciclodextrinas

Este estudo foi conduzido de modo semelhante ao de NAKAMURA e HORIKOSHI(1976b). Preparou-se o substrato em concentração de 1% em tampão borato 50mM(pH 7,5), contendo 10mM de CaCl₂, com os carboidratos amido solúvel, amido de batata, mandioca, milho e amilopectina de milho. A cada 100ml de substrato com temperatura estabilizada em 55°C, adicionou-se 0,8ml de solução da CGTase contendo 760U/ml. Durante a incubação foram retiradas alíquotas de 5ml para determinar a porcentagem do carboidrato convertido em ciclodextrinas, através do método gravimétrico, descrito no item 3.10.

3.13) Efeito de co-substratos sobre a atividade dextrinizante e formação de ciclodextrinas

Para verificar o efeito de co-substratos sobre a atividade dextrinizante e a formação de ciclodextrinas pela CGTase, foram conduzidos estudos seguindo NAKAMURA e HORIKOSHI(1976b).

Para o estudo do efeito de co-substratos sobre a atividade dextrinizante, foi adicionado 0,1ml de solução da CGTase purificada

(6,7U/ml) a amostras de 0,3ml de amido solúvel 0,2% em tampão acetato 50mM(pH 5,8), contendo cada uma a mesma quantidade de 0,05% ou de glicose, ou sacarose, ou lactose, ou maltose, e 0,3% de β -CD. Após uma incubação a 55°C por 10min, determinou-se a atividade dextrinizante.

O efeito de co-substratos sobre a formação de CDs foi estudado, adicionando-se 0,8ml de solução da CGTase(760U/ml) a 100ml de amido solúvel 1% em tampão borato 50mM(pH 7,5), contendo separadamente os co-substratos nas concentrações descritas anteriormente. Depois da incubação a 55°C por 24h, determinou-se a porcentagem de conversão do substrato em CDs, através do método gravimétrico.

3.14) Obtenção da CGTase bruta em meio de cultura industrial

Neste experimento procurou-se obter uma preparação da enzima na forma comercial. Para a produção da CGTase pelo *Bacillus lentus* utilizou-se o mesmo processo descrito no subitem 3.8.1, exceto o meio de cultivo que foi modificado para a seguinte composição: 2% água de maceração de milho(AMM, da Refinações de Milho, Brasil), 2% amido solúvel, 0,1% K_2HPO_4 e 0,02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, conforme tratamento T₂₂ (Tabela 3) do item 3.7. Após o crescimento microbiano, o meio foi centrifugado por 10min a 11200xg a 5°C. A enzima foi precipitada do sobrenadante mediante a adição de álcool etílico, na concentração de 70% v/v de saturação. A mistura foi mantida a 5°C durante uma noite, para sedimentação do precipitado. No dia seguinte, decantou-se o sobrenadante e o precipitado foi centrifugado novamente a 11200xg por 10min. A massa sedimentada contendo a CGTase foi seca à temperatura ambiente sob corrente de ar, e conservada em geladeira. O número de unidades de CGTase/g desta preparação bruta desidratada foi determinada pela medida da atividade dextrinizante.

3.15) Efeito da concentração da CGTase bruta na produção de ciclodextrinas

Este estudo foi conduzido de modo semelhante ao de MATZUZAWA e col.(1975). A taxa de conversão do substrato em ciclodextrinas foi avaliada com diferentes concentrações da preparação bruta da CGTase, obtida de acordo com os procedimentos descritos no subitem anterior. Adicionou-se de 0,2 a 2,0% desta preparação da CGTase, em relação peso seco do substrato amido solúvel 10% em tampão borato 50mM(pH 7,5), contendo 10mM de CaCl_2 . Após uma incubação por 24h a 55°C, determinou-se o rendimento em CDs pelo método gravimétrico.

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1) Isolamento e caracterização dos microrganismos CGTases positivos

A Tabela 4 mostra a ocorrência de microrganismos alcalofílicos produtores de CGTases, levando em consideração o local de amostragem. Como pode ser verificado, 57,97% das amostras originárias de solos que estavam sendo cultivados, foram positivas para microrganismos alcalofílicos produtores de CGTase. Este resultado sugere que o processo de aração e adubação do solo, seguido de sombreamento pelo crescimento da plantação, parecem contribuir para um maior desenvolvimento daqueles microrganismos. De um total de 156 amostras analisadas, 30,76% revelaram a presença dos microrganismos. Os microrganismos CGTases positivos corresponderam a 7,93% da população total de bactérias alcalofílicas (Tabela 5).

As colônias alcalofílicas CGTases positivas foram isoladas adotando-se os critérios de tamanho, morfologia diferente e maior diâmetro do halo amarelo (Figura 5), sobre o meio de cultivo de PARK e col. (1989). Desta forma, foram isoladas 57 colônias, as quais foram cultivadas em Meio A (pH 10,3, Quadro 3) e avaliadas quanto à capacidade de produção de CGTase através do método CD-TCE de NOMOTO e col. (1984). A Figura 6 é uma ilustração deste método. A formação do precipitado branco, indica a presença de ciclodextrinas complexadas com o tricloroetileno (TCE). Neste caso, a enzima presente na cultura

Tabela 4. Frequência de microrganismos alcalofílicos produtores de CGTases, de acordo com a origem da amostra analisada.

Procedência da amostra	Total de amostras analisadas	Nº amostras positivas	% de amostras positivas
Solos de bosque	15	0	0
Solos de terrenos baldios, lotes, etc.	30	7	23,33
Solos de plantações de milho, soja, arroz, mandioca, algodão, etc.	69	40	57,97
Esgoto doméstico (emissário)	8	0	0
Estação de tratamento de efluente de fábrica de biscoito	30	0	0
Pátio de fábrica de ração de ave	4	0	0
Totais	156	48	30,76

Tabela 5. Frequência de microrganismos alcalofílicos CGTases positivos, em relação à população total de microrganismos alcalofílicos.^a

Nº da placa	Nº de bactérias alcalofílicas (UFC/g) ^b	Nº de bactérias CGTases positivas (UFC/g)	% de bactérias CGTases positivas
1	8500	2500	29,41
2	17500	3000	17,14
3	17500	3500	20,00
4	13000	2000	15,38
5	30500	2500	8,19
6	5000	500	10,00
7	17500	500	2,85
8	2000	1000	50,00
9	500	500	100,00
10	4500	500	11,11
11	5500	1000	18,18
12	1500	500	33,33
13	5000	2000	40,00
14	5000	1000	20,00
15	7500	1500	20,00
16	4500	1000	22,22
17	16000	1500	9,37
18	45500	4500	9,89
19	67000	3000	4,47
20	27500	2000	7,27
21	32500	2000	6,15
22	20500	3500	17,07
23	72000	1500	2,08
24	32000	1000	3,12
25	6000	500	8,33
26	21500	1500	6,98
27	30000	2500	8,33
28	14500	1000	6,89
29	2500	500	20,00
30	2000	500	25,00
31	78500	5000	6,37
Médias	21967	1742	7,93

^a-Os dados referem-se às placas em que foram isoladas as colônias produtoras de CGTase.

^b-Unidade Formadora de Colônia/g.

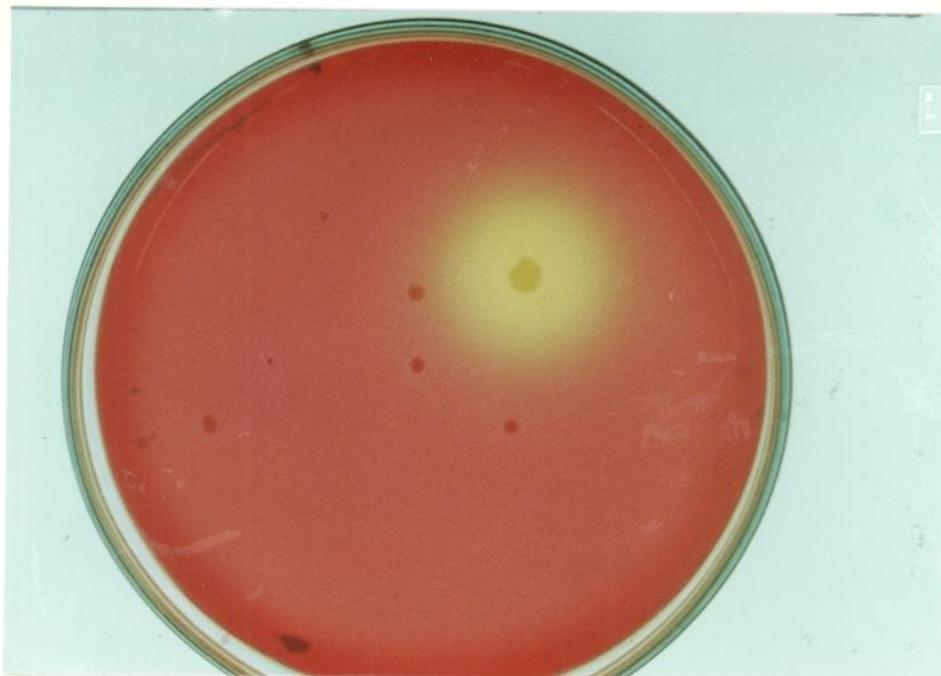


Figura 5. Colônia produtora de CGTase com halo amarelo, sobre o meio de cultivo de PARK e col. (1989).

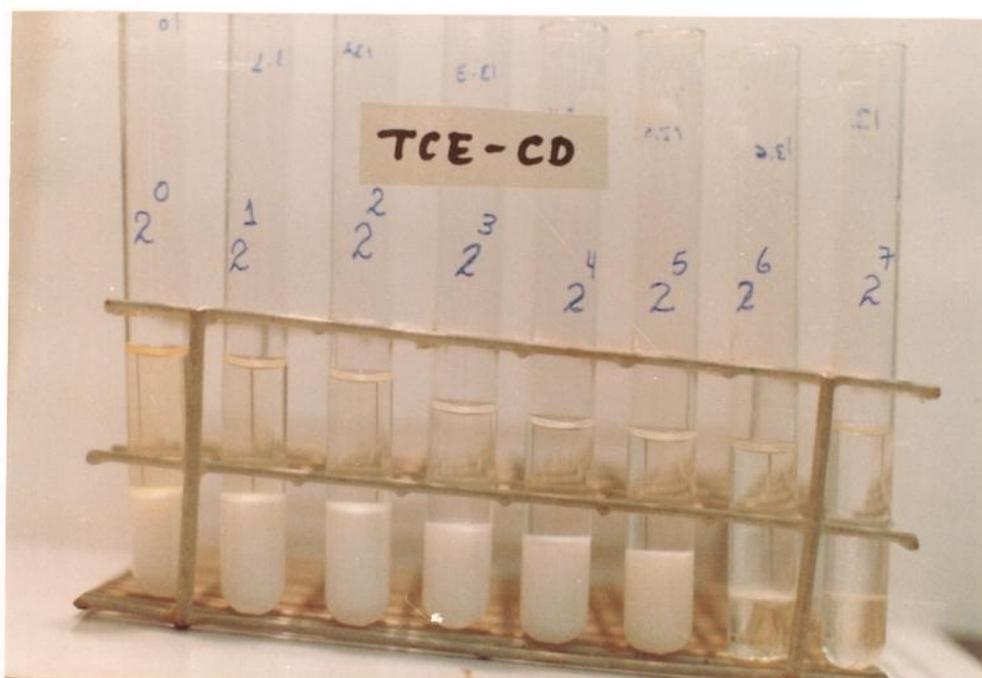


Figura 6. Ilustração da determinação da atividade de CGTase pelo método CD-TCE (NOMOTO e col., 1984). No exemplo a atividade foi de 2⁵.

produziu CDs até um estágio de diluição de 1:32, ou seja, atividade CD-TCE igual a 2^5 .

NOMOTO e col. (1984), comentam que uma das melhores linhagens produtoras de CGTase, *Bacillus* nº 17-1, isolada por Horikoshi e colaboradores em 1981, tem atividade CD-TCE entre 2^7 e 2^8 . Adotado este critério no experimento, observou-se (Tabela 6) que 23 das linhagens isoladas apresentaram atividade CD-TCE entre 2^7 e 2^8 . Para confirmação destes resultados, conduziu-se uma repetição do método com as 23 linhagens anteriores. Os resultados deste estudo, apresentados na Tabela 7, demonstraram que nove linhagens (nº 32, 34, 37, 39, 40, 42, 47, 49 e 53), apresentaram atividade CD-TCE em diluição 2^8 em pH 8,5 a 55°C, após 48h de incubação.

De modo semelhante aos estudos de GORDON e HYDE (1982), a partir das nove linhagens alcalofílicas isoladas foram obtidas linhagens variantes com capacidade de crescimento em pH 7,2 (Tabela 8), as quais foram avaliadas quanto à capacidade de produção da CGTase naquele pH. As linhagens variantes, quando cultivadas a 30°C em Meio A (pH 7,2), sem Na_2CO_3 , apresentaram ainda a capacidade de produção da enzima (Tabela 9). A atividade CD-TCE foi menor, 2^6 , o que pode dever-se ao fato de os microrganismos terem sido cultivados a 30°C, em vez de 37°C. Este resultado indica que o pH não é um fator determinante para a produção de CGTase pelos microrganismos.

As nove linhagens alcalofílicas, produtoras de CGTase em maior nível foram submetidas a estudos taxonômicos para a identificação da espécie. Pelo exame microscópico, todas as culturas apresentaram forma de bastonetes móveis Gram positivos, com esporos elípticos centrais e subterminais. A Tabela 10 mostra algumas características, fisiológicas e bioquímicas dos isolados alcalofílicos. Observa-se que todos os

Tabela 6. Avaliação da capacidade de produção de CGTase dos isolados alcalofílicos, através do método CD-TCE (NOMOTO e col., 1984).

Número do isolado	Fator de diluição da enzima 1:						
	2 ⁰	2 ¹	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸
1		+		+	+	-	-
2		+		+	+	-	-
3		-		-	-	-	-
4		+		+	+	+	-
5		+		+	-	-	-
6		+		+	-	-	-
7		+		-	-	-	-
8		+		+	+	+	-
9		+		+	-	-	-
10		+		+	+	+	-
11		+		+	+	-	-
12		+		+	+	-	-
13		+		+	-	-	-
14		+		+	+	-	-
15		+		-	-	-	-
16		+		-	-	-	-
17		+		+	+	+	-
18		+		+	+	-	-
19		+		+	+	-	-
20		+		+	-	-	-
21		+		+	-	-	-
22		+		+	-	-	-
23		+		+	-	-	-
24		+		-	-	-	-
25		+		+	-	-	-
26		+		+	-	-	-
27		+		+	-	-	-
28		+		+	-	-	-
29		nd		-	-	-	-
30		nd		-	-	-	-
31		nd		-	-	-	-
32		+		+	+	+	+
33		+		+	+	+	+
34		+		+	+	+	+
35		+		+	+	+	+
36		+		+	+	+	+
37		+		+	+	+	+
38		+		+	+	+	+
39		+		+	+	+	+
40		+		+	+	+	+
41		*		*	*	*	*
42		+		+	+	+	+
43		+		+	+	+	+
44		+		+	+	-	-
45		+		+	+	-	-
46		+		+	+	+	-
47		+		+	+	+	-
48		nd		-	-	-	-
49		+		+	+	+	+
50		+		+	-	-	-
51		+		+	-	-	-
52		+		+	+	+	+
53		+		+	+	+	+
54		+		+	+	+	-
55		+		+	+	+	+
56		+		+	+	+	-
57		+		+	-	-	-

nd-não determinado, *-isolado não cresceu.

Tabela 7. Repetição da avaliação da capacidade de produção de CGTase, pelos isolados alcalofílicos que apresentaram atividade enzimática em diluição maior ou igual a 2^7 , pelo método CD-TCE (NOMOTO e col., 1984).

Nº do isolado	Fator de diluição da enzima 1:								
	2^1	a	2^4	2^5	2^6	2^7	2^8	2^9	2^{10}
4		+		+	+	-	-	-	-
8		+		+	+	-	-	-	-
10		+		+	+	+	-	-	-
17		+		+	-	-	-	-	-
32		+		+	+	+	+	-	-
33		+		+	+	+	-	-	-
34		+		+	+	+	+	-	-
35		nd		-	-	-	-	-	-
36		+		+	+	+	-	-	-
37		+		+	+	+	+	-	-
38		+		+	+	+	-	-	-
39		+		+	+	+	+	-	-
40		+		+	+	+	+	-	-
42		+		+	+	+	+	-	-
43		+		+	+	+	-	-	-
46		nd		-	-	-	-	-	-
47		+		+	+	+	+	-	-
49		+		+	+	+	+	-	-
52		nd		-	-	-	-	-	-
53		+		+	+	+	+	-	-
54		+		+	+	+	-	-	-
55		+		+	+	+	-	-	-
56		+		+	+	+	-	-	-

nd-não determinado.

Tabela 8. Isolamento de linhagens variantes dos alcalofílicos com capacidade de crescimento em pH 7,2.

Nº do isolado	pH decrescente					
	10,3	9,0	8,5	8,0	7,5	7,2
32	+	+	+	+	+	+
34	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+
39	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+	+
42	+	+	+	+	+	+
47	+	+	+	+	+	+
49	+	+	+	+	+	+
53	+	+	+	+	+	+

Tabela 9. Verificação da capacidade das linhagens variantes produzirem a CGTase em pH 7,2, pelo método CD-TCE (NOMOTO e col., 1984, 1986).

Nº do isolado	Fator de diluição da enzima 1:								
	2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸
32	+	+	+	+	+	+	+	-	-
34	+	+	+	+	+	+	+	-	-
37	+	+	+	+	+	+	+	-	-
39	+	+	+	+	+	+	+	-	-
40	+	+	+	+	+	+	+	-	-
42	+	+	+	+	+	+	+	-	-
47	+	+	+	+	+	+	+	-	-
49	+	+	+	+	+	+	+	-	-
53	+	+	+	+	+	+	+	-	-

microrganismos isolados apresentaram características idênticas. Pelo Manual de Bergey's (SNEATH, 1986), as características apresentadas na Tabela 10 são similares às descritas para a espécie *Bacillus lentus*. Considerando-se a chave simplificada para identificação de espécies de *Bacillus*, proposta por DEÁK e TIMÁR (1988), foi observado que as características da Tabela 10 também são similares às da espécie *Bacillus lentus*. Baseando-se nestes resultados, as culturas de nº 32, 34, 37, 39, 40, 42, 47, 49 e 53, relacionadas na Tabela 10, foram classificadas como *Bacillus lentus*.

GORDON e HYDE (1982) conduziram estudos taxonômicos com 174 linhagens de *Bacillus* alcalofílicos, e constataram que mais de 50% das linhagens eram *Bacillus lentus*.

Dentre as linhagens que apresentaram atividade CD-TCE em diluição 2⁸ (Tabela 7), quando cultivadas em Meio A (pH 10,3), a de nº 42, classificada como *Bacillus lentus*, foi escolhida aleatoriamente para estudos de produção e caracterização da sua CGTase.

Tabela 10. Características morfológicas e bioquímicas dos isolados alcalofílicos que apresentaram maior produção de CGTase.

		Nº do isolado								
		32	34	37	39	40	42	47	49	53
Coloração de Gram		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Forma de bastonete		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Endosporo		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidade		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temperatura de crescimento	5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 "	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	30 "	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	40 "	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	50 "	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	55 "	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	65 "	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crescimento em NaCl	2%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5 "	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	7 "	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 "	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento anaeróbico		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido de glicose		+	+	+	+	+	+	+	+	+
	manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indol		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Redução do nitrato		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gás de nitrato		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenilalanina desaminase		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise da tirosina		-	-	-	-	-	-	-	-	-
"	gelatina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
"	caseína	+	+	+	+	+	+	+	+	+
"	do amido	+	+	+	+	+	+	+	+	+

4.2) Efeito da temperatura sobre a produção de CGTase

Para o estudo do efeito da temperatura sobre crescimento celular e produção de CGTase, o *Bacillus lentus* foi cultivado em Meio A (pH 10,3) em temperaturas de 30, 37 e 40°C (Figuras 7, 8 e 9, respectivamente). O crescimento microbiano foi avaliado pela turbidimetria e a CGTase pelo método CD-TCE. O microrganismo cresceu satisfatoriamente nas três temperaturas estudadas, com produção da enzima. Entretanto, a 37°C ocorreu um maior crescimento celular. A enzima parecia ser produzida mais rapidamente a 30°C (Figura 7), mas, neste caso, ao final da incubação a atividade CD-TCE era 2^7 , inferior em relação à alcançada nas temperaturas de 37 e 40°C, cuja a atividade CD-TCE atingiu 2^8 (Figuras 8 e 9, respectivamente). A produção da enzima foi mais lenta a 40°C (Figura 9). O efeito da temperatura sobre a produção de CGTases não tem sido descrito na literatura. Temperaturas entre 30 e 40°C foram utilizadas para a produção de CGTases por outros microrganismos (NAKAMURA e HORIKOSHI, 1976a, KITAHATA e OKADA, 1974; KOBAYASHI e col., 1978; NOMOTO e col. 1986; YU e col., 1988, PONGSAWASDI e YAGISAWA, 1988).

4.3) Efeitos das fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção da CGTase

O efeito de diversas fontes de carbono sobre o crescimento celular e produção de CGTase pelo *Bacillus lentus*, é mostrado pela Tabela 11. Conforme se pode notar, o crescimento celular foi satisfatório em todos os tratamentos, exceto no tratamento T₄, sem uma fonte de carbono específica. O microrganismo somente produziu a enzima

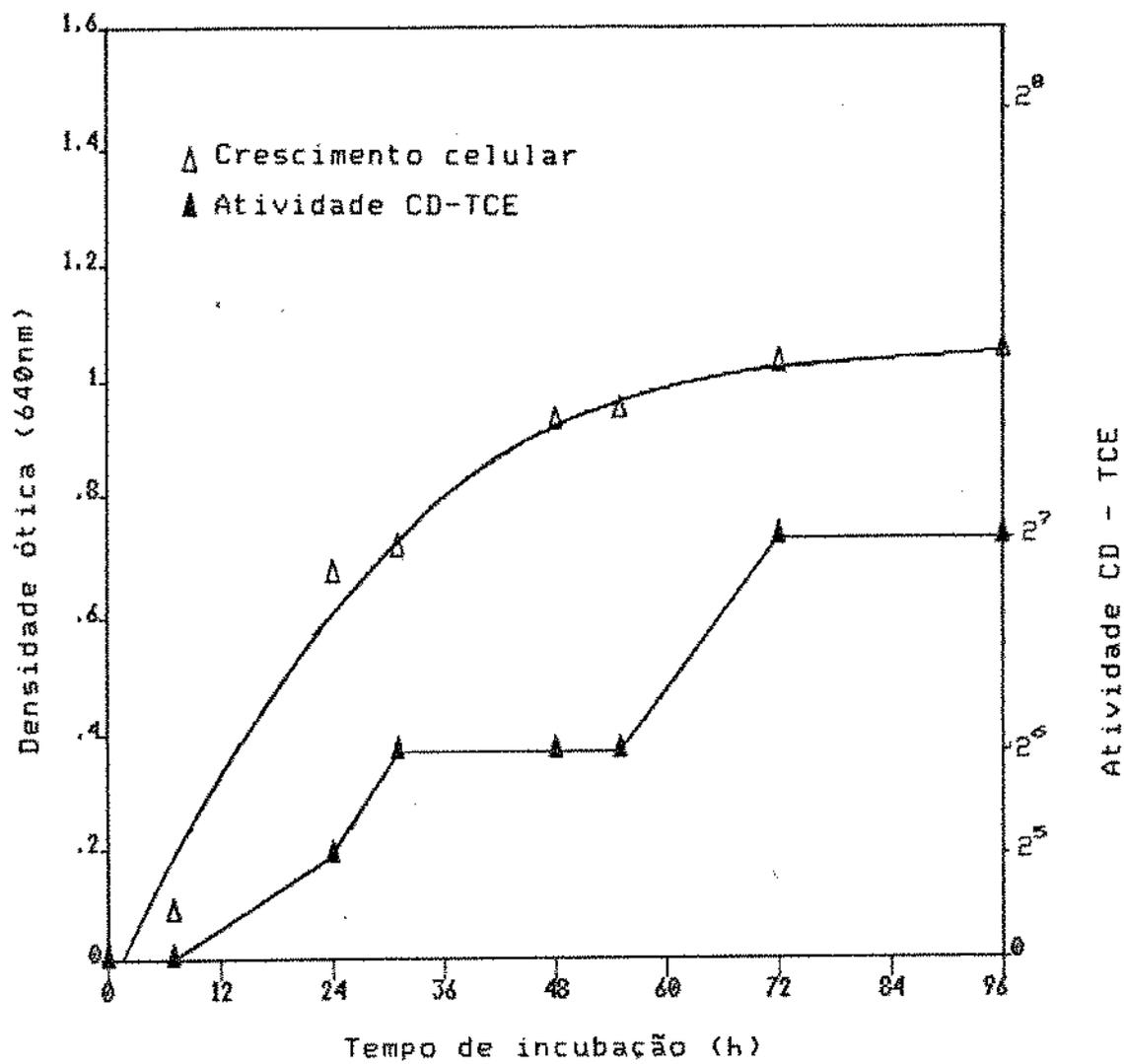


Figura 7. Crescimento celular e produção de CGTase pelo *Bacillus lentus*, a 30°C.

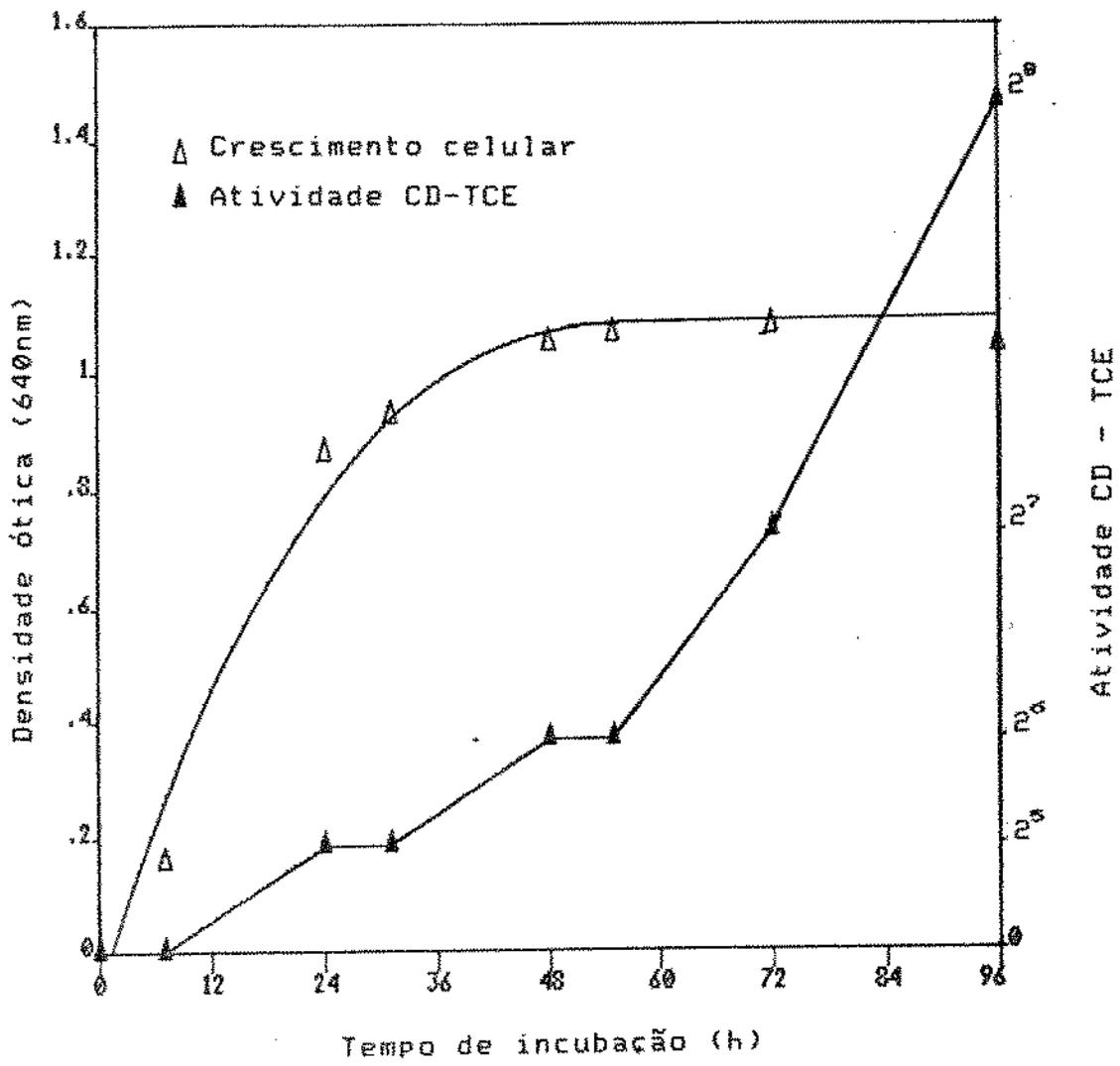


Figura 8. Crescimento celular e produção de CGTase pelo *Bacillus lentus*, a 37°C.

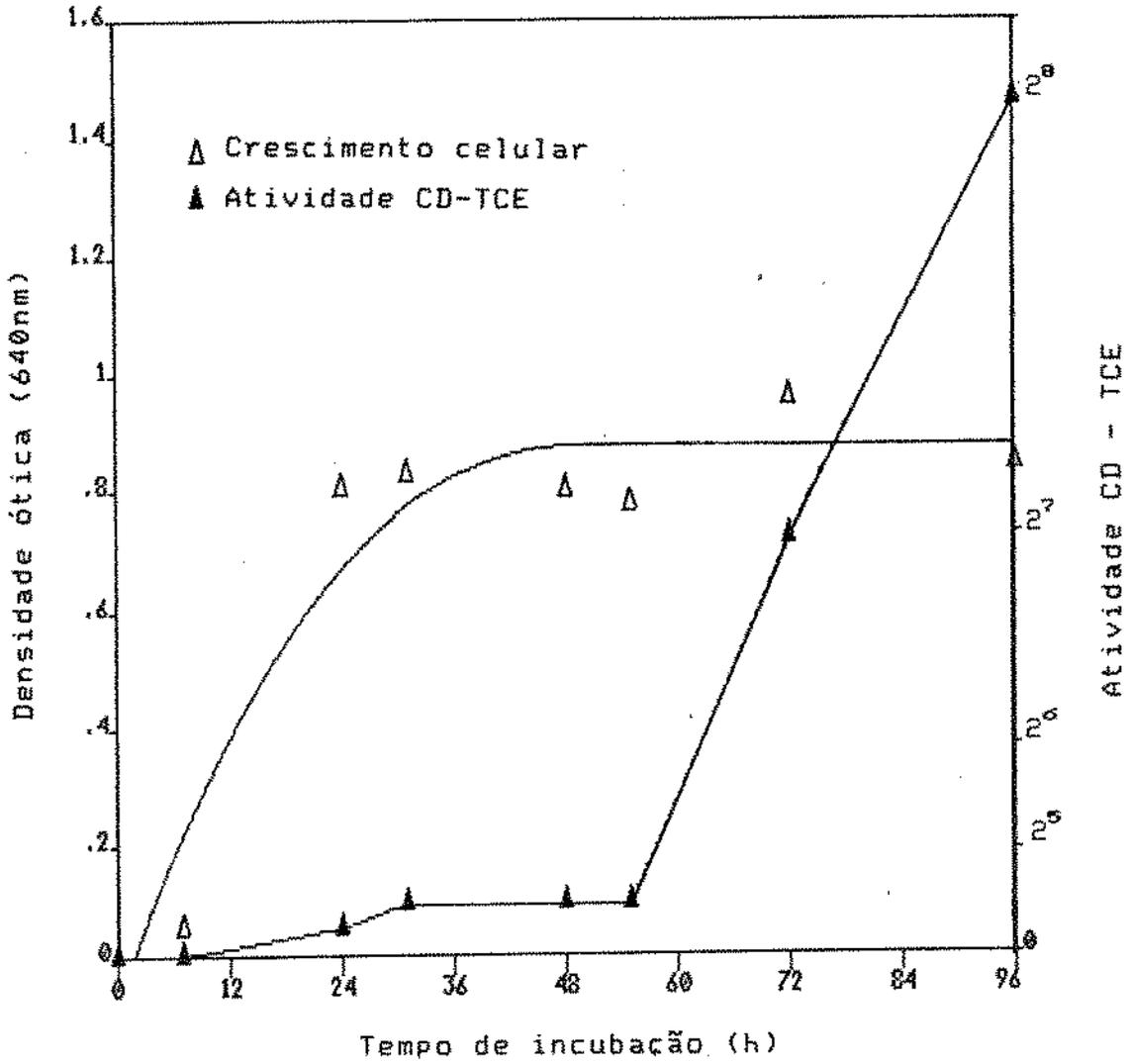


Figura 9. Crescimento celular e produção de CGTase pelo *Bacillus lentus*, a 40°C.

em presença das fontes de carbono: dextrina, amido solúvel, β -ciclodextrina e amilopectina. A β -CD foi o indutor menos eficiente. Estes resultados indicam que a CGTase do *Bacillus lentus* é uma enzima indutível, porém não é induzida pelos carboidratos glicose, frutose, maltose, sacarose e lactose. NAKAMURA e HORIKOSHI (1976a) também verificaram que mono e dissacarídeos não induziam a CGTase do *Bacillus* sp alcalofílico.

Tabela 11. Efeito da fonte de carbono sobre a produção de CGTase pelo *Bacillus lentus*. (meio de cultivo: 0,5% extrato de levedura, 0,02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1% K_2HPO_4 , 1% Na_2CO_3 , pH 10,3, suplementado com os tratamentos indicados)

Tratamentos: fonte de carbono 2%	Fonte nitrogênio 0,5%	Crescimento celular	Atividade CD-TCE ^a	Atividade dextrinizante (U/ml ^b)
T ₁ :nenhuma	peptona	fraco	- ^c	-
T ₂ :glicose	"	bom	-	-
T ₃ :frutose	"	"	-	-
T ₄ :maltose	"	"	-	-
T ₅ :dextrina	"	"	2 ⁸	68,30
T ₆ :amido solúvel	"	ótimo	2 ⁸	61,10
T ₇ :sacarose	"	bom	-	-
T ₈ :lactose	"	"	-	-
T ₉ : β -ciclodextrina	"	"	2 ⁶	34,05
T ₁₀ :amilopectina	"	"	2 ⁸	71,44

a-atividade Ciclodextrina Tricloroetileno(CD-TCE)

b-atividade dextrinizante a 40°C

c-ausente

A Tabela 12 mostra o efeito de diversas fonte de nitrogênio sobre o crescimento microbiano e a produção de CGTase do *Bacillus lentus*. Comparando-se o tratamento T₁₄ com T₁₇, verifica-se que a adição de 1%

Tabela 12. Efeito da fonte de nitrogênio sobre a produção de CGTase pelo *Bacillus lentus*. (meio de cultivo: 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% K_2HPO_4 , 1% Na_2CO_3 , pH 10,3, suplementado com os tratamentos indicados)

Tratamentos:				Ativi-	Atividade
Fonte de nitrogênio	Fonte de carbono	Extrato levedura	Crescimento celular	dade CD-TCE ^a	Dextrinizante (U/ml) ^b
T ₁₁ : nenhuma	2% amido solúvel	0,5%	ótimo	2 ⁸	71,44
T ₁₂ : 1% farinha de soja	"	"	bom	2 ⁷	43,33
T ₁₃ : 1% extrato de carne	"	"	"	2 ⁸	66,66
T ₁₄ : 1% uréia	"	"	fraco	2 ⁵	9,44
T ₁₅ : 1% ácidos casamínos	"	"	ótimo	2 ⁷	36,20
T ₁₆ : extrato de levedura	"	1,5%	"	2 ⁷	30,60
T ₁₇ : 1% peptona	"	0,5%	"	2 ⁷	23,00
T ₁₈ : 1% sulfato de amônio	"	"	ausente	-	-
T ₁₉ : 2% Água de mace- ração de milho (AMM) ^c	1% amido solúvel	"	ótimo	2 ⁷	27,10
T ₂₀ : 2% AMM	2% amido solúvel	"	"	2 ⁷	42,89
T ₂₁ : 4% AMM	"	- ^d	"	2 ⁷	47,77
T ₂₂ : 2% AMM	"	-	"	2 ⁸	70,93
T ₂₃ : 1% AMM	"	-	"	2 ⁶	17,76

a- atividade Ciclodextrina Tricloroetileno (CD-TCE)

b- atividade dextrinizante a 40°C (unidades da enzima/ml do meio de cultivo)

c- AMM com 50% de sólidos

d- não adicionado

de peptona ao meio de cultivo resultou numa menor produção da enzima, demonstrando que o nitrogênio contido em 0,5% do extrato de levedura do tratamento T₁₄, foi suficiente para atender as necessidades do microrganismo, com produção de CGTase em níveis de 2⁸ pelo método CD-TCE, ou 71,44U/ml pela atividade dextrinizante a 40°C. De acordo com a Tabela 12, o microrganismo não cresceu em presença de 1% de sulfato de amônio (tratamento T₁₈). O motivo desta inibição não foi estudado. O meio de cultivo constituído de AMM 2%, amido 2% e demais ingredientes (tratamento T₂₂) suportou um bom crescimento do microrganismo, com satisfatória produção da CGTase. Como pode ser observado, não foi adicionado extrato de levedura ao meio, indicando que AMM, a nível de 2%, atendeu às possíveis necessidades vitamínicas do *Bacillus lentus*. Comparando-se o tratamento T₂₀ com o T₂₂, verifica-se que a adição de 0,5% de extrato de levedura, na realidade, resultou numa aparente inibição da produção da CGTase.

4.4) Purificação da CGTase

4.4.1) Precipitação com sulfato de amônio

Os meios de cultura de *Bacillus lentus* contendo a CGTase, obtidos conforme subitem 3.8.1, foram reunidos num único volume de 2000ml. Após centrifugação, obteve-se um volume de 1950ml, que foi resfriado a 5°C e ao qual foi adicionado sulfato de amônio até uma saturação de 80%. O precipitado formado foi separado por centrifugação, obtendo-se 58ml de um concentrado contendo a CGTase. Parte deste material, 55ml, foi dialisado a 5°C em água destilada por 48h.

4.4.2) Cromatografia da CGTase em coluna de DEAE-celulose

Os 55ml de dialisado obtidos no subitem anterior, foram submetidos à cromatografia em coluna contendo a resina DEAE-celulose. Os resultados da eluição com tampão borato 50mM(pH 8,5) contendo gradientes de NaCl, estão representados na Figura 10. Pela leitura da absorbância das frações a 280nm, obteve-se dois picos de proteínas. O primeiro pico, entre as frações 95 e 115, apresentou atividade proteolítica sobre a caseína a 37°C, em pH 10,3. O segundo pico, entre as frações 160 e 205, apresentou atividade dextrinizante a 55°C. Estas frações foram reunidas num volume de 380ml, que a seguir foi concentrado com Polietilenoglicol 6000 para 41ml, a 5°C.

4.4.3) Cromatografia da CGTase em coluna de CM-celulose

Parte do concentrado obtido no subitem anterior, 38ml, foi submetido à cromatografia em coluna contendo a resina CM-celulose. Os resultados da eluição com tampão borato 50mM(pH 8,5) contendo gradientes de NaCl, estão representados na Figura 11. Pela leitura da absorbância das frações a 280nm, obteve-se um pico entre as frações de nº 10 a 30, o qual apresentou atividade dextrinizante a 55°C. Observa-se também que praticamente toda a proteína havia sido eluída antes da aplicação do NaCl, mostrando que a enzima não foi retida pela CM-celulose, em pH 8,5. As frações contendo atividade dextrinizante foram reunidas num volume de 92ml, posteriormente fracionado em volumes menores e conservados em congelador. Esta preparação contendo 337U/ml, foi utilizada nos estudos de caracterização da enzima, e representava 20% do total da enzima original com atividade específica de 33700U/mg (Tabela 13). O grau de purificação foi de 378 vezes.

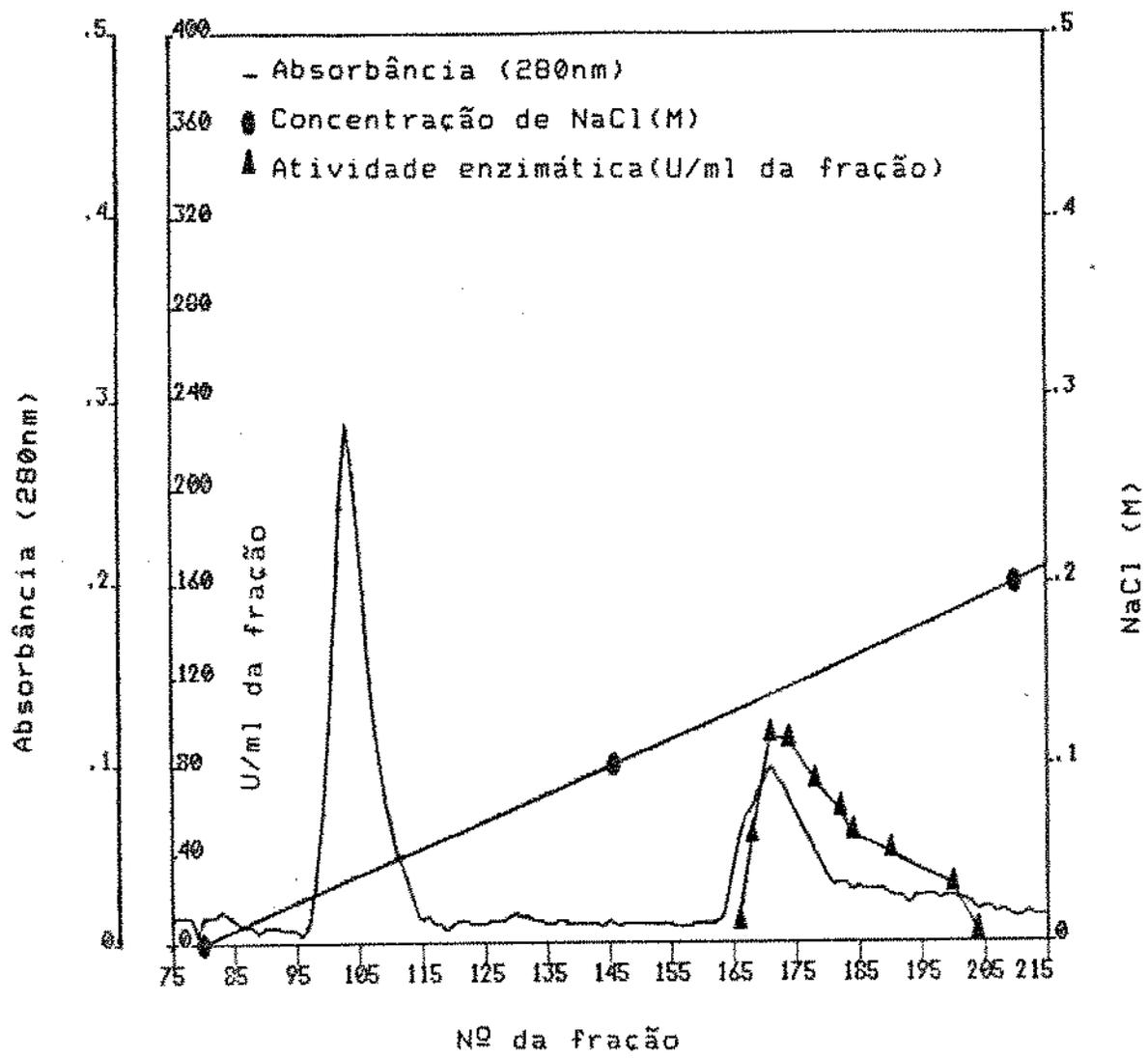


Figura 10. Purificação da CGTase do *Bacillus lentus* por cromatografia em DEAE-celulose.

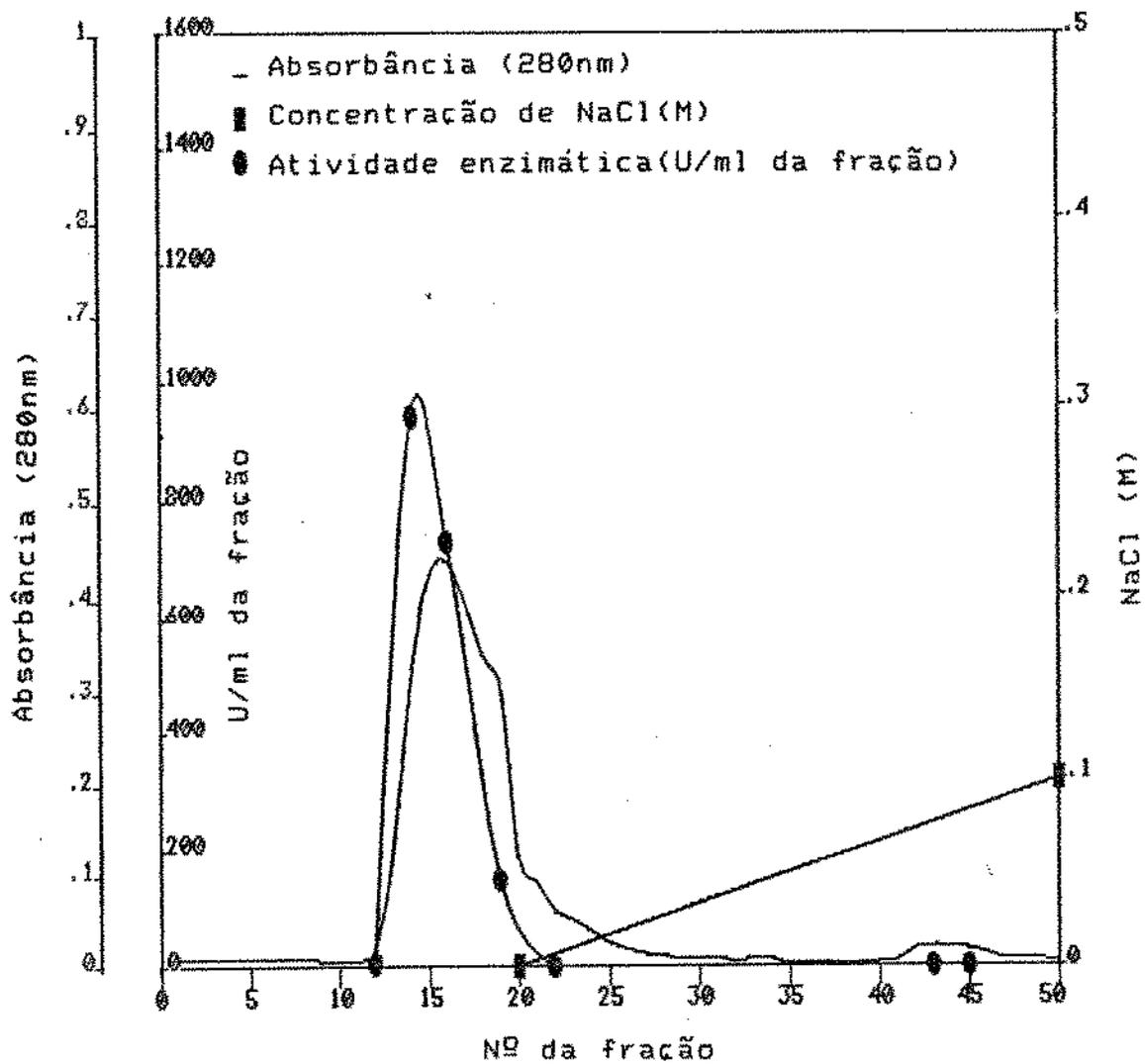


Figura 11. Purificação da CGTase do *Bacillus lentus* por cromatografia em CM-celulose.

Tabela 13. Sumário da purificação da CGTase do *Bacillus lentus*.

Etapas	Volume total (ml)	U/ml ^a	U/totais	Atividade específica (U/mg proteína)	Rendimento(%)
Cultura fluida	1950	79	154050	89	100
Precipitação (NH ₄) ₂ SO ₄ 80%	55	1744	95920	1059	62
DEAE-celulose	380	151	57523	11062	37
CM-celulose	92	337	31004	33700	20

^a- atividade dextrinizante a 55°C

4.5) Características gerais da enzima purificada

4.5.1) Efeito do pH

O efeito do pH sobre a atividade da CGTase a 55°C é mostrado na Figura 12. A enzima mostrou maior atividade dextrinizante em pH entre 5,8 e 6,2, enquanto a atividade de formação de ciclodextrinas, medida pela atividade CD-TCE, foi maior em pH entre 6,5 a 7,5. NOMOTO e col. (1986) observaram que a CGTase do *Bacillus* HA 3-3-2 exibia dois picos de atividade dextrinizante ótima, um em pH 5 e outro em pH 9, enquanto a atividade de formação de ciclodextrinas, era maior entre pH 6,5 e 8. A atividade dextrinizante tem sido usada como parâmetro único de avaliação da atividade de CGTase. Entretanto, conforme foi observado neste experimento, e antes no de NOMOTO e col. (1986), o pH ótimo de atividade dextrinizante da CGTase pode não refletir o pH ótimo de formação de ciclodextrinas. Isto pode acarretar uma menor taxa de conversão do amido em CDs. No que se refere ao pH ótimo de outras CGTases, os valores relatados na literatura oscilam de acordo

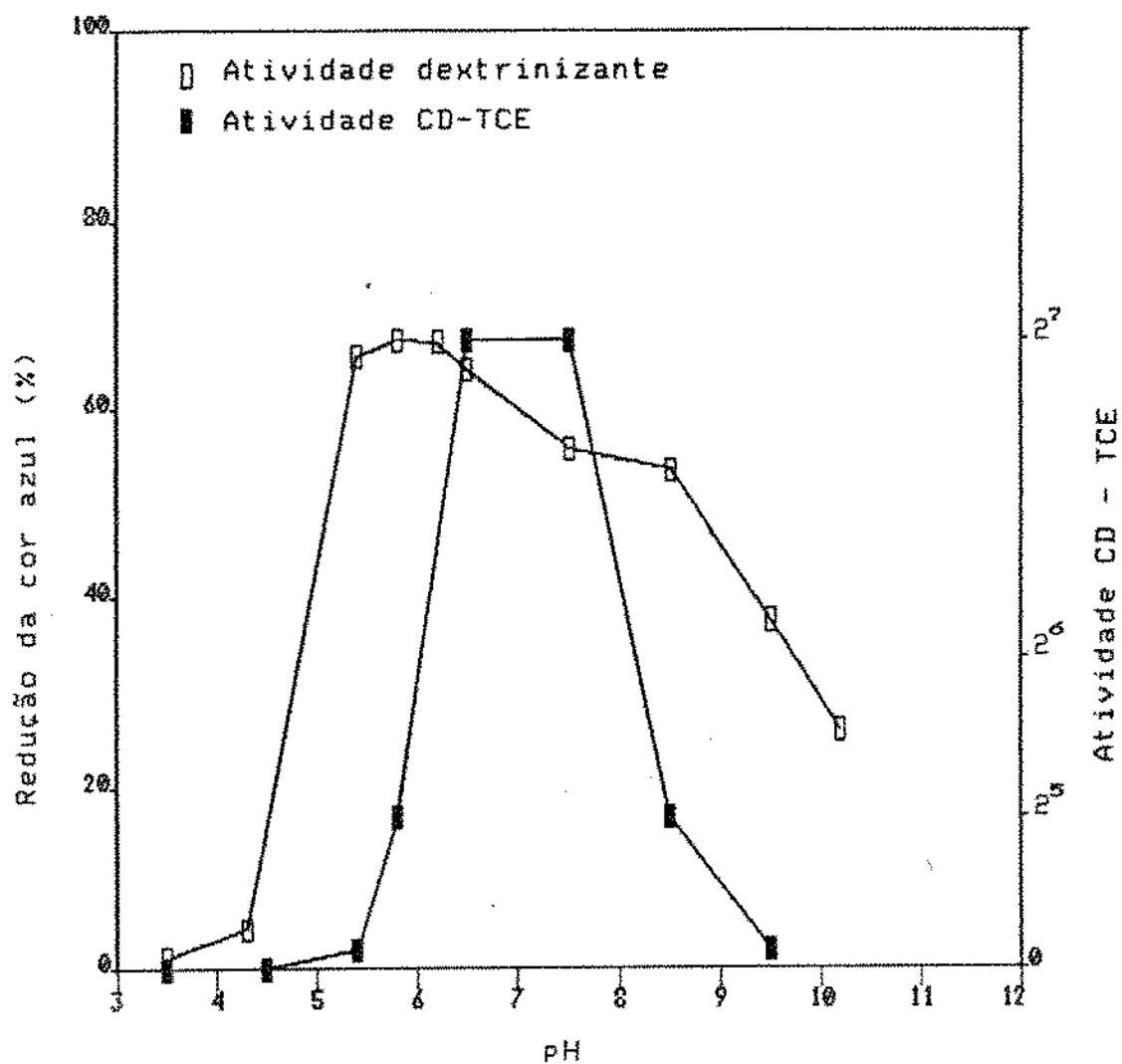


Figura 12. Efeito do pH sobre a CGTase do *Bacillus lentus*, medido pela atividade dextrinizante e formação de ciclodextrinas

com a espécie de microrganismo produtor de CGTase. A Tabela 14 apresenta um resumo das características das CGTases produzidas por espécies de *Bacillus*. Observa-se que existe CGTase, como a do *Bacillus* sp (ATCC 21783), estudada por NAKAMURA e HORIKOSHI (1976b, 1976d), que tem pH ótimo em meio com acentuada acidez (pH 4,5 a 4,7). Já a CGTase produzida pelo *Bacillus subtilis* (KATO e HORIKOSHI, 1986) tem pH ótimo em meio alcalino (pH 8).

A atividade CD-TCE do *Bacillus lentus* manteve 100% de estabilidade em valores de pH entre 6,5 e 8,5, após tratamento térmico de 30min. a 45°C em tampão borato 50mM (pH 7,5). Nestas mesmas condições, mais de 90% da atividade dextrinizante foi mantida em pH entre 7,5 e 9,5 (Figura 13). Aqui constata-se novamente uma diferença entre os métodos. Em pH 9,5, a enzima ainda mantinha cerca de 90% de sua atividade dextrinizante, enquanto a atividade CD-TCE já havia sido reduzida em 50%. NOMOTO e col. (1986), não encontraram estas diferenças para a CGTase do *Bacillus* sp HA 3-3-2, e o pH de estabilidade situava entre 6 e 11. A Tabela 14 mostra o pH de estabilidade das CGTases produzidas por outros microrganismos descritos na literatura. A CGTase do *Bacillus* sp (ATCC 21783) apresentou também uma ampla faixa de pH de estabilidade, entre 6 e 10 (NAKAMURA e HORIKOSHI, 1976b).

4.5.2) Efeito da temperatura

Pela Figura 14 nota-se que a enzima apresentou maior atividade de formação de CDs entre 45 e 55°C, e com relação à atividade dextrinizante, a temperatura ótima foi de 55°C. Estes resultados assemelham-se aos obtidos por outros pesquisadores (Tabela 14). As CGTases produzidas por *Bacillus*, descritas na literatura, têm

Tabela 14. Características de CBases produzidas por *Bacillus*.

Microorganismos	pH		Temperatura	Temperatura	Peso	Principais	Referências
	ótimo	estabil.	ótima(°C)				
<i>Bac. maceanans</i> (IFO-3498)	6,1-6,2	8-10	55	60	139.300	α	DEPINTO e CAMPBELL (1968), KITAHATA e OKADA (1974).
<i>Bac. megaterium</i>	5,2-6,2	7-10	55	55	66.000	β	KITAHATA e OKADA (1974, 1982a).
<i>Bacillus</i> sp (ATCC-21783)	4,5-4,7	6-10	50	65	84.000	β	NAKAMURA e HORIKOSHI (1976b, 1976d).
<i>Bac. stearothermophilus</i> (TC-60)	6	7-9,2	70	50	68.000	α e β	KITAHATA e OKADA (1982a).
<i>Bac. subtilis</i> n° 313	8	6-8	65	50	64.000	γ	KATO e HORIKOSHI (1986).
<i>Bacillus</i> sp HA 3-3-2	6,5-8,5	6-11	60	70	68.000	-	NOMOTO e col. (1986).
<i>Bac. amylicoliquefaciens</i> AL-35	6	8-10	70	60	-	α	YU e col. (1988).
<i>Bac. circulans</i>	5,5	5,5-9	60	50	103.000	β	PONGSASASDI e YADISANA (1987, 1988).

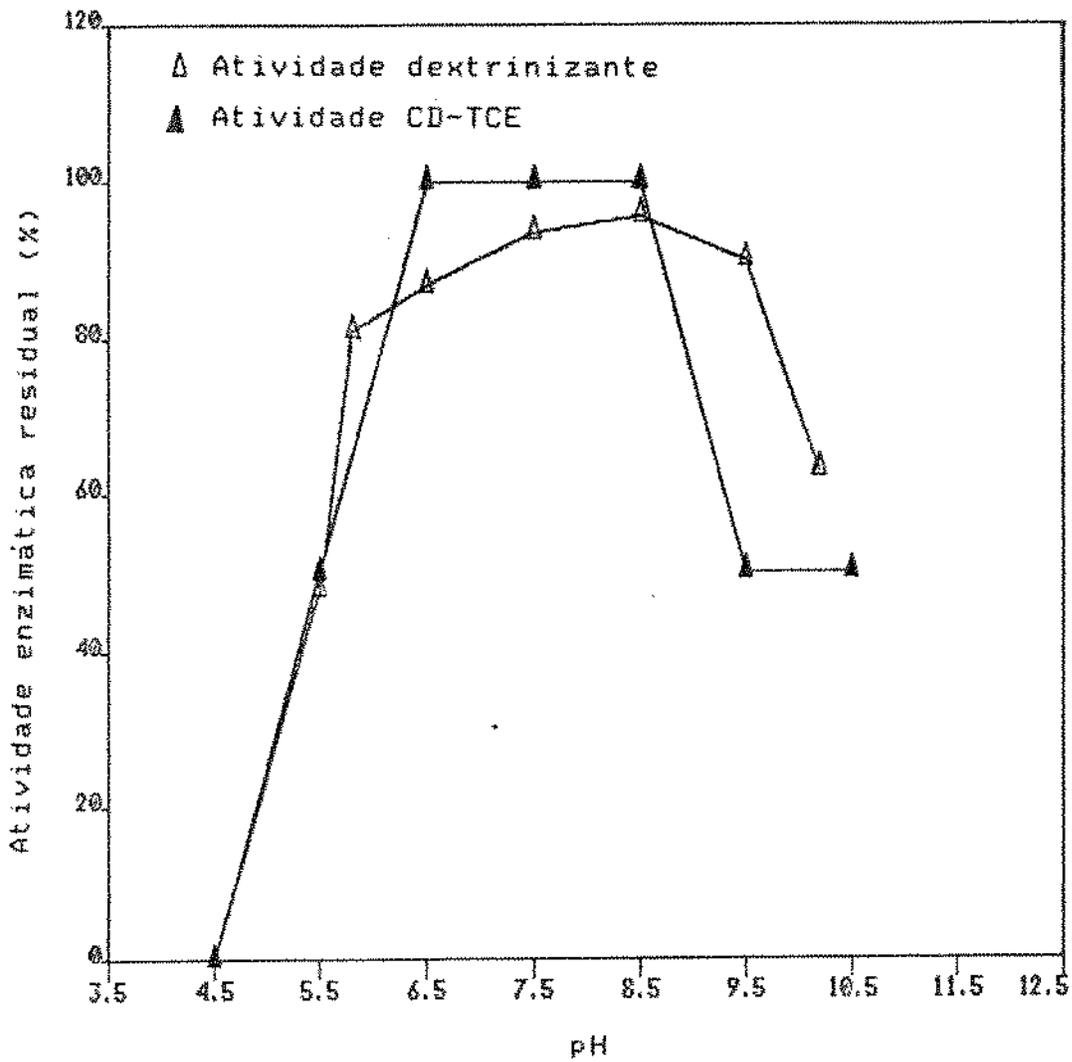


Figura 13. Estabilidade da CGTase do *Bacillus lentus* ao pH, medido pela atividade dextrinizante e formação de ciclodextrinas residual.

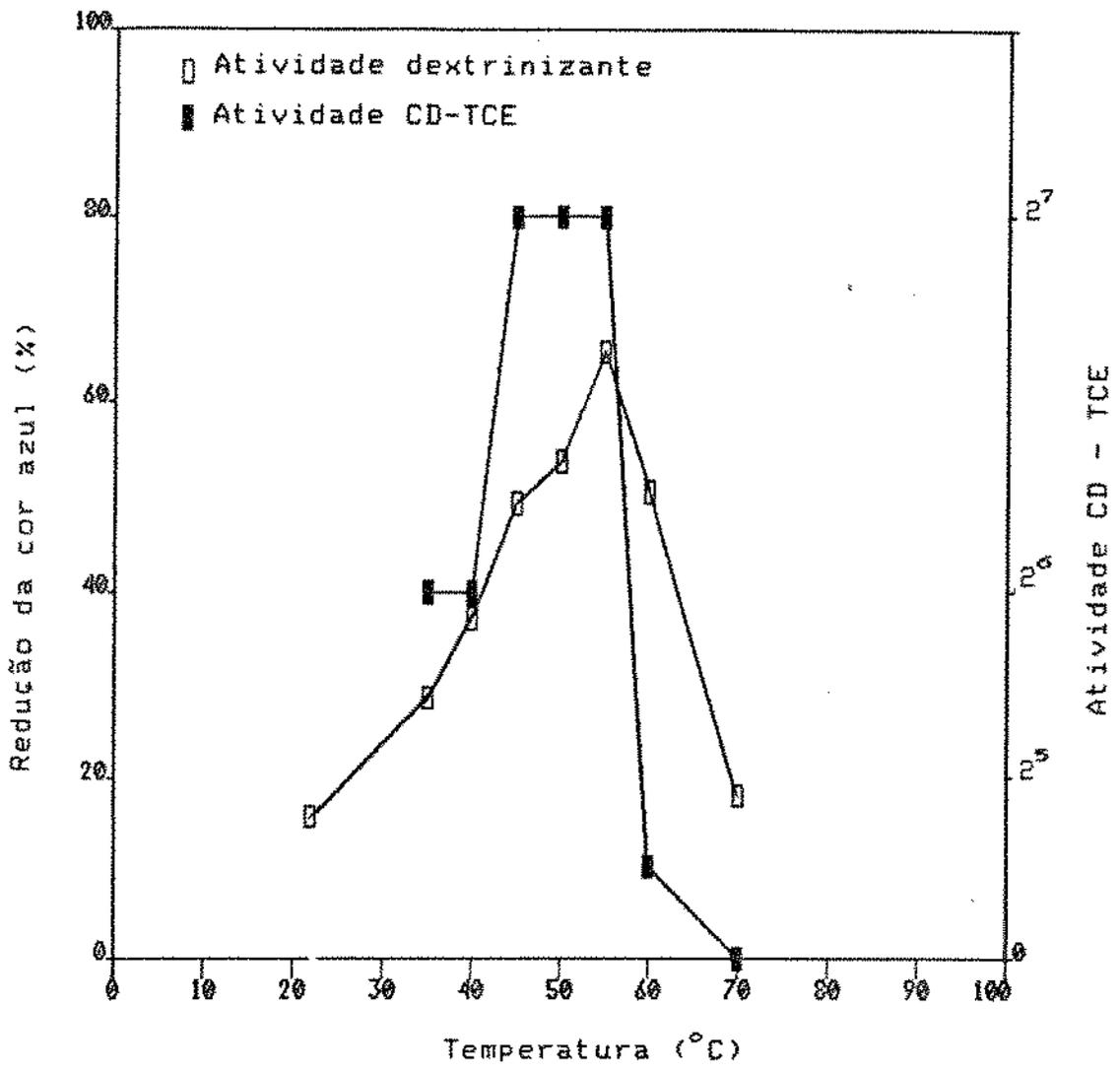


Figura 14. Efeito da temperatura sobre a atividade dextrinizante e formação de ciclodextrinas, pela CGTase do *Bacillus lentus*.

temperaturas ótimas entre 50 e 70°C (Tabela 14). As produzidas pelos *Bacillus macerans* (DePINTO e CAMPBELL, 1968) e *Bacillus megaterium* (KITAHATA e OKADA, 1974), em especial, apresentaram atividade ótima a 55°C.

A estabilidade térmica da enzima em estudo foi avaliada pela atividade enzimática residual, após tratamento térmico de 30min em pH 7,5 (na temperatura em estudo). Verifica-se pela Figura 15 que a enzima manteve mais de 80% de atividade dextrinizante, após 30min. em temperaturas inferiores a 50°C. A formação de CDs, medida pela atividade CD-TCE, era 100% estável até 55°C. A estabilidade térmica das CGTases produzidas por outras espécies de *Bacillus* situaram-se entre 50 e 70°C, conforme mostra a Tabela 14. A CGTase do *Bacillus* sp HA 3-3-2, isolado por NOMOTO e col. (1986), é a que apresentou maior estabilidade térmica.

4.5.3) Efeito do CaCl₂ e do EDTA.

Na Figura 16 é apresentado o efeito do CaCl₂ e do EDTA sobre a atividade dextrinizante residual da CGTase do *Bacillus lentus*, durante o tratamento térmico por até 150min. a 55°C, em tampão borato 50mM (pH7,5). Observa-se que a inativação da enzima controle acentua-se com o aumento do tempo de exposição. A adição de 1mM de EDTA, um sequestrador de cátions bivalentes, resultou numa maior taxa de inativação térmica. Este resultado sugere que cátions participam na estabilização térmica da CGTase. A adição de íons Ca⁺², em todas as concentrações estudadas neste experimento, conferiu praticamente 100% de estabilidade à atividade dextrinizante, mesmo após 150min. a 55°C.

O CaCl₂ e o EDTA apresentaram efeito semelhante sobre a atividade CD-TCE residual, depois de ter submetido a enzima a um

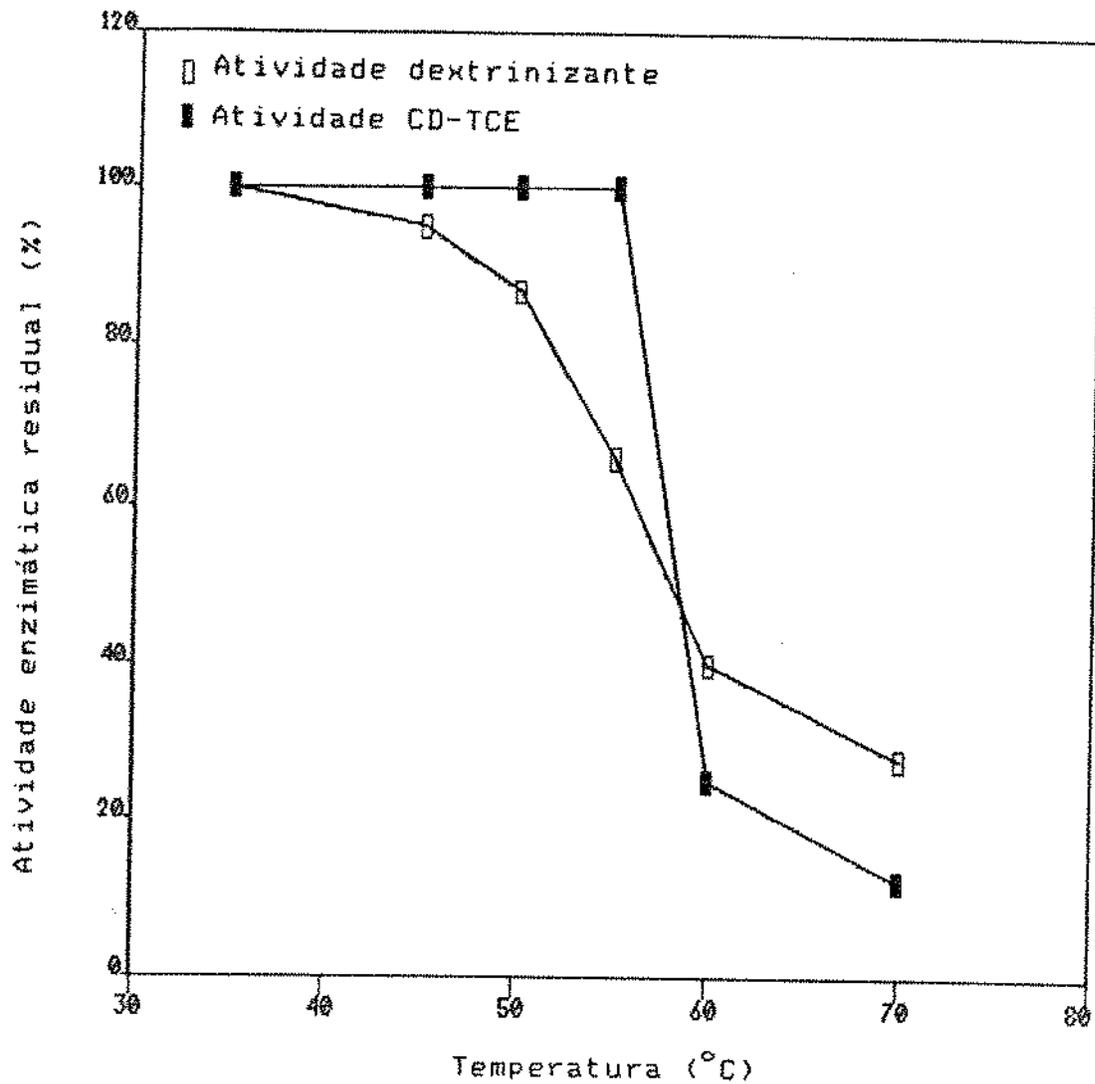


Figura 15. Estabilidade térmica da CGTase do *Bacillus lentus*, medida pela atividade dextrinizante e formação de ciclodextrinas residual.

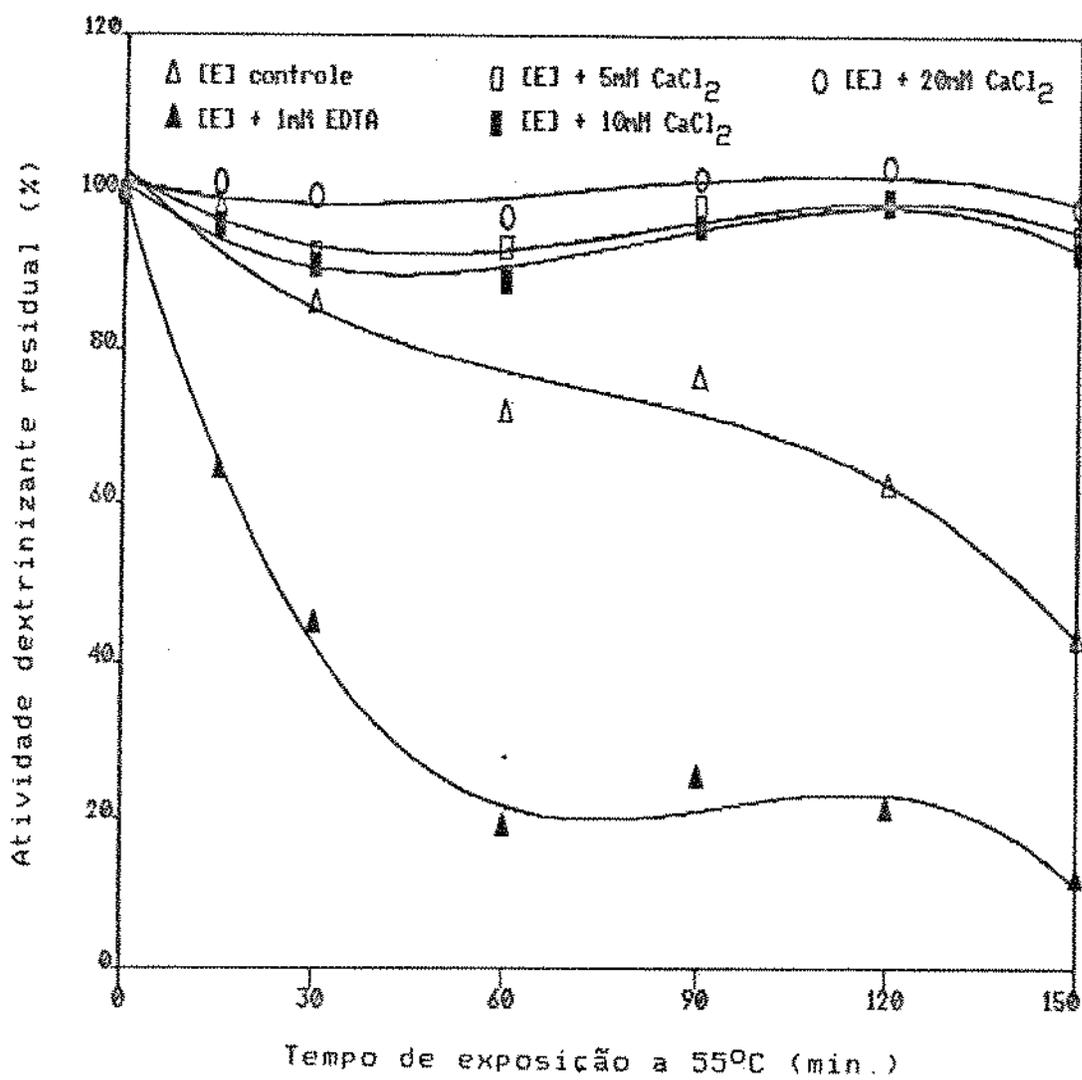


Figura 16. Efeito do CaCl_2 e EDTA sobre a estabilidade térmica da atividade dextrinizante da CGTase do *Bacillus lentus*. [E], concentração da CGTase (6,7U/ml)

tratamento de 150min a 55°C, no mesmo tampão. Conforme a Tabela 15, o tratamento térmico da enzima em ausência de EDTA ou CaCl₂, resultou numa atividade residual de 13%. Com a adição de 1mM de EDTA, a atividade foi reduzida a 2%. Já a adição de 5mM de CaCl₂ garantiu 100% de estabilidade, enquanto a presença de 10 ou 20mM resultou num incremento de 100% à atividade CD-TCE. Isto sugere que a presença de 10mM de CaCl₂ é suficiente para diminuir a desnaturação térmica da CGTase, durante a conversão do substrato em CDs, garantindo uma atividade da enzima por um tempo maior, a ponto de permitir a formação de CDs em diluição 2⁸.

Segundo OGASAHARA e col. (1970), o cálcio é essencial para a ação catalítica de α-amilases bacterianas, e na sua presença a enzima é mais resistente a valores extremos de pH e temperatura. O cálcio

Tabela 15. Efeito do EDTA e do CaCl₂ sobre a estabilidade térmica da formação de ciclodextrinas pela CGTase do *Bacillus lentus*.

Tratamentos	Atividade CD-TCE ^a	Atividade residual(%)
[E] ^b controle(não aquecida)	2 ⁷	100
[E] aquecida sem EDTA ou CaCl ₂	2 ⁴	13
[E] " em CaCl ₂ 5mM	2 ⁷	100
[E] " " " 10mM ^c	2 ⁸	200
[E] " " " 20mM	2 ⁸	200
[E] " " EDTA 1mM	2 ¹	2

a- atividade ciclodextrina tricloroetileno(CD-TCE) residual, após aquecimento por 2,5h a 55°C

b- 0,5ml de solução de CGTase(337U/ml), em tampão borato 50mM(pH 7,5)

c- precipitação mais acentuada

parece atuar de maneira semelhante sobre as CGTases. Neste experimento o cálcio aumentou sensivelmente a estabilidade térmica da CGTase do *Bacillus lentus*. NAKAMURA e HORIKOSHI (1976b) disseram que 10mM de CaCl_2 aumentou a resistência térmica da CGTase do *Bacillus* sp (ATCC 21783), enquanto 1mM de EDTA a diminuía. YU e col. (1988) afirmam que o cálcio também aumentou a estabilidade da CGTase do *Bacillus amyloliquefaciens* AL 35. O EDTA a 1mM não afetou a estabilidade térmica da CGTase do *Bacillus* HA 3-3-2, segundo NOMOTO e col. (1986).

4.5.4) Efeito de íons e inibidores

A Tabela 16 mostra o efeito de íons e inibidores sobre a atividade de formação de CDs da CGTase do *Bacillus lentus*. A enzima apresentou uma forte inibição causada por íons metálicos, como Co^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Hg^{+2} e Fe^{+2} , em concentração de 5mM. Já o Mg^{+2} não provocou nenhum efeito sobre a formação de CDs. Entretanto, NOMOTO e col. (1986), afirmaram que a CGTase do *Bacillus* HA 3-3-2 era fortemente inibida pelo Mg^{+2} , além daqueles íons. O íon Ca^{+2} , conforme discutido anteriormente, aumentou a estabilidade térmica da enzima em estudo, o que também ocorreu com outras CGTases. Não foi observado inibição por 5mM de iodoacetamida ou 0,5mM de p-cloromercuribenzoato, sugerindo que a CGTase do *Bacillus lentus* não possui grupamentos sulfidrílicos essenciais para a sua atividade catalítica. A CGTase do *Bacillus* HA 3-3-2 também não mostrou sensibilidade aos inibidores fluoreto de fenilmetilsulfonil 0,2mM, p-cloromercuribenzoato 0,1mM ou EDTA 0,1mM (NOMOTO e col., 1986). A análise da composição de aminoácidos da CGTase do *Bacillus macerans*, não apresentou resíduos de cistina, segundo os estudos de DePINTO e CAMPBELL (1968). O efeito de inibidores sobre a atividade da CGTase de outros microrganismos não

foi descrito na literatura.

Tabela 16. Efeito de íons e inibidores na atividade de formação de ciclodextrinas da CGTase do *Bacillus lentus*.

Tratamentos	Atividade CD-TCE ^a	Atividade residual(%)
[E] ^b controle	2 ⁷	100
" + 5mM CoCl ₂	2 ⁴	13
" + 5mM MgSO ₄	2 ⁷	100
" + 5mM ZnSO ₄	2 ⁰	1
" + 5mM MnSO ₄	2 ⁷	100
" + 5mM HgCl ₂	2 ⁰	1
" + 5mM CuSO ₄	0	0
" + 5mM KCl	2 ⁷	100
" + 5mM FeSO ₄	2 ¹	2
" + 5mM iodoacetamida	2 ⁷	100
" + 0,1mM p-cloromercuribenzoato	2 ⁷	100
" + 0,5mM p-cloromercuribenzoato	2 ⁷	100

a- atividade ciclodextrina tricloroetileno(CD-TCE)

b- 0,5ml de solução de CGTase(337U/ml), em tampão borato 50mM(pH 7,5)

4.6) Efeito da concentração da CGTase na formação de ciclodextrinas

O efeito da concentração da enzima sobre a conversão do amido solúvel 1% em CDs, foi avaliado pelos métodos da glicoamilase e da gravimetria, descritos no item 3.10. Os resultados deste estudo estão apresentados nas Figuras 17 e 18. Não houve interesse em comparar estatisticamente os dois métodos, mas parece que o método gravimétrico (Figura 18) está menos sujeito ao coeficiente de variação. Observa-se que o aumento da concentração da enzima resultou em aumento da

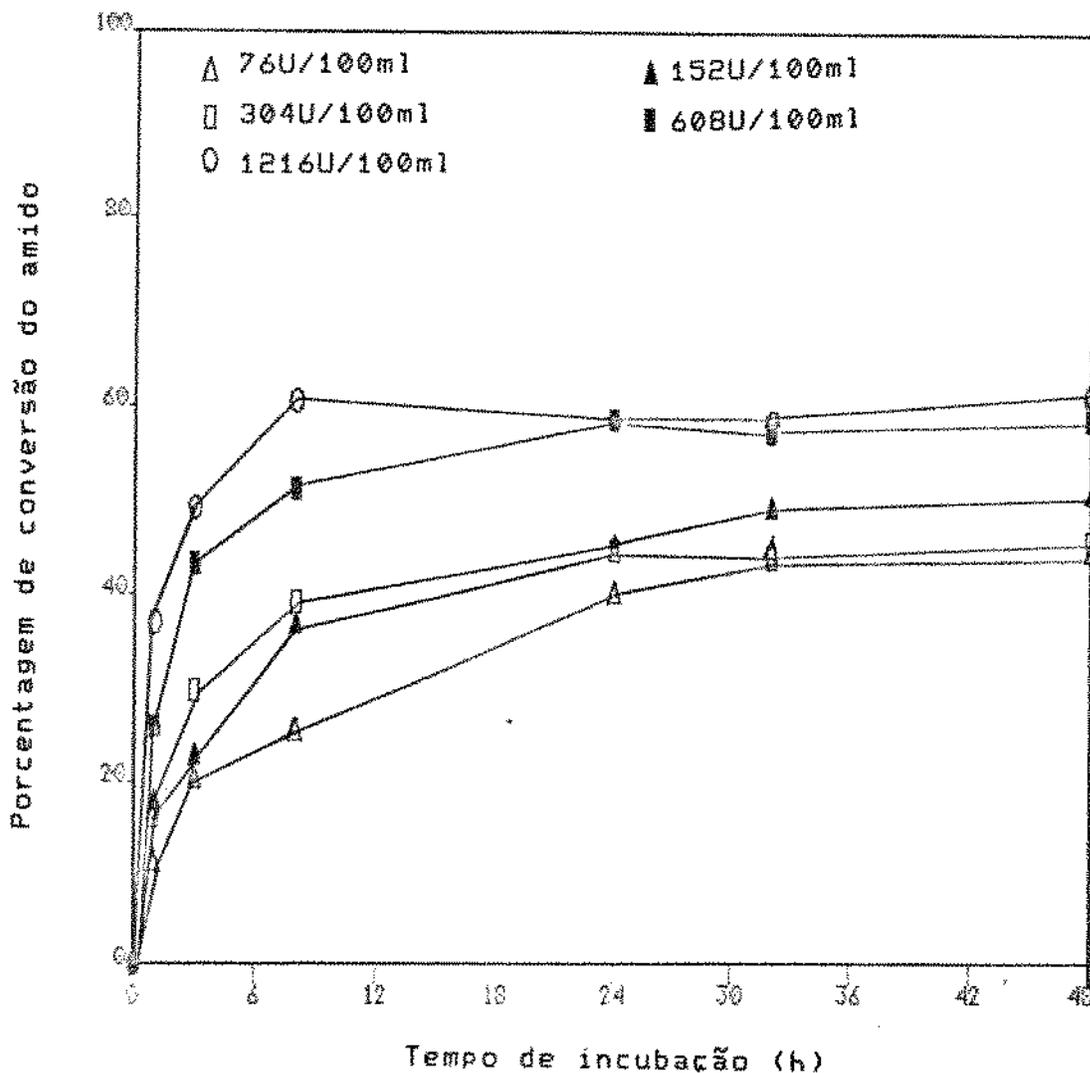


Figura 17. Conversão do amido solúvel 1% em ciclodextrinas, em função da concentração da CGTase do *Bacillus lentus* e do tempo de incubação a 55°C. A formação de ciclodextrinas foi medida pelo método da glicocamilase.

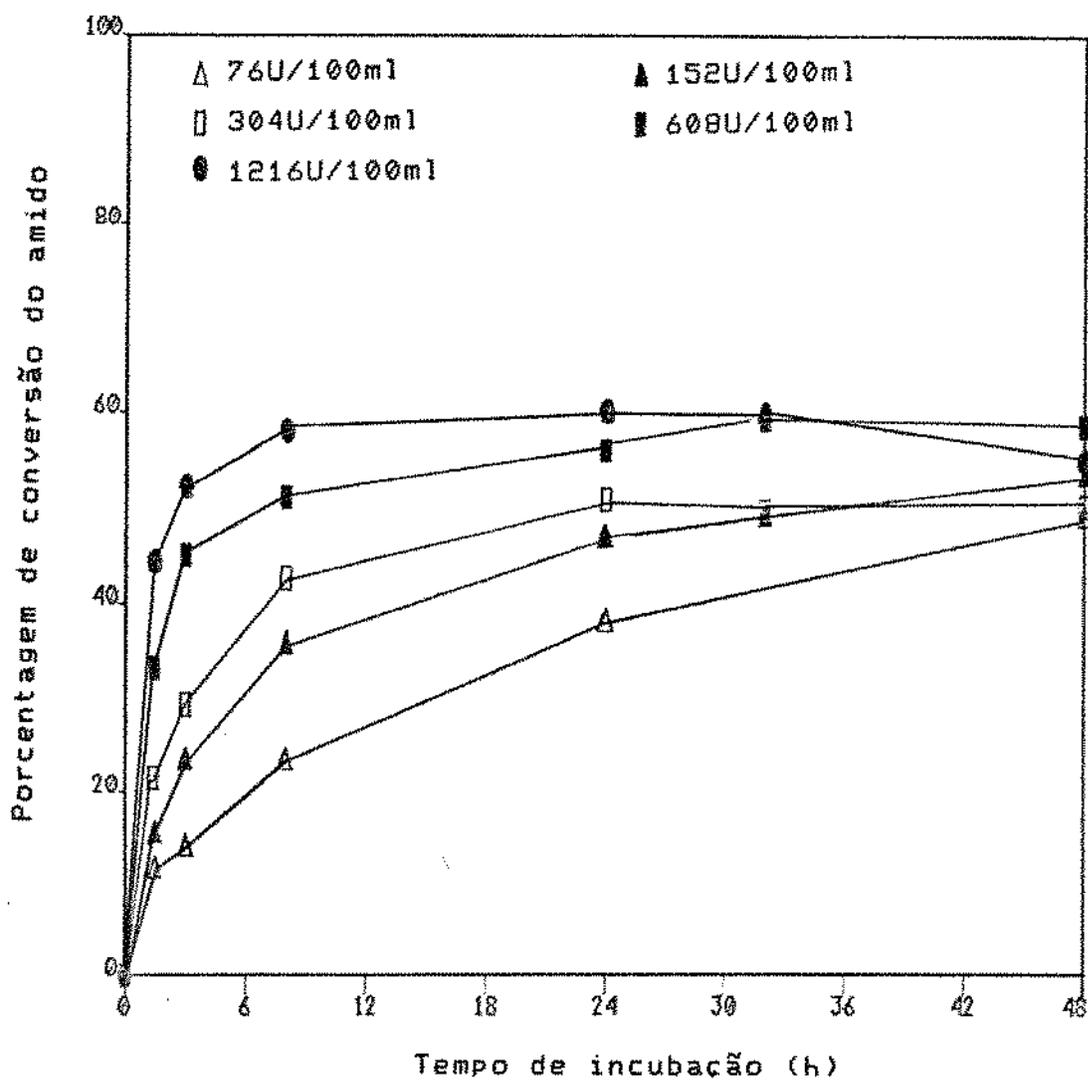


Figura 18. Conversão do amido solúvel 1% em ciclodextrinas, em função da concentração da CGTase do *Bacillus lentus* e do tempo de incubação a 55°C. A formação de ciclodextrinas foi medida pelo método da gravimetria.

velocidade inicial da reação de ciclização. Para uma concentração de 1216U por 100ml de amido solúvel 1%, cerca de 60% de conversão ocorria após 8h de incubação (Figuras 17 e 18). Incubações prolongadas por até 48h, com concentrações reduzidas da enzima, favoreceram a conversão do amido em CDs. Um rendimento superior a 45% foi observado com 76U por 100ml de amido solúvel 1%(Figura 18).

4.7) Proporção de formação de ciclodextrinas pela CGTase

A proporção entre os tipos de CDs produzidas pela CGTase do *Bacillus lentus* foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, conforme descrito no item 3.11. A Figura 19 mostra os cromatogramas dos padrões de CDs e aqueles obtidos após 24 e 48h de hidrólise do amido solúvel 1% com a CGTase. No cromatograma A, o primeiro pico corresponde ao solvente das CDs que foi a água. Nos cromatogramas B e C, o primeiro pico corresponde a água, o segundo e terceiro correspondem à glicose e maltose, produzidas pela amiloglicosidase a partir do amido não convertido em CDs. Nota-se que a β -CD é produzida quase que exclusivamente, independente do tempo de incubação estudado. Baseando-se na porcentagem de área formada para cada CD, calculou-se as proporções de 1:67:1,6 e 1,6:54:1 para α , β e γ -CD, respectivamente, após 24 e 48h de incubação. Tais proporções não foram ainda descritas na literatura. Esta importante característica sugere que a CGTase do *Bacillus lentus* tem potencial para produção específica de β -CD, podendo permitir a obtenção de uma preparação comercial desta ciclodextrina mais purificada.

A Tabela 14 mostra as principais CDs produzidas de acordo com a espécie de microrganismo. KITAHATA e OKADA (1974) verificaram que as CGTases do *Bacillus megaterium* e *Bacillus macerans* produziam as CDs

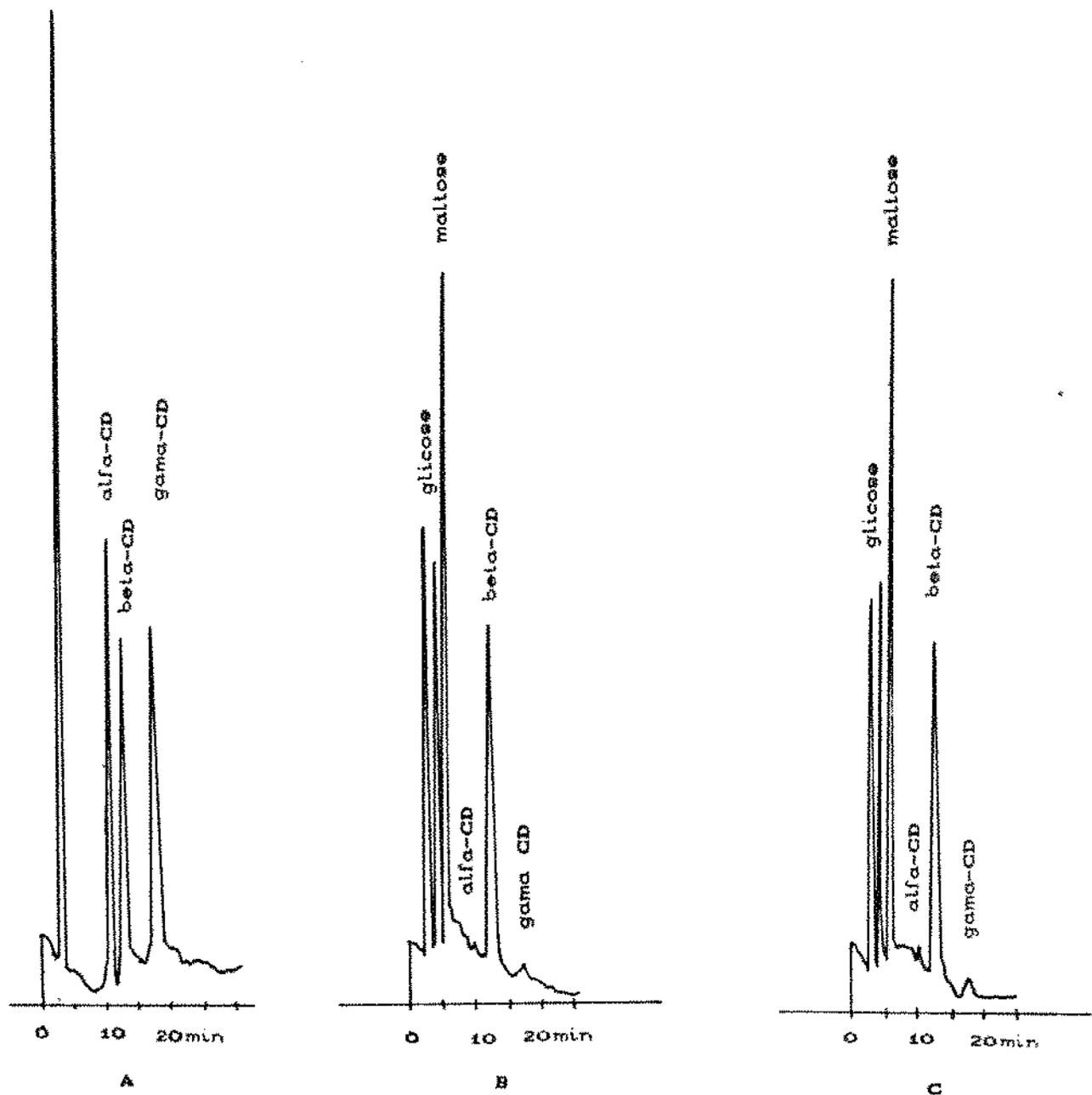


Figura 19. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de ciclodextrinas. (A) - Eluição das ciclodextrinas padrões (10 μ l da mistura, contendo 0,4% de cada ciclodextrina). (B) e (C) - Eluição do hidrolisado (amido solúvel 1%), após 24 e 48h de incubação com a CGTase, respectivamente.

nas proporções de 1:2,4:1 e 2,7:1:1, respectivamente. Para a CGTase do *Bacillus circulans* a proporção era de 1:10,5:0 (POGSAWASDI e YAGISAWA 1987). YU e col. (1988) comentam que a CGTase do *Bacillus amyloliquefaciens* produz principalmente α -CD (80-90% do total de CD) e que a γ -CD não foi detectada. Já, a CGTase do *Bacillus subtilis* produziu somente a γ -CD (KATO e HORIKOSHI, 1986). A maioria das CGTases descritas na literatura, com exceção da anterior, produz principalmente a α ou β -CD (Tabela 14).

BENDER (1983) explica que a reação de ciclização é favorecida pela conformação helicoidal do substrato. Cada espiral do amido contém de 6 a 7 resíduos de glicose, e isto facilita a formação da α e β -CD. Enquanto a γ -CD é provavelmente produzida a partir de regiões não helicoidais, ou pela distorção da hélice durante a ligação do substrato, o que explica sua baixa taxa de formação. A presença de álcoois, ésteres, éteres, cetonas e bromobenzeno no meio de reação, afetam a proporção e os rendimentos das CDs durante a hidrólise (BENDER, 1983; SHIRAIISHI e col., 1989a, 1989b).

4.8) Formação de ciclodextrinas a partir de vários carboidratos

O efeito da origem do carboidrato sobre o rendimento da conversão em CDs também foi estudado. Os substratos foram preparados a 1%, de acordo com os procedimentos de NAKAMURA e HORIKOSHI (1976b). Na Figura 20, nota-se que até 2h de incubação, a enzima apresentava uma conversão em torno de 51% do amido de milho, seguida por amido de mandioca(47%), amilopectina(45%) e aproximadamente 43% para os amidos de batata e solúvel. Mas com 4h de incubação praticamente, inexisteriam tais diferenças de rendimento, e a taxa de conversão era aproximadamente 55% para todos os carboidratos.

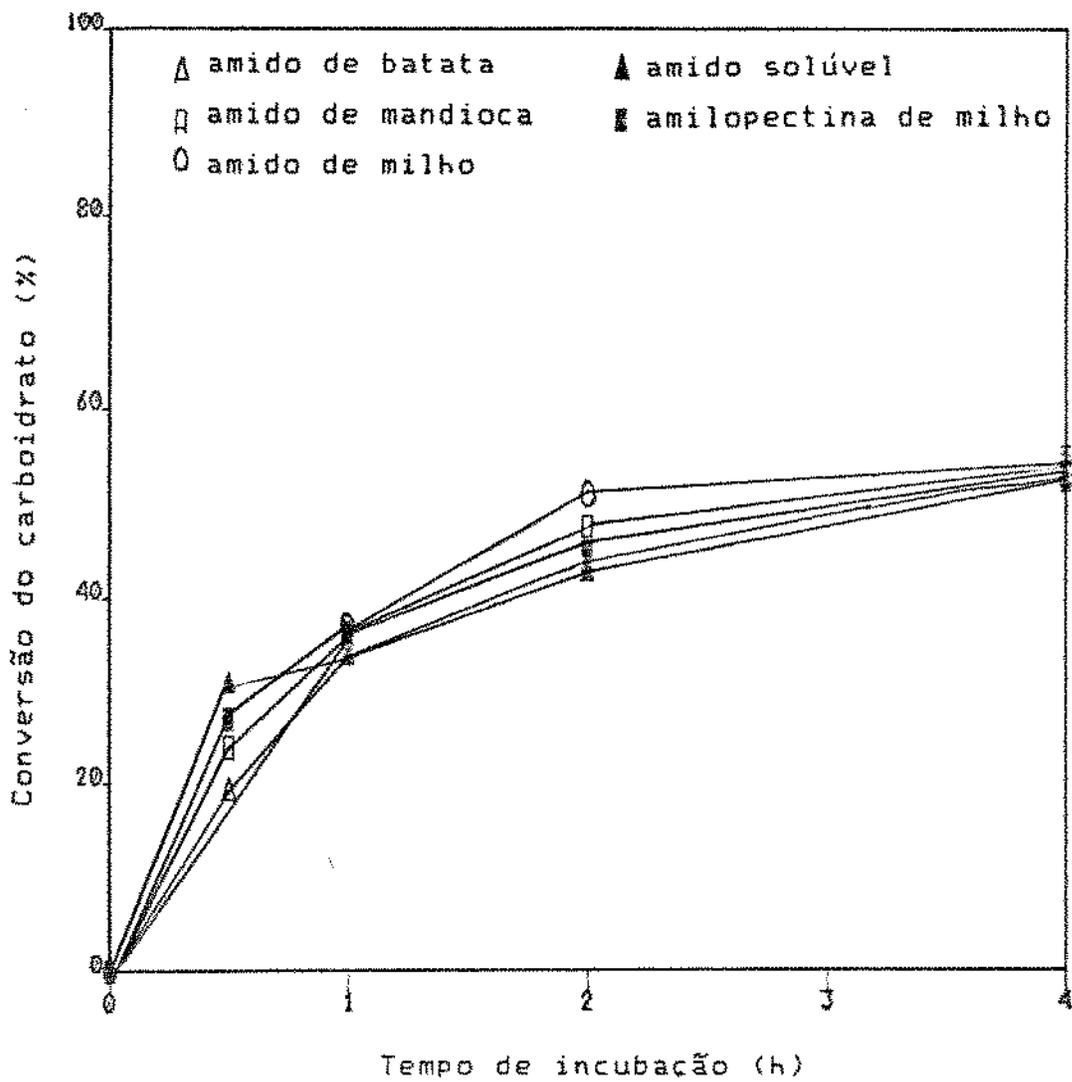


Figura 20. Efeito do tipo de carboidrato sobre a produção de ciclodextrinas pela CGTase do *Bacillus lentus*.

NAKAMURA e HORIKOSHI (1976b) obtiveram maiores rendimentos com a CGTase do *Bacillus* sp (ATCC 21783), pois cerca de 73% do amido de batata e 65% de amilopectina foram convertidos em CDs. Estes mesmos autores (1976d) declaram que não entenderam por que, especialmente com carboidratos altamente ramificados, os rendimentos eram maiores que aqueles obtidos por CGTases de outros microrganismos.

FRENCH (1957) cita que a CGTase do *Bacillus macerans* produzia uma rápida liquefação do amido, sem qualquer formação de açúcares ou CDs. Este comportamento de liquefação do amido, sem formação de açúcares redutores, também foi observado na CGTase do *Bacillus lentus*, e tem sido descrito por outros pesquisadores (MATZUZAWA e col., 1975, HORIKOSHI, 1979).

4.9) Efeito de co-substratos

A Tabela 17 mostra que a presença de 0,05% de glicose, sacarose ou lactose não apresentou qualquer efeito sobre a atividade da enzima. A presença de maltose aumentou em 17% a atividade dextrinizante, mas não aumentou a formação de CDs. No entanto, a presença de 0,3% de β -CD inibiu 41% da atividade dextrinizante e 23% da atividade de formação de CDs, demonstrando que a enzima foi inibida pelo produto. Este experimento foi semelhante ao de NAKAMURA e HORIKOSHI (1976b), que notaram que a glicose, maltose e maltotriose aceleraram a atividade dextrinizante, mas 0,3% de β -CD não afetou tal atividade da CGTase do *Bacillus* sp (ATCC 21783). Os autores relatam que a enzima do *Bacillus macerans* foi inibida em 35% por 0,3% de β -CD. A não inibição da CGTase do *Bacillus* sp (ATCC 21783) pelo produto pode ser uma explicação para sua maior eficiência na conversão do amido em CDs, em relação às outras CGTases. O estudo da inibição pelo produto para outras CGTases

não foi descrito na literatura.

Tabela 17. Efeito de co-substratos sobre a atividade dextrinizante e formação de ciclodextrinas pela CGTase do *Bacillus lentus*.

Co-substratos	Concentração (%)	Atividade enzimática relativa (%)	
		dextrinizante	formação de CDs ^a
Controle	-	100	100
Glicose	0,05	103	96
Sacarose	"	100	100
Lactose	"	100	104
Maltose	"	117	104
β -CD	0,3	59	77

^a- atividade ciclodextrina tricloroetileno(CD-TCE)

4.10) Peso molecular da CGTase

O peso molecular da CGTase do *Bacillus lentus* foi determinada por filtração em gel SEPHADEX G-200, como foi descrito no subitem 3.9.7, e o resultado é mostrado na Figura 21. Pela curva estimou-se o peso molecular da enzima em 33.000. Comparando-se este resultado com os apresentados na Tabela 14, verifica-se que esta enzima apresentou um peso molecular inferior às demais citadas na literatura, para o gênero *Bacillus*. Este resultado sugere que a CGTase do *Bacillus lentus* pode ser considerada uma nova CGTase.

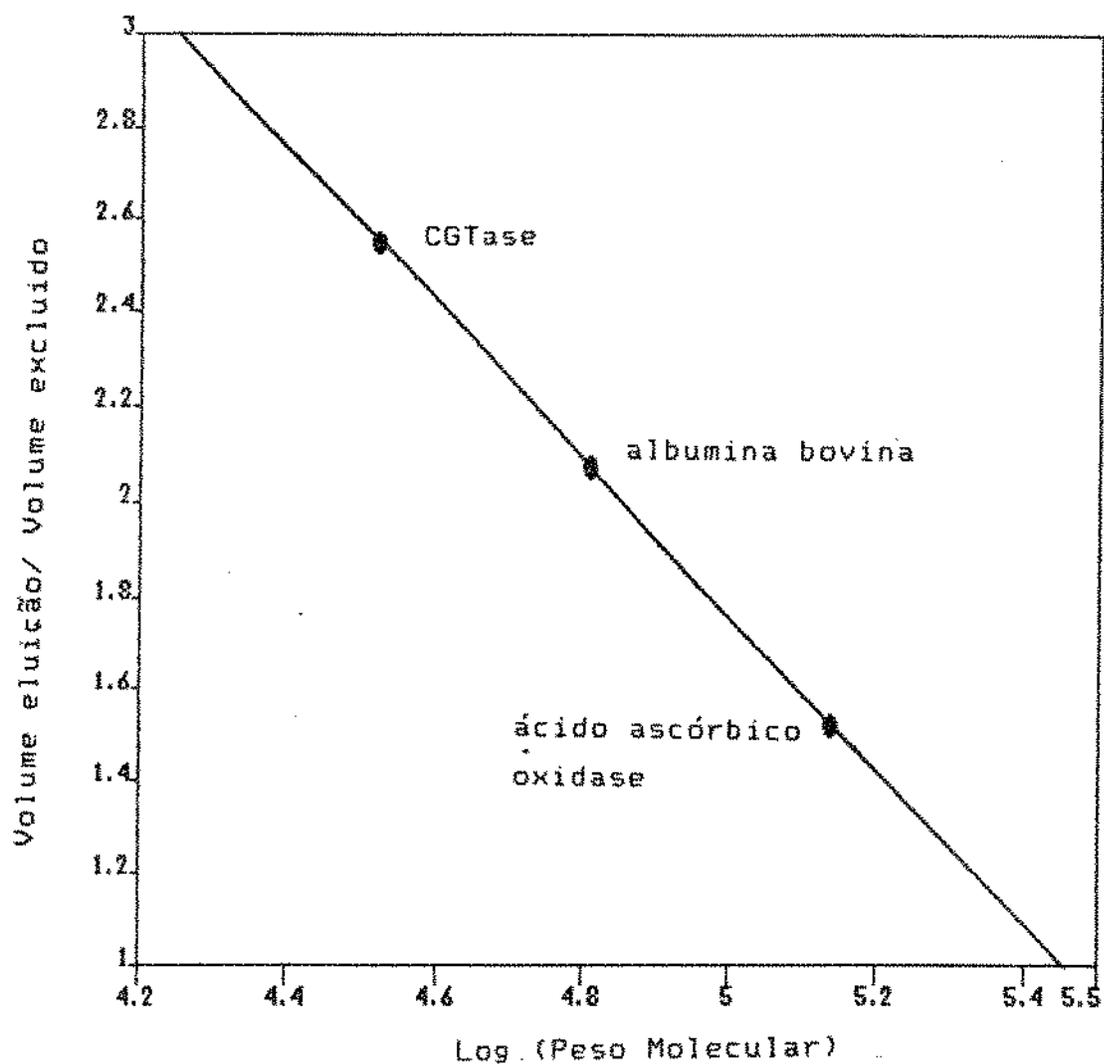


Figura 21. Determinação do peso molecular da CGTase do *Bacillus lentus*, em SEPHADEX G-200. (Proteínas padrão: albumina bovina, PM 65000 e ácido ascórbico oxidase, PM 140.000).

4.11) Estudo da produção da CGTase em meio de cultura industrial

O *Bacillus lentus* foi cultivado no meio descrito no tratamento T₂₂ da Tabela 12, e nas condições descritas no subitem 3.8.1. A partir de 1900ml de cultura obteve-se, após precipitação das proteínas com álcool e secagem do precipitado, 6,1g de uma preparação bruta contendo aproximadamente 15.000U CGTase/g. A enzima foi recuperada em cerca de 55%. A água de maceração de milho (AMM), a nível de 2%, e os demais ingredientes constituíram um excelente meio de cultivo e de produção da CGTase, para o *Bacillus lentus*.

4.12) Produção de ciclodextrinas com a CGTase bruta

A preparação bruta da CGTase, obtida em procedimento anteriormente descrito, quando adicionada em concentrações de 0,2 a 2%(p/p), em relação ao peso seco do amido solúvel a 10%, em tampão borato 50mM (pH 7,5), e após passar por uma incubação por 24h a 55°C, alcançou taxas de conversões do amido em CDs que variaram de 17 a 31% (Figura 22).

MATZUZAWA e col. (1975) obtiveram cerca de 45% de conversão do amido de batata a 15%, mediante a adição de 0,7 a 1% de uma preparação da CGTase do *Bacillus* sp (ATCC 21783), contendo 10.000U/g. Conforme discutido no item 4.9, a CGTase deste microrganismo não apresentou inibição pela β -CD, e isto pode explicar a sua maior eficiência na conversão do amido em ciclodextrinas.

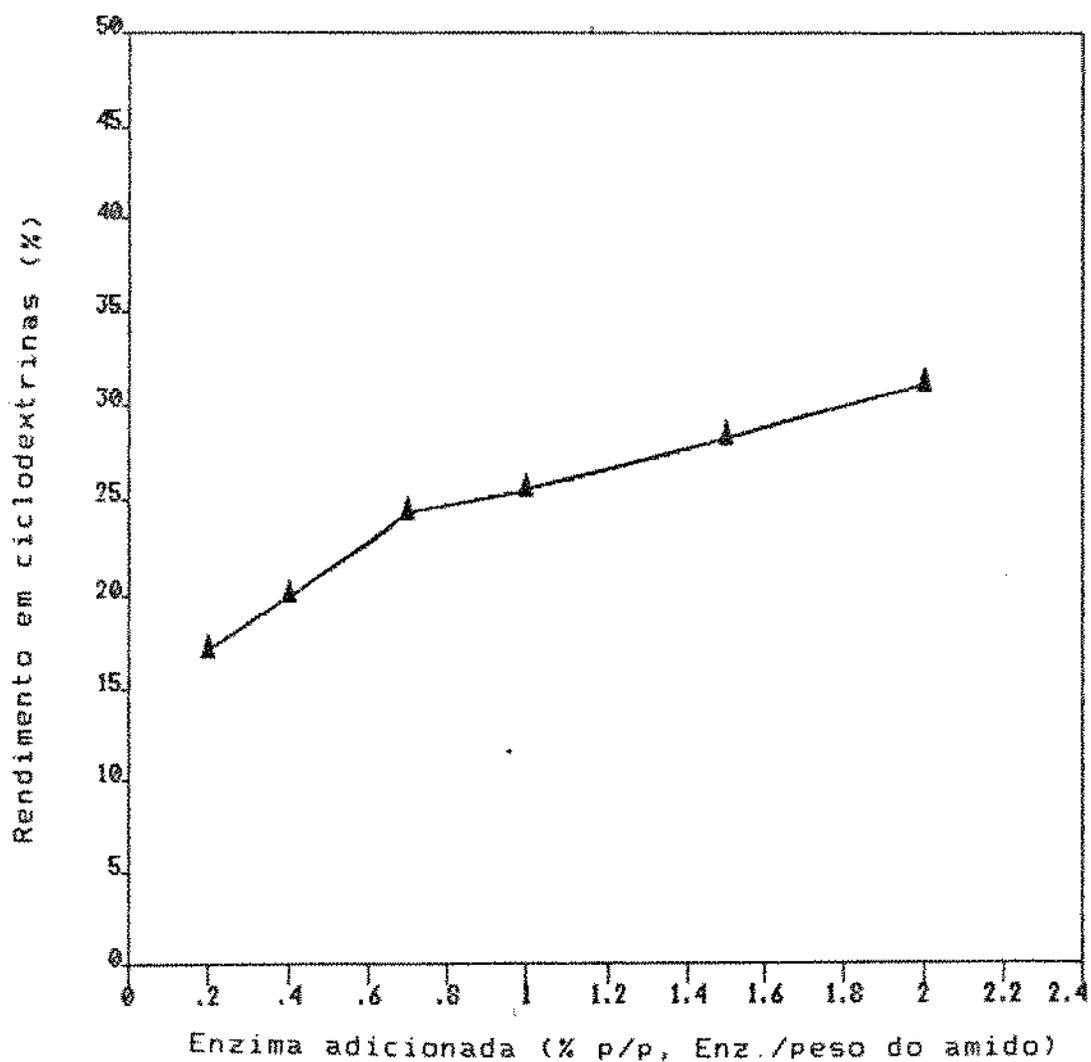


Figura 22. Efeito da concentração da preparação bruta desidratada da CGTase do *Bacillus lentus* ($\cong 15.000$ U/g), sobre a produção de ciclodextrinas, a partir de substrato amido solúvel 10%.

5) CONCLUSÕES

1) O microrganismo alcalofílico estudado neste experimento foi isolado do solo e identificado como *Bacillus lentus*. Esta bactéria produziu a CGTase em proporções semelhantes aos melhores microrganismos produtores desta enzima, descritos na literatura. Isto sugere que a linhagem tem potencial como produtor de CGTase a nível industrial.

2) A CGTase era extracelular e indutível, e sua produção era estimulada por amido, β -ciclodextrina, amilopectina e dextrina.

3) O pH ótimo da CGTase ficou entre de 5,8 a 6,2 para a atividade dextrinizante e 6,5 a 7,5 para a formação de ciclodextrinas.

4) A temperatura ótima para a produção de ciclodextrinas situou-se entre 45 e 55°C. Na ausência de substrato, a enzima ficou estável até 55°C, em tampão borato 50mM (pH 7,5). A adição de 10mM de CaCl₂ aumentou a resistência térmica da enzima para a formação de ciclodextrinas e atividade dextrinizante.

5) A enzima não foi inibida por p-cloromercuribenzoato 0,5mM ou iodoacetamida 5mM, sugerindo que a mesma não apresenta grupos

sulfidrilas essenciais para a catálise.

6) O peso molecular da CGTase foi estimado em 33.000, através de filtração em gel Sephadex G-200.

7) Através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), verificou-se que a CGTase do *Bacillus lentus* produziu as ciclodextrinas numa proporção de 1:67:1,6, para α , β e γ -CD, respectivamente. Este resultado sugere que a enzima tem potencial para ser utilizada na produção específica de β -ciclodextrina.

8) A CGTase do *Bacillus lentus* demonstrou inibição parcial pelo produto, o que pode ter contribuído para o menor rendimento da conversão do amido em ciclodextrinas.

9) Neste experimento, observou-se que a atividade dextrinizante da CGTase, pode não refletir as condições ótimas da enzima nas reações de ciclização. A medida da atividade dextrinizante é, assim, recomendada somente para expressar a atividade enzimática (U/ml ou g), ou a atividade específica (U/mg de proteína). Para estudos de otimização de reações de ciclização, recomenda-se o emprego de um dos seguintes métodos: glicoamilase, gravimétrico ou CD-TCE.

6) LITERATURA CITADA.

- ABE, J., MIZOWAKI, N., HIZIKURI, S., KOIZUMI, K. e UTAMURA, T. (1986). Synthesis of branched cyclomalto-oligosaccharides using *Pseudomonas* isoamylase. *Carbohydr. Res.*, 154:81-92.
- ANDREWS, P. (1965). The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.*, 96:595-606.
- BAR, R. e ROKEM, J. S. (1990). Cyclodextrin-stimulated fermentation of prodigiosin by *Serratia marcescens*. *Biotechnol. Letters.* 12:447-448.
- BENDER, H. (1977a). Cyclodextrin-glucoamylase von *Klebsiella pneumoniae*. 1. *Arch. Microbiol.*, 111:271-282.
- BENDER, H. (1977b). Cyclodextrin-glucoamylase von *Klebsiella pneumoniae*. 2. *Arch. Microbiol.*, 119:49-56.
- BENDER, H. (1983). An improved method for the preparation of cyclo-octaamylose, using starches and cyclodextrin-glucoamylase of *Klebsiella pneumoniae* M 5 al. *Carbohydr. Res.*, 124:225-233.
- BENDER, H. e KOMIYAMA, M. (1978). *Cyclodextrin Chemistry*. Springer-Verlag, New York. p.2-23.

- CRAMER, F. e KAMPLE, W. (1965). Inclusion compounds. XVII. Catalysis of decarboxylation by cyclodextrins. A model for mechanisms of enzymes. *J. Am. Chem. Soc.*, 87:1115-1120.
- CRAMER, F. e HENGLEIN, F. M. (1957). Gesetzmässigkeiten bei der bildung von addukten der cyclodextrine. *Chem Ber.*, 90:2561-2575.
- CRAMER, F. (1967). Probleme der chemischen polynucleotid-synthese. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 73:49-56.
- DEÁK, T. e TIMÁR, E. (1988). Simplified identification of aerobic spore-formers in the investigation of foods. *Internat. J. Food Microbiol.*, 6:115-125.
- DePINTO, J. A. e CAMPBELL, L. L. (1964). Formation and degradation of cyclodextrins by intracellular enzymes of *Bacillus macerans*. *Science*. 146:1064-1066.
- DePINTO, J. A e CAMPBELL, L. L (1968a) Purification and properties of the amylase of *Bacillus macerans*. *Biochemistry*. 7:114-120.
- DePINTO, J. A e CAMPBELL, L. L. (1968b). Purification and properties of the cyclodextrinase of *Bacillus macerans*. *Biochemistry*. 7:121-125
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. e SMITH, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28:350-356.
- FRANK, D. W., GRAY, J. E. e WEAVER, R. N. (1976). Cyclodextrin nephrosis in the rat. *Am. J. Pathol.*, 83:367-374.

- FRENCH, D. (1957). The Schardinger dextrans. *Adv. Carbohydr. Chem.*, 12:189-260.
- FRENCH, D. e RUNDLE, R. E. (1942). The molecular weights of the Schardinger alpha and beta dextrans. *J. Am. Chem. Soc.*, 64:1651-1653.
- FRENCH, D., PAZUR, J., LEVINE, M. L. e NORBERG, E. (1948). Reversible action of *macerans* amylase. *J. Am. Chem. Soc.*, 70:3145.
- FRENCH, D., LEVINE, M. L., PAZUR, J. H. e NORBERG, E. (1949). Studies on the Schardinger dextrans. The preparation and solubility characteristics of alpha, beta and gamma dextrans. *J. Am. Chem. Soc.*, 71:353-356.
- FRENCH, D. LEVINE, M. L. e PAZUR, J. H. (1949a). Studies on the Schardinger dextrans. II. Preparation and properties of amyloheptaose. *J. Am. Chem. Soc.*, 71:356-359.
- FRENCH, D., KNAPP, D. W. e PAZUR, J. H. (1950). Studies on the Schardinger dextrans. VI. The molecular size and structure of the γ -dextrin. *J. Am. Chem. Soc.*, 72:5150-5153.
- FRENCH, D., LEVINE, M. L., NORBERG, E., NORDIN, P., PAZUR, J. H. e WILD, G. M. (1954) Studies on the Schardinger dextrans. VII. Co-substrate specificity in coupling reactions of *macerans* amylase. *J. Am. Chem. Soc.*, 76:2387-2390.
- FRENCH, D., PULLEY, A. D. e WHELAN, W. J. (1963). Preparation of Schardinger dextrans on a larger-than-laboratory scale. *Die Starke*. 15:280-284.

- FUWA, H. (1954). A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *J. Biochem.*, 41:583-603.
- GOMORI, G. (1955). Preparation of buffers for use in enzyme studies. In: COLOWICK, S. P. E KAPLAN, N. O., eds. *Methods in Enzymology*. Vol. I. Academic Press, London. pg 138-146.
- GORDON, R. E. e HYDE, J. L. (1982). The *Bacillus firmus* - *Bacillus lentus* complex and pH 7.0 variants of some alkalophilic strains. *J. Gen. Microbiol.*, 128:1109-1116.
- GRIFFITHS, D. e BENDER, M. L. (1967). Cycloamyloses as catalyst. *Advances in Catalysis.*, 23:209-259.
- HIRAI, H., TOSHIMA, N. e UENOYAMA, S. (1981). Inclusion complex formation of cyclodextrin with large dye molecule. *Polymer J.*, 13:607-610.
- HISAMATSU, M. e TSU, T. Y. (1989) Production of maltosyl β -cyclodextrin by a bioreactor systems whit pullulanase immobilized on partially deacetyled chitin. *Starch.* 41:239-242.
- HORIKOSHI, K. (1971). Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* n^o 221. *Agric. Biol. Chem.*, 35:1407-1414.
- HORIKOSHI, K. (1979). Production and industrial applications of β -cyclodextrin. *Process Biochm.*, 14:26-30.
- KATO, T. e HORIKOSHI, D. (1986). A new γ -cyclodextrin forming enzyme produced by *Bacillus subtilis* n^o 313. *J. Jpn Soc. Starch Sci.*

- KITAHATA, S., TSUYAMA, N. e OKADA, S. (1974). Purification and some properties of cyclodextrin glycosyltransferase from a strain of *Bacillus* species. *Agric. Biol. Chem.*, 38:387-393.
- KITAHATA, S. e OKADA, S. (1974) Action of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus megaterium* strain n^o 5 on starch. *Agric. Biol. Chem.*, 38:2413-2417.
- KITAHATA, S. e OKADA, S. (1975). Tranfer action of cyclodextrin glycosyltransferase on starch. *Agric. Biol. Chem.*, 39:2185-2191.
- KITAHATA, S. e OKADA, S. (1976). Studies on cyclodextrin glycosyltransferase. IV. Enzymatic synthesis of 3-O- α -D-glucopyranosil-L-sorbose and 4- α -D-glucopyranosil-D-xylose using cyclodextrin glycosyltransferase. *J. Biochem.*, 79:641-648.
- KITAHATA, S., OKADA, S. e FUKUI, T. (1978). Acceptor specificity of the transglycosylation catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase. *Agric. Biol. Chem.*, 42:2369-2374.
- KITAHATA, S. e OKADA, S. (1982a). Purification and some properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* TC-60. *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, 29:7-12.
- KITAHATA, S. e OKADA, S. (1982b). Comparison of action of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus* and *B. macerans*. *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, 29:13-18.
- KOBAYASHI, S., KAINUMA, K. e SUZUKI, S. (1978). Purification and some properties of *Bacillus macerans* cycloamylose(cyclodextrin)

- glucanotransferase. *Carbohydr. Res.*, 61:229-238.
- KOIZUMI, K. e UTAMURA, T. (1986). Isolation and characterization of branched cyclodextrins. *Carbohydr. Res.*, 153:55-67.
- KONNO, A., MIYAWAKI, M., MISAKI, M., e YAMATSU, K. (1981). Bitterness reduction of fruits by β -cyclodextrin. *Agric. Biol. Chem.*, 45:2341-2342.
- LACH, J. L. e COHEN, J. (1963). Interaction of pharmaceutical with Schardinger dextrans. II. Interaction with selected compounds. *J. Pharm. Sci.*, 52:137-142.
- LINDNER, K., SZENT, L. e SZEJTLI, J. (1981). Food flavouring with β -cyclodextrin complexed flavour substances. *Acta Alimentaria*, 10:175-186.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. e RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.
- MALLETTE, M. F. (1969). Evaluation of growth by physical and chemical means. In: NORRIS, J. R. e RIBBONS, D. W. *Methods in Microbiology*. vol. 1. Academic Press, London. pg 522-566.
- MATZUZAWA, M., KAWANO, M., NAKAMURA, N. e HORIKOSHI, K. (1975). An improved method for the preparation of Schardinger β -dextrin on a industrial scale by cyclodextrin glycosyl transferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. (ATCC 21783). *Starch*, 27:410-413.
- McCLENAHAN, W. S., TILDEN, E. B. e HUDSON, C. S. (1942). A study of

- the products obtained from starch by action of the amylase of *Bacillus macerans*. J. Am. Chem. Soc., 64:2139-2144.
- MIRDLAJCZYK, M. e DRABOWICZ, J. (1978). Optical resolution of chiral sulfinyl compounds via β -cyclodextrin inclusion complex. J. Am. Chem. Soc., 100:2510-2515.
- NAKAMURA, N. e HORIKOSHI, K. (1976a). Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase-producing alkalophilic *Bacillus* sp. Agric. Biol. Chem., 40:753-757.
- NAKAMURA, N. e HORIKOSHI, K. (1976b). Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. Agri. Biol. Chem., 40:935-941.
- NAKAMURA, N. e HORIKOSHI, K. (1976c). Characterization of acid-cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. Agric. Biol. Chem., 40:1647-1648.
- NAKAMURA, N. e HORIKOSHI, K. (1976d). Purification and properties of neutral-cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. Agric. Biol. Chem., 40:1785-1791.
- NEMETHY, G. e SCHERAGA, H. A. (1962). Structure of water and hydrophobic bonding in proteins. II. Model for the thermodynamic properties of aqueous solutions hydrocarbons. J. Chem. Phys., 36:3401-3417.
- (NSKK), NIHON SHOKUHIN KAKO Co., LTD. (1983). CELDEX(cyclodextrins). Technical data. 2nd ed. 04/1983, 13p.

- NOMOTO, M., SHEW, D. C., CHEN, S. J., YEN, C. W. L. e YANG, C. P. (1984). Cyclodextrin glucoamylase from alkalophilic bacteria of Taiwan. *Agric. Biol. Chem.*, 48:1337-1338.
- NOMOTO, M., CHEN, C. C., e SHEW, D. C. (1986). Purification and characterization of cyclodextrin glucoamylase an alkalophilic bacterium of Taiwan. *Agric. Biol. Chem.*, 50:2701-2707.
- NORBERG, E. e FRENCH, D. (1950). Studies on the Schardinger dextrans. III. Redistribution reactions of macerans amylase. *J. Am. Chem. Soc.*, 72:1202-1205.
- OGASAHARA, K., IMANISHI, A. e ISEMURA, T. (1970). Studies on thermophilic α -amylase from *Bacillus stearothermophilus* II. Thermal stability of thermophilic α -amylase. *J. Biochem.*, 67(1):77-82.
- PARK, C. S., PARK, K. H. e KIM, S. H. (1989). A rapid screening method for alkaline β -cyclodextrin glucoamylase using phenolphthalein-methyl orange-containing-solid medium. *Agric. Biol. Chem.*, 53:1167-1169.
- PONGSAWASDI, P. e YAGISAWA, M. (1987). Screening and identification of a cyclomaltoamylase-producing bacteria. *J. Ferment. Technol.*, 65:463-467.
- PONGSAWASDI, P. e YAGISAWA, M. (1988). Purification and some properties of cyclomaltoamylase from *Bacillus circulans*. *Agric. Biol. Chem.*, 52:1099-1103.
- PSZCZOLA, D. E. (1988). Production and potential food applications of cyclodextrins. *Food Technol.*, 42:96-100.

- SAENGER, W. (1980). Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 19:344-362.
- SANKANO, Y., SANDO, M. e KOYABASHI, T. (1985). Preparation and enzymatic hydrolysis of maltosyl- α -cyclodextrin. *Agric. Biol. Chem.*, 49:3391-3398.
- SATO, M., YAGI, Y., NAGANO, H. e ISHIKURA, T. (1985). Determination of CGTase from *Bacillus oshimensis* and its optimum pH using HPLC. *Agric. Biol. Chem.*, 49:1189-1191.
- SAWADA, H., SUZUKI, T., AKIYAMA, S. e NAKAO, Y. (1987). Stimulatory effect of cyclodextrins on the production of lankacidin-group antibiotics by *Streptomyces* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26:52-526.
- SHAW, E. P., TATUM, J. H. e WILSON, C. W. (1984). Improved flavor of Navel orange and grapefruit juices by removal of bitter components with β -cyclodextrin polymer. *J. Agric. Food Chem.*, 32:832-836.
- SHAW, E. P. e WILSON, C. W. (1985). Reduction of bitterness in grapefruit juice with β -cyclodextrin polymer in a continuous-flow process. *J. Food Sci.*, 50:1205-1207.
- SHAW, E. P. e BUSLIG, B. S. (1986). Selective removal of bitter compounds from grapefruit juice and from aqueous solution with cyclodextrin polymers and with amberlite XAD-4. *J. Agric. Food Chem.*, 34:837-840.
- SHIRAISHI, T., FUJIMOTO, D. e SANKANO, Y. (1989). Synthesis of branched α -cyclodextrin carrying a side chain longer than maltose

using *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase. Agric. Biol. Chem., 53:3093-3095.

SHIRAISHI, F., KAWAKAMI, K. e MARUSHIMA, H. e FUKUOKA, K. K. (1989a). Effect of ethanol on formation of cyclodextrin from soluble starch by *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase. Starch. 41:151-155.

SHIRAISHI, F., KAWAKAMI, K., MARUSHIMA, H. E FUKUOKA, K. K. (1989b). Effects of aliphatic alcohols on formation of cyclodextrin from soluble starch by *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase. Starch. 41:417-420.

SNEATH, P. A. (1986). Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In: SNEATH, P.H., MAIR, N. S., SHARPE, M. E. e HOLT, J. G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. vol. 12 Waverly Press, Inc. Baltimore. p.1104-1141.

SOMOGYI, M. (1945). A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem., 160:61-68.

SZEJTLI, J. FENYVESI, é. e ZSANDON, B. (1978). Cyclodextrinpolymere. Starch. 30:127-131.

SZEJTLI, J. e SEBESTYÉN, G. (1979). Resorption, metabolism and toxicity studies on the peroral application of beta-cyclodextrin. Starch. 31:385-389.

SZEJTLI, J. (1982). Cyclodextrins in food, cosmetic and toiletries. Starch. 34:379-385.

SZEJTLI, J. (1984). Industrial applications of cyclodextrins. In:

- ATWOOD, J. L., DAVIES, J. E. D. e MacNICOL, D. D. eds. Inclusion Compounds. vol 3. Academic Press. London. p.331-389.
- TABUSHI, I., KIYOSUKE, Y., SUGIMOTO, T. e YAMAMURA, K. (1978). Approach to the aspects of driving force of inclusion by α -cyclodextrin. J. Am. Chem. Soc., 100:916-919.
- TAGUCHI, K. (1986). Transient binding mode of phenolphthalein- β -cyclodextrin complex: an example of induced geometrical distortion. J. Am. Chem. Soc., 108:2705-2709.
- TAKKAR, A. L., KUEHN, P. B. PERRIN, J. H. e WILHAN, W. L. (1972). Cycloheptamylose-barbiturate inclusion complex: solubility and circular dichroism studies. J. Pharm. Sci., 61:1841-1843.
- TAKEUCHI, S., KOCHI, M., SAKAGUCHI, K., NAKAGAWA, K. e MIZUTANI, T. (1978). Benzaldehyde as a carcinostatic principle in figs. Agric. Biol. Chem., 42:1449-1451.
- TILDEN, E. B. e HUDSON, C. S. (1939). Conversion of starch to crystalline dextrans by the action of a new amylase separet from culture of *Aerobacillus macerans*. J. Am. Chem. Soc., 61:2900-2902.
- TILDEN, E. B. e HUDSON, C. S. (1942). Preparation and properties of the amylases produced by *Bacillus macerans* and *Bacillus polymixa*. J. Bacteriol., 43:527-544.
- van ETEN, R. L., SEBASTIAN, J. F., CLOWES, G. A. e BENDER, M. L. (1967a). Acceleration of phenyl ester cleavage by cycloamyloses. A model for enzymatic specificity. J. Am. Chem. Soc., 89:4242-3253.

- van ETEN, R. L., GLOWES, G. A., SEBASTIAN, J. F. e BENDER, M. L. (1967b). The mechanism of the cycloamylose-accelerated cleavage of phenyl esters. *J. Am. Chem. Soc.*, 89:3253-3263.
- VALLEE, B., SUMEWELL, W. N. e FISCHER, E. (1959). Metal content of α -amylase of various origins. *J. Biol. Chem.*, 234:2901-2905.
- WAGNER Jr., C. J., WILSON, C. W. e SHAW, P. E. (1988). Reduction of grapefruit bitter components in a fluidized β -cyclodextrin polymer bed. *J. Food Sci.*, 53:516-518.
- WIEDENHOF, N. (1969). Properties of cyclodextrins. Part IV. Features and use of insoluble cyclodextrins-epichlorohydrin-resins. *Die Starke*. 21:163-166.
- WIEDENHOF, N., LAMMERS, J. N. J. J. e van PANTHALEON, van E. (1969). Properties of cyclodextrins. Part III. Cyclodextrin-epichlorohydrin resins: preparation and analysis. *Die Starke*. 21:119-123.
- WILSON, C. W., WAGNER, C. J. e SHAW, P. E. (1989). Reduction of bitter components in grapefruit and Navel orange juices with β -cyclodextrin polymer or XAD resins in a fluidized bed process. *J. Agric. Food Chem.*, 37:14-18.
- YU, E. K. C., AOKI, H. e MISAWA, M. (1988). Specific alpha-cyclodextrin production by novel thermostable glycosyltransferase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28:377-379.