



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Raisa Déli de Oliveira Sanches

Produção e obtenção de ciclodextrinas produzidas por CGTases
bacterianas

São José do Rio Preto
2014

Raisa Déli de Oliveira Sanches

Produção e obtenção de ciclodextrinas produzidas por CGTases
bacterianas

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

São José do Rio Preto
2014

DEDICATÓRIA

À minha mãe pelo incondicional amor e apoio aos meus estudos.
Ao meu marido Matheus pelo amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria se realizado se não existissem essas pessoas, nesta ocasião agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram.

À Deus, por sua infinita misericórdia e incontáveis demonstrações de cuidado e amor.

Ao Prof. Dr Roberto da Silva, pela orientação e a confiança.

À Profa Dra Heloiza Ferreira Alves do Prado, pela dedicada orientação, incentivo, paciência e amizade.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro na concessão da bolsa de mestrado.

Aos assessores da FAPESP, que com suas avaliações ajudaram a enriquecer meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Maurício Boscolo, pela ajuda na operação do HPLC.

Aos amigos Lumena, Sirlene, Aline e o técnico José Hernandes do Lab. de Biotecnologia/UNESP-Ilha Solteira por terem me acolhido desde o primeiro dia de estágio.

Aos amigos Fernanda, Priscila, Emily, Cissa, Christiane, Isabel, Josiane, Pedro, Diego e a técnica Daniela pela amizade e convivência diária no laboratório.

À minha mãe, meus tios, meu avô, meu irmão e minha cunhada, muito obrigada por me apoiarem nos meus sonhos, por me ajudarem a suportar a distância e as dificuldades, e por compreenderem a minha ausência, vocês são fundamentais para mim.

Ao meu amor Matheus, pelo amor, amizade e compreensão em todos os momentos.

Aos meus sogros, Arabela e Dorival pela torcida e orações.

Aos meus amigos Flávia, Irene, Letícia, Ana Paula, Jodelma, Andrei, Claiton, Matheus e Leandro pela amizade, carinho e por sempre torcerem pelo meu sucesso.

Muito obrigada!

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”.

Isaac Newton

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---|--|
| CGTase | ciclomaltodextrina glucanotransferase |
| CDs | ciclodextrinas |
| FDA | Food and Drugs Administration |
| UV | radiação ultravioleta |
| α-CD | alfa ciclodextrina |
| β-CD | beta ciclodextrina |
| γ-CD | gama ciclodextrina |
| CaCl₂ | cloreto de cálcio |
| CLAE | cromatografia líquida de alta pressão |
| K₂HPO₄ | fosfato de potássio dibásico anidro |
| MgSO₄.7H₂O | sulfato de magnésio heptahidratado |
| Na₂CO₃ | carbonato de sódio |
| HCl | ácido clorídrico |
| KI | iodeto de potássio |
| I₂ | iodo ressublimado |
| U | unidade de atividade enzimática |
| C | controle da atividade enzimática |
| Abs | absorbância da amostra |
| Fd | fator de diluição |
| mM | milimolar |
| NaCl | cloreto de sódio |
| SDS-PAGE | eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio |
| mL | mililitro |
| mg | miligrama |

LISTA DE FIGURAS

| | Páginas |
|---|---------|
| Figura 1. Estrutura da amilose e da amilopectina | 6 |
| Figura 2. Representação esquemática das reações de transglicosilação catalisadas pela CGTase. No primeiro passo da reação, um Asp é ligado covalentemente, no sítio de clivagem, formando um oligossacarídeo intermediário. Em um segundo passo, esse oligossacarídeo é transferido para uma molécula receptora. | 9 |
| Figura 3. Representação estrutural das principais ciclodextrinas | 10 |
| Figura 4. Curva padrão para o método CD-fenolftaleína | 19 |
| Figura 5. Cromatograma com a eluição dos padrões de CDs. | 23 |
| Figura 6. Perfil de eluição da cromatografia de gel filtração em resina Sephadex G-75, para purificação parcial da CGTase produzida por <i>Paenibacillus campinasensis</i> H69-3 | 25 |
| Figura 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida da junção de frações resultantes da purificação parcial da CGTase produzida por <i>Paenibacillus campinasensis</i> H69-3 | 26 |
| Figura 8. Perfil de eluição da cromatografia de gel filtração em resina Sephadex G-75, para purificação parcial da CGTase produzida por <i>Bacillus</i> sp subgrupo <i>alcalophilus</i> E16 | 27 |
| Figura 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações com atividade CD-fenolftaleína, a seta indica a banda para CGTase. Purificação parcial da CGTase produzida por <i>Bacillus</i> sp subgrupo <i>alcalophilus</i> E16 | 28 |
| Figura 10. Produção de ciclodextrinas pela CGTase produzida por <i>Paenibacillus campinasensis</i> H69-3, em amidos com diferentes origens, analisada pelo método CD-fenolftaleína. A) Concentração de amido a 1,0%. B) Concentração de amido a 2,5% | 29 |
| Figura 11. Produção de ciclodextrinas pela CGTase produzida por <i>Paenibacillus campinasensis</i> H69-3, em amidos com diferentes origens, analisada pelo método dextrinizante. A) Concentração de amido a 1,0%. B) Concentração de amido a 2,5% | 30 |
| Figura 12. Produção de ciclodextrinas pela CGTase produzida por <i>Bacillus</i> sp subgrupo <i>alcalophilus</i> E16, em amidos com diferentes origens, analisada pelo método CD-fenolftaleína. A) Concentração de amido a 1,0%. B) Concentração de amido a | 31 |

2,5%

Figura 13. Produção de ciclodextrinas pela CGTase produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, em amidos com diferentes origens, analisada pelo método dextrinizante. A) Concentração de amido a 1,0%. B) Concentração de amido a 2,5%

31

Figura 14. Produção de ciclodextrinas pela CGTase produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, em amidos com diferentes origens, na concentração de 2,5%. A) Método CD-fenolftaleína B) Método dextrinizante

32

Figura 15. Produção de ciclodextrinas pela ação das CGTases bruta e parcialmente purificada, produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, utilizando amido de mandioca à 2,5 % como substrato, analisada pelos métodos CD-fenolftaleína e Dextrinizante.

33

Figura 16. Produção de ciclodextrinas pela ação das CGTases bruta e parcialmente purificada, produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3, utilizando amido de mandioca à 2,5 % como substrato, analisada pelos métodos CD-fenolftaleína e Dextrinizante.

34

Figura 17. Produção de ciclodextrinas pela ação das CGTases bruta e parcialmente purificada, produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3, utilizando amido de mandioca à 4,0 % como substrato, analisada pelos métodos CD-fenolftaleína e Dextrinizante.

35

Figura 18. Produção de ciclodextrinas pela ação das CGTases bruta e parcialmente purificada, produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, utilizando amido de mandioca à 2,5 % como substrato, analisada pelos métodos CD-fenolftaleína e Dextrinizante.

36

Figura 19. Produção de ciclodextrinas pela ação das CGTases bruta e parcialmente purificada, produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, utilizando amido de mandioca à 4,0 % como substrato, analisada pelos métodos CD-fenolftaleína e Dextrinizante.

37

LISTA DE TABELAS

| | Páginas |
|---|----------------|
| Tabela 1. Resumo da purificação parcial da CGTase produzida por <i>Paenibacillus campinasensis</i> H69-3 | 26 |
| Tabela 2. Resumo da purificação parcial da CGTase produzida por <i>Bacillus</i> sp subgrupo <i>alcalophilus</i> E16 | 27 |
| Tabela 3. Teor de sólidos e teor de umidade dos hidrolisados pela CGTase de <i>Paenibacillus campinasensis</i> H69-3 bruta e parcialmente purificada | 38 |
| Tabela 4. Teor de sólidos e teor de umidade dos hidrolisados pela CGTase de <i>Bacillus</i> sp subgrupo <i>alcalophilus</i> E16 bruta e parcialmente purificada | 39 |
| Tabela 5. Conversão de ciclodextrinas pela ação da CGTase produzida por <i>Paenibacillus campinasensis</i> H69-3 na produção de CD em amido de milho nas concentrações de 2,5% e 4,0% de substrato | 41 |
| Tabela 6. Conversão de ciclodextrinas pela ação da CGTase produzida por <i>Bacillus</i> sp subgrupo <i>alcalophilus</i> E16 na produção de CD em amido de mandioca nas concentrações de 2,5% e 4,0% de substrato | 41 |

SUMÁRIO

| | Páginas |
|--|----------------|
| RESUMO | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| 1. INTRODUÇÃO | 5 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 2.1 Amido | 5 |
| 2.2 Ciclomaltodextrina glucanotransferase (CGTase) | 7 |
| 2.2.1 Mecanismo de ação | 7 |
| 2.3 Ciclodextrinas | 9 |
| 2.4 Produção de ciclodextrinas. | 11 |
| 2.5 Aplicação das ciclodextrinas | 13 |
| 2.5.1 Indústria de alimentos | 13 |
| 2.5.2 Indústria farmacêutica | 14 |
| 2.5.3 Indústria têxteis | 15 |
| 3.OBJETIVOS | 15 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 15 |
| 4.1 Meios de cultura | 16 |
| 4.1.1 Meio de seleção | 16 |
| 4.1.2 Meio de produção | 16 |

| | |
|--|----|
| 4.1.3 Meio de manutenção | 16 |
| 4.2 Micro-organismos | 16 |
| 4.3 Estudo da produção enzimática dos micro-organismos selecionados | 17 |
| 4.3.1 Pré-inóculo | 17 |
| 4.3.2 Fermentação Submersa e obtenção das enzimas | 17 |
| 4.4 Determinação das atividades enzimáticas | 18 |
| 4.4.1 Atividade CD-fenoltaleína | 18 |
| 4.4.2 Atividade Dextrinizante | 19 |
| 4.5 Determinação de Proteína | 20 |
| 4.6 Pré- purificação do extrato enzimático | 20 |
| 4.6.1 Ultrafiltração | 20 |
| 4.7 Purificação parcial | 20 |
| 4.8 Eletroforese SDS-PAGE | 21 |
| 4.9 Produção de CDs | 21 |
| 4.10 Secagem por Spray Dryer | 22 |
| 4.11 Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) | 23 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 24 |
| 5.1 Purificação parcial das CGTases em estudo | 24 |
| 5.1 a) CGTase produzida por <i>Paenibacillus campinasensis</i> H69-3 | 24 |

| | |
|---|----|
| 5.1 b) CGTase produzida por <i>Bacillus</i> sp subgrupo <i>alcalophilus</i> E16 | 26 |
| 5.2 Perfil de produção de β -CDs pela ação da CGTase bruta produzida por <i>Paenibacillus campinasensis</i> H69-3 na hidrólise de amidos diferentes fontes vegetais | 29 |
| 5.3 Produção de β -CDs pela ação da CGTase bruta produzida por <i>Bacillus</i> sp subgrupo <i>alcalophilus</i> E16 na hidrólise de amidos diferentes fontes vegetais. | 30 |
| 5.4 Produção de β -CDs pela ação da CGTase parcialmente purificada produzida por <i>Bacillus</i> sp subgrupo <i>alcalophilus</i> E16 e por <i>Paenibacillus campinasensis</i> H69-3 na hidrólise de amidos diferentes fontes vegetais | 32 |
| 5.5 Produção de β -CDs pela ação das CGTases bacterianas | 33 |
| 5.5.1. Produção de β -CDs pela ação da CGTase bruta e parcialmente purificada produzida por <i>Paenibacillus campinasensis</i> H69-3 na hidrólise de amido de milho | 34 |
| 5.5.2 Produção de β -CDs pela ação da CGTase bruta e parcialmente purificada produzida por <i>Bacillus</i> sp subgrupo <i>alcalophilus</i> E16 na hidrólise de amido de mandioca | 35 |
| 5.6 Secagem dos hidrolisados por spray dryer | 38 |
| 5.7 Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) | 40 |
| 6. CONCLUSÃO | 42 |
| REFERÊNCIAS | 43 |

RESUMO

A ciclomaltodextrina glucanotransferase (EC 2.4.1.19) é uma enzima capaz de formar ciclodextrinas a partir do amido. As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, os quais os principais tipos são α -, β - e γ -CD, que apresentam 6, 7 e 8 unidades de glicose interligadas por ligações α -1,4. Duas bactérias alcalofílicas *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 e *Paenibacillus campinasensis* H69-3 foram estudadas por apresentarem boa produção de CGTase, ambas foram isoladas de amostras de solo. A atividade enzimática foi estudada utilizando os métodos já pré-determinados em estudos anteriores, como dextrinizante, CD-fenoltaleína e determinação de proteína. Para alcançar a purificação foram utilizados os processos de ultrafiltração e purificação por gel filtração em resina Sephadex G-75. A partir desses processos obteve-se resultados significativos, para o extrato purificado produzido por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, obteve-se um fator de purificação de 35,4 vezes, um rendimento de 34.1 % e atividade específica de 13.10 U/mg, enquanto o extrato purificado de *Paenibacillus campinasensis* H69-3 resultou em um fator de purificação de 94.5 vezes, um rendimento de 33.2 % e a atividade específica de 23.64 U/mg. Foram feitos ensaios quanto a produção de ciclodextrinas utilizando o extrato bruto concentrado da CGTase por ultrafiltração produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3, no perfil de hidrólise de diferentes amidos a 1.0%, a enzima atuou convertendo o amido em β -CD de melhor forma nos amidos de arroz e de mandioca, enquanto que na concentração de 2.5 % a melhor conversão se deu nos amidos de milho e mandioca. Quanto à dextrinização dos amidos, as concentrações de 1.0 % e 2.5 % apresentaram o mesmo perfil de hidrólise, sendo os amidos de mandioca, solúvel e batata apresentaram melhor conversão, quando comparadas aos amidos de arroz e milho. A dextrinização do amido foi mais efetiva na concentração de 1.0%, pois praticamente todo amido havia sido hidrolisado, na concentração de 2.5 %, a hidrólise foi mais lenta, pois em 24 horas os amidos em estudo não foram hidrolisados em sua totalidade. Ensaios com o extrato bruto e parcialmente purificado

foram feitos e a CGTase de *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 teve maior eficiência hidrolisando amido de mandioca e a CGTase de *Paenibacillus campinasensis* H69-3 em amido de milho, para os ensaios de secagem foram utilizadas as concentrações de 2.5% e 4.0% pois o teor de sólidos é um fator importante para a secagem. A caracterização das CDs foi realizada por HPLC com detector de índice de refração, nenhuma das amostras apresentou a presença de α -CD, a CGTase bruta produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 uma proporção α : β : γ para os hidrolizados produzidos de 0:1,0:0,50 e 0:1,0:0,56 nas concentrações de 2.5 % e 4.0 % de amido, respectivamente, para os hidrolizados utilizando CGTase parcialmente purificada a proporção foi de 0:1,0:0,46 para ambas as concentrações de substrato. A proporção α : β : γ para os hidrolizados produzidos pela CGTase bruta de *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, foi de 0:1,0:0,24 e 0:1,0:0,23 nas concentrações de 2.5 % e 4.0 % de amido, respectivamente, enquanto que para os hidrolizados utilizando CGTase parcialmente purificada a proporção foi de 0:1,0:0,26 e 0:1,0:0,28 nas concentrações de 2.5 % e 4.0 % de amido de mandioca, respectivamente.

Palavras-chave: Ciclodextrinas. Bactérias alcalofílicas. Amido. Spray drying.

ABSTRACT

The cyclomalto-dextrin glucanotransferase (EC 2.4.1.19) is an enzyme able to form cyclodextrin from starch . Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides , which are the main types α - , β - and γ - CD which have 6, 7 and 8 glucose units connected by α - 1, 4 bonds. Two bacterial alkalophilic *Bacillus* sp subgroup *alcalophilus* E16 and *Paenibacillus campinasensis* H69 -3 was studied due to their good CGTase production, both of which were isolated from soil samples. The enzymatic activity was studied using the methods already pre-determined in previous studies, as dextrinization, CD-phenolphthalein and protein determination. To achieve the purification and ultrafiltration processes were used for purification gel filtration resin Sephadex G-75. From these processes significant results were obtained for the purified extract produced by *Bacillus* sp subgroup *alcalophilus* E16 gave a purification factor of 35.4 times, a yield of 34.1% and a specific activity of 13.10 U / mg , while the purified extract of *Paenibacillus campinasensis* H69-3 resulted in a purification factor of 94.5 times , a yield of 33.2 % and specific activity of 23.64 U / mg . Tests were made for the production of cyclodextrins using concentrated crude extract by ultrafiltration CGTase produced by *Paenibacillus campinasensis* H69 3, hydrolysis of starches from different profile than 1.0 % , the enzyme acted converting starch into β - CD best in rice starch and tapioca , whereas a concentration of 2.5 % and better conversion is given cassava and corn starch . As for dextrinizing the starch, the concentrations of 1.0% and 2.5% showed the same profile hydrolysis , and cassava starches , potato and soluble showed better conversion, when compared to starches of rice and corn. Dextrinisation of starch was more effective at 1.0% concentration , because practically all starch was hydrolyzed at a concentration of 2.5% was slower hydrolysis , for 24 hours, the starches in the study were not hydrolyzed to a entirety. Tests with crude and partially purified extracts were made and the CGTase from *Bacillus* sp subgroup *alcalophilus* E16 had higher efficiency and cassava starch hydrolyzing CGTase of *Paenibacillus campinasensis* H69-3 corn starch , drying for testing concentrations were used 2.5 % and 4.0 % for the solids content is an important factor for drying . The characterization of the CDs was

performed by HPLC with refractive index detector , none of the samples showed the presence of α -CD , gross CGTase produced by *Paenibacillus campinasensis* H69-3 is a ratio $\alpha:\beta:\gamma$ hydrolysates produced for 0:1,0:0,50 0:1,0:0,56 at concentrations of 2.5% and 4.0% of starch, respectively, for the hydrolysates using partially purified CGTase ratio was 0:1,0 : 0.46 for both substrate concentrations. The ratio to $\alpha:\beta:\gamma$ hydrolysates produced by crude CGTase from *Bacillus* sp subgroup *alcalophilus* E16, was 0:1,0:0,24 and 0:1,0:0,23 at concentrations of 2.5% and starch 4.0%, respectively , whereas for the hydrolysates using partially purified CGTase ratio was 0:1,0:0,26 and 0:1,0:0,28 concentrations of 2.5 % and 4.0 % cassava starch , respectively.

Keywords: Cyclodextrins. Alkalophilic bacteria. Starch . Spray drying.

1. INTRODUÇÃO

A ciclomaltopectina glucoamilase (CGTase, EC 2.4.1.19) é a única enzima capaz de converter amido e substâncias relacionadas em ciclodextrinas (CDs) através de uma reação de transglicosilação intramolecular (ciclização), ela também é responsável por catalisar reações de acoplamento e desproporcionamento (transglicosilação intermolecular). É uma enzima produzida por vários tipos de micro-organismos, como *Thermoanaerobacterium*, *Klebsiella oxytoca* e algumas espécies de *Bacillus*, como *B. macerans*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. firmus*, *B. stearothermophilus* e *B. lentus*. As ciclodextrinas ou cicloamiloses são oligossacarídeos cíclicos contendo seis (α -CD), sete (β -CD), oito (γ -CD) ou mais unidades de glicopirranose unidas por ligações α -(1,4). A molécula de CD tem o formato de cone truncado, cujo interior é hidrofóbico e a superfície hidrofílica, devido apresentarem esta estrutura, as CDs podem formar complexos de inclusão com várias moléculas orgânicas e inorgânicas, resultando na alteração das propriedades físicas, químicas e/ou biológicas da molécula hóspede. As CDs podem ser amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêutica e na agricultura, atuando como agentes estabilizantes de substâncias voláteis e/ou instáveis, emulsificantes, antioxidantes, na solubilização de compostos insolúveis em água, em sistemas de liberação controlada de drogas, na imobilização de enzimas e compostos tóxicos. Vários tipos de amidos podem ser utilizados como substrato para a CGTase, incluindo amido de milho, batata e mandioca e arroz.

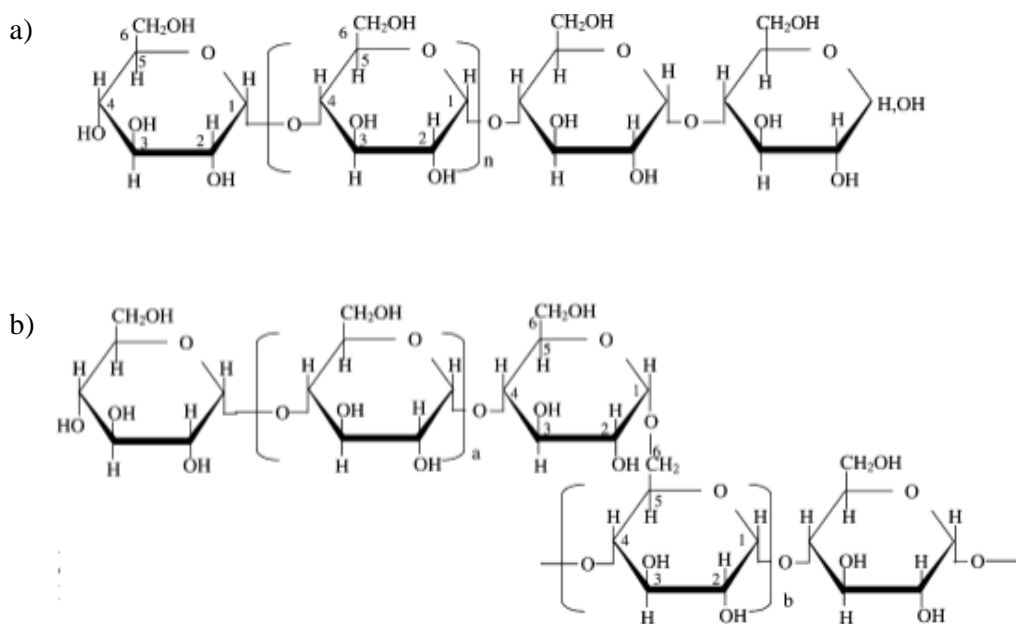
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Amido

O amido é uma substância de reserva das plantas verdes superiores encontrado em sementes, raízes e tubérculos. É um dos compostos orgânicos mais abundantes do mundo depois da celulose. Os amidos em sua maioria são compostos por dois tipos de polissacarídeos, a

amilose e a amilopectina (ROBYT, 1998). A amilose é constituída de unidades de glicose unidas entre si por ligações do tipo α -1,4 de forma linear. A amilopectina é formada de cadeias curtas de amilose, ligadas entre si, formando uma estrutura ramificada, devido a ligações do tipo α -1,6 existentes ao longo da cadeia principal a intervalos de 18 a 28 unidades de glicose (TESTER et al. 2004).

Figura 1 Estrutura da amilose (a) e da amilopectina (b) (Tester et al. 2004)



Inicialmente, o amido era degradado utilizando-se ácidos minerais, mas a aplicação biotecnológica de biocatalisadores em processos químicos conduziu ao uso das enzimas, em substituição às substâncias químicas, na produção de uma variedade de produtos à base de glicose. Entre as enzimas que atuam no amido, a ciclodextrina glucanotransferase (CGTase) vem ganhando grande importância industrial, por converter o amido e formar ciclodextrinas (CDs) como produto final (BENDER, 1986).

As CDs tem sido estudadas há aproximadamente um século e sua habilidade de formar complexos de inclusão foi reconhecida há aproximadamente 40 anos. Elas são moléculas cíclicas formadas por unidades de glicose unidas por ligações α -1,4-glicosídicas, as CDs mais

conhecidas são do tipo α -, β - e γ -CD, consistindo de seis, sete e oito unidades de glicose, respectivamente.

2.2 Ciclodextrina glucanotransferase (CGTase, EC 2.4.1.19)

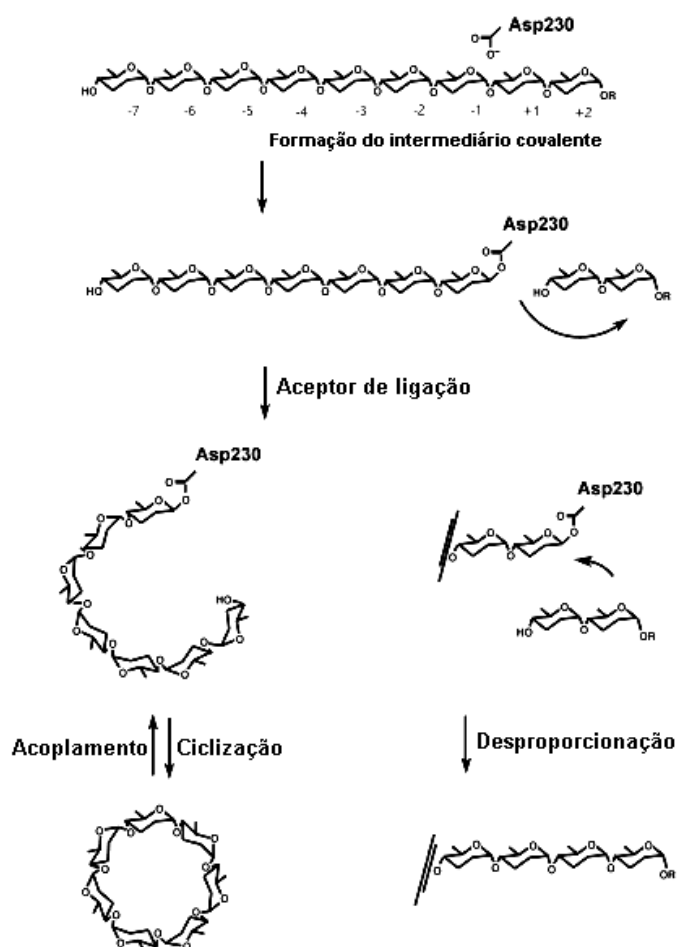
2.2.1 Mecanismo de ação

A ciclodextrina glucanotransferase (CGTase) (EC. 2.4.1.19) é uma enzima capaz de converter o amido em ciclodextrinas. Esta enzima é responsável por catalisar três reações: uma de ação hidrolítica e as transglicosilações inter e intramoleculares da α -1,4 glucana. A produção de ciclodextrinas ocorre a partir do processo de ciclização ou transglicosilação intramolecular, utilizando o amido como principal substrato. Na reação, a extremidade não redutora atua como receptor para a extremidade redutora (Figura 2). A reação de acoplamento, conhecida como transglicosilação intermolecular, consiste na abertura do anel da CD com transferência de maltooligosacarídeos produzidos para moléculas receptoras, reação esta que ocorre na presença de CDs e co-substratos promovendo uma competição entre eles (Figura 2) (BENDER, 1986). Outra reação é a de desproporcionalização, que ocorre quando o substrato apresentar um peso molecular inferior a seis unidades de glicose e superior à maltose, a CGTase é capaz de sintetizar oligômeros de maior peso molecular até superior a seis unidades de glicose.

O mecanismo catalítico para a CGTase é composto de um número de subsítios de ligação de açúcar, resultante da cadeia de aminoácidos localizada entre os *loops* das fitas β e α -hélice do domínio catalítico. Cada um desses subsítios interage com uma unidade de glicose proveniente do substrato, por ligações de hidrogênio com grupos OH da glicose ou por interações hidrofóbicas (LEEMHUIS et al 2003). De acordo com sua localização os subsítios podem ser (i) doador (-1, -2,...) determinando o comprimento da cadeia de açúcar do intermediário covalente ou (ii) receptor (+1, +2,...) determinando qual será a molécula receptora. Assim, a clivagem da cadeia de açúcar ocorre entre os subsítios +1 e -1. O número e constituição dos subsítios são também responsáveis pelas diferenças na especificidade ao produto da enzima e tem sido usado

como ferramenta para mudanças na especificidade ao produtor em proteínas engenheiradas (VAN DER VEEN et al, 2000; LEEMHUIS et al, 2003). Na figura 2 têm-se uma representação esquemática das reações catalisadas pela enzima CGTase.

Figura 2. Representação esquemática das reações de transglicosilação catalisadas pela CGTase. No primeiro passo da reação, um Asp é ligado covalentemente, no sítio de clivagem, formando um oligossacarídeo intermediário. Em um segundo passo, esse oligossacarídeo é transferido para uma molécula receptora.



Fonte modificada: LEEMHUIS et al. 2003.

Vários micro-organismos cujas características enzimáticas são conhecidas foram catalogados como produtores de CGTase. A maioria das espécies bacterianas produtoras de

CGTase pertencem ao gênero *Bacillus*, entre eles *Bacillus cereus* (JAMUNA et al. 1993), *Bacillus circulans* (PONGSAWASDI e YAGISAWA, 1987; PINTO et al. 2007; SALVA et al. 1997), *Bacillus* sp (ALVES-PRADO et al. 2002; MENOCI et al. 2008; ATANASOVA et al. 2008), *Bacillus macerans* (TILDEN et al. 1942; SHIRAISHI et al. 1989), *Bacillus stearothermophilus* linhagens 2/2, R2 e HR1 (FUJIWARA et al. 1992), *Bacillus alkalophilic* (MORIWAKI et al. 2014; ATANASOVA et al, 2008), *Bacillus licheniformis* (BONILHA et al. 2006), *Bacillus lentus* (SABIONI e PARK, 1992), *Bacillus firmus* (GAWANDE et al. 1999; MORIWAKI et al. 2007), *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 (ALVES-PRADO, 2000) *Bacillus* sp G1 (SIAN et al. 2005) e *Bacillus sphaericus* (MORIWAKI et al. 2009), *Paenibacillus campinasensis* (ALVES-PRADO et al, 2006), *Klebsiella pneumoniae* (BENDER, 1977), *Klebsiella oxytoca* (LEE et al. 1992); bactérias anaeróbias termofílicas *Thermoanaerobacter* sp (STARNES, 1990) e actinomicetos como *Thermoactinomyces* sp (ABELYAN et al. 1995). Até o presente momento, nenhum fungo ou levedura foram descritos como produtores de CGTase.

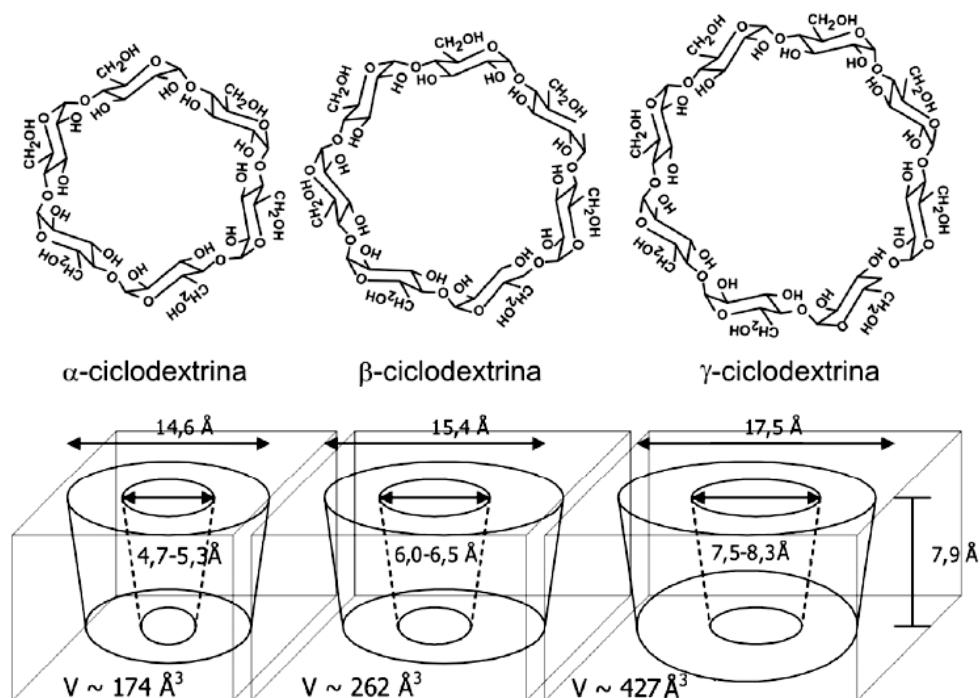
2.3 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos que contém unidades de D-glicopiranosose unidas por ligações α -1,4, devido à ação da enzima ciclodextrina glucanotransferase utilizando o amido como principal substrato. As principais e mais comuns ciclodextrinas são aquelas compostas de seis (α -CD), sete (β -CD) e oito (γ -CD) unidades de D-glicose unidas por ligações α -1,4 conforme a Figura 3 (VENTURINI et al. 2008).

A principal característica da CD é sua forma circular, proveniente da conformação C1 da unidade de D-glicose e suas ligações glicosídicas. A aparência ovalada da molécula, semelhante a um cone truncado (Figura 3), tem uma parte com o aspecto distendido formada pelas hidroxilas secundárias OH(2) e OH(3) e uma parte mais fechada, onde está a hidroxila primária OH(6), conferindo à molécula, uma hidrofília externa. A cavidade da CD é hidrofóbica porque está alinhada pelos grupos C-H e interligada pelos oxigênios O(4) e O(5). Os complexos de inclusões

(encapsulação molecular) formados permanecem em soluções aquosas, permitindo assim, a investigação de substâncias hidrofóbicas, importantes para os sistemas biológicos (BENDER, 1986; VENTURINI et al. 2008).

Figura 3. Representação estrutural das principais ciclodextrinas.



Fonte: VENTURINI et al., 2008

As ciclodextrinas apresentam a habilidade de formar complexos de inclusão com diferentes tipos de compostos, ou seja, tem a capacidade de abrigar em sua cavidade várias moléculas externas. Para que isso ocorra, a molécula hospedeira deve se adequar dentro da cavidade da ciclodextrina, na ausência da molécula hóspede, a cavidade menos hidrofílica é ocupada por moléculas de água (MATIOLI et al. 2000). Os complexos de inclusão podem ser formados pelas CDs e corantes do tipo vermelho congo, cristal violeta, azul de metileno, entre outros e ligantes orgânicos contendo íons metálicos complexados.

Essa capacidade de incorporar compostos no interior da sua cavidade hidrofóbica, ocorre devido a presença das ligações envolvidas na formação dos complexos são força de van der Waals, interações dipolo-dipolo e/ou pontes de hidrogênio, esse fenômeno foi denominado de

"encapsulação molecular" e recebeu atenção porque podia melhorar as características de solubilidade e estabilidade da molécula encapsulada. Essas ligações são fortes o suficiente para permitir a separação do complexo mesmo em estado sólido e fraco o suficiente para permitir a liberação da molécula encapsulada, quando necessário (BENDER, 1986; VENTURINI et al. 2008).

As CDs passaram a ser aplicadas nas indústrias alimentícias a partir da década de 70 (PSZCZOLA, 1988). Em 2000, os setores absorviam a produção de CDs eram as indústrias de alimentos e de cosméticos as quais consumiam aproximadamente 84% da produção mundial de CDs (ALVES-PRADO et al. 2000). As CDs foram aprovadas como aditivos específicos na Bélgica, França, Alemanha, Itália, Holanda, Luxemburgo e Espanha. Nos U.S.A, as ciclodextrinas são produzidas comercialmente pela Americam Maize-Products. Nas indústrias farmacêuticas as CDs tem sido utilizadas como encapsulante de princípio ativo em medicamentos, melhorar a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade das moléculas bioativas , elas tem alta biocompatibilidade e são aprovados pela FDA (Food and Drug Administration), não causando toxicidade ao organismo (PINHO et al. 2014).

2.4 Produção de ciclodextrinas

Atualmente, tem-se tido um maior interesse em novas técnicas ou o aperfeiçoamento das já existentes para a produção de CDs, visando o aumento da produção, tendo em vista a importância da comercialização de produtos empregando as CDs no mercado. Sendo assim, a melhora na produção de CDs, ainda têm sido o objetivo de muitos pesquisadores em todo o mundo.

A CGTase produzida por *Bacillus autolyticus* 11149 apresentou melhoras na produção de β -CD quando adicionou 4% (p/v) de triton X-100 à solução de amido de batata 10% (p/v) onde obtiveram 56% de conversão. A produção de α - e γ -CDs foi muito baixa, sendo menor que 1% (TOMITA et al. 1993).

MORI et al (1994) estudaram a produção de CDs a partir da CGTase produzida por *Brevibacterium* sp nº 9605, em diferentes tipos de substrato e obtiveram melhores rendimentos com amido de milho waxy Lintener's solúvel com 36,1% de conversão em % de $\alpha:\beta:\gamma$ igual a 1,1:14,7:20,3; e com amilopectina (milho) obtendo 35,4% de conversão em % de $\alpha:\beta:\gamma$ igual a 0,9:13,7:20,8. MORI et al (1995) estudando a mesma CGTase observaram que a produção de CD foi variável com as condições de reação como temperatura, pH, presença ou ausência de CaCl_2 e concentração de etanol. Em solução de amido solúvel 1% (p/v) a 50°C, pH 7,0, com 5mM de CaCl_2 houve conversão de 38,7% em CDs com % de $\alpha:\beta:\gamma$ igual a 1,8:13,3:23,6.

MARÉCHAL et al (1996) observaram que em solução de amido solúvel 5% (p/v) a conversão foi de 36% em $\alpha:\beta:\gamma$ -CDs na proporção de 1:0,9:04, utilizando a CGTase produzida por *Bacillus circulans* DF 9 tipo R.

RENDLEMAN JR. (1997) observou melhoras significativas no rendimento de α -, β - e γ -CD utilizando a CGTase de *Bacillus macerans* associada a complexantes específicos e a enzima desramificante.

YAMAMOTO et al (2000) observaram que grânulos intactos de amido de batata foram degradados pela ação da CGTase produzida por *Bacillus macerans*. Os autores estudaram ainda, os efeitos de pH, temperatura, concentração de substrato e quantidade de enzima para determinar as melhores condições para a produção de CDs.

PISHTIYSKI e ZHEKOVA (2006) estudaram o *Bacillus megaterium* que produziu ciclodextrinas em vários tipos de substratos como amidos, dextrinas, amilose e amilopectina. Os amidos apresentaram-se como as melhores fontes para a conversão em ciclodextrinas, e dentre os amidos testados, o amido de milho foi o que apresentou o melhor rendimento, apresentando produção de 50,9% de ciclodextrinas.

MATIOLI et al. (2009) observou que *Bacillus firmus* cepa 7B apresentou o melhor desempenho, resultando numa produção maior de β -CD para todas as fontes de amido, sendo o amido de milho o substrato de melhor rendimento.

Em outro estudo, ZHEKOVA et al. (2009) obtiveram preferencialmente β -CD, a partir da hidrólise com CGTase produzida por *Bacillus megaterium*, o produto de ciclodextrinas isolado continha 75-79 % de β -ciclodextrina e 4,0 % e 6,0 % de α -ciclodextrina e γ -ciclodextrina, respectivamente.

2.5 Aplicação das ciclodextrinas

Devido a seu grande potencial, as ciclodextrinas tem a capacidade de fazer encapsulação molecular com uma variedade de compostos sólidos, líquidos e gasosos. A capacidade de formar complexos de inclusão favorece a aplicação das ciclodextrinas em diversas indústrias de alimentos, químicas, farmacêuticas e cosméticas. O fenômeno de encapsulação molecular pode modificar as propriedades físicas e/ou químicas das substâncias complexadas. Tais modificações incluem estabilização frente à luz, radiação UV, temperatura, oxidação, hidrólise (cor e aromas em alimentos; princípio ativo em fármacos e agroquímicos, emulsões em cosméticos e alimentos), aumento da solubilidade em água, substituição de solventes orgânicos, mudanças de propriedades reológicas (princípios ativos em fármacos e agroquímicos, corantes têxteis), liberação controlada dos ingredientes ativos, mascarar odores e gostos desagradáveis, aumento da biodisponibilidade, extração seletiva, redução da volatilidade (ALVES-PRADO, 2000)

2.5.1 Indústria de alimentos

Flavours desempenham um papel importante na aceitação do consumidor no consumo de alimentos. Processos de fabricação, armazenamento e os ingredientes dos alimentos muitas vezes causam modificações no sabor, reduzindo a intensidade composto aromático ou produzindo componentes não desejáveis, os chamados “off-flavours” (LUBBERS et al. 1998). Para reduzir a degradação ou perda do aroma durante o processamento e/ou armazenamento, tem sido utilizado a encapsulação de ingredientes voláteis com as CDs antes da utilização dos mesmos em alimentos e bebidas. A adição de β - CD como estabilizador ou agentes de espessamento pode reter alguns compostos de aroma em matrizes alimentares durante processos térmicos como

cozimento e pasteurização. Na indústria de alimentos as CDs têm sido aplicadas para melhorar a retenção de sabor em alimentos processados termicamente, para melhorar a cor e/ou aroma de diferentes sucos de frutas (ASTRAY et al. 2009), ou em embalagens de alimentos para manter os compostos indesejáveis (LÓPEZ-DE-DICASTILLO et al. 2010). Também têm-se aplicado na microencapsulação de óleos essenciais com β -CD na gastronomia para melhorar as propriedades sensoriais de alimentos (GARCÍA-SEGOVIA et al. 2011). Em estudos de observou que utilizando α -ciclodextrina como suplementação pelo período de dois meses, sem mudança na alimentação, levou à perda significativa de peso em indivíduos não-obesos, uma vez que o complexo α -ciclodextrina em gordura não é acessível para a flora intestinal humana e é comumente excretados nas fezes, não ocasionando efeitos colaterais gastrointestinais associados à produtos para perda de peso que causam má absorção de gordura (COMERFORD et al. 2011).

2.5.2 Indústria farmacêutica

Na indústria farmacêutica, as CDs são utilizadas como veículos de fármacos para melhorar a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade das moléculas bioativas. Em adição à melhoria da solubilização, CDs protegem as moléculas bioativas de efeitos secundários em relação às condições ambientais (temperatura, pH, luz) e, conseqüentemente, aumentam a sua vida de prateleira e reduzem as concentrações do agente necessária para alcançar um efeito biológico.

As CDs podem aumentar a biodisponibilidade de drogas insolúveis, aumentando a solubilidade da droga, elas também aumentam a permeabilidade de fármacos hidrofóbicos insolúveis, tornando o medicamento disponível para a superfície da barreira biológica por exemplo, pele e mucosa, nesses casos, é importante o uso de CDs suficiente para solubilizar o fármaco no veículo aquoso uma vez que seu excesso pode diminuir a disponibilidade da droga (VADHANAM et al, 2013).

2.5.3 Indústria têxtil

A principal razão por poucas aplicações práticas na indústria têxtil é o custo relativamente alto das CDs, porém durante os últimos anos os preços de produção caíram e novas aplicações se tornaram possíveis. A introdução de novos auxiliares na indústria têxtil é viável quando eles são usados em baixas concentrações, são biodegradáveis e não prejudicam a qualidade do efluente. Além de serem biodegradáveis, não ocasionando problemas nos efluentes têxteis, as CDs melhoram a biodegradabilidade de muitas substâncias orgânicas tóxicas.

O derivado β -CD-monoclorotriazinil (MCT), apresenta na sua estrutura um grupo reativo que é capaz de formar ligações covalentes com grupos nucleofílicos como as hidroxilas das fibras celulósicas, podendo ser aplicado nos processos de tingimento (ALVES-PRADO, 2000). Esse derivado tem baixa afinidade pelas fibras celulósicas, sendo impossível a sua aplicação em altas temperaturas, como é feito no tingimento utilizando corantes reativos, nesta situação o grupo reativo da ciclodextrina irá reagir com a água e não com a fibra têxtil (ANDREAUS et al., 2010).

3. OBJETIVOS

Este estudo é uma proposta de continuidade de trabalho anterior no qual a CGTase produzida pelo *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 e *Paenibacillus campinasensis* H69-3 foi estudada e caracterizada. No presente projeto, o objetivo é produzir a CD a partir das respectivas CGTases em diferentes tipos de amidos, em seguida aplicar o processo de secagem por pulverização e obtê-la na forma de um formulado em pó adequado, para posteriormente, aplicar como encapsulante.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Meios de cultura

4.1.1 Meio de seleção

O meio utilizado para a seleção de micro-organismos produtores de CGTase foi o meio de cultura alcalofílico descrito por PARK et al (1989), composto de 10,0 g/L de amido solúvel; 5,0 g/L de peptona; 5,0 g/L de extrato de levedura; 1,0 g/L de K_2HPO_4 ; 0,2 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 10,0 g/L de Na_2CO_3 *; 0,03 g/L de fenolftaleína; 0,1 g/L de alaranjado de metila; 15,0 g/L de ágar; pH 10,0. (*) Esterilizado separadamente e adicionado ao meio após atingir a temperatura de 60°C.

4.1.2 Meio de produção

O meio utilizado para a produção de CGTase foi o meio nutriente alcalino descrito por NAKAMURA e HORIKOSHI (1976) e otimizado por (ALVES-PRADO, 2000): 1,35% de amido solúvel; 0,49% de peptona; 0,59% de extrato de levedura; 0,1% de K_2HPO_4 ; 1,25% de Na_2CO_3 (*) pH 10,0. (*) Esterizado separadamente e adicionado ao meio após atingir a temperatura de 60°C.

4.1.3 Meio de manutenção

O meio de manutenção utilizado foi o mesmo que o meio de produção, acrescido de 20,0 g/L de ágar.

4.2 Micro-organismos

As duas linhagens bacterianas *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 e *Paenibacillus campinasensis* H69-3, foram isoladas em estudos anteriores e mantidas na coleção de trabalho do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, UNESP-IBILCE, Campus de São José do Rio Preto. Os estoques foram armazenados em meio alcalino em tubo inclinado a 4 °C e em 20% de glicerol a -80 °C.

As linhagens foram repicadas em meio seletivo (PONGSAWASDI e YAGISAWA, 1987), quanto a produção de halo característico para CGTase. As colônias positivas para CGTase foram mantidas em meio alcalino (NAKAMURA e HORIKOSHI, 1976) inclinado para os estudos subsequentes.

4.3 Estudo da produção enzimática dos micro-organismos selecionados

4.3.1 Pré inóculo

O pré inóculo foi preparado com 20 mL de meio de produção, para o qual foi transferido, com o auxílio de uma alça de inoculação toda a massa celular de um tubo de ensaio. A fermentação foi feita em Erlenmeyer de 125 mL, com agitação de 150 rpm, a 35 °C para o *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 e a 45 °C para o *Paenibacillus campinasensis* H69-3, por 24 horas.

4.3.2 Fermentação submersa e obtenção das enzimas

Para a obtenção das CGTases bacterianas foi utilizado o processo de fermentação submersa para as duas linhagens bacterianas *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, *Paenibacillus campinasensis* H69-3. A linhagem *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, foi previamente cultivada em meio nutriente alcalino otimizado (ALVES-PRADO, 2007a) 1,35% de amido solúvel; 0,49% de peptona; 0,59% de extrato de levedura; 0,1% de K_2HPO_4 ; 1,25% de Na_2CO_3 (adicionado separadamente após resfriamento); pH 10,10. A linhagem *Paenibacillus campinasensis* H69-3 foi cultivada em meio alcalino contendo 0,5% de Na_2CO_3 , baseando-se em estudos de ALVES-PRADO et al. (2007b). O material inoculado foi incubado em BOD Shaker a 35 °C para *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 e a 45 °C para quando de *Paenibacillus campinasensis* H69-3, por 72 horas e agitação a 150 oscilações por minuto. O material oriundo do crescimento bacteriano foi centrifugado a 10.000xg, por 10 minutos, sob refrigeração a 5 °C e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta.

4.4 Determinação das atividades enzimáticas

4.4.1 Atividade CD-fenolftaleína

O ensaio de atividade CD-fenolftaleína adotado foi baseado no modificado por ALVES-PRADO et al, 2007, no qual 0,1 mL de solução enzimática diluída foi adicionada 0,8 mL de solução de amido solúvel a 1,0%, em tampão acetato 0,1 M, pH 5,6. Após incubação a 55 °C, por 10 minutos, a reação foi paralisada com a adição de 4,0 mL de solução de Na₂CO₃, 0,25 M. Em seguida, foi acrescentado 0,1 mL de solução de fenolftaleína a 1 mM. O controle recebeu a solução enzimática apenas no momento da leitura. A absorbância foi determinada em 550 nm.

A unidade de atividade foi definida a partir de uma curva padrão linear de concentração de β-CD (μmol), na presença de fenolftaleína, em função da absorbância, da qual resultou na seguinte equação:

$$Y = 0,0183x + 0,1654$$

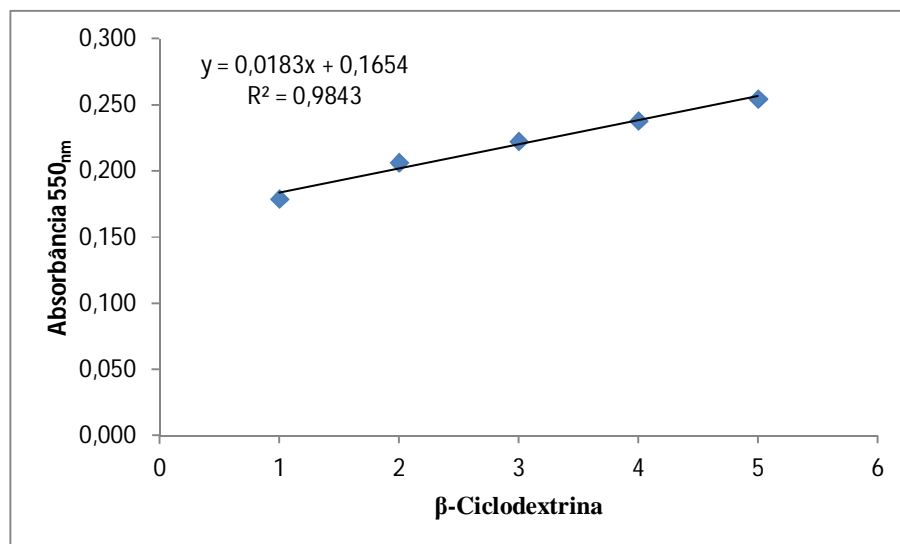
Onde: y = absorbância da amostra *

X = μmol de β-CD

*Absorbância da amostra = (Abs. do controle – Abs. da mistura de reação)

Uma unidade de atividade enzimática fenolftaleína, foi definida como a quantidade de enzima, necessária para produzir 1 μmol de β-ciclodextrina, por minuto e por mL de solução enzimática.

Figura 4. Curva padrão para o método CD-fenolftaleína



4.4.2 Atividade Dextrinizante

No ensaio de atividade dextrinizante proposto por FUWA (1954) e PONSASWADI e YAGISAWA (1987) com algumas modificações, a mistura da reação foi composta por 0,1 mL da solução enzimática, convenientemente diluída, foi adicionado a 0,3 mL de solução de amido solúvel a 0,5%, em tampão acetato 0,1 M, pH 5,6. Após incubação a 55 °C, por 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 4,0 mL de solução de HCl 0,2 M. Em seguida, a reação recebeu 0,5mL de reativo de Iodo (0,30% de KI e 0,03% de I₂). A mistura de reação foi diluída com 10 mL de água destilada. O controle foi preparado conforme o processo descrito, substituindo-se a enzima pelo volume equivalente de enzima inativa. A absorbância foi determinada a 700 nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para reduzir em 10% a intensidade da cor azul do complexo Iodo-Amido por minuto e calculada segundo a equação:

$$U \text{ (m/L)} = [(C - \text{Abs}) / C] \times 100 / 10 \times fd$$

Onde: U = unidade de atividade;

C = controle;

Abs = absorbância da amostra;

fd = fator de diluição.

4.5 Determinação de proteína

A proteína total foi determinada pelo método de Hartree-Lowry, usando soro albumina bovina como padrão (HARTREE, 1972).

4.6 Pré-purificação do extrato enzimático

4.6.1 Ultrafiltração

A fim de se obter um extrato concentrado e sem a presença de interferentes, além de eliminar possíveis interferentes e inibidores da atividade enzimática ou que possam atrapalhar o processo de purificação parcial, o extrato bruto foi concentrado pelo processo de ultrafiltração, utilizando o sistema QuixStand™ Benchtop da Amersham Bioscience com membrana miliporosa de 10kDa, utilizando uma unidade de ultrafiltração com uma pressão de 15psi. O extrato foi concentrado cerca de 10 vezes (v:v), seguido de medida de atividade enzimática.

4.7 Purificação parcial da CGTase bruta

Para a purificação parcial da enzima produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 e por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 foram utilizados alguns métodos já estudados para purificação dessas enzimas. O extrato enzimático concentrado foi submetido à cromatografia de gel filtração em resina Sephadex G-75, pré-equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) contendo NaCl 20 mM. Foram utilizados 600 mL de resina Sephadex G-75 em uma coluna com tamanho de 100 cm X 2,5 cm.

Foram aplicados 10 mL da amostra, que foi carregada pelo tampão a um fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, e foram coletados frações de 4 mL usando coletor de fração (BIO-RAD model 2110 Fraction Collector). A CGTase parcialmente purificada foi analisada através da atividade enzimática (atividade CD-fenolftaleína e atividade dextrinizante) e em gel de eletroforese para a confirmação do processo de purificação da enzima (ALVES-PRADO et al, 2007).

4.8 Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese SDS-PAGE foi realizada utilizando um gel de poliacrilamida a 10% com 10% de SDS (dodecil sulfato de sódio). Um kit (SIGMA) padrão de baixa massa molar de proteínas foi utilizado contendo Miosina (220 kDa), β -galactosidase (116 kDa), Fosforilase b (97 kDa), Albumina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anidrase Carbônica (31 kDa), Inibidor de Tripsina (21 kDa), Lisozima (14.4 kDa) e Aprotinina (6.5 kDa). Para detecção de outras proteínas foi utilizada solução corante de prata.

4.9 Produção das CDs

Foram realizados ensaios quanto à produção de CDs, para analisar o desempenho das soluções enzimáticas brutas concentradas e das soluções parcialmente purificadas, quanto a produção de ciclodextrinas. Aplicou-se a solução enzimática bruta de CGTases concentradas por ultrafiltração. Foram realizados ensaios com a CGTase produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 e *Paenibacillus campinasensis* H69-3, utilizando amidos de diferentes fontes vegetais como amido de mandioca, amido de batata, amido de milho, amido de arroz, o amido solúvel foi utilizado como padrão. As concentrações dos diferentes tipos de amido utilizadas foram a 1,0 % e 2,5 % baseando-se na metodologia descrita por Alves-Prado et al. (2008), com algumas modificações.

Os amidos de batata e mandioca foram obtidos por extração manual, o amido de arroz foi obtido no mercado local, sendo utilizado o de nome comercial Arrozina, da marca Maisena; o amido de milho foi adquirido no comércio local, utilizando o da marca Maisena e o amido solúvel (Mallinckrodt). As soluções de amido para hidrólise foram preparadas em tampão acetato, 100 mM, pH 5,5, e gelatinizados por aquecimento em micro-ondas nas concentrações de 1,0 % e 2,5 %. Quinhentos microlitros ($82,0 \text{ U mL}^{-1}$, método dextrinizante) da CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 e quinhentos microlitros ($75,0 \text{ U mL}^{-1}$, método dextrinizante) da CGTase produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 foram adicionados em 100 mL de cada substrato gelatinizado, e estes foram incubados em shaker sob agitação a 120 ciclos por minuto a 55 °C por 24 horas. Alíquotas das amostras em tempos

determinados foram transferidas para tubos de eppendorf em duplicata, fechados e submetidos ao congelamento. As demais amostras foram submetidas a análises de determinação enzimática de atividade dextrinizante e atividade CD-fenoltaleína.

Após ensaios de hidrólise em amidos de diferentes fontes vegetais, foram selecionados os amidos que seriam utilizados nos ensaios posteriores, com base na melhor conversão em ciclodextrinas.

4.10 Secagem por Spray Dryer

Para a secagem da suspensão de amido hidrolisado foram escolhidas amostras contendo os amidos que apresentaram maior conversão em ciclodextrina, determinada pelos métodos CD-fenoltaleína e dextrinização durante a hidrólise pela ação da CGTase bruta e da CGTase parcialmente purificada. O processo de secagem foi realizado utilizando hidrolisados contendo 2,5 % e 4,0 % de amido de milho e amido de mandioca. O equipamento utilizado foi o mini Spray Dryer - Labmaq modelo MSD 0,5, no Laboratório de Engenharia de Processos e Biorreatores da UNESP-Campus de São José do Rio Preto. As condições adotadas para o funcionamento do *spray dryer* foi uma vazão de alimentação da solução de amido hidrolisado de $12,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de entrada do gás de secagem de 100°C e a temperatura de saída de 191°C . A suspensão de amido hidrolisado foi introduzida no equipamento com o auxílio de uma bomba peristáltica e entrou no bico atomizador de duplo fluido, juntamente com ar comprimido a $4 \text{ kgf (cm}^2\text{)}^{-1}$, pressão normalmente aplicada nesse tipo de sistema.

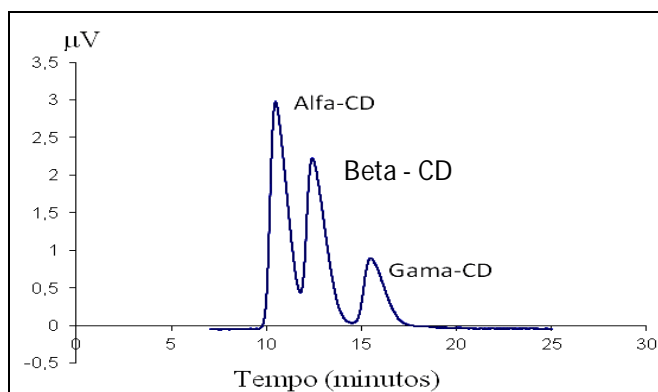
Após o processo de secagem foi determinado o teor de umidade de cada pó obtido. O desempenho do processo de secagem, assim como as propriedades do pó obtido foram avaliados de acordo com a taxa de recuperação do produto (Cromatografia Líquida de Alta Performance - HPLC), da umidade e da morfologia das amostras secas. O pó obtido da secagem foi armazenado em tubos Falcon e embalados em papel filme e colocados sobre refrigeração, pequenas amostras do pó foram retiradas e armazenadas em tubos de eppendorf para a análises posteriores.

4.11 Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

A concentração de α -CD, β -CD e γ -CD produzidas pela ação da CGTases bruta e pela CGTase parcialmente purificada foram determinadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). O sistema de HPLC consiste em uma bomba Jasco PU 990 (Jasco, Japan) conectado a um detector de índice de refração Shodex RI 72, e uma coluna Zorbax-NH₂ (250X4,6 mm, 5 μ m, Agilent, Technologies), instalada em um forno Dionex STH 585 (Dionex Softron GmbH, Alemanha) a 60 °C. Foi utilizada uma mistura de acetonitrila e água (60:30 v/v) como fase móvel com fluxo de 0,8 mL min⁻¹ de acordo com trabalhos de SATO et al, (1985) e ALVES-PRADO et al, (2008) com algumas modificações. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Os padrões e as amostras foram filtrados em membrana de 0,45 μ m. As curvas analíticas para α -CD, β -CD e γ -CD foram construídas utilizando diferentes faixas de concentração. Para a α - e β -CD os valores variaram de 0,25 a 6 mg mL⁻¹ e para a γ -CD de 0,25 a 4 mg mL⁻¹. A dosagem cromatográfica de α CD, β -CD e γ -CD por HPLC apresentou curvas analíticas cujas equações, coeficiente de correlação. Na Figura 5, observa-se o cromatograma da solução padrão de α -CD, β -CD e γ -CD.

Figura 5. Cromatograma com a eluição dos padrões de CDs.



Fonte: próprio autor

Para a determinação da concentração de α -CD:

$$C_{\alpha\text{-CD}} = \frac{(\text{Area do pico} + 0,1904)}{1,5302} \quad r^2 = 0,998$$

Para a determinação da concentração de β -CD:

$$C_{\beta\text{-CD}} = \frac{(\text{Area do pico} + 0,3002)}{1,3397} \quad r^2 = 0,994$$

Para a determinação da concentração de γ -CD:

$$C_{\gamma\text{-CD}} = \frac{(\text{Area do pico} + 0,011882)}{0,819682} \quad r^2 = 0,999$$

A porcentagem de amido convertido em CDs foi calculada em relação ao total de gramas de CDs formadas dividido por gramas de amido multiplicado por 100.

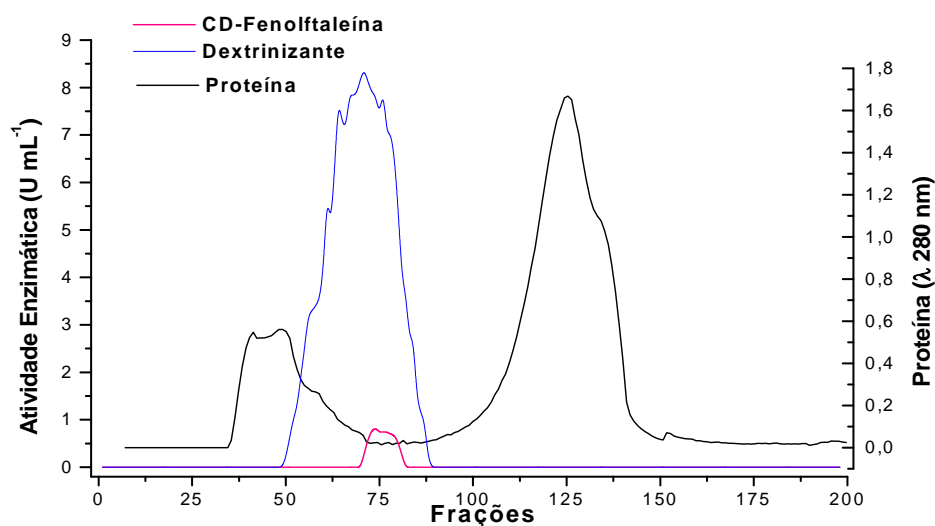
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Purificação parcial das CGTases em estudo

a) CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3

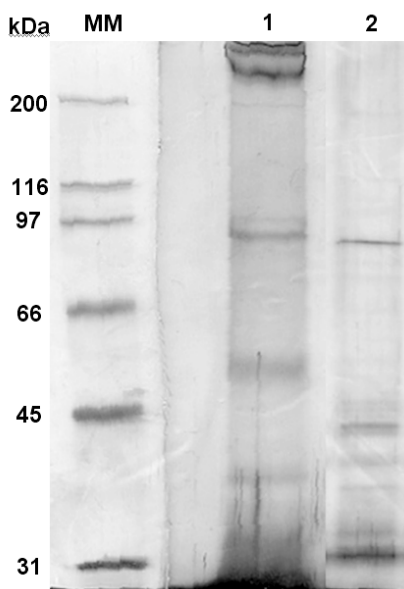
Foi utilizado a solução enzimática bruta produzida pela linhagem bacteriana *Paenibacillus campinasensis* H69-3 para os ensaios de purificação da CGTase. Foram adotados procedimentos de ultrafiltração para concentração da CGTase e cromatografia em gel filtração. A Figura 6 ilustra o perfil de eluição de proteínas obtido para o processo cromatográfico adotado, bem como para as atividades enzimáticas para CGTase.

Figura 6. Perfil de eluição da cromatografia de gel filtração em resina Sephadex G-75, para purificação parcial da CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3.



Fonte: próprio autor

Figura 7. Eletroforese em gel de poliácridamida da junção de frações resultantes da purificação parcial da CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3. MM: marcador de massa molecular; 1: Extrato bruto; 2: Extrato parcialmente purificado.



Fonte: próprio autor

As frações com atividade foram unidas em uma única fração, na qual obteve-se os dados de purificação total. O grau de purificação foi avaliado pela eletroforese em gel de poliacrilamida, revelado com método de coloração em prata (Figura 7). Os dados referentes ao resumo dos ensaios cromatográficos estão disponibilizados na Tabela 1. O fator de purificação está em 94,5 vezes e o rendimento de 33,2 %. Posteriormente, foi realizada a concentração dessa CGTase por liofilização e diálise, para a aplicação nos processos de hidrólise. O fator de purificação obtido foi 1.698,4 vezes e um rendimento de 90,26 %.

Tabela 1. Resumo da purificação parcial da CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3.

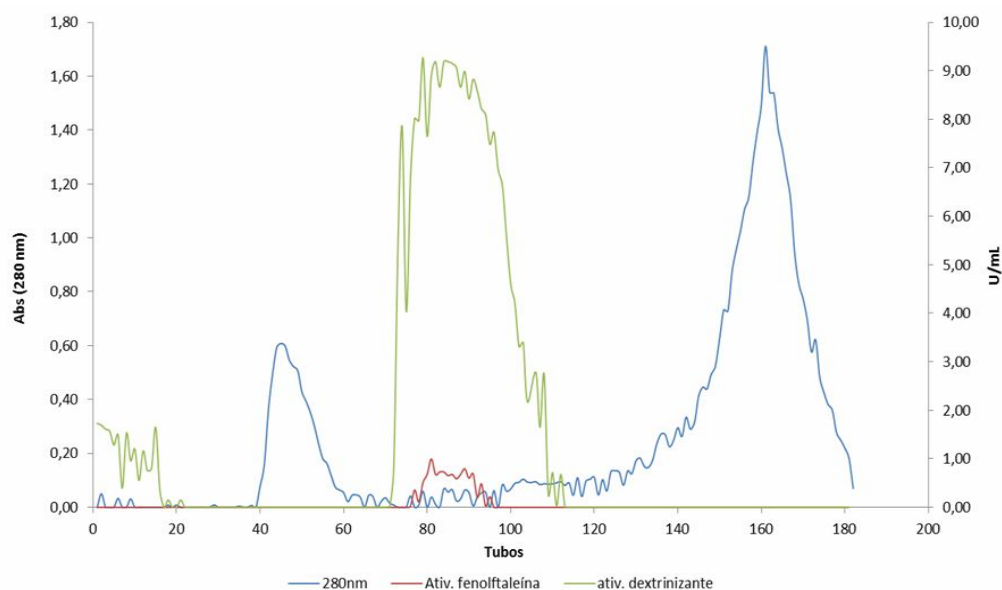
| Etapas | Volume | Proteína | | Atividade CD-Fenoltaleína | | Ativ. Espec. | Rendimento | Fator Purificação |
|----------------------------|--------|---------------------|----------|---------------------------|---------|--------------------|------------|-------------------|
| | mL | mg mL ⁻¹ | mg total | U mL ⁻¹ | U Total | U mg ⁻¹ | % | |
| Enzima bruta | 1.200 | 2,37 | 2.370 | 0,49 | 588,0 | 0,25 | 100,00 | 1,0 |
| Ultrafiltração | 60 | 3,73 | 223,6 | 1,14 | 68,4 | 0,31 | 11,63 | 1,22 |
| Gel filtração Sephadex G75 | 250 | 0,033 | 8,25 | 0,78 | 195,0 | 23,64 | 33,16 | 94,5 |
| Liofilização | 25 | 0,544 | 13,6 | 10,6 | 265,0 | 19,48 | 3,31 | 77,92 |
| Diálise | 25 | 0,05 | 1,25 | 21,23 | 530,75 | 424,6 | 90,26 | 1698,4 |

Fonte: próprio autor

b) CGTase produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16

A enzima bruta contendo o sobrenadante foi concentrada por ultrafiltração e em seguida purificada por gel filtração, obtendo-se o perfil de eluição ilustrado na Figura 8. Esses processos resultaram em fator de purificação de 35,4 vezes, rendimento de 34 % e atividade específica de 12,54 U mg⁻¹ de proteína conforme mostra a Tabela 2.

Figura 8. Perfil de eluição da cromatografia de gel filtração em resina Sephadex G-75, para purificação parcial da CGTase produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16.



Fonte: próprio autor

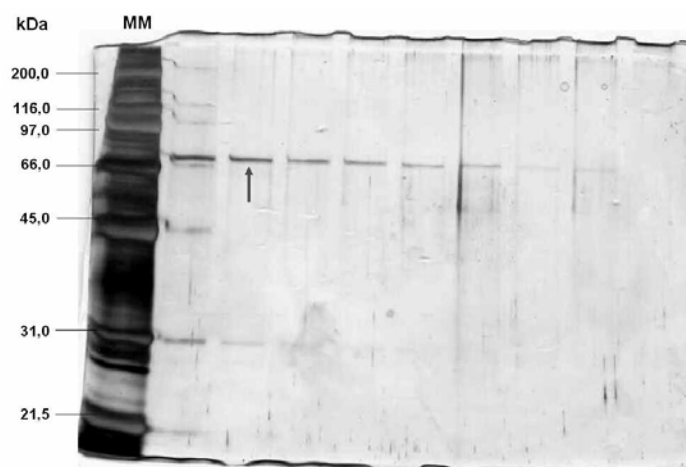
Tabela 2. Resumo da purificação parcial da CGTase produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16

| Etapas | Volume mL | Proteína | | Atividade CD- Fenolftaleína | | Ativ. Espec. U mg ⁻¹ | Rendi- mento | Fator Purifi- |
|-------------------------------|--------------|---------------------|----------|--------------------------------|---------|---------------------------------------|-----------------|------------------|
| | | mg mL ⁻¹ | mg total | U mL ⁻¹ | U Total | | | |
| Enzima bruta | 700 | 1,50 | 1050 | 0,56 | 392,0 | 0,37 | 100,00 | 1,00 |
| Ultrafiltração | 50 | 3,23 | 161,5 | 2,78 | 139,0 | 0,86 | 35,4 | 2,32 |
| Gel filtração Sephadex G75 | 206 | 0,05 | 10,3 | 0,65 | 133,6 | 13,10 | 34,1 | 35,4 |
| Liofilização | 20 | 0,09 | 1,8 | 13,6 | 272,0 | 20,0 | 69,38 | 54,05 |
| Diálise | 18 | 0,05 | 0,9 | 12,54 | 11,29 | 12,54 | 2,88 | 33,40 |

Fonte: próprio autor

A Figura 9 apresenta o grau de pureza para algumas frações eluídas a partir de cromatografia por gel filtração. Observa-se a banda próximo a 80 kDa, correspondente a CGTase de interesse e há poucas bandas de outras proteínas, significando a eficiência desse procedimento cromatográfico

Figura 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações com atividade CD-fenoltaleína, a seta indica a banda para CGTase. Purificação parcial da CGTase produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16.



Fonte: próprio autor

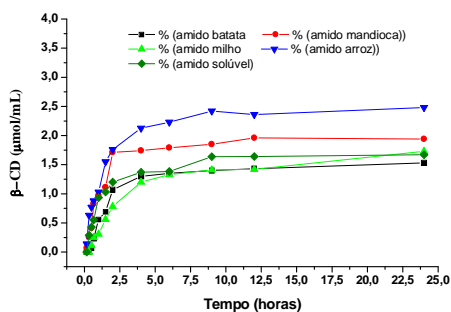
Em trabalho de SUN et al. (2013), purificaram a CGTase de *Bacillus* sp SK13.002 utilizando cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose CL-6B obtiveram um fator de purificação de 15,1 e um rendimento de 26,7 %. MANOJ et al. (2012), para purificar a CGTase de *Bacillus circulans* utilizaram precipitação por sulfato de amônio e cromatografia de afinidade bioespecífica com resina Sepharose 6B, e tiveram como resultados após a cromatografia uma atividade específica de 46,09 U mg⁻¹, rendimento de 55,14 % e um fator de purificação de 20,21. Estudos realizados por ALVES-PRADO et al. (2007) purificando a CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 relataram um fator de purificação de 115 vezes e um rendimento de 13,3% após utilizarem o processo de gel filtração. A purificação de CGTase produzida por *Bacillus* sp G1 utilizou a cromatografia de afinidade, obtendo um fator de purificação de 1.750 vezes com rendimento de 10 % (SIAN et al, 2005).

5.2 Perfil de produção de β-CDs pela ação da CGTase bruta produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 na hidrólise de amidos diferentes fontes vegetais

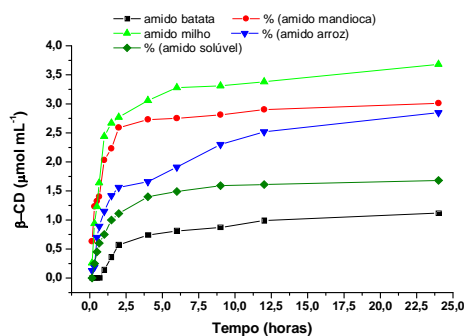
A solução enzimática bruta, depois de concentrada por ultrafiltração, foi submetida ao ensaio de hidrólise em amidos de diferentes fontes vegetais como amido de mandioca, amido de milho, amido de batata, amido de arroz e o amido solúvel. Inicialmente foi proposto trabalhar com as concentrações de amido a 1,0 %, 2,5 % e 5,0 %, no entanto, em função das diferentes características dos amidos estudados, não foi possível a realização do ensaio a 5,0 % para todos os amidos propostos. Nas figuras 10 e 11, tem-se o desempenho da enzima produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 na conversão dos amidos em CDs. No perfil de hidrólise dos diferentes amidos a 1,0%, a conversão do amido em β -CD foi melhor em amido de arroz seguido do amido de mandioca (Figura 10A). Na concentração de 2,5% de amido o perfil de conversão foi diferente, no qual os amidos de milho e mandioca resultaram nas melhores conversões (Figura 10B). Em dez horas de hidrólise praticamente todo o amido havia sido convertido em ciclodextrinas, não havendo muitas alterações até 24 horas.

Figura 10. Produção de ciclodextrinas pela CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3, em amidos com diferentes origens, analisada pelo método CD-fenoltaleína. A) Concentração de amido a 1,0%. B) Concentração de amido a 2,5%.

A)



B)



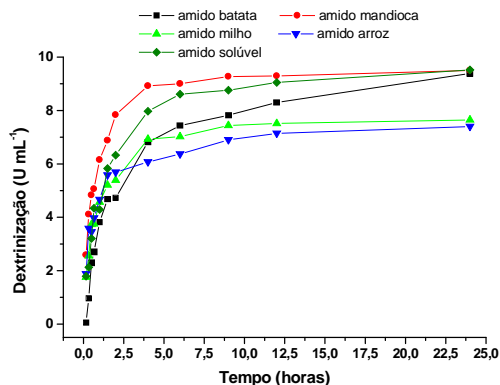
Fonte: próprio autor

Quanto o perfil de dextrinização dos diferentes amidos, as concentrações de 1,0 % e 2,5 % apresentaram o mesmo perfil de hidrólise (Figuras 11A e 11B). Os amidos de mandioca, solúvel e batata apresentaram a melhor conversão, quando comparadas aos amidos de arroz e milho. É possível observar que a dextrinização foi mais efetiva na concentração de 1,0 %, pois

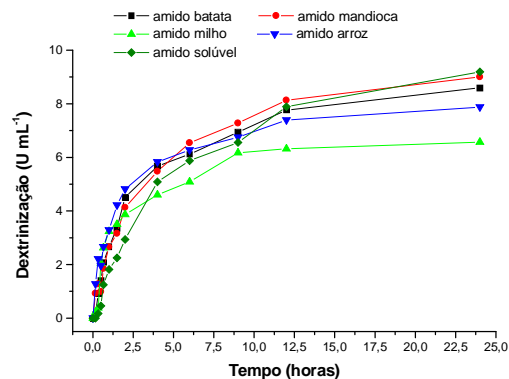
praticamente todo o amido de mandioca, solúvel e de batata havia sido hidrolisado. Sendo que para os amidos na concentração de 1,0 %, após 4 horas de hidrólise, praticamente todo o amido estava hidrolisado. Já na concentração de 2,5 %, a hidrólise foi mais lenta, em 24 horas os amidos em estudo não foram hidrolisados em sua totalidade, sendo que cerca de 20 % do amido de arroz não foi hidrolisado em 24 horas de hidrólise.

Figura 11. Produção de ciclodextrinas pela CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3, em amidos com diferentes origens, analisada pelo método dextrinizante. A) Concentração de amido a 1,0 %. B) Concentração de amido a 2,5 %.

A)



B)



Fonte: próprio autor

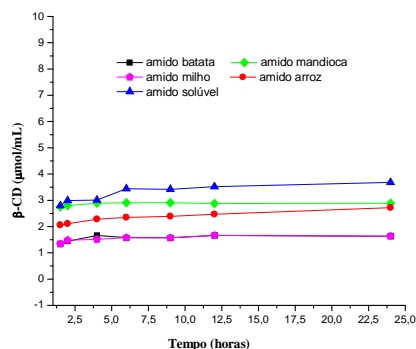
5.3 Produção de β -CDs pela ação da CGTase bruta produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 na hidrólise de amidos diferentes fontes vegetais.

Nas figuras 12 e 13 observa-se o perfil de hidrólise da enzima produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16. No perfil de hidrólise dos diferentes amidos a 1,0%, a conversão em β -CD foi melhor em amido solúvel seguido do amido de mandioca (Figura 12A). Na concentração de 2,5% de amido o perfil de conversão foi igual, onde os amidos solúvel e de mandioca resultaram nas melhores conversões (Figura 12B).

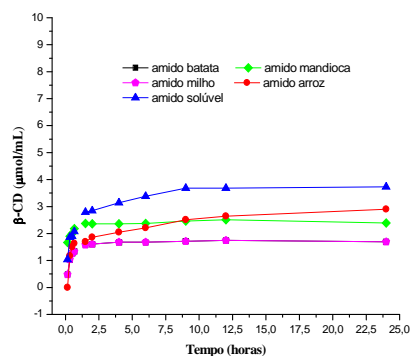
Quanto à dextrinização dos amidos, na concentração de 1,0% os amidos solúvel, de batata e de mandioca (Figura 13A).

Figura 12. Produção de ciclodextrinas pela CGTase bruta, produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, em amidos de diferentes fontes vegetais, analisada pelo método CD-fenolftaleína. A) Concentração de amido a 1,0 %. B) Concentração de amido a 2,5 %.

A)



B)

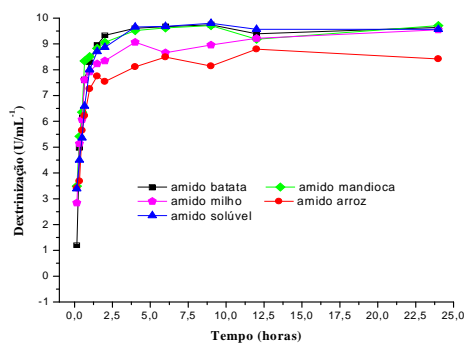


Fonte: próprio autor

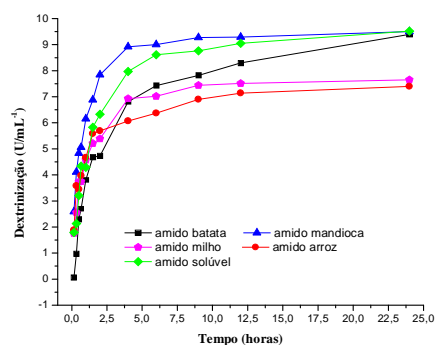
Os amidos de mandioca e solúvel apresentaram a melhor conversão, quando comparadas aos amidos de batata, arroz e milho na concentração de 2,5% (Figura 13B). É possível observar que a dextrinização foi mais efetiva na concentração de 1,0%, pois praticamente todo o amido solúvel, de mandioca e batata haviam sido hidrolisados.

Figura 13. Produção de ciclodextrinas pela CGTase bruta, produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, em amidos de diferentes fontes vegetais, analisada pelo método dextrinizante. A) Concentração de amido a 1,0 %. B) Concentração de amido a 2,5 %.

A)



B)



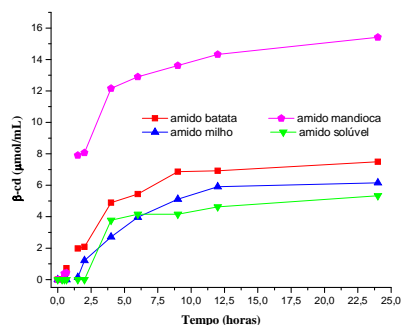
Fonte: próprio autor

5.4 Produção de β -CDs pela ação da CGTase parcialmente purificada produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 e por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 na hidrólise de amidos diferentes fontes vegetais

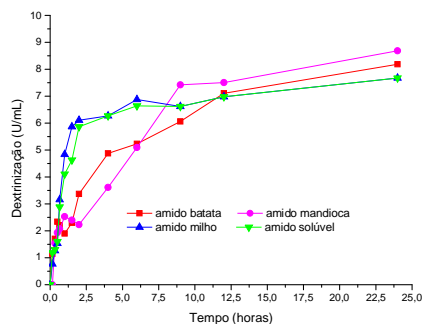
A conversão em CDs, após hidrólise de amidos de diferentes fontes vegetais pela ação das CGTases parcialmente purificadas estão ilustradas nas figuras 14 e 15. Foi possível observar uma melhor eficiência de conversão pela CGTase produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, ao hidrolisar o amido de mandioca, no qual foi determinada produção de $14 \mu\text{mol mL}^{-1}$ de β -CD ao final de 24 horas de hidrólise (Figura 14A), e dextrinização de $8,5 \text{ U/mL}^{-1}$ (Figura 14B).

Figura 14. Produção de ciclodextrinas pela CGTase parcialmente purificada, produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, em amidos de diferentes fontes vegetais, na concentração de 2,5 %. A) Método CD-fenoltaleína B) Método dextrinizante.

A)



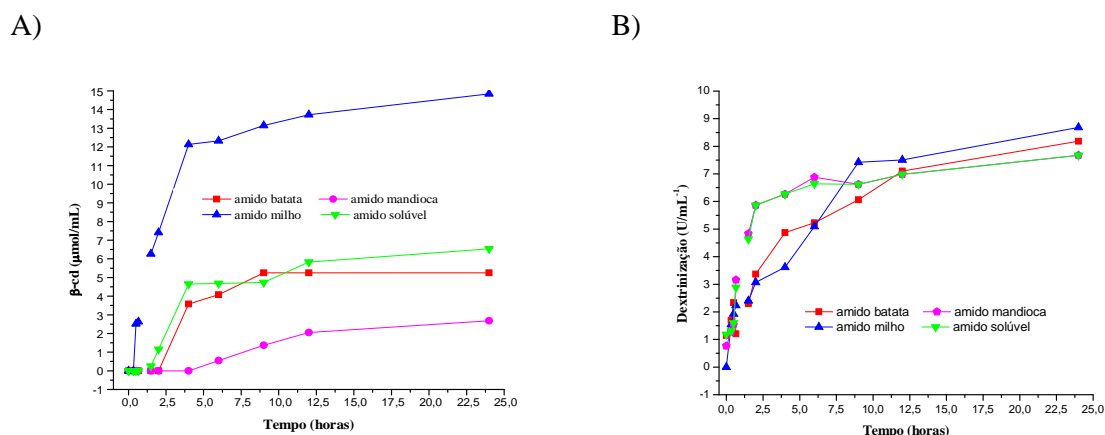
B)



Fonte: próprio autor

A conversão de amido milho em β -CD foi de $15 \mu\text{mol mL}^{-1}$ pela ação da CGTase parcialmente purificada, produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 (Figura 15A). A dextrinização do amido de milho foi de $8,5 \text{ U mL}^{-1}$ (Figura 15B)

Figura 15. Produção de ciclodextrinas pela ação CGTase parcialmente purificada, produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3, em amidos de diferentes fontes vegetais, na concentração de 2,5 %. A) Método CD-fenolftaleína. B) Método dextrinizante.



Fonte: próprio autor

A partir da hidrólise de amidos de diferentes fontes vegetais, utilizando as CGTases bruta e parcialmente purificada, foi possível selecionar os tipos de amidos com a melhor conversão para os ensaios de secagem por atomização. Desse modo, foi observada uma melhor conversão do amido de milho, em CDs, quando foi utilizada a CGTase bruta e parcialmente purificada, produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3. Uma melhor conversão em CDs, foi determinada para a CGTase produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 em amido de mandioca.

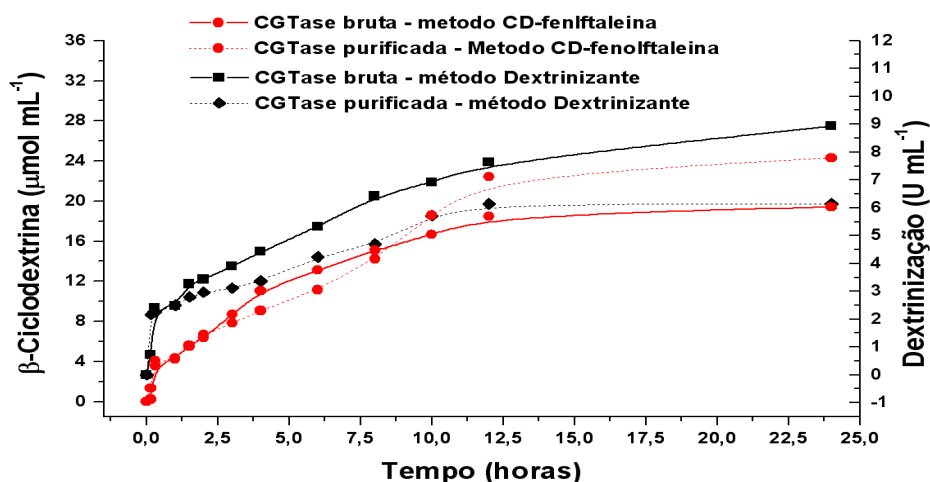
5.5 Produção de β-CDs pela ação das CGTases bacterianas

Para essa etapa dos ensaios de hidrólise foram adotadas as concentrações de amido de 2,5 % e 4,0 %, uma vez que o teor de sólidos para os processos de secagem é importante. Os ensaios foram realizados em quatro repetições para obtenção de volume significativo para aplicação dos processos de secagem. Os resultados abaixo são relativos aos valores médios obtidos em cada hidrólise.

5.5.1. Produção de β -CDs pela ação da CGTase bruta e parcialmente purificada produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 na hidrólise de amido de milho

A hidrólise do amido de milho à concentração de 2,5 %, com a CGTase bruta resultou em uma conversão de $20 \mu\text{mol mL}^{-1}$ de β -CD enquanto, a dextrinização do amido, resultou em atividade 9 U mL^{-1} . Utilizando a CGTase parcialmente purificada, a produção de β -CD foi de $24 \mu\text{mol mL}^{-1}$ e a dextrinização foi de $6,0 \text{ U mL}^{-1}$ (Figura 16). Assim, a CGTase produzida por *P. campinasensis* H69-3 apresentou à 2,5 % de amido de milho melhor produção de β -CD na condição de parcialmente purificada, enquanto a dextrinização foi melhor com a CGTase bruta.

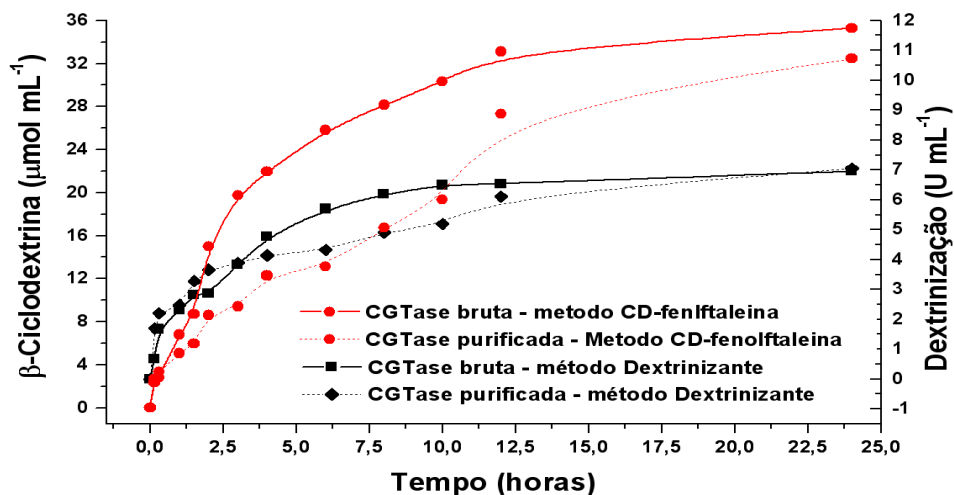
Figura 16. Produção de ciclodextrinas pela ação das CGTases bruta e parcialmente purificada, produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3, utilizando amido de milho à 2,5 % como substrato, analisada pelos métodos CD-fenolftaleína e Dextrinizante.



Fonte: próprio autor

A hidrólise do amido de mandioca à concentração de 4,0 %, com a CGTase bruta resultou em uma conversão de $35,5 \mu\text{mol mL}^{-1}$ de β -CD enquanto, a dextrinização do amido, resultou em atividade $7,0 \text{ U mL}^{-1}$. Utilizando a CGTase parcialmente purificada, a produção de β -CD foi de $32 \mu\text{mol mL}^{-1}$ e a dextrinização foi de $7,0 \text{ U mL}^{-1}$ (Figura 17). Assim, a CGTase bruta e parcialmente purificada, produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 não diferiram quanto a conversão em β -CD e na dextrinização, na concentração de 4,0% de amido de milho.

Figura 17. Produção de ciclodextrinas pela ação das CGTases bruta e parcialmente purificada, produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3, utilizando amido de milho à 4,0 % como substrato, analisada pelos métodos CD-fenolftaleína e Dextrinizante.

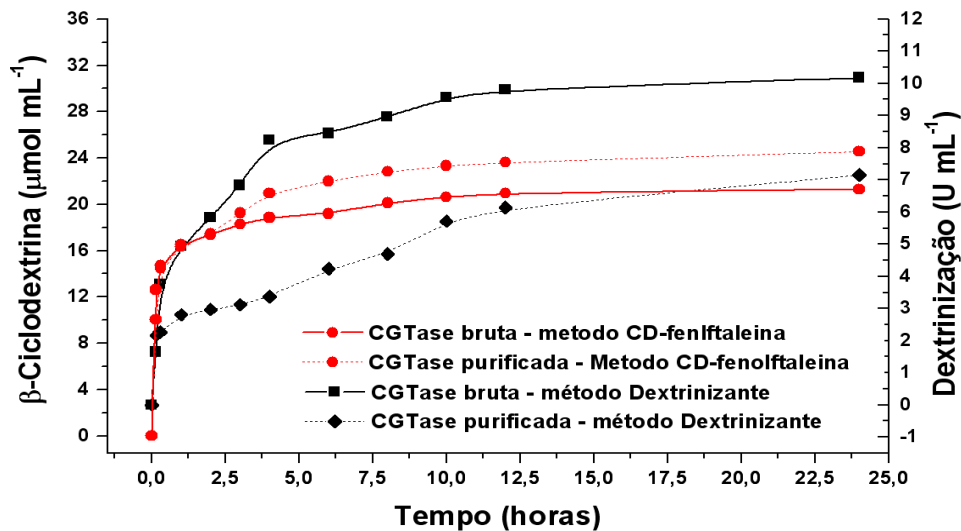


Fonte: próprio autor

5.5.2 Produção de β-CDs pela ação da CGTase bruta e parcialmente purificada produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 na hidrólise de amido de mandioca

A hidrólise do amido de mandioca à concentração de 2,5 %, com a CGTase bruta resultou em uma conversão de $18,0 \mu\text{mol mL}^{-1}$ de β-CD enquanto, a dextrinização do amido, resultou em atividade $10,0 \text{ U mL}^{-1}$. Utilizando a CGTase parcialmente purificada, a produção de β-CD foi de $20,0 \mu\text{mol mL}^{-1}$ e a dextrinização foi de $7,0 \text{ U mL}^{-1}$ (Figura 18). Assim, a CGTase produzida por *Bacillus* sp E16 apresentou à 2,5 % de amido de mandioca melhor produção de β-CD na condição de parcialmente purificada, enquanto a dextrinização foi melhor com a CGTase bruta.

Figura 18. Produção de ciclodextrinas pela ação das CGTases bruta e parcialmente purificada, produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, utilizando amido de mandioca à 2,5 % como substrato, analisada pelos métodos CD-fenolftaleína e Dextrinizante.

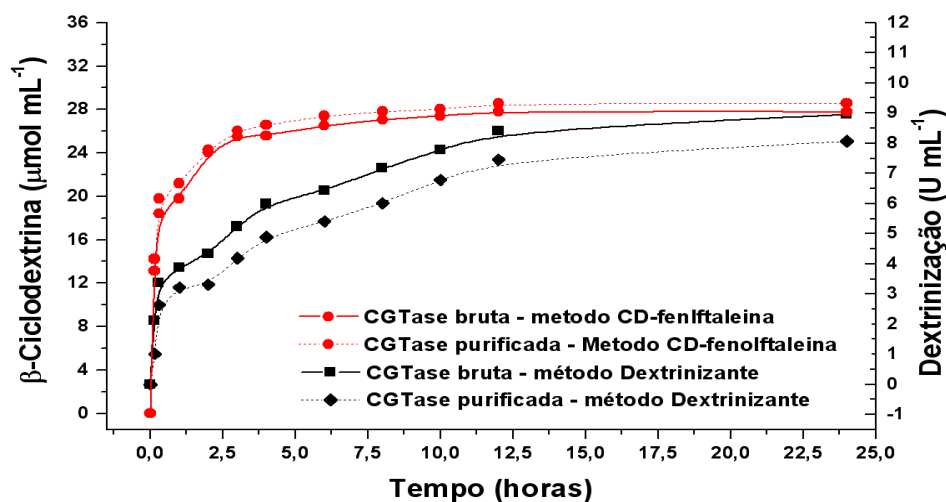


Fonte: próprio autor

A hidrólise do amido de mandioca à concentração de 4,0 %, com a CGTase bruta resultou em uma conversão de 26,0 μmol mL⁻¹ de β-CD enquanto, a dextrinização do amido, resultou em atividade 9,0 U mL⁻¹. Utilizando a CGTase parcialmente purificada, a produção de β-CD foi de 27,0 μmol mL⁻¹ e a dextrinização foi de 8,0 U mL⁻¹ (Figura 19). Assim, a CGTase bruta e parcialmente purificada, produzida por *Bacillus* sp E16 não diferiram quanto a conversão em β-CD e na dextrinização, na concentração de 4,0% de amido de mandioca.

A concentração de amido à 4,0 % resultou nas melhores conversões em ciclodextrina para ambas as CGTases estudadas, tanto na condição bruta como purificada. Quanto a dextrinização em média foi mais eficiente na concentração de 2,5 %.

Figura 19. Produção de ciclodextrinas pela ação das CGTases bruta e parcialmente purificada, produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, utilizando amido de mandioca à 4,0 % como substrato, analisada pelos métodos CD-fenolftaleína e Dextrinizante.



Fonte: próprio autor

Em estudos, Moriwaki e colaboradores (2009) utilizaram CGTases purificadas de *B. firmus* cepa 7B, *B. firmus* cepa 37 e *B. sphaericus* cepa 41, e como fonte de amido foram utilizados maltodextrina, amido de arroz, amido de batata, amido de milho, polvilho, fécula e tapioca em uma concentração de 10%, obtiveram desempenho na produção de β-CD, para todas as fontes de amido, porém o amido de milho foi o substrato que resultou no melhor rendimento na produção de β-CD.

SZERMAN et al. (2007) produziram CGTase por *Bacillus circulans* DF 9R, e para o estudo de conversão de amido de mandioca em CDs, utilizaram diferentes concentrações do amido. Os autores obtiveram resultados satisfatórios na concentração de 5,0 %, sendo que após 4 horas de hidrólise grande parte do substrato havia sido convertido em ciclodextrinas.

5.6 Secagem dos hidrolisados por spray dryer

Para o processo de secagem por atomização, foi necessário escolher os hidrolisados que apresentavam maior teor de sólidos, sendo assim foi acrescentado ao trabalho a concentração de 4,0% de substrato para a realização da hidrólise e excluído a concentração de 1,0% devido a baixa concentração de teor de sólidos no final da hidrólise. Devido a viscosidade e a dificuldade no homogeneização da solução enzimática, não foi possível trabalhar na concentração de amido a 5,0%. Foram adotadas as condições de 12,0 mL min⁻¹ de vazão de alimentação da solução de amido hidrolisado, temperatura de entrada do gás de secagem de 100 °C, temperatura de saída de 191 °C, e ar comprimido a uma pressão de 4 kgf (cm²)⁻¹. As condições adotadas pelo spray dryer foi diferente das condições observadas na literatura devido ao equipamento utilizado não atingir tais condições. Antes do processo de secagem foi verificado o teor de sólidos contido em cada amostra e após o processo foi verificada a umidade das mesmas utilizando uma balança de umidade com lâmpada de halogênio, como é possível observar nas Tabelas 3 e 4 abaixo.

Tabela 3. Teor de sólidos e teor de umidade dos hidrolisados pela CGTase de *Paenibacillus campinasensis* H69-3 bruta e parcialmente purificada

| Amostra | Teor de Sólidos (antes da secagem) (%) | Teor de Umidade (após a secagem) (%) |
|---|---|---|
| Amido de milho 2,5 % CGTase bruta | 4,28 % | 6,79 % |
| Amido de milho 4,0 % CGTase bruta | 2,67% | 7,23 % |
| Amido de milho 2,5 % CGTase parcialmente purificada | 1,48% | 6,86 % |
| Amido de milho 4,0 % CGTase parcialmente purificada | 2,78 % | 6,16 % |

Fonte: próprio autor

Na tabela 3, podemos observar que nas amostras contendo amido de milho a 4,0% hidrolisado pela CGTase de *Paenibacillus campinasensis* H69-3 o teor de sólidos antes do processo de secagem se apresentava semelhante tanto na enzima bruta quanto para a enzima parcialmente purificada sendo de 2,67% e 2,78% respectivamente, e após o processo a amostra

contendo 4,0% com a enzima bruta apresentou maior umidade no pó de secagem 7,23% e com a enzima parcialmente purificada de 6,16%. As amostras que apresentam a concentração de 2,5% de substrato, o teor de sólidos antes da secagem variou bastante, sendo a amostra com enzima bruta apresentando 4,28% de teor de sólidos e a amostra com a enzima parcialmente purificada 1,48%, porém após a secagem a umidade das amostras apresentaram uma semelhança sendo de 6,79 % para a bruta e 6,86 % para a parcialmente purificada.

Tabela 4. Teor de sólidos e teor de umidade dos hidrolisados pela CGTase de *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 bruta e parcialmente purificada

| Amostra | Teor de Sólidos (antes da secagem) (%) | Teor de Umidade (após a secagem) (%) |
|---|---|---|
| Amido de mandioca 2,5 % CGTase bruta | 2,64 % | 6,25 % |
| Amido de mandioca 4,0 % CGTase bruta | 3,22 % | 6,52 % |
| Amido de mandioca 2,5 % CGTase parcialmente purificada | 2,99 % | 7,36 % |
| Amido de mandioca 4,0 % CGTase parcialmente purificada | 3,02 % | 9,07 % |

Fonte: próprio autor

Na tabela 4 observou que o teor de sólidos das amostras na concentração de 2,5% e 4,0% de amido de mandioca tanto com a CGTase bruta quanto para a parcialmente purificada não variou muito sendo de 2,64% a 3,22%, porém após a secagem o teor de umidade das amostras variou na concentração de 2,5% sendo 6,25% para a enzima bruta e 7,36% para a enzima parcialmente purificada. Na concentração a 4,0% de amido de mandioca, para a enzima bruta foi de 6,52% enquanto para a enzima parcialmente purificada foi de 9,07%. Carvalho, 2012, em trabalho propôs a secagem de ovo em spray dryer, foram feitos testes secando somente o ovo e a associação de ovo + maltodextrina nas concentrações de 10% (DE 10), 15% (DE 10) e 20% (DE 20), observaram um aumento de umidade residual da amostra com a adição de maltodextrina sendo de 3,94% somente para o ovo, e as associações ovo + maltodextrina 4,50%, 6,80% e

3,45%, respectivamente. Em estudos de VALDUGA et al. 2008, com a secagem de extrato de erva-mate utilizaram goma arábica como adjuvante, e observaram que o teor de sólidos da amostra sem goma arábica apresentou 2,88% enquanto as amostras com a presença de adjuvante apresentaram uma variação de 2,80% a 2,91%, a umidade do pó coletado foi de 1,9% para a amostra sem goma arábica e a amostra contendo 0,6% de goma arábica foi a amostra que apresentou maior umidade de 6,8%, após a secagem.

5.7 Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

As tabelas 5 e 6 mostram a produção de CDs após 24 horas de hidrólise quantificadas por HPLC. Observou-se que a conversão em ciclodextrinas utilizando CGTase bruta é relativamente melhor que quando utilizou-se a CGTase parcialmente purificada para ambas as CGTases estudadas. A CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 utilizando amido de milho como substrato teve maior rendimento na conversão de CDs na concentração de 2,5% com CGTase bruta que foi de 30,04%, na hidrólise com a enzima parcialmente purificada a conversão de CDs foi de 4,72 % e 7,15 % para 2,5 % e 4,0 % de amido de milho (Tabela 5).

O amido de mandioca foi o substrato que proporcionou melhor rendimento na produção de β -CD tanto na concentração a 2,5 % quanto a 4,0 %, sendo de 7,13 a 7,86 mg mL⁻¹, respectivamente (Tabela 6). Foi possível observar que houve maior rendimento na produção das CDs utilizando a CGTase bruta quando comparada à CGTase parcialmente purificada. Em nenhuma das amostras foi possível detectar a presença de α -CD por esse método de quantificação conforme observamos nas Tabelas 5 e 6.

A produção de CDs pela cepa 37 *B. firmus* e *B. sphaericus* cepa 41 utilizando células imobilizadas sobre a esponja vegetal foi realizada usando amido de milho e maltodextrina, à taxa de conversão de CDs variou 16,2-29,3 %, usando o amido de milho não apresentou produção de α -CD para nenhuma das linhagens enquanto a produção de β -CD variou de 16,2 a 17,5mg/mL. Utilizando maltodextrina, o *B. firmus* cepa 37 apresentou uma conversão de 23,3%

e o *B. sphaericus* cepa 41, 16,2% de CDs, sendo a maior conversão em β -CD 11,5 mg/mL e 8,5 mg/mL respectivamente (MORIWAKI et al, 2014)

Tabela 5. Conversão de Ciclodextrinas pela ação da CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 na produção de CD em amido de milho nas concentrações de 2,5% e 4,0% de substrato.

| Substrato | Produção de CD (mg mL ⁻¹) | | | | Conversão de CD (%) |
|---|---------------------------------------|-------------|--------------|-------|---------------------|
| | α -CD | β -CD | γ -CD | Total | |
| Amido de milho 2,5 % CGTase bruta | - | 5,01±0,20 | 2,50±0,50 | 7,51 | 30,04 |
| Amido de milho 4,0 % CGTase bruta | - | 2,88±0,12 | 1,60±0,1 | 4,48 | 17,92 |
| Amido de milho 2,5 % CGTase parcialmente purificada | - | 1,29±0,00 | 0,6±0,1 | 1,89 | 4,72 |
| Amido de milho 4,0 % CGTase parcialmente purificada | - | 1,96±0,02 | 0,9±0,1 | 2,86 | 7,15 |

Fonte: próprio autor

Tabela 6. Conversão de Ciclodextrinas pela ação da CGTase produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 na produção de CD em amido de mandioca nas concentrações de 2,5% e 4,0% de substrato.

| Substrato | Produção de CD (mg mL ⁻¹) | | | | Conversão de CD (%) |
|--|---------------------------------------|-------------|--------------|-------|---------------------|
| | α -CD | β -CD | γ -CD | Total | |
| Amido de mandioca 2,5 % CGTase bruta | - | 7,13±0,20 | 1,7±0,00 | 8,83 | 35,32 |
| Amido de mandioca 4,0 % CGTase bruta | - | 7,86±0,13 | 1,8±0,20 | 9,66 | 38,64 |
| Amido de mandioca 2,5 % CGTase parcialmente purificada | - | 5,59±0,03 | 1,5±0,00 | 7,09 | 17,72 |
| Amido de mandioca 4,0 % CGTase parcialmente purificada | - | 4,95±0,03 | 1,4±0,10 | 6,35 | 15,87 |

Fonte: próprio autor

MORA et al, (2012), utilizando amido de inhame para a produção de CD, obtiveram uma proporção de 0.74:1:0.61 para α : β : γ , e utilizando amido solúvel o rendimento foi para α : β : γ de 0.29:1:0.85. ZHEKOVA et al, (2011), realizaram estudos variando o pH na solução contendo substrato e observaram que a produção de CDs em pH 9 teve a proporção de 2.6:83.5:13.9 para α : β : γ e em pH 5 a relação foi 8.6:84.6:6.8. Utilizando modelos matemáticos para determinar as condições de conversão máxima de amido em CDs que foi de 45,88% em uma concentração de 5,0% de substrato. CALSAVARA et al, (2011), utilizando amido de milho pré-tratado a uma

concentração de 15,0% na presença de etanol e, tiveram como resultado uma produção total de CDs de 57,4%, sendo 53,2% α -CD, 36,1% β -CD e 10,7% γ -CD.

Trabalhos de ATANASOVA et al, (2009) utilizando células de *Bacillus pseudocaliphilus* 20RF e *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB bons produtores de CGTase foram imobilizadas e principalmente β e γ -CD depois de 6 horas de reação da enzima a pH 9,0, sob estas condições, foram observados uma maior produção de β e γ -CD, a relação da conversão de CDs foi de 0:62.3:37.7 de α : β : γ , respectivamente.

6. CONCLUSÃO

O processo de purificação parcial das CGTases obtidas apresentou melhores resultados para a CGTase de *Paenibacillus campinasensis* H69-3. Os ensaios de conversão realizados com a CGTase bruta e parcialmente purificada produzida pelas duas bactérias mostraram resultados significativos, pois a enzima conseguiu converter os diferentes amidos em β -CDs. A CGTase bruta e parcialmente purificada produzida por *P. campinasensis* H69-3 teve melhor atuação em amido de milho, enquanto a CGTase bruta e parcialmente purificada produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 teve melhor atuação em amido de mandioca. A CGTase produzida pela linhagem mesofílica *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 foi a que apresentou melhor produção de β - e γ -CD em relação a linhagem termofílica. A α -CD não foi detectada pelo método utilizado. A proporção α : β : γ para os hidrolizados produzidos pela CGTase bruta foi de 0:1,0:0,50 e 0:1,0:0,56 nas concentrações de 2,5 % e 4,0 % de amido, respectivamente. Para os hidrolizados utilizando CGTase parcialmente purificada a proporção foi de 0:1,0:0,46 para ambas as concentrações de amido de milho. A CGTase bruta produzida por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 apresentou uma proporção α : β : γ para os hidrolizados produzidos pela CGTase bruta foi de 0:1,0:0,24 e 0:1,0:0,23 nas concentrações de 2,5 % e 4,0 % de amido, respectivamente. Para os hidrolizados utilizando CGTase parcialmente purificada a proporção foi de 0:1,0:0,26 e 0:1,0:0,28 nas concentrações de 2,5 % e 4,0 % de amido.

REFERÊNCIAS

- ABELYAN, V. A.; AFYAN, K. B.; AVAKYAN, Z. G.; MELKUMYAN, A. G.; AFRIKYAN, E. G. Cyclomaltodextrin glucotransferases from thermophilic actinomycetes. *Biochemistry (Moscow)*, v.60, n.10, p. 1223-1229, 1995.
- ALVES PRADO, H. F. Estudo da produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) por *Bacillus* sp alcalofílico. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, 2000.
- ALVES-PRADO, H. F.; GOMES, E.; DASILVA, R. Produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) microbiana e aplicação das ciclodextrinas em alimento: Revisão. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologias de Alimentos*, v. 36, n. 1, p. 43-54, 2002.
- ALVES-PRADO, H. F.; GOMES, E.; DASILVA, R. Evaluation of Solid and Submerged Fermentations for the Production of cyclodextrin glycosyltransferase by *Paenibacillus campinasensis* H69-3: characterization of crude enzyme. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 129, n. 1-3, p. 234-246, 2006.
- ALVES-PRADO, H. F.; BOCCHINI, D.A.; GOMES, E.; BAIDA, L. C.; CONTIERO, J.; ROBERTO, I. C.; DaSILVA, R. Optimization of cyclodextrin glucanotransferase production from *Bacillus clausii* E16 in submerged fermentation using response surface methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 136-140, p. 27-40, 2007a.
- ALVES-PRADO, H. F.; GOMES, E.; DASILVA, R. Purification and characterization of a cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) from *Paenibacillus campinasensis* strain H69-3. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 136-140, p. 41-55, 2007b.
- ALVES-PRADO, H. F.; CARNEIRO, A. A. J.; PAVEZZI, F. C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; FRANCO, C. M. L.; DASILVA, R. Production of cyclodextrins by CGTase from *Bacillus clausii* using different starches as substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 146, p. 3-13, 2008.
- ANDREAUS, J., DALMOLIN, M. C., OLIVEIRA JUNIOR, I. B., BARCELLOS, I. O. Aplicação de ciclodextrinas em processos têxteis. *Química Nova*, v. 33, n. 4, p. 929-937, 2010.
- ATANASOVA, N., PETROVA, P., IVANOVA, V., YANKOV, D., VASSILEVA, A., TONKOVA, A. Isolation of Novel Alkaliphilic Bacillus Strains for Cyclodextrin Glucanotransferase Production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* v. 149, p 155-167, 2008.
- ATANASOVA, N., KITAYSKA, T., YANKOV, D., SAFARIKOVA, M., TONKOVA, A. Cyclodextrin glucanotransferase production by cell biocatalysts of alkaliphilic bacilli. *Biochemical Engineering Journal*, v. 46, p. 278-285, 2009.

- ASTRAY, G., GONZALEZ-BARREIRO, C., MEJUTO, J. C., RIAL-OTERO, R., & SIMAL-GÁNDARA, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, v. 23, p. 1631–1640, 2009.
- BENDER, H. Cyclodextrin glucanotransferase from *Klebsiella pneumoniae*. 1. Formation, purification and properties of the enzyme from *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.*, v. 111, 271-282, 1977.
- BENDER, H. Production, Characterization, and application of cyclodextrins. *Advances in Biotechnological Processes*. v.6, p. 31-71, 1986.
- BONILHA, P. R. M., V., MENOCCI, A. J., GOULART, POLIZELI, M. L. T. M., MONTI, R. Cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus licheniformis*: optimization of production and its properties, *Brazilian Journal of Microbiology*, v 37, p. 317-323, 2006.
- CALSAVARA, L. P. V.; CUNHA, A. R. D.; BALBINO, T. A.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Production of Cyclodextrins from Cornstarch Granules in a Sequential Batch Mode and in the Presence of Ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 165, p. 1485–1493, 2011.
- CARVALHO, F. Construção e Avaliação do Desempenho de um *Spray Dryer* Piloto. Tese de Doutorado, Lavras/MG, 2012.
- CHUNG, H. J.; YOON, S. H.; LEE, M. J.; KIM, M. J.; KWEON, K. S.; LEE, I. W.; KIM, J. W.; OH, B. H.; LEE, H. S.; SPIRIDONOVA, V. A.; PARK, K. H. Characterization of a thermostable cyclodextrin glucanotransferase isolated from *Bacillus stearothermophilus* ET1. *Journal Agric. Food Chemistry*. v.46, p.952-959, 1998.
- COMERFORD, K.B., ARTISS, J.D., JEN, K.L., KARAKAS, S.E. The beneficial effects of alpha-cyclodextrin on blood lipids and weight loss in healthy humans. *Obesity*, v.19, p. 1200–1204, 2011.
- FUJITA, Y.; TSUBOUCHI, H.; INAGI, Y. TOMITA, K.; OZAKI, A.; NAKANISHI, K. Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus* sp. AL-9. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. v.70, n.3, p. 150-154, 1990.
- FUJIWARA, S.; KAKIHARA, H.; SAKAGUCHI, K.; IMANAKA, T. Analysis of mutations in cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* which affect cyclization characteristics and thermostability. *Journal of Bacteriology*. v. 174, n.22, p 7474-7481, 1992
- FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amilose as the substrate. *J. Biochem*. v. 41, p. 583-603, 1954.

- GARCÍA-SEGOVIA, P., BARRETO-PALACIOS, V., BRETÓN, J., MARTÍNEZ-MONZÓ, J. Microencapsulation of Essential oils using β -cyclodextrin: Applications in gastronomy. *Journal of Culinary Science and Technology*, v. 9, n 4, p 150-157, 2011.
- GAWANDE, B. N.; GOEL, A.; PATKAR, A. Y.; NENE, S. N. Purification and properties of a novel raw starch degrading cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 51, n. 4, p. 504-509, 1999.
- HAMES, B. D. *Gel eletroforesis of protein*. IRL Press Ltd., Oxford, 1981.
- JAMUNA, R.; SASWATHI, N.; SHEELA, R.; RAMAKRISHNA, S.V. Syntesis of cyclodextrin-Glucosiltransferase by *Bacillus cereus* for the production of cyclodextrins. *Appl. Biochem. Biotechnol.* v. 43, p. 163-176, 1993.
- LEE, J. H.; CHOI, K. H.; LEE, Y. S.; KWON, I.B.; YU, J. H. Enzymatic production of α -cyclodextrin with the cyclomalto-dextrin glucanotransferase of *Klebsiella axytoca* 19-1. *Enzyme and Microbial Technology*. v.14, n.12, p. 1017-1020, 1992.
- LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C., GALLUR, M., CATALÁ, R., GAVARA, R., & HERNANDEZ-MUÑOZ, P. Immobilization of β -cyclodextrin in ethylene-vinyl alcohol copolymer for active food packaging applications. *Journal of Membrane Science*, V. 353, P. 184–191, 2010.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-75, 1951.
- LUBBERS, S., LANDY, P., VOILLEY, A. Retention and release of aroma compounds in food containing proteins. *Journal of Food Technology*, v.52, p. 68–74, 1998.
- MÄKELÄ, M. J., KORPELA, T. K., PUISTO, J.; LAAKSO, S. V. Nonchromatographic cyclodextrin assays: evaluation of sensitivity, and conversion mixture applications. *Journal Agric. Food Chem.* v. 36, p. 83-88, 1988.
- MARECHAL, L. R., ROSSO, A. M., MARECHAL, M. A., KRYMKIEWICZ, N., FERRAROTTI, S. A. Some properties of a cyclomaltodestrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* DF9R type. *Cell Mol. Biol.* v. 42, p. 659-664, 1996.
- MATIOLI, G.; ZANIN, G. M.; GUIMARÃES, M. F.; MORAES, F. F. Production and purification of CGTase of alkalophilic *Bacillus* isolated from Brazilian soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 70-72, p. 267-275, 1998.
- MATIOLI, G.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais, 1ª ed.; Editora da UEM: Maringá, p. 07-26, 2000.

- MORA, M. M. M.; SÁNCHEZ, K. H.; SANTANA, R. V.; ROJAS, A. P.; RAMÍREZ, H. L.; TORRES-LABANDEIRA, J. J. Partial purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from alkalophilic *Bacillus* species. *SpringerPlus*, p. 1-6, 2012.
- MORI, S.; GOTO, M.; MASE, T.; MATSUURA, A.; OYA, T.; KITAHATA, S. Reaction conditions for the production of γ -cyclodextrin by cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp n° 9605. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. v.59, n.6, p. 1012-1015, 1995.
- MORI, S.; HIROSE, S.; OYA, T.; KITAHATA, S. Purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp n° 9605. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. v.58, n. 11, p. 1968-1972, 1994.
- MORIWAKI, C., COSTA, G. L., PAZZETTO, ZANIN, G. M., R., MORAES, F. F., PORTILHO, M., TIOLI, G. Production and characterization of a new cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* isolated from Brazilian soil. *Process Biochem.*, v 42, 1384-1390, 2007.
- MORIWAKI, C.; MAZZER, C.; PAZZETTO, R., MATIOLI, G.; Produção, purificação e aumento da performance de ciclodextrina glicosiltransferases para a produção de ciclodextrinas. *Química nova*. v. 32, n. 9, p. 2360-2366, 2009.
- MORIWAKI, C., MANGOLIM, C. S., RUIZ, G. B., MORAIS, G. R., BAESSO, M. L., MATIOLI, G. Biosynthesis of CGTase by immobilized alkalophilic bacilli and crystallization of beta-cyclodextrin: Effective techniques to investigate cell immobilization and the production of cyclodextrins. *Biochemical Engineering Journal*. v. 83, p. 22-32 2014.
- NAKAMURA, N.; HORIKOSHI, K. Purification and properties of neutral cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.*, 40, 1785-1791, 1976.
- PINHO, E., GROOTVELD, M., SOARES, G., HENRIQUES, M. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers*, v. 101 p.121–135, 2014.
- PISHTIYSKI, I.; ZHEKOVA, B. Effect of different substrates and their preliminary treatment on cyclodextrin production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 22, p. 109-114, 2006.
- PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Purification and some properties of cyclomalto-dextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans*. v.52, n.5, p. 1099-1103, 1988.
- PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Screening and identification of a cyclomalto-dextrin glucanotransferase-producing bacteria. *Journal Fermentation Technology*. v.65, n.4, p. 463-467, 1987.

- PSZCZOLA, D. E. Production and potencial food applications of cyclodextrins. *Food Technology*. January, p. 96-100, 1988.
- RENDLEMAN Jr., J. A. Enhanced production of cyclomaltooctaose (γ -cyclodextrin) through selective complexation with C₁₂ cyclic compounds. *Carbohydrate Research*. v. 230, p. 343-359, 1992.
- RENDLEMAN Jr., J. A. Enhancement of cyclodextrin production through use of debranching enzymes. *Biotechnol. Appl. Biochem.* v. 26, p. 51-61, 1997.
- ROBYT, J. F. *Essentials of carbohydrate chemistry*. New York. Springer, Cap. 6, p. 160-168, 1998.
- SABIONI, J. G.; PARK, Y. K. Production and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus lentus*. *Starch/Stärke*. v.44, n.6, p. 225-229, 1992.
- SALVA, T. J. G.; LIMA, V. B.; PAGAN, A. P. Screening of alkalophilic bacteria for cyclodextrin glycosyltransferase production. *Revista de Microbiologia*. v. 28, p. 157-164, 1997.
- SATO, M.; YAGI, Y.; NAGANO, H.; ISHIKURA, T. Determination of CGTase from *Bacillus ohbensis* and its optimum pH using HPLC. *Agric. Biol. Chem.* v. 49, n.4, p. 1189-1191, 1985.
- SIAN, H. K.; SAID, M.; HASSAN, O.; KAMARUDDIN, K., ISMAIL, A. F., RAHMAN, R. A., MAHMOOD, N. A. N., ILLIAS, R. Md. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. G1. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1101-1111, 2005.
- SZERMAN, N., SCHOH, I., ROSSI, A. L., ROSSO, A. M., KRYMKIEWICZ, N., FERRAROTTI, S. A. Cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2886-2891, 2006.
- SHIRAISHI, F. KAWAKAMI, K., MARUSHIMA, H.; KUSUNOKI, K. Effect of ethanol on formation of cyclodextrin from soluble starch by *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase. *Starch/Stärke*. v. 41, n. 4, p. 151-155, 1989.
- STARNES, R. L. Industrial potential of cyclodextrin glycosyltransferases. *Cereal Foods World*. v.35, n.11, p. 1094-1099, 1990.
- SZEJTLI, J. Cyclodextrin in food, cosmetic and toiletries. *Starch/Stärke*. v.34, n.11, p.379-385, 1982.
- SZEJTLI, J. Cyclodextrin in Pesticides. *Starch/Stärke*. v.37, n.11, p.382-386, 1985
- SZEJTLI, J. Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. *Journal Mater. Chem.* v.7, n.4, p.575-587, 1997.

- TESTER, R. F.; Karkalas J.; Qi, X. Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science* v. 39, p. 151–165, 2004.
- TILDEN, E. B.; HUDSON, C. S. Preparation and properties of de amylases produced by *Bacillus macerans* and *Bacillus polymyxa*. *Journal of Bacteriology*. v.43, p.527-544, 1942.
- TOMITA, K.; KANEDA, M.; KAWAMURA, K.; NAKANISHI, K. Purification and properties of a cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus autolyticus* 11149 and selective formation of β -cyclodextrin. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 75, n.2, p. 89-92, 1993
- VADHANAM ,M. V. , AQIL, F., MUNAGALA, R., JEYABALAN, J. Bioavailability of phytochemicals and its enhancement by drug delivery systems. *Cancer Letters*,v. 334, p. 133–141, 2013.
- VALDUGA, A. T.; BATTESTIN, V.; FINZER, J. R. D. Secagem de extratos de erva-mate em secador por atomização. *Ciênc. e Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 23(2) p. 184-189, 2003.
- VAN DER VEEN, B.A., UITDEHAAG, J.C.M., DIJKSTRA, B.W. AND DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin glycosyl transferase reaction and product specificity. *Biochim. Biophys. Acta*. v. 1543: p. 336–360, 2000.
- VENTURINI, C. G., NICOLINI, J., MACHADO, C., MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas, *Química nova*, v. 31, n. 2, 360-368, 2008.
- ZHEKOVA B., DOBREV, G., STANCHEV, V., PISHTIYSKI I. Approaches for yield increase of β -cyclodextrin formed by cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v25, n 46, p. 1043-1049, 2009.
- ZHEKOVA B.Y. AND STANCHEV V.S. Reaction Conditions for Maximal Cyclodextrin Production by Cyclodextrin Glucanotransferase from *Bacillus megaterium*. *Polish Journal of Microbiology*, v. 60, n 2, p. 113–118, 2011.
- YAMAMOTO, K., ZHANG, Z. Z., & KOBAYASHI, S. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 962–966, 2000.
- YU, E. K. C.; AOKI, H.; MISAWA, M. Specific alpha-cyclodextrin production by a novel thermostable cyclodextrin glycosyltransferase. *Applied Microbiol Biotechnol*. v. 28, p. 377-379, 1988.