Gisele Rodrigues Cucolo

Produção e Caracterização da CGTase de *Bacillus* SP Subgrupo *Alcalophilus* El6 e Aplicação da Enzima em Produtos de Panificação

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

1910001407

U N E S P UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Campus de São José do Rio Preto
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
CEP 15054.000 - Rua Cristóvão Colombo, 2265 - J. Nazareth - PABX - (017) 221.2200
ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA CGTase DE *BACILLUS* SP SUBGRUPO *ALCALOPHILUS* E16 E APLICAÇÃO DA ENZIMA EM PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO

GISELE RODRIGUES CUCOLO

Orientador: Prof. Dr. ROBERTO DA SILVA

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto
T. 1407/05

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia e Ciências de Alimentos (Área de Concentração: Ciências e Tecnologia de Alimentos).

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP
AGOSTO 2004

664:577.15
C963p

13/06/2005
Doação
R$ 27,00
Autor(a)
076/2005
164/05

Cucolo, Gisele Rodrigues.
Produção e caracterização da CGTase de *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 e aplicação da enzima em produtos de panificação / Gisele Rodrigues Cucolo. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2004
127 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Roberto da Silva
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Enzimas - Aplicações industriais. 2. Ciclodextrinas. 3. Fermentação. 4. CGTase. 5. *Bacillus* sp *alcalophilus*. I. Silva, Roberto da. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.15

ÍNDICE

Página

APRESENTAÇÃO i

RESUMO ii

ABSTRACT iv

INTRODUÇÃO GERAL 1

CAPÍTULO I 8

REVISÃO DE LITERATURA 8

1 - Ciclodextrina Glicosiltransferase (CGTase) 8

1.1 – Origem e produção da CGTase 9

1.2 – Aplicações industriais da CGTase 13

1.3 – Mecanismos de ação da CGTase 14

1.4 – Estrutura molecular da CGTase 17

2 – Ciclodextrinas (CDs) 18

2.1 – Características e Propriedades das CDs 23

2.2 – Inclusão Molecular 31

BIBLIOGRAFIA 34

CAPÍTULO II 46

PRODUÇÃO DA CGTase DO *BACILLUS* sp SUBGRUPO *ALCALOPHILUS* E16 EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA E EM ESTADO SÓLIDO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO 46

I. INTRODUÇÃO 46

II. MATERIAL E MÉTODOS 51

1 - Microrganismo 51

2 - Enzima 51

3 - Meio de Cultivo para Pré-Inóculos 51

4 - Determinação da Atividade da CGTase 51

4.1 - Método CD-fenolftaleína 52

5 – Determinação de Proteínas 52

6 – Determinação de Proteases 53

7– Estudo da Produção de CGTase em Diferentes Fontes de Carbono para Seleção do Melhor Meio 54

7.1 – Fermentação Submersa 54
7.2 – Fermentação em Estado Sólido (FES) 55
8 - Estudo da Produção de CGTase por Fermentação Submersa no Melhor Meio ... 57
8.1 – Estudo da Influência da Concentração de Substrato e da Temperatura na Produção de CGTase 57
8.2 – Análise Estatística 57
8.3 – Análise da Massa Celular 58
9 – Caracterização Físico-Química do Extrato Enzimático Bruto 58
9.1 – pH Ótimo 58
9.2 – pH de Estabilidade 59
9.3 – Temperatura Ótima 59
9.4 – Temperatura de Estabilidade 59
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO 60
1 – Estudo da Produção de CGTase em Diferentes Fontes de Carbono para Seleção do Melhor Meio 60
1.1 – Fermentação Submersa 60
1.2 – Fermentação em Estado Sólido (FES) 63
2 - Estudo da Produção de CGTase no Melhor Meio 67
2.1 – Estudo de dois fatores -Concentração de Substrato e Temperatura 67
2.2 – Análise Estatística 68
3 – Caracterização Físico-Química do Extrato Enzimático Bruto 71
3.1 – pH Ótimo 71
3.2 – pH de Estabilidade 72
3.3 – Temperatura Ótima e de Estabilidade 72
IV. CONCLUSÃO 77
V. BIBLIOGRAFIA 79

CAPÍTULO III 85
APLICAÇÃO DA ENZIMA CGTase DE *BACILLUS* sp SUBGRUPO *ALCALOPHILUS* E16 EM PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO 85
I. INTRODUÇÃO 85
II. MATERIAIS E MÉTODOS 92
1 - Microrganismo 92
2 - Enzima 92
3 - Meio de Cultivo para Pré-Inóculos 92
4 - Produção da CGTase em Fermentação Submersa 92
5 - Determinação da Atividade da CGTase 93

5.1 - Método Dextrinizante 93
5.2 - Método CD-fenolftaleína 94
6 – Determinação de Proteínas 94
7 – Determinação de Proteases 96
8 - Purificação Parcial da CGTase 96
8.1 - Concentração da Enzima Presente no Extrato Bruto 96
8.2 - Cromatografia de troca iônica 97
9 – Hidrólise do Amido de Trigo 97
9.1 - Extração do Amido de Trigo 97
9.2 - Hidrólise 98
10 - Aplicação da Enzima nos Produtos de Panificação 98
10.1 – Aplicação da CGTase em Pães 98
10.2 – Aplicação da CGTase em Bolos 99
10.2.1 – Ensaio para a Determinação da Quantidade de Enzima a ser Usada em Bolos 99
10.2.2 – Ensaio utilizando CGTase e Agentes Aromatizantes em Bolos 99
10.2.3 – Aplicação da CGTase da linhagem E16 e da CGTase Comercial em Bolos com Agentes Aromatizantes 100
11 - Análise das CDs produzidas na Massa 101
11.1 - Teste qualitativo: Colorimétrico CD- fenolftaleína 101
11.2- Teste quantitativo: Método CD-fenolftaleina 101
12–Análise da Retenção do Aroma pelas CDs produzidas na Massa do Bolo 102
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO 103
1 - Purificação da Enzima 103
2- Hidrólise do Amido de Trigo 104
3– Aplicação da enzima em produtos de panificação 106
3.1– Aplicação da CGTase em Pães 106
3.2– Aplicação da CGTase em Bolos 108
3.2.1– Ensaio para a Determinação da Quantidade de Enzima a ser Usada em Bolos 108
3.2.2 - Ensaio utilizando CGTase e Agentes Aromatizantes em Bolos 110
3.2.3- Aplicação da CGTase da linhagem E16 e da CGTase Comercial em Bolos com Agentes Aromatizantes 111
4– Análise da Retenção do Aroma pelas CDs produzidas na Massa do Bolo 115
IV. CONCLUSÃO 119
V. BIBLIOGRAFIA 120

AGRADECIMENTOS

A Deus

por ter amenizado esta caminhada colocando verdadeiros anjos em meu caminho.

Aos anjos

um agradecimento especial a todos aqueles que nos últimos dois anos e meio participaram diretamente do meu amadurecimento profissional e pessoal.

Em especial ao anjo ***Heloiza*** *pela sua orientação e a quem devo grande parte deste trabalho, e que acredito ter realmente caiu do céu....*

muito obrigada!

Ao ***Prof. Dr. Roberto da Silva*** *pela confiança e por acreditar, apoiar e contribuir para a concretização deste sonho.*

Aos profs.

Dra. Ieda A. Pastre *e* ***Dr. Maurício Boscolo***

pela preciosa ajuda e orientação dispensados durante todo este trabalho.

À minha família *e* ***amigos***

Por me compreenderem e me suportarem durante este período tão complicado.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação apresenta-se dividida em três capítulos, sendo um de revisão bibliográfica e dois de planos de pesquisa, os quais estão em formato para publicações em revistas especializadas.

Um resumo do trabalho e uma introdução geral foram incluídos para orientar o leitor a respeito da relevância científica do trabalho.

O primeiro plano de trabalho, teve como objetivo o estudo da produção e caracterização do extrato bruto da enzima CGTase do *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, em diferentes tipos de fermentação e variando-se as fontes de carbono.

No segundo plano, objetivou-se a aplicação de uma enzima CGTase semi-purificada em produtos de panificação, visando à produção de ciclodextrinas diretamente na massa destes produtos, e ainda, se houve indícios de inclusão do aroma nas ciclodextrinas presentes nas massas.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

RESUMO

A ciclodextrina-glicosil-transferase (CGTase, EC 2.4.1.19) é uma enzima capaz de formar ciclodextrinas (CDs) a partir do amido. CDs são oligossacarídeos cíclicos compostos por unidades de glicose interligadas entre si por ligações do tipo α- 1,4. As mais comuns são do tipo α-, β- e γ- CD, que apresentam 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente. A β-CD é a mais utilizada nos processos industriais. A característica mais marcante das CDs é a capacidade de formar complexos de inclusão com uma grande variedade de substâncias. A substância encapsulada tem suas propriedades físico-químicas alteradas que resultam em melhor estabilidade, volatilidade, solubilidade ou biodisponibilidade. Esta dissertação é apresentada em três capítulos, sendo um de revisão bibliográfica e dois de planos de pesquisa. O primeiro plano de trabalho teve como objetivo o estudo da produção e caracterização do extrato bruto da enzima CGTase do *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, em diferentes tipos de fermentação e variando-se as fontes de carbono. Neste trabalho observamos que a fermentação submersa, meio A, foi a mais significativa para a produção de

CGTase pelo microrganismo em estudo, tendo o substrato polvilho a melhor produção enzimática. Ainda, a fermentação submersa (meio B) com fubá e a fermentação em estado sólido com farelo de trigo e fubá apresentaram uma significativa produção de CGTase, merecendo maiores estudos. Análises estatísticas apontaram 35ºC e 30ºC como as melhores temperaturas de cultivo e, 2% e 3% como as concentrações de substratos mais significativas para a produção da enzima. A caracterização da enzima apresentou pH ótimo de 7,0; pH de estabilidade na faixa de 5,0-8,5 por 24h, temperatura ótima de atuação entre 55º-60ºC e uma estabilidade térmica de 100% de atividade até a temperatura de 50ºC em 1h de incubação. No segundo plano, objetivou-se a aplicação de uma enzima CGTase semi-purificada em produtos de panificação, visando a produção de CDs diretamente na massa destes produtos; ainda, foi observado se houve indícios de inclusão do aroma de limão nas ciclodextrinas presentes nas massas. Os resultados encontrados foram: i) o uso da enzima CGTase, diretamente na massa de pães e bolos, resulta em produção de CDs; ii) o uso da CGTase na massa dos produtos de panificação não apresentou problemas relacionados à produção excessiva de dextrinas e por fim, iii) estudos preliminares indicaram uma possível complexação do aroma com as ciclodextrinas presentes nas massas dos produtos de panificação.

ABSTRACT

Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) is an enzyme capable of converting starch into CD molecule. Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides composed of glucose units jointed by α-1,4 linkages. The common types of cyclodextrins, α-, β- and γ- CD, consist of 6, 7 and 8 glucose units, respectively. β-CD has been the most used in various industrial process. The most important characteristic of CDs is the ability of forming inclusion complexes with a great variety of compounds. The encapsulated compound has its physical and chemical properties changed to improve stability, volatility, solubility or bioavailability. This study was divided in three chapters, the first is about one bibliographic review, and the other are about two research approaches. The aim of the first plan was to verify production and characterization of crude CGTase enzyme of *Bacillus* sp subgroup alcalophilus E16, in different kinds of fermentation and in different carbon sources. In this study, the first submerged fermentation (medium A) was the most significant to produce CGTase according to the microrganism analyzed, and cassava starch (polvilho doce) was the best substrate

for. In addition, the second submerged fermentation (medium B) with fine corn meal (fubá) and the solid-state fermentation with wheat bran and fine corn meal (fubá) showed a considerable production of CGTase, what deserves careful studies. Statistical analysis have pointed to 35°C and 30°C as the best temperatures of cultivation and to 2% and 3% as the most significant concentrations of substrates to the production of the enzyme. The characterization of CGTase showed optimum pH at 7,0; stability pH values from 5,0 to 8,5; optimum temperature of action at 55°-60°C; thermal stability 100% of activity up to temperature 50°C. In the second research plan, it was studied the application of a semi purified CGTase enzyme in bread making products, aiming at the production of CDs right into the bread dough. Also evidences which suggested flavor encapsulation with cyclodextrins found in this dough were analyzed. The results found were: i) the use of CGTase enzyme, directly in the process of making cakes and breads, resulted in the production of cyclodextrins; ii) the application of CGTase in dough of bread did not present problems concerning to the excessive production of dextrins (crumb soft and sticky); at last, iii) preliminary studies pointed to a possible complexation of flavor with the cyclodextrins present in dough of bread.

INTRODUÇÃO GERAL

O amido e a celulose são as duas fontes de carbono mais amplamente distribuídas na natureza. Depois da celulose, o amido é o principal carboidrato fotossintetizado pelas plantas. Muitas plantas produzem amido, polímero de glicose de alta massa molar, acumulado na forma de substância de reserva e constituindo uma fonte de carbono e energia essencial para muitos organismos (VAN DER VEEN et al., 2000). O amido é formado basicamente por dois distintos polímeros: amilose e amilopectina (figura 1.1 e 1.2). A amilose é essencialmente um polímero linear, constituído de unidades de glicose (α-D-glicopiranosil) unidas entre si por ligações α-1,4. A amilopectina é um polímero altamente ramificado, formado por cadeias de amiloses, interligadas por

aproximadamente 5% de ligações α-1,6, formando uma estrutura altamente ramificada (HAMILTON et al., 2000; RABALHO, 2002).

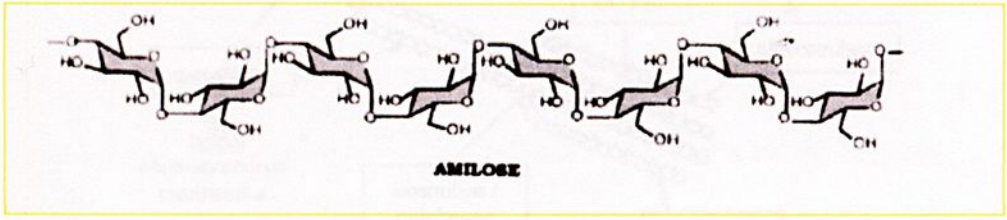


Figura 1.1: Representação da estrutura primária da amilose (RABALHO, 2002).

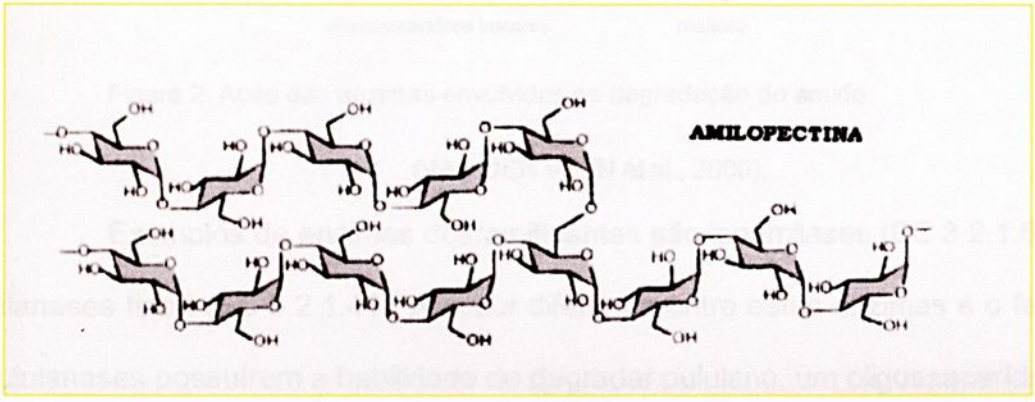


Figura 1.1: Representação da estrutura primária da amilopectina (RABALHO, 2002).

Historicamente, o amido era degradado utilizando-se ácidos minerais, mas a utilização de enzimas amilolíticas, em substituição às substâncias químicas, na produção de derivados de amido, tem crescido vertiginosamente (ALVES PRADO, 2000). Uma grande variedade de enzimas é capaz de degradar o amido (figura 2). As enzimas que degradam amido podem ser divididas em amilases (hidrolisam ligações α-1,4) e enzimas desramificantes (hidrolisam ligações α-1,6) (VAN DER VEEN et al., 2000).

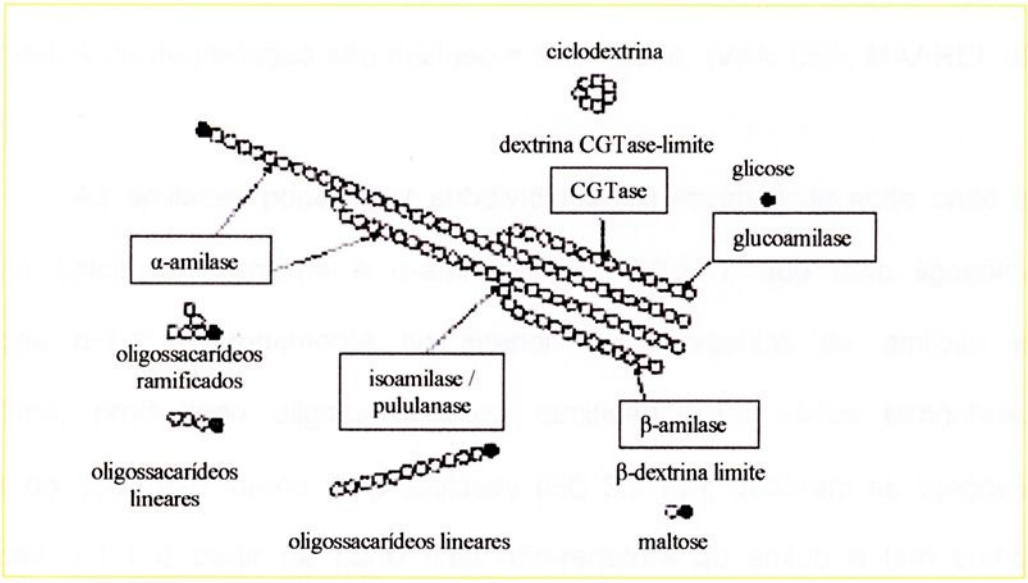


Figura 2: Ação das enzimas envolvidas na degradação do amido

(VAN DER VEEN et al., 2000).

Exemplos de enzimas desramificantes são isoamilases (EC 3.2.1.68) e pululanases tipo I (EC 3.2.1.41). A maior diferença entre estas enzimas é o fato das pululanases possuírem a habilidade de degradar pululano, um oligossacarídeo constituído de repetições de maltotriose unidos por ligações α-1,6. Pululanases hidrolisam ligações glicosídicas α-1,6 tanto em pululano e amilopectina, enquanto isoamilases podem somente hidrolisar as ligações α-1,6 na amilopectina. Ambas as enzimas só catalisam a degradação de moléculas de amilopectina no amido, e os produtos da degradação destas enzimas são oligossacarídeos lineares longos (VAN DER MAAREL et al., 2002).

Existem ainda, diversos tipos de pululanases que podem hidrolisar tanto ligações glicosídicas α-1,4 quanto α-1,6. Elas pertencem às pululanases do

grupo II, e são conhecidas como α-amilases-pululanases ou amilopululanases. Seus produtos da degradação são maltose e maltotriose. (VAN DER MAAREL et al., 2002)

As amilases podem ser subdivididas em enzimas de ação endo e exo. Uma típica endo-enzima é α-amilase (EC 3.2.1.1), que cliva ligações glicosídicas α-1,4 aleatoriamente no interior das moléculas de amilose e amilopectina, produzindo oligossacarídeos ramificados de vários tamanhos. Amilases de ação exo, como as β-amilases (EC 3.2.1.2), quebram as ligações glicosídicas α-1,4 a partir da parte final não-redutora do amido e tem como produtos da hidrólise somente oligossacarídeos de baixa massa molar (geralmente glicose ou maltose), (VAN DER VEEN et al., 2000).

Como as enzimas citadas são incapazes de clivar os pontos de ligações glicosídicas α-1,6 das moléculas de amilopectina, ocorre assim, uma degradação parcial do amido com formação de compostos de alta massa molar. Outras enzimas são necessárias para degradar esses compostos, as endo-enzimas amiloglucosidase ou glucoamilase (EC 3.2.1.3) e a α-glucosidase (EC 3.2.1.20) são capazes de degradar esses macro-compostos pois atuam tanto em ligações glicosídicas α-1,6 quanto em α-1,4, sendo que a quebra das ligações α-1,4 ocorre em velocidade bem menor quando comparada com as de α-1,6. Como produto da ação desta enzimas no amido, obtém-se moléculas de glicose. Glucoamilase e α-glucosidase diferem ainda em relação aos seus substratos de maior afinidade: α-glucosidase atua melhor em maltooligossacarídeos curtos,

enquanto glucoamilase age preferencialmente em polissacarídeos de cadeias longas. (VAN DER VEEN et al., 2000; VAN DER MAAREL et al., 2002).

Entre ainda as enzimas de ação exo que atuam no amido, a ciclodextrina-glicosil-transferase (CGTase, EC 2.4.1.19) vem apresentando grande importância industrial. A CGTase é uma enzima monomérica, com massa molar da ordem de 75 kD e que apresenta uma seqüência de aminoácidos que revela uma similaridade estrutural com a enzima α-amilase, sendo por isso considerada uma enzima da família das amilases (VETTER & THORN, 1992; NAKAMURA et al., 1994a; UITDEHAAG et al., 2002). Essa enzima catalisa a conversão do amido formando ciclodextrinas (CDs) por meio de reações reversíveis de transglicosilação intramolecular (ciclização). Exibe, ainda, atividade em reações de transglicosilação intermolecular (acoplamento e desproporcionamento) e, em menor intensidade, em reações de hidrólise de amido (VAN DER VEEN et al., 2001; VAN DER MAAREL et al., 2002; MARTINS & HATTI-KAUL, 2003;)

Estudos recentes, sobre enzimas CGTases de vários microrganismos, vêm sendo amplamente difundidos com relação à produção (ABELYAN et al., 2002), otimização (GAWANDE et al., 2003), purificação (MATIOLI et al., 1998, MARTINS & HATTI-KAUL, 2002), mecanismos de ação da enzima (LEEMHUIS et al., 2003; ABELYAN et al., 2004) e aplicação da enzima em produtos industriais, como papel e alimentos (BRUINENBERG et al., 1996; VAN EIJK & MUTSAERS, 1999).

As ciclodextrinas (CDs) são moléculas cíclicas formadas por monômeros de glicoses, unidos por ligações glicosídicas α-1,4. As CDs mais conhecidas são do tipo α-, β- e γ- CD, consistindo de seis, sete e oito monômeros de glicose, respectivamente. Estes monômeros estabelecem interações intermoleculares, formando um anel, conferindo rigidez à molécula de ciclodextrina (PSZCZOLA, 1988).

Em virtude da estrutura geométrica das ciclodextrinas, com a cavidade interna hidrofóbica e a região externa hidrofílica, é possível a formação de complexos de inclusão cristalinos com uma variedade de compostos sólidos, líquidos e gasosos. Esse fenômeno único, denominado como "inclusão molecular" pode melhorar as propriedades químicas e físicas da molécula encapsulada. As ciclodextrinas têm sido estudadas há aproximadamente um século e sua habilidade em formar complexos de inclusão, alterando as propriedades da molécula encapsulada, foi reconhecida há pelo menos 40 anos. Essa capacidade das CDs de formar complexos de inclusão, favorece um grande número de aplicações em indústrias de alimentos, de cosméticos, farmacêuticas, agroquímicas, químicas e outras (SINGH et al., 2002). Os efeitos benéficos proporcionados pelo uso de CDs incluem: proteger princípios ativos contra a oxidação pela luz, calor e volatilidade; mascarar, reduzir ou eliminar odores e sabores indesejáveis; estabilizar cores, tintas, aromas, vitaminas, temperos ou emulsões; aumentar a solubilidade de fármacos e substâncias químicas e transformar em pó alguns gases e líquidos (YU et al., 1988).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

A β-CD é a mais utilizada nos processos industriais, e recentemente obteve o titulo de "Substances Generally Recognized as Safe" (GRAS), e foi liberada para o uso como aditivo em alimentos e fármacos nos EUA. Outras CDs, ou as derivadas das mesmas, são pouco utilizadas em razão do alto custo, referente à baixa produtividade ou á difícil purificação. Os principais campos de aplicação das CDs na indústria alimentícia estão relacionados com a encapsulação de aromas e a extração de colesterol, mas outras aplicações nesse tipo de indústria são realizadas (ALLEGRE & DERATANI, 1994; SMITH et al, 1995; SZEJTLI, 1997). Em alguns alimentos prontos, a β-CD pode ser usada para mascarar o gosto amargo de proteínas hidrolisadas ou de alho. Os produtos ABB (*ant bady breath*- anti mau hálito) com pequenas quantidades de β-CD, são amplamente desenvolvidos no Japão na forma de tabletes ou gomas de mascar (ALLEGRE & DERATANI, 1994; SZEJTI,1997).

Esta dissertação apresenta-se dividida em três capítulos, sendo um de revisão bibliográfica e dois de planos de pesquisa. O primeiro plano de trabalho, teve como objetivo o estudo da produção e caracterização do extrato bruto da enzima CGTase do *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, em fermentação submersa e em estado sólido, variando-se as fontes de carbono.

No segundo plano objetivou-se a aplicação de uma enzima CGTase semipurificada em produtos de panificação, visando à produção de ciclodextrinas diretamente na massa destes produtos, e se houve indícios de encapsulação do aroma com as ciclodextrinas presentes nas massas.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1 – Ciclodextrina-glicosil-transferase (CGTase).

Muitas são as enzimas que encontram aplicação na indústria de processamento de amido, tanto para a modificação das moléculas de amido quanto para a produção de produtos específicos da degradação do mesmo. Essas enzimas são estudadas extensivamente, levando ao aumento do conhecimento de seus mecanismos e fatores de determinação do substrato e produto específicos. Uma enzima, particularmente interessante, é a Ciclodextrina-glicosil-transferase

(CGTase, EC 2.4.1.19), que possui a capacidade única de formação de ciclodextrinas a partir do amido (VAN DER VEEN et al., 2000).

A enzima ciclodextrina-glicosil-transferase catalisa a conversão do amido em ciclodextrinas por meio de reações reversíveis de transglicosilação intramolecular (ciclização). Exibe, ainda, atividade em reações de transglicosilação intermolecular (acoplamento e desproporcionamento) e, em menor intensidade, em reações de hidrólise de amido (VAN DER VEEN et al., 2001; VAN DER MAAREL et al., 2002; MARTINS & HATTI-KAUL, 2003). A CGTase é uma enzima monomérica, com peso molecular da ordem de 74,5 kD e que apresenta uma seqüência de aminoácidos que revela uma similaridade estrutural com a enzima α-amilase, sendo por isso considerada uma enzima da família das amilases (VETTER & THORN, 1992; NAKAMURA et al., 1994a; UITDEHAAG et al.; 2002).

1.1–Origem e Produção da CGTase:

O primeiro microrganismo descrito na literatura como produtor de CGTase foi o *Bacillus amylobacter*, com o qual Villiers, em 1891, observou estruturas cristalinas que mais tarde foram denominadas de dextrinas de Schardinger (FRENCH, 1957).

Em 1904, o *Bacillus macerans* (*Aerobacillus macerans*) foi isolado por Schardinger e a CGTase deste microrganismo foi estuda por Tilden e Hudson, em 1939. TILDEN e HUDSON (1942) estudaram 11 linhagens de *Bacillus*

macerans, e concluíram que todas elas produziam a enzima capaz de converter amido em dextrinas de Schardinger.

Desde a descoberta da CGTase, no meio de cultura de *B. macerans*, em 1939 e após os estudos de TILDEN e HUDSON (1942), vários outros autores voltaram suas pesquisas a microrganismos produtores de CGTase. A produção dessa enzima tem sido estudada em diversas linhagens de bactérias, tais como *B. circulans* (ABELYAN et al.; 2002 e 2004), *B. megaterium, B. macerans* (SHIBUYA et al, 2003; ABELYAN et al.; 2004) , *Klebsiella pneumoniae* (GAWANDE et al., 2003), *Klebsiella oxytoca* (LEE et al., 1992) e *B. stearothermophillus* (SHIBUYA et al, 2003). As enzimas obtidas a partir desses microrganismos apresentam diferentes propriedades, tais como estabilidade térmica, pH ótimo, peso molecular e capacidade de formação de CDs.

Na literatura, são citadas mais de 15 espécies de bactérias que produzem a CGTase e a maior parte delas pode ser classificada em dois grandes grupos: α-CGTase e β-CGTase. Até o presente momento, ainda não se têm relatos de uma CGTase específica para a produção de α, β ou γ-CD, mas muitos estudos são realizados nesta área na busca de uma CGTase produtora de um único tipo de ciclodextrina (GAWANDE et al., 2003). Sabe-se que *B.macerans* e *K. pneumoniae* produzem, preferencialmente, α-CD, enquanto bactérias alcalofílicas produzem, preferencialmente, β-CD no inicio da reação (MATIOLI et al., 2000).

Todas essas enzimas apresentam a desvantagem da baixa estabilidade térmica, o que é um fator limitante do ponto de vista industrial, além

de apresentarem um rendimento baixo. Isso fez com que as pesquisas se direcionassem para a busca de uma CGTase mais termoestável e/ou com maior rendimento na produção de CDs, ou ambos.

Em pesquisas realizadas no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (IBILCE/UNESP), foram isoladas linhagens de microrganismos produtores de CGTase. Um desses microrganismos, o *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, foi escolhido para este trabalho pelo fato de estudos anteriores mostrarem que esta é uma boa linhagem produtora de CGTase e forma preferencialmente β-CD (ALVES-PRADO, 2000).

Recentemente, muitas CGTases termoestáveis foram estudas e caracterizadas a partir de bactérias anaeróbicas termofílicas do gênero *Thermoanaerobacter* (ALCALDE et al., 2001) e *Thermoanaerobacterium* (LEEMHUIS et al., 2003). Essas enzimas são ativas e estáveis em altas temperaturas e baixos valores de pH, e são capazes de solubilizar o amido, portanto, eliminando a necessidade de um pré-tratamento com α-amilase, além de não apresentarem nenhum traço de oligossacarídeos de baixo peso molecular nos estágios inicias da reação, pois estes comprometem a produção de ciclodextrinas, sendo utilizados em reações de transglicosilação intermolecular (acoplamento e desproporcionamento) pela CGTase. O uso dessas enzimas termoestáveis tem tido como vantagem uma produção total de ciclodextrinas em menor tempo (VAN DER VEEN et al., 2000).

Em 1993, foi publicado por GEORGANTA e colaboradores o isolamento de cepas alcalofílicas produtoras de CGTase de lodo do fundo do mar. Essas cepas foram identificadas como do gênero *Bacillus*, e uma delas cresceu e produziu CGTase a 4ºC, sendo, portanto, um microrganismo psicrofílico.

O cultivo de microrganismos para a produção de CGTase geralmente é realizado em fermentação submersa, entretanto alguns trabalhos relatam a produção em fermentação em substrato sólido (RAMAKRISHNA et al., 1994; ALVES-PRADO, 2002; GAWANDE et al., 2003). A produção da enzima é, normalmente, realizada em condições aeróbias e, geralmente, em reator batelada com agitação. O tempo de cultivo depende do microrganismo. No geral, o cultivo demora de 2 a 3 dias, em temperaturas de 30 a 37ºC para os mesofílicos, e superior a 50ºC para os termofílicos. A faixa de pH varia de 6 a 10 (BENDER, 1986).

Os meios de cultura utilizados para as diferentes cepas são bastante complexos e variados. Os substratos mais usados são diferentes tipos de amido como: amido de milho, de batata, de trigo, de arroz e de mandioca (CHAROENLAP et al., 2004). Várias são as fontes de proteínas, nitrogênio e sais minerais adicionados aos meios.

CGTases são usualmente secretadas externamente no meio de cultura, embora atividade intracelular desta enzima também tenha sido relatada. Em muitos organismos produtores de CGTase, a enzima é produzida durante a

fase de crescimento exponencial e secretada na fase estacionária (GAWANDE et al., 2003). MATIOLI et al. (2000) em seu livro, citam que estudos com algumas cepas de *B. macerans* apontaram a localização extracelular da enzima, sendo que outras cepas do mesmo microrganismo apresentaram a enzima com sua localização intracelular. A produção intracelular da enzima foi associada à baixa concentração da enzima no início do cultivo, e concentrações mais altas de enzima somente apareceram na última fase de crescimento do microrganismo, provavelmente devido à ruptura de estruturas celulares. Já estudos com *Bacillus circulans* var. *alkalophilus* em relação à produção de CGTase, apontaram uma liberação ativa da enzima no meio de cultivo desde o início do crescimento microbiano, isto é , a partir da fase lag (MATIOLI et al., 2000).

1.2 –Aplicações industriais da CGTase:

As CGTases como mencionado anteriormente, produzem ciclodextrinas a partir do amido via reações de ciclização, que é a base de sua aplicação industrial. Em adição à produção de ciclodextrinas, pesquisas recentes são encontradas voltadas ao uso de CGTase como catalisadora de reações de acoplamento e desproporcionamento para a transferência de oligossacarídeos de um substrato doador, como o amido ou a própria ciclodextrina , para várias moléculas aceptoras, resultando em um novo componente glicosilado (VAN DER VEEN et al., 2000; SHIBUYA et al., 2003).

unesp

ABELYAN et al. (2004) relataram a ação de CGTases, provenientes de diversos grupos de microrganismos, na glicosilação do steviosídeo. Este composto, isolado da planta *Stevia rabaudiana*, possui baixas calorias e tem alto poder adoçante (250 a 300 vezes mais doce que o açúcar), mas possui um residual gosto amargo e baixa solubilidade. A transglicosilação catalisada pela CGTase resultou na diminuição do amargor do composto com o aumento de sua solubilidade.

Outra aplicação industrial da CGTase é encontrada na produção de papéis, onde é usada nos processos de formação da superfície e revestimento do papel, obtendo um melhoramento da qualidade do mesmo, com um papel de maior brilho e melhor superfície de impressão (BRUINENBERG et al., 1996; VAN DER VEEN et al., 2000).

Há ainda relatos da utilização da CGTase na indústria alimentícia, na preparação de massas de produtos de panificação, onde a incorporação da enzima na massa provocaria o aumento do volume do produto de panificação. (VAN EIJK & MUTSAERS, 1999; VAN DER VEEN et al., 2000; VAN DER MAAREL et al., 2002)

1.3 – Mecanismos de ação da CGTase:

Nos primeiros estudos, considerou-se que ação da amilase de *Bacillus macerans* (CGTase) era, essencialmente, a de degradar o amido,

formando as dextrinas de Schardinger, do mesmo modo que a β-amilase produz a maltose (FRENCH, 1957). Atualmente são conhecidos quatro tipos de reações catalisadas pela CGTase: ciclização, acoplamento, desproporcionamento e hidrólise (VAN DER VEEN et al., 2000; CHAROENLAP et al., 2004).

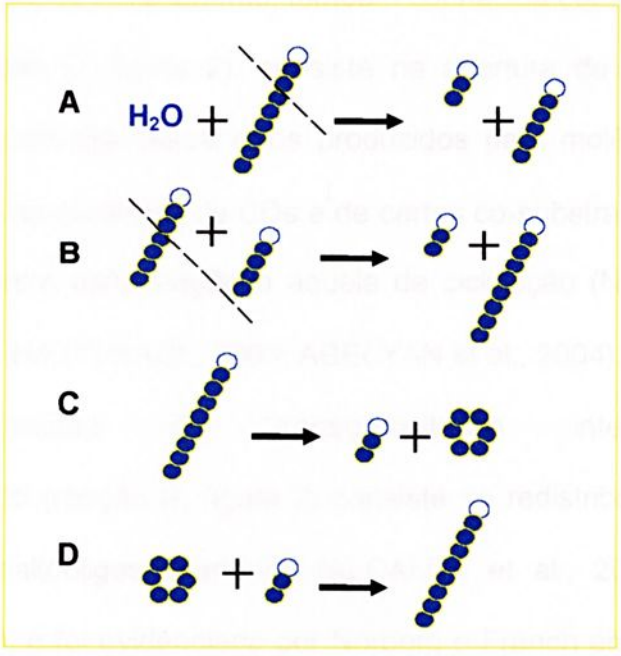


Figura 2: Esquema de representação de reações de catálise da CGTase. Os círculos azuis representam moléculas de glicose; as esferas brancas indicam a extremidade redutora final dos açúcares. (A) hidrólise; (B) desproporcionamento; (C) ciclização; (D) acoplamento (Modificado: VAN DER VEEN et al., 2000).

As ciclodextrinas são produzidas a partir do processo conhecido como ciclização ou transglicosilação intramolecular (reação C, figura 2). Nesse processo, parte da cadeia α-1,4-D-glicopiranosil, contida na extremidade não redutora, é transferida, via C1-OH para o aceptor C4-OH de um outro oligossacarídeo. A cadeia doadora envolvida na reação deve conter acima de seis

unidades de glicose. Nessa reação, a extremidade não redutora atua como receptor para a extremidade redutora (BENDER, 1986, VAN DER VEEN et al., 2000). Pode-se considerar que a reação de ciclização é um caso especial da reação de desproporcionamento.

A reação de acoplamento, também conhecida como transglicosilação intermolecular (reação D, figura 2), consiste na abertura do anel da CD com transferência dos maltooligossacarídeos produzidos para moléculas receptoras. Essa reação ocorre na presença de CDs e de certos co-substratos, existindo uma certa competição entre esta reação e aquela de ciclização (NAKAMURA et al., 1994a; MARTINS & HATTI-KAUL, 2003; ABELYAN et al., 2004).

A reação de transglicosilação intermolecular de desproporcionamento (reação B, figura 2) consiste na redistribuição de resíduos de glicose entre maltooligossacarídeos (ALCALDE et al., 2001; MARTINS & HATTI-KAUL, 2003), e foi evidenciada por Norberg e French em 1950 quando se observou que dextrinas lineares, na presença da amilase de *Bacillus macerans*, eram capazes de reagir entre si, e apresentavam uma redistribuição das unidades de glicose (SABIONI, 1992).

A quarta reação catalisada pela enzima CGTase é a de hidrólise (reação A, figura 2) do amido ou da própria ciclodextrina, mas esta ação hidrolítica ocorre em bem menor proporção quanto comparada com as demais reações (VAN DER VEEN et al., 2001, VAN DER MAAREL et al., 2002;MARTINS & HATTI-KAUL, 2003).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

1.4 – Estrutura molecular da CGTase:

A estrutura terciária da CGTase foi determinada por difração de raios-X (NAKAMURA et al., 1994a, HAGA et al., 1994) onde se observou que a estrutura tridimensional de α-amilases e CGTases eram muito similares. As α-amilases geralmente possuem três domínios estruturais: A, B e C. As CGTases apresentam, além dos três domínios citados anteriormente, dois domínios adicionais (D e E), ausentes nas α-amilases (figura 3). Portanto, as CGTases geralmente apresentam um peso molecular entre 70-75 kDa, enquanto as α-amilases tem um peso molecular de 45-55 kDa (WIND et al., 1995; VAN DER VEEN et al., 2000; NIELSEN & BORCHERT, 2000).

A CGTase é uma enzima monomérica, ou seja, composta de uma única cadeia de polipeptídios com aproximadamente 650 aminoácidos. Essa enzima não possui ligações intramoleculares por pontes de dissulfeto, mas necessita de cálcio para manter sua atividade catalítica (MATIOLI et al., 2000).



Figura 3: Estrutura tridimensional da CGTase de *Bacillus circulans* (NIELSEN & BORCHERT, 2000).

O domínio A, que as CGTases possuem em comum com outros membros da família α-amilase, é um domínio catalítico e também possui a função de ligação ao substrato. Esse domínio é conhecido como barril-$(\beta/\alpha)_8$ ou barril-TIM e detém em sua estrutura os resíduos de aminoácidos mais conservados dentre a família das α-amilases (NAKAMURA et al., 1994b). O domínio B também está relacionado à ligação da enzima aos substratos. O domínio C e E são especializados na ligação da enzima com grânulos de amido crus, sendo que o domínio C, nas CGTases, possui ainda um sítio de ligação com a maltose, sendo portanto ambos os domínios relacionados à ligação a substratos. A função do domínio D, apesar de ser uma estrutura tridimensional parecida com os domínios C e E, ainda não teve ainda sua função claramente elucidada (VAN DER VEEN et al., 2000; UITDEHAAG et al.; 2002).

2 – Ciclodextrinas (CDs).

O primeiro trabalho referente ao isolamento de uma substância reconhecida como CD foi feito em 1891 por Villiers (SINGH et al., 2002), que isolou uma pequena quantidade de uma substância cristalina a partir de um meio de cultura de *Bacillus amylobacter*, contendo amido. A substância cristalina foi denominada "celulosina" porque tinha aparência de celulose (ARMSPACH et al., 1999; MATIOLI et al., 2000).

Entre 1903 e 1911, Schardinger observou que uma linhagem de *Bacillus* chamada II, isolada de alimentos deteriorados, era resistente ao calor e tinha a capacidade de fermentar o amido com produção de duas dextrinas cristalinas. Uma delas era formada por cristais hexagonais, dextrina A, e a outra por prismáticos, dextrina B. Estas dextrinas não apresentaram poder redutor. Schardinger observou ainda, que a dextrina B era semelhante à celulosina de Villiers. Em 1904, Schardinger isolou a linhagem do *Bacillus macerans*, que, quando cultivado na presença de amido, produzia grandes quantidades de dextrinas cristalinas A e B, as quais foram denominadas de dextrina cristalina α e dextrina cristalina β. Schardinger também publicou a primeira descrição detalhada para a preparação e isolamento desses oligossacarídeos cíclicos (FRENCH, 1957).

Após 1911, os 24 anos seguintes não foram muito frutíferos no campo da pesquisa sobre a química das CDs. Nesse período, destacaram-se os pesquisadores Pingsheim e Karrer. A literatura é extensa, mas muito repetitiva, cheia de controvérsias e baseada em conceitos errôneos (FRENCH, 1957).

Por volta dos anos 30 até o inicio dos anos 70, a estrutura das CDs foi elucidada por Freudenberg e seu grupo. As propriedades de formação de complexos de inclusão foram estudadas, e numerosos derivados preparados, e ainda, diversas enzimas caracterizadas. Dentre os muitos pesquisadores, os nomes Cramer e French marcaram esse período (MATIOLI et al., 2000).

McCLENAHAN *et al.* (1942) observaram a conversão do amido de batata em dextrinas cristalinas de Schardinger pelo *Bacillus macerans*, o qual produzia um novo tipo de enzima presente no filtrado livre das células microbianas. FRENCH & RUNDLE (1942), por meio da difração de raio-X, estabeleceram o peso molecular e o número de unidades de glicose para as ciclodextrinas α e β.

Devido aos altos custos envolvidos, no final dos anos 60, a maior refinadora de milho americana abandonou a produção de CDs. Desde então, numerosas opções para a produção de CDs, por ação enzimática no amido, foram propostas na literatura e os processos de purificação foram aprimorando-se (PSZCZOLA, 1988).

Em 1969, a Corn Products International Co. produziu β-CD usando a CGTase de *Bacillus macerans*. A Teijin Ltd. no Japão, também produziu β-CD, usando a mesma enzima em uma planta piloto, mas sérios problemas foram encontrados em ambos os processos. A CGTase de *Bacillus macerans* não foi adequada para a aplicação industrial, por não ser suficientemente termoestável. Desse modo, os rendimentos de produção em CD a partir do amido, eram baixos: 20 a 30% em escala industrial, (HORIKOSHI, 1996).

As CDs passaram a ser utilizadas na indústria alimentícia a partir da década de 70, quando Japão e Hungria iniciaram sua produção com propósitos comerciais (SZEJTLI, 1982; PSZCZOLA, 1988). As CDs foram aprovadas como aditivos específicos na Bélgica, França, Alemanha, Itália, Luxemburgo, Holanda e

Espanha. Estudos realizados por TOYODA et al. (1997), relacionados à ingestão de altas doses de β-CD por ratos em 104 semanas, levaram a conclusão de não haver potencial carcinogênico nesta ingestão.

Nos EUA, o U.S.Food and Drugs Administration (FDA) outorgaram à β-CD (2001) e γ-CD (2000) o titulo de Substances Generally Recognized as Safe (GRAS), sendo liberadas para o uso como aditivo em alimentos e fármacos. Todos os três tipos de CDs (α, β e γ) são aprovados na Hungria, Japão e Holanda como aditivos diretos em alimentos e medicamentos não-controlados. Na Austrália, a Australia Food Standards Code, permite o uso da β-CD para a extração de colesterol em ovos, mas não na complexação de aromas (PSZCZOLA, 1988; STARNES, 1990; SHUKLA, 1991; ALLEGRE & DERATANI, 1994, ALVES-PRADO, 2000).

No Brasil, o uso de ciclodextrina é encontrado no medicamento brexin® , antigo cicladol®, onde temos o complexo β-CD - piroxicam. No mercado brasileiro, ainda, é permitido pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) a venda e o consumo de aromas complexados em β-CD.

Atualmente, pesquisas sobre a utilização de ciclodextrinas são muito difundidas em várias áreas: alimentos, fármacos, química, cosmética e médica (SINGH et al., 2002). Recentes trabalhos realizadas nos Estados Unidos, descobriram que a aplicação da β-CD dentro da vagina de ratos antes da inoculação com células infectadas por HIV reduziam substancialmente a transmissão (KHANNA et al., 2002). Na Espanha, pesquisas mostraram a

utilização do fármaco itraconazol complexado em ciclodextrina no tratamento de dermatoses fúngicas (PALACIO et al., 2002).

Há aproximadamente 30 anos, eram publicados, por mês de 8 a 10 artigos e patentes referentes à CDs. Há 10 anos, esse número aumentou para a faixa de 20 a 25 publicações mensais e, até julho de 1996, cerca de 130 novos artigos, patentes e resumos em conferências foram dedicados a essa molécula, mensalmente. Em 1996, o número de publicações referentes às CDs foi avaliado em cerca de 13.000 (SZEJTLI, 1997).

Segundo os resumos contidos na *CD-News*, de janeiro a novembro de 1994, das 1072 publicações listadas, 25,7% foram dedicadas a aplicações farmacêuticas das CDs; 20% à química analítica, dedicando-se principalmente a separações cromatográficas; 19,4% à química dos complexos de CDs; 17,5% foram dedicados a enzimologia, a efeitos biológicos e à produção de CD natural e modificada; 10% a produtos e processos químicos e bioquímicos; 6% à indústria de alimentos e cosméticos. Apesar do número modesto de publicações científicas, cerca de 70% da CD mundialmente produzida é destinada ao setor alimentício e de cosméticos, necessitando de aproximadamente 20 – 40 toneladas/ano de CD (SZEJTLI, 1997).

A utilização de ciclodextrina complexada a fármacos, aromas e inseticidas vem sendo pesquisada no Brasil. Na UNICAMP, em 2001, foi apresentado um estudo sobre o uso de ciclodextrinas como carreadora de praziquantel (fármaco utilizado no tratamento de esquistossomose e outros

helmintos), para melhorar a biodisponibilidade do principio ativo do fármaco que é pouco solúvel (JESUS et al., 2001) e, em 2003, o estudo de encapsulação de bioaromas de gorgonzola em β-CD foi apresentado em tese de doutorado (MARTINS, 2003). Ainda, na UEM, BERGAMASCO (2003) pesquisou a redução da perda de sulfluramida por sublimação na produção de inseticida, por meio do aumento da estabilidade desta molécula via encapsulação molecular com ciclodextrinas.

2.1 – Características e Propriedades das CDs:

As ciclodextrinas (cicloamilose, ciclomaltose, dextrinas de Schardinger, cG, CDs) são maltooligossacarídeos cíclicos, produzidos a partir do amido, pela ação da CGTase (EC 2.4.1.19) de algumas espécies microbianas. As principais e mais comuns ciclodextrinas são compostas de seis (α-CD, ciclohexamilose, ciclomaltohexaose, cG_6), sete (β-CD, cicloheptamilose, ciclomaltoheptaose, cG_7) e oito (γ-CD, ciclooctamilose, ciclomaltooctaose, cG_8) unidades de D-glicose unidas por ligações α-1,4 (figura 4) (VAN DER VEEN et al., 2000; SHIBUYA et a.l., 2003, GAWANDE et al., 2003).

As ciclodextrinas com mais de oito unidades de D-glicose são mais raras, mas FRENCH (1957) já mencionava a existência de ciclodextrinas com até dez unidades de glicose. Entretanto, devido à baixa produção e dificuldade de purificação, estas CDs não foram inteiramente caracterizadas. Somente

recentemente, CDs com 9 a 19 unidades de glicose, denominadas de δ-, ε-, ζ-, η-, θ-, ι-, κ-, λ-, μ-, ν- e ξ-CDs foram caracterizadas e purificadas (LARSEN & ZIMMERMANN, 1999).

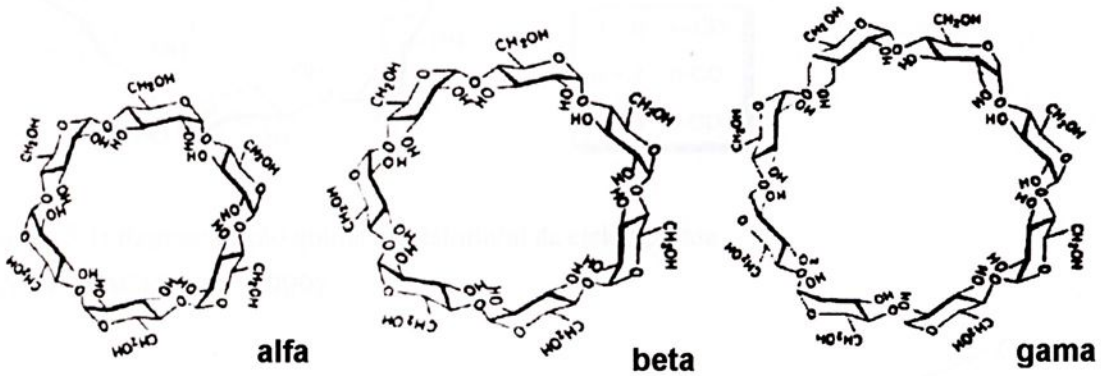


Figura 4: Estruturas da α-CD, β-CD e γ-CD

(VAN DER VEEN et al., 2000).

Nas ciclodextrinas, os grupos de hidroxilas secundários (nos átomos de carbono C_2 e C_3 das unidades de glicose) estão situados de um lado do anel e todas as hidroxilas primárias (nos átomos de carbono C_6) do outro lado (figura 5.1), (ARMSPACH et al., 1999). O lado das hidroxilas secundárias é mais largo que o lado das hidroxilas primárias. A rotação livre das hidroxilas primárias reduz o diâmetro efetivo da cavidade no lado onde elas ocorrem, enquanto o grupo de hidroxilas secundárias apresenta uma cadeia relativamente rígida, sem rotação. Como conseqüência, as CDs não são moléculas perfeitamente cilíndricas, mas apresentam a forma de cone truncado (figura 5.2), (PSZCZOLA, 1988; VAN DER VEEN et al., 2000).

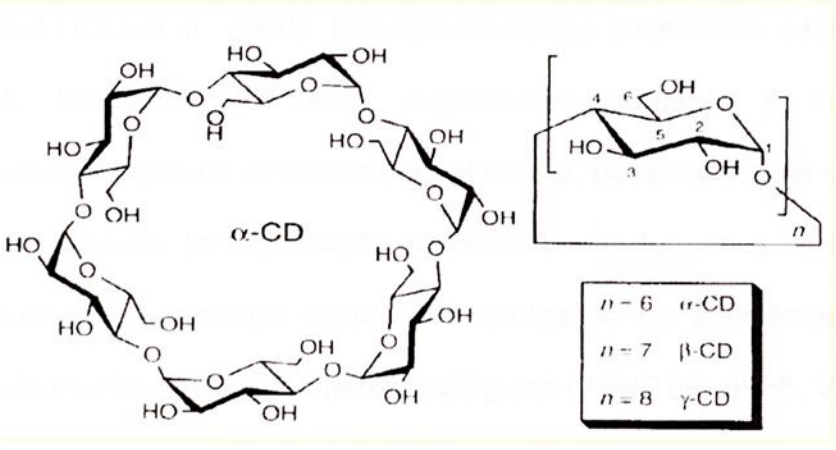


Figura 5.1: Representação química e estrutural da ciclodextrina (ARMSPACH et al., 1999).

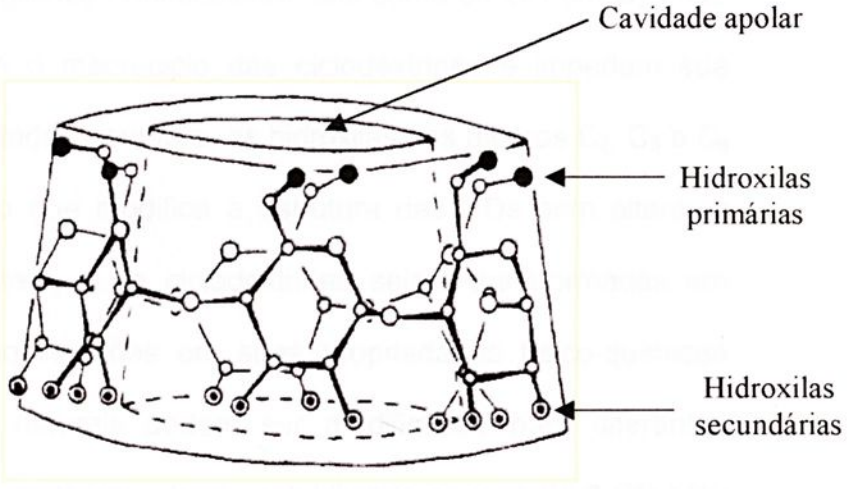


Figura 5.2: Aspecto da estrutura anelar de uma ciclodextrina (PSZCZOLA, 1988).

Essa conformação molecular faz ainda, com que as CDs apresentem um caráter hidrofílico no lado externo da molécula. Enquanto a superfície externa possui natureza hidrofílica, os pares de elétrons livres dos oxigênios envolvidos em ligações glicosídicas são dirigidos para o interior da cavidade, proporcionando uma elevada densidade eletrônica e, por conseqüência, um caráter apolar

(MATIOLI et al., 2000). Tais características possibilitam a formação de complexos de inclusão com várias substâncias orgânicas e inorgânicas, que são encapsuladas na cavidade central da CD, podendo formar cristais. Os complexos de inclusão (encapsulação molecular) são formados e existem em soluções aquosas, permitindo assim, a investigação de substâncias hidrofóbicas muito importantes para os sistemas biológicos (BENDER, 1986; VAN DER VEEN et al., 2000).

Há muitas pontes de hidrogênio intramoleculares entre as hidroxilas secundárias de unidades de glicose consecutivas, tais como os OH em C_2 e C_3. Essas interações estabilizam o macrociclo das ciclodextrinas e impedem sua hidratação. Por estarem orientadas para fora, as hidroxilas nos átomos C_2, C_3 e C_6 podem sofrer ataque químico que modifica a estrutura das CDs sem alterar a cavidade central. Isso permite que as ciclodextrinas sejam transformadas em derivados (figura 6), com modificações em suas propriedades físico-químicas (SINGH et al., 2002). CDs naturais podem ser modificadas para diferentes propósitos, por exemplo, para melhorar a baixa solubilidade aquosa da β-CD e/ou para diminuir a toxidade em aplicações parenterais. Os grupos hidroxilas das CDs são utilizados como pontos iniciadores das modificações estruturais e vários grupos funcionais têm sido incorporados nas moléculas de CD. Por exemplo, CDs alquiladas e hidroxialquiladas são preparadas para se obter um melhor carreador de fármacos. Outros exemplos são os polímeros de CD e as CDs ramificadas (BEKERS et al., 1991; SINGH et al., 2002).

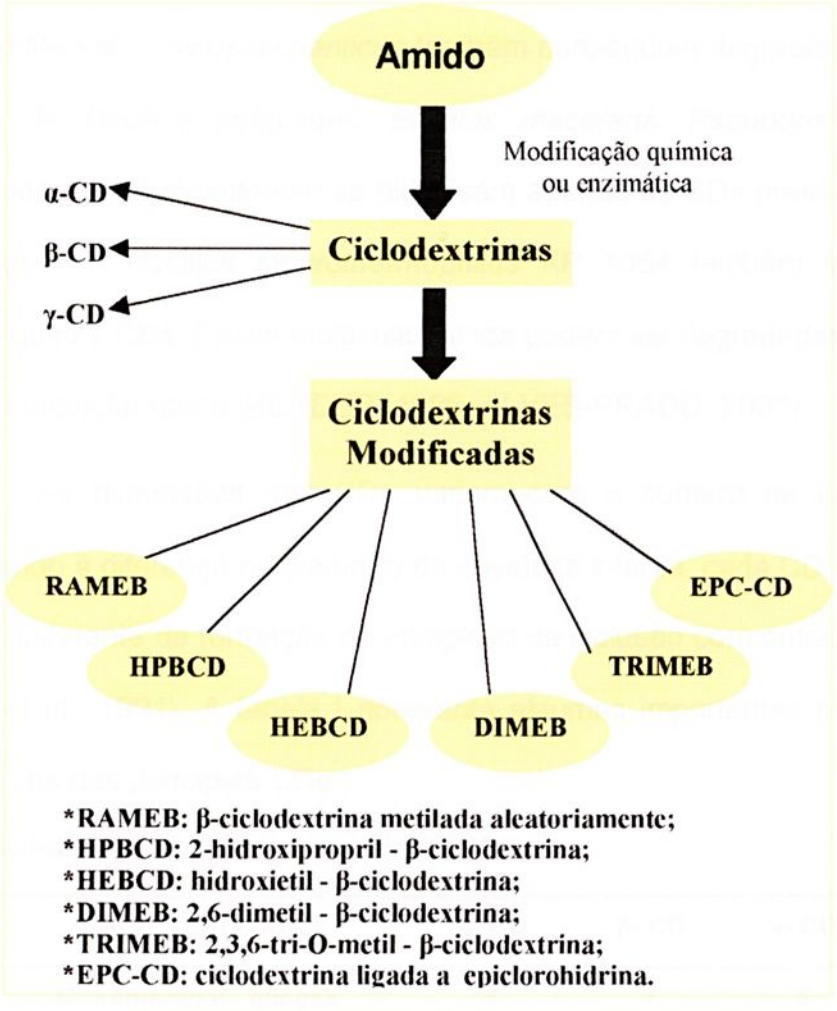


Figura 6: Tipos mais comuns de CDs e os modificadas a partir destas. (SINGH et al., 2002).

Em comparação com o correspondente maltooligossacarídeo linear, as CDs são moléculas muito estáveis. Pelo fato de serem circulares, não apresentam extremidade redutora e não redutora. Desta forma, as CDs não podem ser degradadas por enzimas com ação do tipo exo. Além das CGTases, apenas poucas enzimas podem abrir o anel das CDs, sendo uma delas as Ciclomaltodextrinases (CDase, EC 3.2.1.54) (PARK et al., 2000, HASHIMOTO et al., 2001). As α-amilases produzidas por *Aspergillus oryzae, Bacillus subtilis* e

Bacillus subtilis var. *amylossachariticus* também conseguem degradar CDs. Já as α-amilases de *Bacillus coagulans*, *Bacillus macerans*, *Pseudomonas* Msl e glucoamilases de *Flavobacterium* sp hidrolisam apenas as CDs presas ao amido. A exoamilase de *Bacillus stearothermophilus* KP 1064 também é capaz de hidrolisar algumas CDs. Essas moléculas ainda podem ser degradadas por ácidos fortes e por radiação gama (BENDER, 1986; ALVES-PRADO, 2000).

As dimensões das CDs variam com o número de unidades de glicose. Devido à diferença no diâmetro da cavidade interna, cada CD mostra uma capacidade diferente de formação do complexo de inclusão com outras moléculas (BEKERS et al., 1991). A tabela I apresenta algumas importantes propriedades físico-químicas das principais CDs.

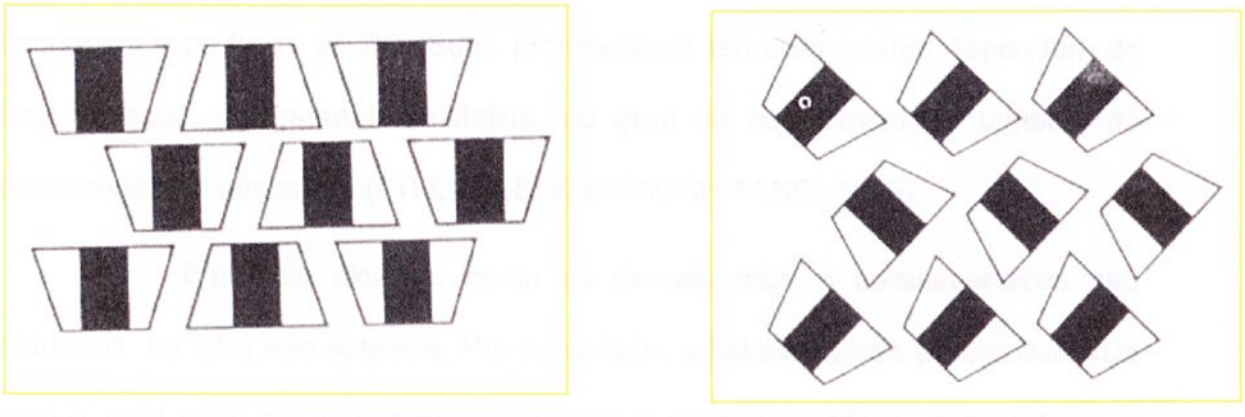
Tabela I: Propriedades físico-químicas das principais CDs.

CARACTERÍSTICAS	α- CD	β- CD	γ- CD
Monômeros de glicose	6	7	8
Massa molar	972	1135	1297
Diâmetro da cavidade interna (Å)	5,7	7,8	9,5
Volume da cavidade interna($Å^3$)	174	262	427
Diâmetro externo (Å)	14,6 ± 0,4	15,4 ± 0,4	17,5 ± 0,4
Solubilidade em água (g/L – 25^{0}C)	145	18,5	232
Forma dos cristais (60% propanol)	hexagonal	monoclínico	quadrado
Moléculas de água na cavidade	6	11	17
Rotação específica $[\alpha]_D^{25}$	150,5^0	162,5^0	177,4^0

Fonte: ALVES-PRADO (2000).

unesp

A solubilidade das CDs aumenta rapidamente com a elevação da temperatura, o que permite uma recristalização fácil quando do abaixamento da temperatura. A disposição de moléculas CD, em arranjo cristalino, pode ser de dois tipos: as moléculas podem arranjar-se formando uma estrutura em gaiola ou em canal. Nas estruturas em gaiola, a cavidade de cada CD é bloqueada dos dois lados pelas moléculas adjacentes de CD, isolando, assim, cada uma das cavidades. Nesse tipo de arranjo cristalino, as CDs podem ser dispostas em padrões com forma de cruz, bloco ou espinha de peixe (figura 8.1). Nas estruturas em canal, as moléculas se alinham umas sobre as outras como uma pilha de moedas. As moléculas inclusas ficam dentro dos canais "infinitos", formados pelo alinhamento linear das cavidades. Esses alinhamentos podem ser "cabeça-cabeça" ou "cabeça-cauda", como demonstrado na figura 8.2 (CITERNESI & SCIACCHITANO, 1995, ARMSPACH et al., 1999).



A B

Figura 8.1: Estruturas em gaiola: bloco (A) e espinha de peixe (B) (ARMSPACH et al., 1999).

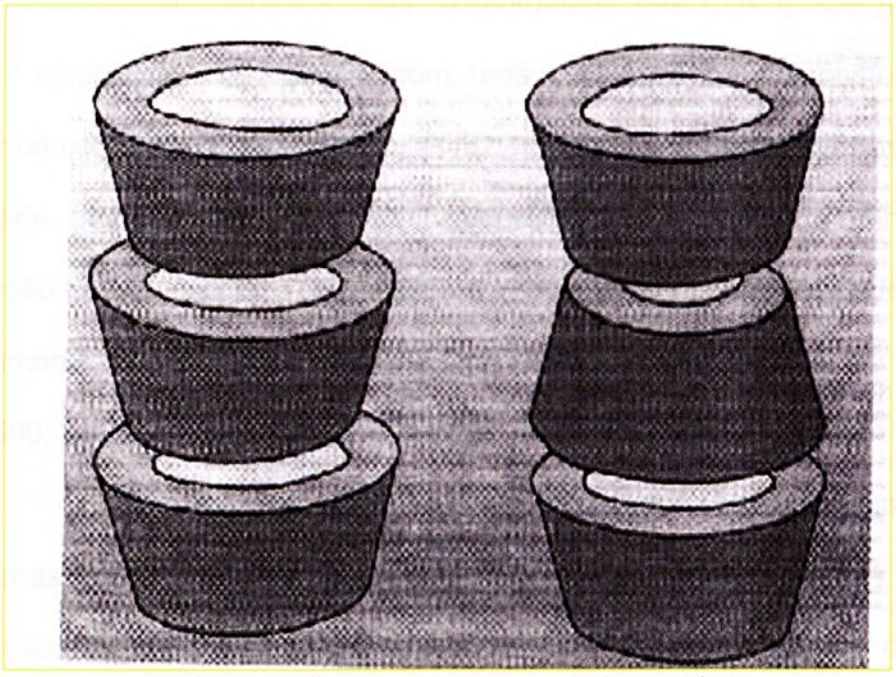


Figura 8.2: Estrutura de canal cabeça-cauda e cabeça-cabeça (CITERNESI & SCIACCHITANO, 1995).

As CDs não têm ponto de fusão definido, mas começam a se decompor a partir de 200ºC. Suas propriedades térmicas exatas dependem do teor de água, da estrutura cristalina, do grau de aquecimento e também da composição da atmosfera (CITERNESI & SCIACCHITANO, 1995).

Em meio alcalino, como os demais oligo e polissacarídeos não redutores, as CDs são estáveis. Por outro lado, a hidrólise ácida parcial das CDs produz uma série de maltooligossacarídeos e glicose. Contudo, a resistência à hidrólise ácida das CDs é de 3 a 5 vezes maior (dependendo da temperatura e da acidez) que aquelas das dextrinas lineares correspondentes (BENDER, 1986).

2.2 – Inclusão Molecular:

A característica mais extraordinária das CDs é sua habilidade de formar complexos de inclusão com uma variedade de compostos, isto é, o aprisionamento de várias moléculas externas (moléculas hóspedes) dentro da cavidade de uma CD (molécula hospedeira). A necessidade mínima para a formação desse complexo de inclusão é que a molécula hóspede deve se adequar inteiramente, ou ao menos parcialmente, dentro da cavidade da CD (MATIOLI et al., 2000; SINGH et al., 2002).

Complexos estáveis não são formados com moléculas hóspedes pequenas, porque estas escapam do interior da cavidade. Também é impossível a formação de complexos com moléculas que não possam penetrar na cavidade das CDs, mas, se certos grupos ou cadeias laterais da molécula volumosa conseguem se acomodar na cavidade da CD, a formação do complexo de inclusão se torna possível. Usualmente, são formados os complexos 1:1 (CD: hóspede), mas, quando uma molécula hóspede é muito longa para se acomodar em uma cavidade, e a sua outra extremidade também é responsável pela formação do complexo, assim, podem ser formados os complexos 2:1; 2:2; 3:1; 3:2; 4:5, etc. Contudo é possível formar complexos 1:2 (CD: hóspede), isso é muito comum nas γ-CDs, devido ao maior diâmetro de sua cavidade interna, quando comparada as outras CDs. Não somente à estequiometria, mas também a polaridade das moléculas hóspedes determinam se a inclusão pode ocorrer. Em geral, moléculas

hidrofóbicas ou alguns resíduos hidrofílicos tem a mais alta afinidade pela cavidade da CD em solução aquosa (BEKERS et al., 1991).

Na ausência da molécula hóspede, a cavidade hidrofóbica é ocupada por moléculas de água. Contudo, uma molécula hóspede específica, quando adicionada à solução de CD, expulsa as moléculas de água e ocupa ela própria esta cavidade. A figura 9 apresenta um exemplo típico de complexação, em que moléculas de água internas à cavidade da CD no inicio da reação são substituídas pela molécula de *p*-xileno (CITERNESI & SCIACCHITANO, 1995; VAN DER VEEN et al., 2000)

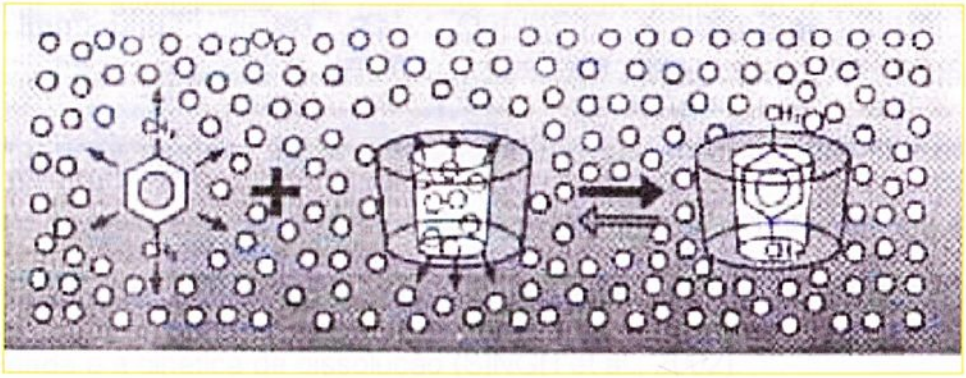


Figura 9: Representação esquemática da formação do complexo de inclusão (CITERNESI & SCIACCHITANO, 1995).

Segundo Tabushi e colaboradores (1978), as CDs exibem um comportamento semelhante ao de uma enzima, em relação ao substrato ligante, sugerindo que existe uma interação específica entre a ciclodextrina e a molécula hóspede. Ainda existem muitas dúvidas a serem esclarecidas, tais como a natureza da força de ligação, a natureza da estrutura da água em torno ou próxima do complexo de inclusão, a dinâmica molecular de inclusão, entre outras.

Esses autores, pesquisando a encapsulação molecular, concluíram que as interações de Van der Waals, a energia de conformação e os grupamentos de água governam o processo de inclusão (MATIOLI et al., 2000).

Um dos principais campos de aplicação das CDs na indústria de alimentos, com relação à inclusão de componentes, está relacionada a inclusão de agentes aromatizantes, freqüentemente de alto valor comercial, e à extração do colesterol de certos alimentos, por meio do processo de inclusão deste nas CDs. Outras aplicações na indústria de alimentos estão relacionadas a: adoçantes, extratos de plantas, óleos, vitaminas e anti-sépticos. Na prática, a inclusão pode aumentar a estabilidade da molécula hóspede frente ao calor, levando à diminuição da volatilidade ou aumentando a resistência térmica. Pode, também, aumentar a estabilidade frente à oxidação e, ainda, diminuir o poder irritante ou disfarçar o gosto amargo e cheiros desagradáveis de determinados compostos. Para compostos relativamente insolúveis em água, a inclusão pode melhorar a solubilidade e a cinética de dissolução (SINGH et al., 2002).

unesp

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELYAN, V.A., BALAYAN, A.M., MANUKYAN, L.S., AFYAN, K.B., MELIKSETYAN, V.S., ANDREASYAN, N.A., MARKOSYAN, A.A. Characteristics of cyclodextrin production using cyclodextrin glucanotransferases from various groups of microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology,* v. 38 (6), p. 527-535, 2002.

ABELYAN, V.A., BALAYAN, A.M., GHOCHIKYAN, V.T., MARKOSYAN, A.A. Transglycosylation of stevioside by cyclodextrin glucanotransferases of various groups of microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology,* v. 40 (2), p. 129-134, 2004.

ALCALDE, M., PLOU, F.J., MARTIN, M.T., VALDÉS, I., MÉNDEZ, E., BALLESTEROS, A. Succinylation of cyclodextrin glucanotransferases from *Thermoanaerobacter* sp. 501 enhances its transferase activity using starch as donor. *Journal of Biotechnology,* v. 86, p. 71-80, 2001.

ALLEGRE, M., DERATANI, A. Cyclodextrin uses: from concept to industrial reality. *Agroo Food Industry Hi-Tech.*, January/February, p. 9-17, 1994.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

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, p.188.

ALVES PRADO, H. F., HILÁRIO, E., GOMES, E., DA SIILVA, R. Seleção de microrganismos produtores de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produção e caracterização da enzima. *Brazilian Journal of Food Technology,* v. 5, p. 189-196, 2002.

ARMSPACH, D., GATTUSO, G., KÄNIGER, R., STODDART, J.F. Cyclodextrins. *In Bioorganic Chemistry: Carbohydrates*. ED. S.M. Hecht, Oxford University Press, New York, p.458-488, 1999.

BEKERS, O., UIJTENDAAL, E.V., BENIJNEN, J.H. *Cyclodextrins in the pharmaceutical field. Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 17, p.1249-1270, 1991.

BENDER, H. Production, characterization, and application of cyclodextrins. *Advances in Biotechnological Processes*, v.6, p. 31-71, 1986.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

BERGAMASCO, R.C. Complexação de sulfluramida em ciclodextrinas. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, 2003, p.74.

BRUINENBERG, P.M., HULST, A.C., FABER, A., VOOGD, R.H. A process for surface sizing or coating of paper. *Eur. patente application EP 0690170 AL*, 1996.

CHAROENLAP, N., DHARMSTHITI, S., SIRISANSANEEYAKUL, S., LERTSIRI, S. Optimization of cyclodextrin production from sago starch. *Bioresearch Technology*, v.92, p.49-54, 2004.

CITERNESI, U., SCIACCHITANO, M. Ciclodextrinas em dermocosméticos funcionais. *Cosmetics & Toiletries*, v.7, p. 50-55, 1995.

FRENCH, D., RUNDLE, R.E. The molecular weights of the Schardinger alfa and beta dextrins. *Journal of the American Chemical Society*, v 64, p. 1651, 1942.

FRENCH, D. The Schardinger Dextrins. *Advances in Carbohydrate Chemistry,* v.12, p.189-260, 1957

GAWANDE, B.N., SONAWANE, A.M., JOGDAND, V.V., PATKAR, A.Y. Optimization of cyclodextrin glicosiltransferase production from *Klebsiella pneumoniae* AS-22 in batch, fed-batch and continuous cultures. *Biotechnology Progress*, v. 19, p. 1697-1702, 2003.

GEORGANTA, G., KANEKO, T., NAKAMURA, N. Isolation and partial properties of cyclodextrin glicosiltransferase producing alkalophilic *Bacillus spp.* from a deep-sea mud sample. *Starch/Stärke,* v. 45, p. 95-99, 1993.

HAGA, K., HARATA, K., NAKAMURA, A., YAMANE, K. Crystallization and preliminary X-ray studies of cyclodextrin glycanotransferase from alkalophilic *Bacillus sp.* 1011. *Journal of Molecular Biology,* v. 237, p.163-164, 1994.

HAMILTON, L.M., KELLY, C.T., FOGARTY, W.M. Review: cyclodextrins and their interaction with amylolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology,* v. 26, p.561-567, 2000.

HASHIMOTO, Y., YAMAMOTO, T., FUJIWARA, S., TAKAGI, M., IMANAKA, T. Extracellular synthesis, specific recognition, and intracellular degradation of cyclomaltodextrins by the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. strain B1001. *Journal of Bacteriology*, v 183, p. 5050-5057, 2001.

HORIKOSHI, K. Alkaliphiles – from an industrial point of view. *FEMS Microbiology Reviews*, v.180, p. 259-270, 1996.

JESUS, M.B., ALVES PINTO, L.M., DE PAULA, E. Caracterização do complexo sólido praziquantel em β-ciclodextrina. Congresso Interno de Iniciação Cientifica da UNICAMP, 2001.

KHANNA, K.V., WHALEY, K.J., ZEITHIN, L., MOENCH, T.R., MEHRAZAR, K., CONE, R.A., LIAO, Z., HILDRETH J.E.K., HOEN, T.E., SHULTZ, L., MARKHAM, R.B. Vaginal transmission of cell-associated HIV-1 in the mouse is blocked by a topical, membrane-modifying agent. *Journal of Clinical Investigation*, v.109 (2), p. 205-211, 2002.

LARSEN, K. L., ZIMMERMANN, W. Analysis and characterization of cyclodextrins and their inclusion complexes by affinity capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v.836, p.3-14, 1999.

LEE, J. H.; CHOI, K. H.; LEE, Y. S.; KWON, I.B. and 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.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

LEEMHUIS, H., DIJKSTRA, B.W., DIJKHUIZEN, L. *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* cyclodextrin glycosyltransferase: mechanism and kinetics of inhibition by acarbose and cyclodextrins. *European Journal of Biochemistry, v.* 270, p. 155-162, 2003.

MARTINS, F. Estudo do processo de encapsulação do bioaroma de gorgonzola em β-ciclodextrina e em lipossomas. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2003, p.174.

MARTINS, R. F., HATTI-KAUL, R. A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkalophilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, p. 116-124, 2002.

MARTINS, R. F., HATTI-KAUL, R. *Bacillus agaradhaerens* LS-3C cyclodextrin glycosyltransferase: activity and stability features. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, p. 819-827, 2003.

MATIOLI, G.; ZANIN, G.M.; GUIMARÃES, M.F., DE MORAES, F.F. Production and purification of CGTase of alkalophilic *Bacillus* isolate from Brazilian soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology,* v. 70-72, p. 267-275, 1998.

MATIOLI, G.; ZANIN, G.M.; DE MORAES, F.F. Ciclodextrinas: e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais. Maringá: Eduem, 2000, p 124.

McCLENAHAN, W.S., TILDEN, E.B. and HUDSON, C.S. A study of the products obtained from starch by the action of the amylase of *Bacillus macerans*. *Journal of the American Chemical Society*, v. 64, p. 2139-2144, 1942

NAKAMURA, A., HAGA, K., YAMANE, K. The transglycosylation reaction of cyclodextrin glucanotransferase is operated by a ping-pong mechanism. *FEBS Letters*, v. 337, p. 66-70, 1994a.

NAKAMURA, A., HAGA, K., YAMANE, K. Four aromatic residues in the active center of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic Bacillus sp. 1011: effects of replacements on substrate binding and cyclization characteristics. *Biochemistry*, v. 33, p.9929-9936, 1994b.

NIELSEN, J.E., BORCHERT, T.V. Protein engineering of bacterial α-amylases. *Biochimica et Biophysica Acta,* v. 1543, p.253-274, 2000.

PALACIO, A., GARAU, M., CUÉTARA, M.S. Tratamiento actual de las dematofitosis. *Revista Iberoamericana de Micología,* v. 19, p.68-71, 2002.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

PARK, K., KIM, T., CHEONG, T., KIM, J., OH, B., SVENSSON, B. Structure, specificity and function of cyclomaltodextrinase, a multispecific enzyme of the α-amylase family. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1478, p.165-185, 2000.

PSZCZOLA, D. E. Production and potential food applications of cyclodextrins. *Food Technology*. January, p.96-100, 1988.

RABALHO, A.A. Isolamento de linhagens microbianas termofílicas amilolíticas, produção, caracterização e aplicação das amilases na hidrólise do amido de mandioca. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, 2002, p.172.

RAMAKRISHNAA, S.V., SASWATHI, N., SHEELA, R., JAMUNA, R. Evaluation of solid, slurry, and submerged fermentations for the production of cyclodextrin glycosyltransferase by *Bacillus cereus*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 16 (5), p. 441-444, 1994.

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.

SHIBUYA, T., AGA, H., WATANABE, H., SONODA, T., KUBOTO, M., FUKUDA, S., KURIMOTO, M., TSUJISAKA, Y. Transglycosylation of glycosyl residues to cyclic tetrasaccharide by *Bacillus stearothermophillus* cyclomaltodextrin glucanotransferase using cyclomaltodextrin as the glycosyl donor. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.67, n.5, p.1094-1100, 2003.

SHUKLA, T. P. Industrial research on cyclodextrins. *Cereal Foods World*, v.36, n.4, p.387, 1991.

SINGH, M., SHARMA, R., BANERJEE, U.C. Biotechnological applications of cyclodextrin. *Biotechnology Advances*, v.20, p.341-359, 2002.

SMITH, D. M.; AWAD, A. C.; BENNINK, M. R.; GILL, J. L. Cholesterol reduction in liquid egg yolk using β-cyclodextrin. *Journal of Food Science*, v.6, n.4, p.691-694, 1995.

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.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

SZEJTLI, J. Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. *Journal of Materials Chemistry*, v.7, n.4, p.575-587, 1997.

TILDEN, E. B., HUDSON, C. S. Preparation and properties of amylases produced by *Bacillus macerans* and *Bacillus polymyxa*. *Journal of Bacteriology*, v.43, p.527-544, 1942.

TOYODA, K., SHODA, T., UNEYAMA, C., TAKADA, K., TAKAHASHI, M. Carcinogenicity study of β-cyclodextrin in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, v.35, p.331-336, 1997.

UITDEHAAG, J.C.M., VAN DER VEEN, B.A., DIJKHUIZEN, L., DIJKSTRA, B.W., Catalytic mechanism and produc specificity of cyclodextrin glycosyltransferase a prototypical transglycosylase from the α-amylase family. *Enzyme and Microbial Technology,* v.30, p.295-304, 2002.

VAN DER MAAREL, M.J.E.C., VAN DER VEEN, B.A., UITDEHAAG, J.C.M., LEEMHUIS, H., DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family. *Journal of Biotechnology,* v. 94, p.137-155, 2002.

VAN DER VEEN, B.A., UITDEHAAG, J.C.M., DIJKSTRA, B.W., DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochimica et Biophysica Acta,* v. 1543, p.336-360, 2000.

VAN DER VEEN, B.A., LEEMHUIS, H., KRALJ, S., UITDEHAAG, J.C.M., DIJKSTRA, B.W., DIJKHUIZEN, L. Hydrophobic amino acid residues in the acceptor binding site are main determinants for reaction mechanism and specificity of cyclodextrin-glycosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry,* v. 276 (48), p.44557-44562, 2001.

VAN EIJK, J.H., MUTSAERS, J.H.G. Process for increasing the volume of baked product. *Patente application US5916607*, 1999.

VETTER, D., THORN, W. Chain length specificity of cyclodextrin glycosyltransferase. *Starch/Stärke,* v. 44, p.229-233, 1992

WIND, R.D.; LIBL, W.; BUITELAAR, R.M.; PENNINGA, D.; SPREINAT, A.; DIJKHUIZEN, L., BAHL, H. Cyclodextrin formation by the thermostable α-amylase of *Thermanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 and reclassification of the enzyme as a cyclodextrin glycosyltransferase. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, n.4, p. 1257-1265, 1995.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

YU, E. K. C.; AOKI, H., MISAWA, M. Specific alpha-cyclodextrin production by a novel thermostable cyclodextrin glycosyltransferase. *Applied Microbiology and Biotechnology,* v.28, p. 377-379, 1988.

CAPÍTULO II

PRODUÇÃO DA CGTase DO *BACILLUS* sp SUBGRUPO *ALCALOPHILUS* E16 EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA E EM ESTADO SÓLIDO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO .

I - INTRODUÇÃO

A ciclodextrina-glicosil-transferase (CGTase, EC 2.4.1.19) é uma enzima particularmente interessante que possui a capacidade única de formação de ciclodextrinas a partir do amido (VAN DER VEEN et al., 2000). A CGTase é uma enzima monomérica, a maioria delas possui peso molecular da ordem de 70-75kD e apresenta uma seqüência de aminoácidos que revela uma similaridade

estrutural com a enzima α-amilase, sendo por isso considerada uma enzima da família das amilases (VETTER & THORN, 1992; UITDEHAAG et al.; 2002).

A CGTase é composta de uma cadeia única de polipeptídios com aproximadamente 650 aminoácidos, não possuindo ligações intramoleculares por pontes de dissulfeto, mas necessitando de cálcio para manter sua atividade catalítica (MATIOLI et al.; 2000).

A enzima ciclodextrina-glicosil-transferase catalisa a conversão do amido em ciclodextrinas por meio de reações reversíveis de transglicosilação intramolecular (ciclização). Exibe, ainda, atividade em reações de transglicosilação intermolecular (acoplamento e desproporcionamento) e, em menor intensidade, reações de hidrólise de amido (VAN DER VEEN et al., 2001; VAN DER MAAREL et al., 2002; MARTINS & HATTI-KAUL, 2003; CHAROENLAP et al., 2004).

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos formados pela ação da enzima CGTase sobre o amido. As CDs são formadas por monômeros de glicose, unidos por ligações glicosídicas α-1,4, sendo as mais comuns as do tipo α-, β- e γ- CD, consistindo de seis, sete e oito monômeros de glicose, respectivamente (PSZCZOLA, 1988; ABELYAN et al., 2002).

A característica mais marcante das ciclodextrinas é a capacidade que possui de formar complexos de inclusão com uma grande variedade de substâncias em virtude da sua estrutura geométrica, com a cavidade interna hidrofóbica e a região externa hidrofílica. Esse fenômeno, denominado como "inclusão molecular" pode melhorar as propriedades químicas e físicas da



molécula encapsulada. Essa capacidade das CDs de formar complexos de inclusão favorece um grande número de aplicações em indústrias de alimentos, de cosméticos, farmacêuticas, agroquímicas, químicas e outras. A substância encapsulada tem suas propriedades físico-químicas alteradas que resultam em melhor estabilidade, solubilidade, biodisponibilidade e menor volatilidade. (YU et al., 1988; GAWANDE et al., 2003).

Desde a descoberta da CGTase, no meio de cultura de *B. macerans*, em 1939 e após os estudos de TILDEN e HUDSON (1942), vários outros autores voltaram suas pesquisas a microrganismos produtores de CGTase. A produção dessa enzima tem sido estudada em diversas linhagens de bactérias, tais como *B. circulans* (ABELYAN et al.; 2002 e 2004), *B. megaterium, B. macerans* (SHIBUYA et al, 2003; ABELYAN et al.; 2004) , *Klebsiella pneumoniae* (GAWANDE et al., 2003), *Klebsiella oxytoca* (LEE et al, 1992) e *B. stearothermophillus* (SHIBUYA et al, 2003). As enzimas obtidas a partir desses microrganismos apresentam diferentes propriedades, tais como estabilidade térmica, pH e temperatura ótimos, peso molecular e capacidade de formação de CDs.

Convencionalmente, a enzima CGTase tem sido produzida por fermentação submersa contendo vários tipos de amido e outros carboidratos, e complexas fontes de nitrogênio (ROSSO et al., 2002), entretanto alguns trabalhos relatam a produção em fermentação em estado sólido (RAMAKRISHNA et al., 1994; ALVES-PRADO, 2002; GAWANDE et al., 2003). A produção da enzima é,

normalmente, realizada em condições aeróbias e, geralmente, com reator em batelada com agitação. O tempo de cultivo depende do microrganismo. No geral, o cultivo demora de 2 a 3 dias, em temperaturas de 30 a 37ºC para os mesofílicos, e superior a 50ºC para os termofílicos. A faixa de pH varia de 6 a 10 (BENDER, 1986).

NAKAMURA & HORIKOSHI (1976) propuseram dois tipos de meio de produção de CGTase em fermentação submersa, um com amido solúvel e caldo de maceração de milho e outro denominado de meio II, composto de amido solúvel, extrato de levedura, peptona, K_2HPO_4, $MgSO_4.H_2O$ e Na_2CO_3. Esse último meio foi o mais difundido entre os pesquisadores para a produção de CGTase, principalmente empregando microrganismos do gênero *Bacillus*.

Techaiyakul e colaboradores, em 1990, verificaram a influência de diferentes tipos de amido na produção da CGTase pelo *Bacillus* A11. A produção de CGTase foi maior quando foram utilizados os amidos de arroz, de milho e de batata. Os amidos de mandioca e de trigo apresentaram rendimento menor. Também verificou-se que a concentração de amido influenciava a produção da CGTase (MATIOLI et al., 2000).

Os meios de cultivo tradicionais são formulados com fontes de carbono, de nitrogênio, de vitaminas e aminoácidos que acarretam consideráveis custos na produção industrial de enzimas (DIAS et al., 1992; DAMASO et al., 2000). Pesquisas dirigidas à produção de enzimas, utilizando resíduos agroindustriais de baixo custo, visando à substituição das fontes convencionais de

C e N, são importantes para avaliar economicamente o uso das enzimas em escala comercial (DAMASO et al., 2000). Assim, estudos dirigidos à produção das CGTases com menor custo terão importantes reflexos nos custos das CDs contribuindo para viabilizar economicamente o uso das CDs em escala comercial.

A natureza e a concentração da fonte de carbono são fundamentais para a produção da enzima CGTase a partir de muitos organismos, especialmente quando a fonte de carbono atua como importante fator para a indução da enzima (GAWANDE et al., 2003).

Neste sentido, no presente trabalho foi estudada a produção da CGTase do *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, em fermentação submersa (FS) e em fermentação em estado sólido (FES) com diferentes substratos, para a seleção do melhor meio, isto é, aquele que produzia uma CGTase com maior poder de conversão de amido em CDs. Também realizou-se um estudo da influência da concentração de substrato e da temperatura de fermentação na produção da enzima CGTase no melhor meio selecionado e ainda, o efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade do extrato bruto da enzima CGTase.

II - MATERIAIS E MÉTODOS

1 – Microrganismo.

O microrganismo utilizado foi isolado por ALVES-PRADO (2000) no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (IBILCE/UNESP) e identificado como *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello" – Campinas – SP.

2 - Enzima.

Foi utilizado o extrato enzimático (CGTase) produzido pelo *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 em fermentação submersa.

3 – Meio de Cultivo para Pré-Inóculos:

Para os pré-inóculos, utilizou-se o meio proposto por ALVES-PRADO (2000) composto por 1,35% de amido solúvel (Synth); 0,49% de peptona (BioBrás); 0,59% de extrato de levedura (BioBrás); 0,1% de K_2HPO_4; 1,3% de Na_2CO_3 (adicionado separadamente após resfriamento), pH final 10,10. O tempo de cultivo foi de 48h, 37ºC, com agitação de 150rpm.

4 - Determinação da Atividade da CGTase.

A atividade da CGTase foi analisada pelo método CD-fenolftaleína baseado no proposto por MÄKELÄ et al. (1988).

4.1 - Método CD-fenolftaleína: 0,1mL de solução enzimática foi adicionada a 0,8mL de solução de (1,0%) maltodextrina (Aldrich), em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,5. Após incubação, a 55°C por 10 minutos, a reação foi paralisada com a adição de 4,0mL de solução de Na_2CO_3 0,25M. Em seguida, acrescentou-se 0,1mL de solução de fenolftaleína (50% etanol) 1mM. Para a solução controle seguiu-se os mesmos procedimentos acima, com exceção da solução enzimática que foi adicionada apenas no momento da leitura. A absorvância foi determinada em 550nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1µmol de β-ciclodextrina, por minuto e por mL de solução enzimática.

5 – Determinação de Proteínas .

Para determinar a concentração de proteínas no extrato enzimático foi usado o método Hartree-Lowry (HARTREE, 1972), usando soro albumina bovina como padrão. Na tabela I são indicados os reagentes utilizados:

Tabela I: Reagentes usados no método Hartree-Lowry.

REAGENTE A	REAGENTE B	REAGENTE C
0,4g de $KNaC_4H_4O_6.4H_2O$ (7mM), 20g de Na_2CO_3 (0,81M), 100mL de NaOH (0,5N), completar p/ 200mL c/ H_2O.	0,4g de $KNaC_4H_4O_6.4H_2O$ (7mM), 0,2g $CuSO_4.5H_2O$ (0,04M), 2mL NaOH (0,5N) 18mL de H_2O.	diluir 1 volume de Folin Ciocalteau (Sigma) com 15 volumes de água.
Estocagem: 2 a 3 meses em temperatura ambiente e frasco de plástico.	Estocagem: 2 a 3 meses em temperatura ambiente e frasco de plástico	Estocagem: preparar diariamente 16mL ou múltiplos deste, não estocar.

A mistura de reação foi preparada com 1mL da amostra de proteína convenientemente diluída adicionada a 0,9mL do reagente A. A mistura da reação foi incubada a 50°C, por 10 minutos em banho-maria. Em seguida, resfriou-se a amostra à temperatura ambiente e adicionou-se 0,1mL do reagente B. Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, a reação recebeu 3mL do reagente C e foi incubada a 50°C, por 10 minutos em banho-maria. O branco foi feito seguindo-se todos os procedimentos descritos acima mas, substituindo a amostra de proteína por água. A absorvância foi determinada em espectrofotômetro a 650nm.

6 – Determinação de Proteases.

Para determinar a concentração de proteases no extrato enzimático foi usado o método modificado de KEMBHAVI et al., 1993. A reação consistiu de: 0,2mL de solução enzimática adicionada a 0,8mL de solução de caseína a 1,0%, em tampão acetato 0,1M, pH 5,5. Após incubação a 37°C, por 60 minutos, a reação foi paralisada com a adição de 1,0mL de solução de TCA 10%. Em seguida, a amostra foi resfriada em banho de gelo por 30 minutos e depois centrifugada a 6.000xg por 5 minutos. O branco consistiu de 1mL de água mais 1mL de solução de TCA 10% e o controle recebeu a solução enzimática apenas após a incubação a 37ºC, sendo um controle para cada amostra. A absorvância foi determinada em 280nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que conduzia à variação de 0,01 de absorvância.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

7 – Estudo da Produção de CGTase em diferentes Fontes de Carbono para Seleção do Melhor Meio.

A produção de CGTase por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 foi estudada sob fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES). As principais fontes de carbono utilizadas nas fermentações foram: farelo de mandioca; amido de batata-doce; polvilho doce; amido de milho (Maizena®); fubá; extrato de soja; farinha de soja; farelo de soja; soja; farelo de trigo e amido solúvel.

7.1 – Fermentação Submersa:

A fermentação submersa foi realizada em erlenmeyers de 125mL contendo 20mL de meio. Cada erlenmeyer foi inoculado com 0,5mL de pré inóculo, incubado a 35ºC sob agitação de 150rpm e o tempo de cultivo foi de 48h.

A composição dos nutrientes do meio utilizado foi baseado no proposto por ALVES-PRADO (2000) com algumas modificações. Duas composições de meio foram analisadas, uma variando apenas a fonte de carbono (substratos) que foi denominada de meio "A" e o outro meio, além da variação do substrato, não recebeu os compostos: extrato de levedura e peptona, em sua composição, buscando-se assim uma fermentação mais "limpa", isto é, sem a cor e presença das substâncias residuais resultantes das reações e degradações dos compostos acima mencionados. Este último meio foi denominado de "B". A composição detalhada dos meios A e B são descritos na tabela II.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

O material fermentado foi centrifugado a 10.000xg, por 15 minutos, sob refrigeração a 5ºC. O sobrenadante foi utilizado para as análises enzimáticas pelo método CD-fenolftaleína como descrito nos item 4.1. As amostras foram analisadas também com relação à quantidade de proteína pelo método Hartree-Lowry, descrito no item 5 e com relação à existência de proteases (item 6).

Tabela II – Composição dos meios para fermentação submersa.

MEIO A	MEIO B
0,5% de extrato de levedura; 0,5% de peptona; 0,1 % de K_2HPO_4; 0,02% de $MgSO_4$; 1% de substrato: 1)farelo de mandioca; 2)amido de batata-doce; 3)polvilho doce; 4)amido de milho (Maizena®); 5)fubá e 6)amido solúvel; 1,3% de Na_2CO_3 (autoclavado separado);	**0,1 % de K_2HPO_4; 0,02% de $MgSO_4$; 1% de substrato: 1)farelo de mandioca; 2)amido de batata-doce; 3)polvilho doce; 4)amido de milho (Maizena®); 5)fubá; 6)extrato de soja; 7)farinha de soja; 8)farelo de soja; 9)soja; 10)farelo de trigo e 11)amido solúvel; 1,3% de Na_2CO_3 (autoclavado separado);**

7.2 – Fermentação em Estado Sólido (FES):

Foram realizadas fermentações em erlenmeyers de 250mL contendo 5g dos seguintes substratos: farelo de trigo, amido solúvel, farinha de trigo, amido de milho (Maizena®), polvilho, farelo de soja, fubá, farelo de mandioca e farinha de soja. Estes substratos foram utilizados sozinhos ou misturados conforme indicado na tabela III.

As fermentações foram realizadas a 35°C e receberam volumes diferentes de solução 1,3% de Na_2CO_3 (autoclavado separado) de acordo com a umidade do substrato. Cada erlenmeyer foi inoculado com 2,5mL de pré inóculo e o tempo de cultivo foi de 48h.

Tabela III – Composição do meio para fermentação em substrato sólido.

MEIO	VOL. Na_2CO_3 (1,3%)	VOL. DE INÓCULO
5g de farelo de trigo	**7,5mL**	**2,5mL**
5g de farelo de soja	**5mL**	**2,5mL**
5g de farelo de soja/farelo de trigo (1:1)	**5mL**	**2,5mL**
5g de farelo de trigo/fubá (1:1)	**5mL**	**2,5mL**
5g de farelo de trigo/ farelo de mandioca (1:1)	**5mL**	**2,5mL**
5g de farelo de trigo/farinha de soja (1:1)	**5mL**	**2,5mL**
5g de farelo de trigo/amido solúvel (1:1)	**2,5mL**	**2,5mL**
5g de farelo de trigo/farinha de trigo (1:1)	**2,5mL**	**2,5mL**
5g de farelo de trigo/amido de milho (Maizena®) (1:1)	**2,5mL**	**2,5mL**
5g de farelo de trigo/polvilho (1:1)	**2,5mL**	**2,5mL**

O material fermentado foi filtrado e centrifugado a 10.000xg, por 15 minutos, sob refrigeração de 5ºC. O sobrenadante foi utilizado para as análises enzimáticas pelo método CD-fenolftaleína como descrito no item 4.1. As amostras foram analisadas também com relação á quantidade de proteína pelo método Hartree-Lowry, descrito no item 5 e com relação à existência de proteases (item 6).

8 - Estudo da Produção de CGTase por Fermentação Submersa no Melhor Meio.

Foram realizadas fermentações submersas como descrito no item 7.1 (meio A), contendo polvilho doce como substrato.

8.1 – Estudo da Influência da Concentração de Substrato e da Temperatura na Produção de CGTase:

As concentrações testadas de polvilho doce foram de 0,25g, 0,5g, 1g, 2g e 3g. As cinco concentrações foram incubadas em quatro diferentes temperaturas (30ºC, 35ºC, 40ºC e 45ºC). As fermentações foram realizadas em duplicata, em erlenmeyers de 125mL contendo 20mL de meio. Cada erlenmeyer foi inoculado com 0,5mL de um pré inóculo de 24h, e incubado a 35ºC sob agitação de 150rpm e o tempo de cultivo foi de 48h.

8.2 – Análise Estatística:

Os dados obtidos no experimento do item 8.1 foram analisados estatisticamente pela da Análise de Variância e do Teste de Tukey, para verificar o nível dos efeitos dos fatores e de suas interações, e estabelecer assim, a melhor concentração e temperatura para a produção de CGTase em polvilho doce. O programa utilizado foi o ESTAT – Sistema Para Análises Estatísticas (V.2.0), desenvolvido pelo Pólo Computacional 1 do Departamento de Ciências Exatas, UNESP / FCAV, campus de Jaboticabal.



8.3 – Análise da Massa Celular:

A análise da massa celular foi feita nas fermentações submersas tendo concentrações variadas de polvilho doce como substrato (1g, 2g, 3g, 4g, 5g, 6g e 8g) e cultivadas a 35°C por 48h. Após o crescimento, o material foi centrifugado a 10000xg, a 5°C durante 10 minutos, para separar as células do meio. O precipitado celular foi ressuspendido com 20mL de solução salina (0,8%) e centrifugado novamente nas condições descritas acima, sendo o sobrenadante posteriormente descartado. O mesmo procedimento foi repetido por quatro vezes, com o intuito de livrar a massa celular de compostos residuais do meio. Após a última centrifugação a massa celular foi novamente ressuspendida, homogeneizada e foi realizada a leitura da turbidez a 600nm.

9 – Caracterização Físico-Química do Extrato Enzimático Bruto:

9.1 – pH Ótimo:

Para a determinação do pH ótimo de atividade do extrato enzimático bruto em polvilho, foram preparadas soluções de maltodextrina a 1% em três diferentes tampões com variações de pHs. Os tampões utilizados foram: tampão Acetato (pH de 2,5 a 5,5), tampão Tris-malato (pH de 5,5 a 8,5) e tampão Glicina – NaOH (pH de 8,5 a 12). O método CD-fenolftaleína (item 4.1) foi utilizado para medir a atividade da enzima em cada um dos pHs em estudo.

unesp

9.2 – pH de Estabilidade:

O pH de estabilidade foi determinado pela incubação de 0,2mL de enzima em 0,4mL de solução tampão. Os pHs variaram de 3 a 11, e os tampões utilizados foram o tampão Acetato (pH de 3 a 5,5), tampão Tris-malato (pH de 5,5 a 8,5) e tampão Glicina–NaOH (pH de 8,5 a 11). A incubação ocorreu em temperatura ambiente, por um período de 24h. Após tal período foi utilizado o método CD-fenolftaleína (item 4.1) para medir a atividade residual da enzima de cada amostra.

9.3 – Temperatura Ótima:

A temperatura ótima foi determinada pelo método CD-fenolftaleína, incubando-se de 0,1mL de enzima convenientemente diluída, em solução de maltodextrina a 1%, preparada no pH estabelecido como ótimo (item 9.1), nas temperaturas de 30ºC a 80ºC, em intervalos de 5ºC, durante 10 minutos.

9.4 – Temperatura de Estabilidade:

A temperatura de estabilidade da enzima foi determinada pela incubação de 0,5mL de solução enzimática bruta, nas temperaturas de 30ºC a 80ºC, em intervalos de 5ºC, por 1h. Em seguida, os tubos com a enzima, foram colocados em banho com gelo, para paralisar o efeito de desnaturação protéica, e realizada a análise da atividade remanescente pelo método CD-fenolftaleína (item 4.1).

III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 – Estudo da Produção de CGTase em diferentes Fontes de Carbono para Seleção do Melhor Meio.

A produção de CGTase por *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 foi estudada sob fermentação submersa (FS), meios A e B, e fermentação em estado sólido (FES) como descrito no itens 7.1 e 7.2 do Materiais e Métodos.

1.1 – Fermentação Submersa:

Neste estudo, entre as fontes de carbono usadas para a formulação do meio A, os melhores rendimentos enzimáticos, determinados pelo método CD-fenolftaleína, foram encontrados nos meios contendo os substratos: amido de batata-doce, polvilho (doce) e amido solúvel, este último sendo considerado como controle (figura 1).

O substrato polvilho apresentou a melhor produção enzimática (1,8U/mL) na fermentação submersa em meio A, sendo maior que a produção do substrato controle (1,4U/mL). Este resultado mostrou ser este substrato uma alternativa bastante interessante e viável para a produção da CGTase da linhagem do *Bacillus* sp *alcalophilus* E16.

Nas fermentações submersas que continham o meio B, a melhor produção de CGTase ocorreu na fermentação contendo fubá como substrato (0,58U/mL). Nas fermentações com o meio B (figura 2), observou-se um

rendimento enzimático menor quando comparado ao dos substratos do meio A, sendo que o fubá apontou um rendimento inferior à metade da atividade dos melhores substratos do meio A.

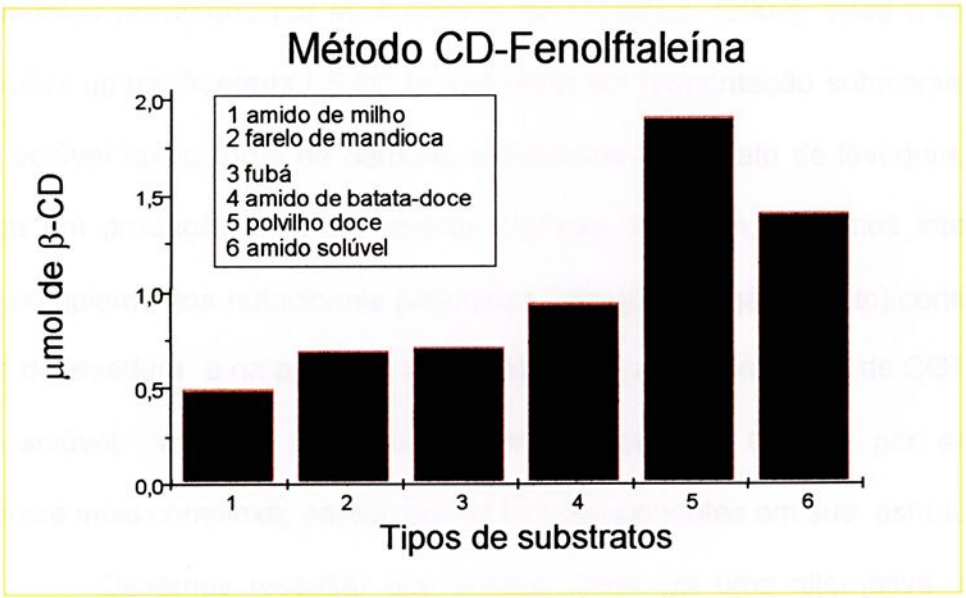


Figura 1: Produção da CGTase no meio A com diferentes substratos.

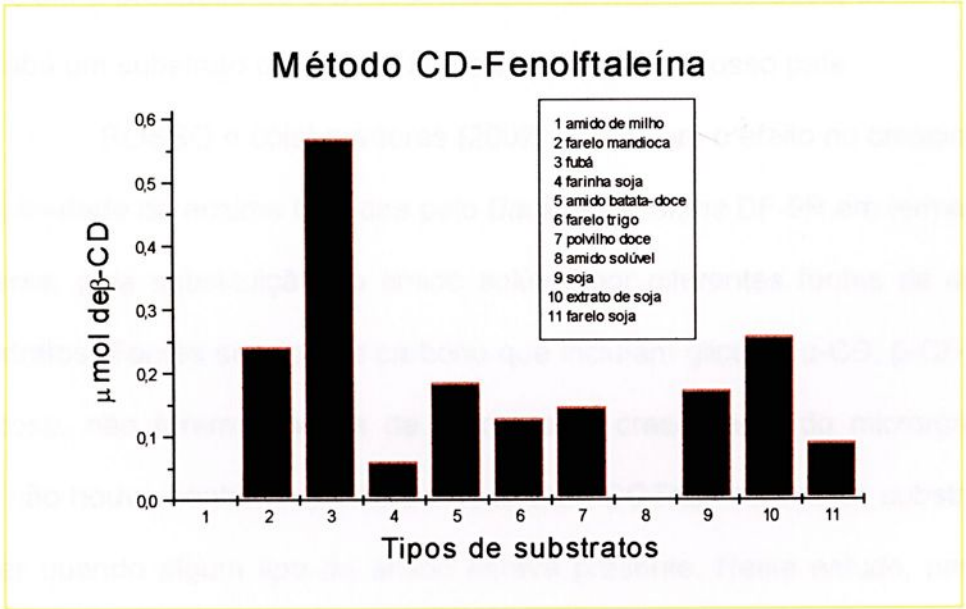


Figura 2: Produção da CGTase no meio B com diferentes substratos.

Nota-se ainda nos experimentos com o meio B, a ausência de produção da enzima CGTase no meio com amido solúvel e amido de milho (Maizena®) como substrato. Fato parecido também foi encontrado em experimentos realizados por MARTINS & HATTI-KAUL (2002), onde a linhagem de *Bacillus agaradhaerens* LS-3C foi cultivada em fermentação submersa, tendo amido solúvel como fonte de carbono e ausência de extrato de levedura, o que resultou em produção nula da enzima CGTase. Portanto, podemos inferir que certos complementos nutricionais (vitaminas, nitrogênio orgânico, etc) contidos no extrato de levedura e na peptona, são essenciais para a produção de CGTase. O amido solúvel apenas, não contém estes nutrientes. O fubá por ser uma substância mais complexa, parece conter tais componentes em sua estrutura.

Devemos ressaltar que o fubá, pode ser uma alternativa viável e barata para a produção de CGTase, merecendo maiores estudos, ainda mais por ser o fubá um substrato de baixo custo e abundante no nosso país.

ROSSO e colaboradores (2002) estudaram o efeito no crescimento e a produtividade da enzima CGTase pelo *Bacillus circulans* DF-9R em fermentação submersa, pela substituição do amido solúvel por diferentes fontes de amido e carboidratos. Fontes simples de carbono que incluíam glicose, α-CD, β-CD, xilose e maltose, não foram capazes de promover o crescimento do microrganismo, assim não houve nenhuma produção da enzima CGTase com estes substratos, a não ser quando algum tipo de amido estava presente. Neste estudo, para o *B.*

circulans DF-9R o aumento mais significativo da produção de CGTase foi obtido com amido de mandioca e arroz.

As diferenças entre as melhores atividades enzimáticas obtidas com relação ao vários tipos de amidos em fermentação submersa, podem estar relacionadas com a estrutura física dos amidos usados, ou ainda, é uma característica inerente do microrganismo em estudo (ROSSO et al., 2002). Assim, GAWANDE et al., em 1998, apontaram o amido de milho (Maizena®) como melhor fonte de carbono para a produção de CGTase por *Bacillus firmus* e, em 2003, observaram máxima produção de CGTase com amido de mandioca e dextrinas no cultivo de *Klebsiella pneumoniae* AS-22. MARTINS & HATTI-KAUL (2002) obtiveram a mais alta produção enzimática de CGTase para a linhagem de *Bacillus agaradhaerens* LS-3C em meio alcalino tendo amido solúvel como substrato.

1.2 – Fermentação em Estado Sólido (FES):

A fermentação em estado sólido (FES) foi realizada com farelo de trigo e misturas de farelo de trigo com diferentes fontes de carbono, como descrito no item 7.2 (tabela II do Materiais e Métodos), pois relatos na literatura indicam esse composto como bom substrato para a produção de CGTase (RAMAKRISHNA et al., 1994; ALVES-PRADO et al., 2002). Os substratos contendo farelo de trigo + fubá, farelo de trigo + farelo mandioca e farelo de trigo apresentaram as melhores atividades enzimáticas (figura 3).

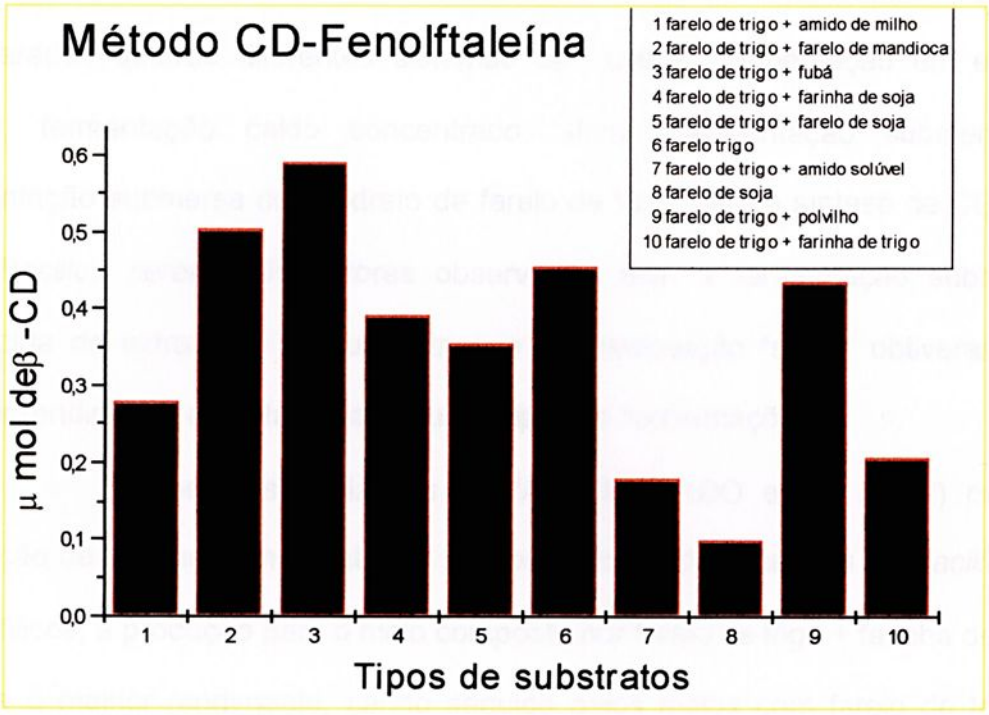


Figura 3: Produção da CGTase em fermentação em estado sólido com diferentes substratos.

O cultivo para a produção da enzima CGTase é geralmente realizado em fermentação submersa, entretanto algumas pesquisas vêm relatando o uso de fermentação em estado sólido na produção desta enzima (GAWANDE et al., 2003). A fermentação em estado sólido tem sido explorada na preparação de diversas enzimas extracelulares. A maior vantagem deste tipo de fermentação consiste na sua simplicidade operacional.

TILDEN & HUDSON (1942) ao estudarem o cultivo de 11 linhagens de *Bacillus macerans,* utilizando no meio de cultivo 0,5% de aveia e 2,0% de $CaCO_3$, obtiveram uma produção média de 2-3 U/mL de CDs, e concluíram que todas as linhagens produziam a enzima capaz de converter amido em dextrinas de Schardinger.

Já no trabalho de RAMAKRISHNA et al. (1994), foram utilizados e comparados quatros diferentes sistemas de cultivo: fermentação em estado sólido; fermentação caldo concentrado "slurry"; fermentação submersa e fermentação submersa com extrato de farelo de trigo, para a síntese de CGTase pelo *Bacillus cereus*. Os autores observaram que, a fermentação submersa acrescida de extrato de farelo de trigo e a fermentação "slurry" obtiveram um melhor rendimento em relação aos outros tipos de fermentações.

Em estudos realizados por ALVES-PRADO et al. (2002) para a produção de CGTase em substratos sólidos, com várias linhagens de *Bacillus* sp alcalofílicos, a produção para o meio composto por farelo de trigo + farinha de soja obteve o melhor rendimento, sendo seguido pelos meios com farelo de trigo + mandioca e somente farelo de trigo.

Os resultados obtidos indicam o farelo de trigo como promissora fonte de carbono na síntese de CGTase por da fermentação em estado sólido, sendo este um composto relativamente barato e facilmente encontrado mundialmente.

No estudo desenvolvido em nosso laboratório, foi observado que os resultados das fermentações submersas, meio A, mostraram-se melhores que o da fermentação em estado sólido, entretanto deve-se salientar que, os valores de produção para os substratos com melhores rendimentos da FES encontram-se próximos aos encontrados para o substrato fubá (meio B) e a alguns dos valores

dos substratos testados no meio A (amido de milho (Maizena®), farelo de mandioca e fubá) nas fermentações submersas.

Conforme apresentado na tabela I, houve detecção de atividade proteolítica na maioria dos meios indicados como melhores, sendo exceção o substrato polvilho doce (fermentação submersa, meio A). A aparente ausência de proteases na fermentação tendo como substrato o polvilho é outro fator que torna esse substrato extremamente interessante para a produção da CGTase, pois este poderia ser utilizado em fermentações prolongadas sem problemas de degradação de enzima, que ocorre quando há proteases presentes no meio.

Tabela I: Comparação dos melhores substratos em fermentação submersa e estado sólido.

	COMPOSIÇÃO DO MEIO	ATIVIDADE CD-FENOLFTALEÍNA µmol / mL	PRESENÇA DE PROTEASES
MEIO A	AMIDO DE BATATA-DOCE	1,00	SIM
	AMIDO SOLÚVEL	1,40	SIM
	POLVILHO DOCE	1,80	NÃO
MEIO B	FUBÁ	0,58	SIM
MEIO FES	FARELO DE TRIGO	0,45	SIM
	FARELO DE TRIGO + FARELO DE MANDIOCA	0,50	SIM
	FARELO DE TRIGO + FUBÁ	0,58	SIM

Este resultado era esperado, uma vez que de acordo com a literatura especializada, a fermentação sólida é mais indicada e favorável a fungos do que bactérias, devido à maior "mobilidade" dos filamentos fúngicos. Entretanto,

PANDEY et al (2000), salientaram que linhagens bacterianas têm sido selecionadas e utilizadas com sucesso na produção de enzimas em fermentação sólida, principalmente microrganismos pertencentes ao gênero *Bacillus* e ainda, RAMAKRISHMA e colaboradores (1994) observaram que a fermentação submersa com farelo de trigo e a fermentação "slurry" conduziram a rendimentos relativamente maiores que em fermentação submersa apenas, para a produção de CGTase pelo *Bacillus cereus* .

2 - Estudo da Produção de CGTase no Melhor Meio .

A fermentação submersa, tendo polvilho doce como fonte de carbono, foi selecionada para o estudo de produção de CGTase devido este substrato ter apresentado a melhor atividade enzimática e ausência de proteases (item 1.1).

2.1 – Estudo de dois fatores - Concentração de Substrato e Temperatura:

Foram realizados estudos com relação a dois fatores fundamentais: concentração de substrato e temperatura, os demais fatores da fermentação foram mantidos constantes como descrito no item 7.1 do Materiais e Métodos (pH, tempo de cultivo, agitação, etc.). As cinco concentrações testadas foram submetidas a cultivos em quatro diferentes temperaturas (30ºC, 35ºC, 40ºC e 45ºC). Os resultados foram analisados estatisticamente por Analise de Variância e Teste de Tukey.

2.2 – Análise Estatística:

O resultado da análise de variância dos dados mostrando o efeito dos fatores temperatura e concentração de substratos separadamente e ambos juntos na produção da enzima CGTase, estão representados na tabela II abaixo.

Tabela II: Quadro de Análise de Variância . Fator A: temperatura e Fator B: concentração de substrato

CAUSAS DE VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fator A	3	1,8605	0,6202	340,4417 **
Fator B	4	2,1954	0,5488	301,2884 **
Fator AxB	12	1,0280	0,0857	47,0285 **
(Tratamentos)	19	5,0839	0,2676	
Resíduo	60	0,1093	0,0018	

(** = $P < 0,01$) (G.L.= grau de liberdades; S.Q.= soma dos quadrados; Q.M.=quadrados médios; F= teste F de snedecor)

Observamos que a temperatura (fator A) e a concentração de substrato (fator B) foram significativos ao nível de 1% de probabilidade, assim, podemos dizer que a temperatura e a concentração do substrato são fatores que exercem um grande efeito na produção da enzima. A interação deste dois fatores também apresentou nível de significância de 1% de probabilidade. Concluímos, portanto, que ambos os fatores, separadamente ou em interação influenciam na produção enzimática da CGTase. A media geral do ensaio foi de 0,9437 e o desvio padrão de 0,0427.

A análise das médias do fator temperatura pelo teste de Tukey indicou que os tratamentos dois e um, temperaturas 35ºC e 30ºC respectivamente, como as melhores temperaturas, pois não apresentam diferenças significativas

entre si, já os tratamentos três (40ºC) e quatro (45ºC) diferem entre si e com relação as demais temperaturas testadas (tabela III).

Tabela III: Teste de Tukey para o fator temperatura.

TRAT.	MEDIA
2	1.1025 A
1	1.0867 A
3	0.8233 B
4	0.7624 C

Médias seguidas de letra distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (P < 0,05)
(Tratamentos - 1=30ºC, 2= 35ºC, 3=40ºC e 4= 45ºC).

Com relação á análise das médias do fator concentração de substrato pelo teste de Tukey, observamos na tabela IV que os tratamentos cinco e quatro, concentrações de polvilho de 3% e 2% respectivamente, não apresentam diferenças significativas entre si, já os tratamentos três (1%), dois (0,5%) e um (0,25%) diferem entre si e com relação às demais concentrações testadas .

Tabela IV: Teste de Tukey para o fator concentração de substrato.

TRAT.	MÉDIA
5	1.1156 A
4	1.0749 A
3	1.0268 B
2	0.8178 C
1	0.6836 D

Médias seguidas de letra distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (P < 0,05)
(Tratamentos - 1=0,25%, 2= 0,5%, 3= 1%, 4= 2% e 5= 3%).

Posteriormente à análise estatística, foi realizado um ensaio para observar os efeitos do aumento da concentração de polvilho e a concentração de massa celular presente nestes cultivos (figura 4), sendo a temperatura de cultivo 35ºC. Observou-se um progressivo acréscimo na produção enzimática com o aumento da concentração do substrato. Com relação à massa celular, ela se apresentou máxima na concentração de substrato igual a 3%.

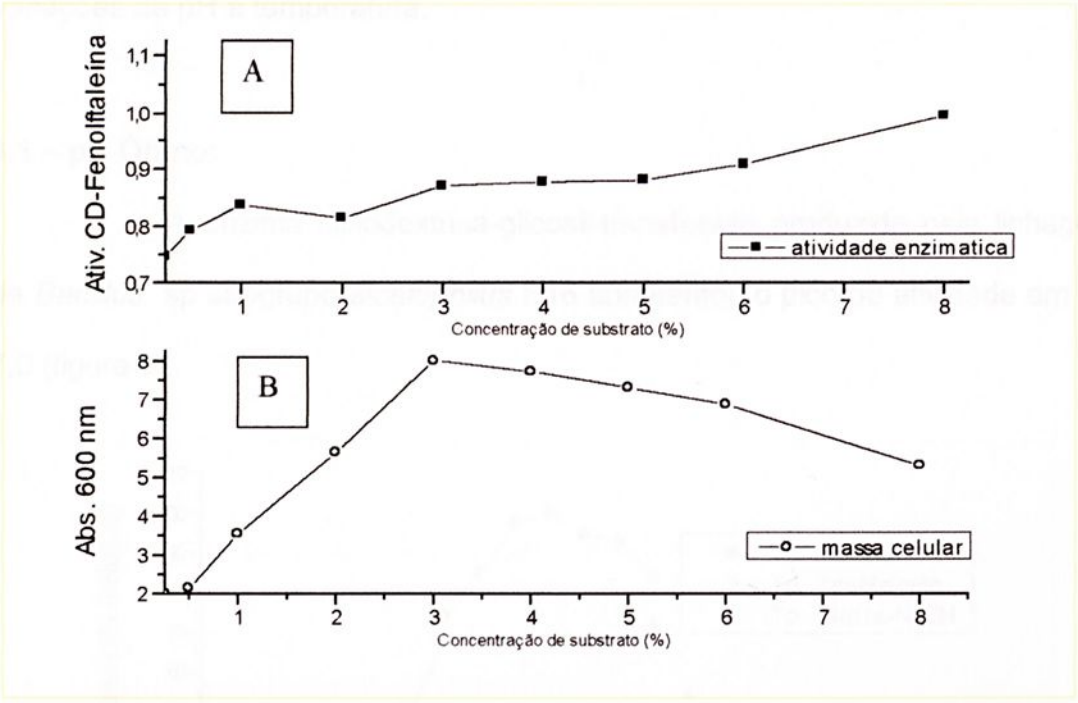


Figura 4: Gráfico A : atividade da enzima CGTase com o aumento da concentração do substrato a 35ºC. Gráfico B: curva da massa celular presente nas respectivas concentrações testadas (λ=600nm)

Com base na análise estatística anterior foi escolhida para a caracterização do extrato bruto as fermentações que ocorreram a 35ºC tendo 3% de polvilho como concentração de substrato, pois estes foram apontados como os melhores parâmetros para a produção da enzima CGTase.

3 – Caracterização Físico-Química do Extrato Enzimático Bruto:

Os ensaios para a caracterização da enzima foram realizados a partir das soluções enzimáticas brutas obtidas pelo cultivo da linhagem do *Bacillus* sp *alcalophillus* E16 em fermentação submersa, tendo polvilho doce como substrato. Foram avaliados pH e temperatura ótimos de atividade de CGTase, assim como, a estabilidade das soluções enzimáticas frente às variações de pH e temperatura.

3.1 – pH Ótimo:

A enzima ciclodextrina-glicosil-transferase produzida pela linhagem de *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 apresentou o pico de atividade em pH 7,0 (figura 5).

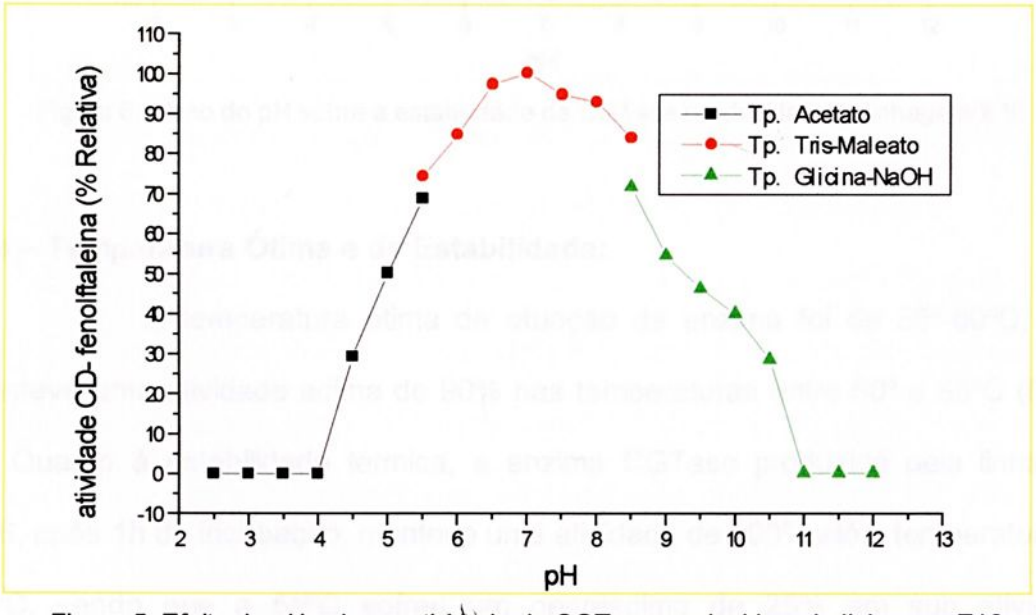


Figura 5: Efeito do pH sobre a atividade da CGTase produzida pela linhagem E16.

3.2 – pH de Estabilidade:

A enzima mostrou-se relativamente estável na faixa de pH 5,0 - 8,5, mantendo uma estabilidade acima de 70% de atividade nesta faixa durante 24h (figura 6). A partir do pH 9,0 já se observa um decréscimo de 60% na atividade, com relação à melhor a0tividade.

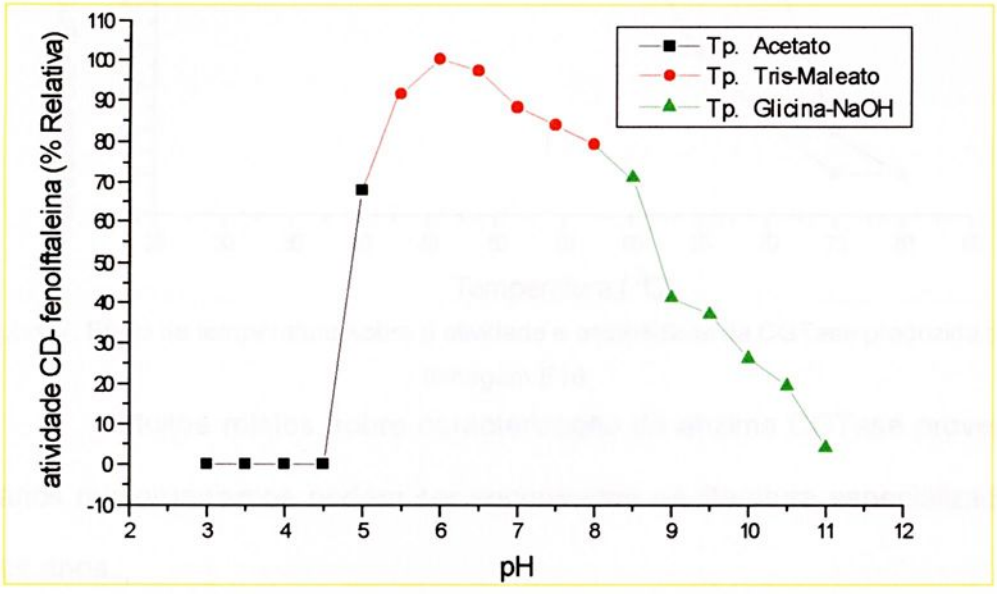


Figura 6: Efeito do pH sobre a estabilidade da CGTase produzida pela linhagem E16

3.3 – Temperatura Ótima e de Estabilidade:

A temperatura ótima de atuação da enzima foi de 55º-60ºC, mas manteve uma atividade acima de 90% nas temperaturas entre 50º e 65ºC (figura 7). Quanto à estabilidade térmica, a enzima CGTase produzida pela linhagem E16, após 1h de incubação, manteve uma atividade de 100% até a temperatura de 50ºC, sendo que a 55ºC sofreu um decréscimo de 25% em sua atividade enzimática e foi completamente inativada a 80ºC.

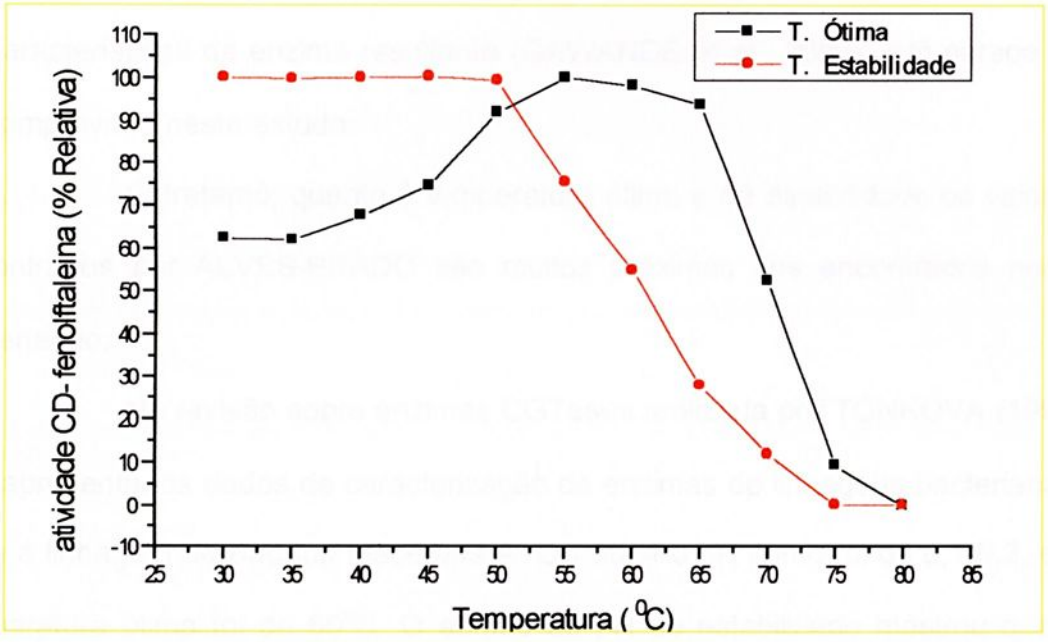


Figura 7: Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da CGTase produzida pela linhagem E16.

Muitos relatos sobre caracterização da enzima CGTase proveniente de vários microrganismos podem ser encontrados na literatura especializada nos últimos anos.

A mesma linhagem de *Bacillus* sp *alcalophilus* E16 foi estudada por ALVES-PRADO (2000) e apontou um pH ótimo e de estabilidade diferente do encontrado neste estudo. O pH ótimo foi de 5,5 e a faixa de estabilidade de pH foi 5,5-10,0. Essas variações podem ser atribuídas ao método utilizado para analisar a atividade enzimática. No estudo deste autor a atividade da enzima CGTase foi realizada pelo método Dextrinizante, enquanto em nosso estudo foi utilizado o método CD-fenolftaleína. Ressalta-se ainda, que ALVES-PRADO utilizou amido solúvel como substrato e em nosso estudo foi usado polvilho doce, e como tem

sido relatado que a composição do meio de fermentação afeta significantemente as características da enzima resultante (GAWANDE et al., 2003), isto parece ter se comprovado neste estudo.

Entretanto, quanto à temperatura ótima e de estabilidade os valores encontrados por ALVES-PRADO são muitos próximos aos encontrados nesta dissertação.

Na revisão sobre enzimas CGTases realizada por TONKOVA (1998) são apresentados dados de caracterização de enzimas de linhagens bacterianas. Para a linhagem de *Bacillus macerans* ATCC 8514 o pH ótimo foi de 6,1-6,2, e a temperatura ótima foi de 60^{0}C. O estudo do pH de estabilidade mostrou que a enzima foi estável na faixa de pH de 8,0-10,0. Com relação à temperatura de estabilidade a enzima reteve 100% de atividade nas temperaturas abaixo de 60^{0}C. Já para a CGTase do *Bacillus* sp INMIA-A7/1, esta mostrou estabilidade numa larga faixa de pH de 5,5-10,0 e foi estável até a temperatura de 55^{0}C. Ainda neste artigo, temos que no extrato enzimático bruto do *Bacillus* sp ATCC 21783 alcalofílico foi caracterizada e apresentou duas faixas ótimas de pHs uma ácida pH 4,5-4,7 e outra alcalina pH 7,5-8,5. A faixa alcalina de pH mostrou-se mais instável e facilmente inativada a altas temperaturas, enquanto a enzima na faixa de pH ácida obteve a mais alta atividade. A temperatura ótima para esta enzima foi de 45^{0}C. Este autor conclui ainda, que CGTases de origem bacteriana tem máxima atividade em pH com valores entre 4,5 a 7,0 e em temperaturas de 40^{0}C a 85^{0}C (tabela V).



Devemos citar, que os valores obtidos na caracterização do extrato enzimático bruto CGTase proveniente do *Bacillus* sp *alcalophilus* E16 apresentada nesta dissertação, estão dentro da faixa apontada por TONKOVA (1988) para enzimas de origem bacteriana (tabela V).

Tabela V: Algumas propriedades de CGTases Bacterianas.

Produtores	pH Ótimo	Temperatura Ótima (^{0}C)	Massa Molecular	Tipos de CDs Produzidas
Bacillus macerans ATCC 8514	6,1-6,2	60^{0}C	139	-
Bacillus macerans IFO 3490	5,0-5,7	55^{0}C	-	α-CD
Bacillus macerans IAM 1243	-	-	74	α-CD
Bacillus megaterrium N^{o}5	5,0-5,7	55^{0}C	-	β-CD
Bacillus circulans var. alcalophilus ATCC 21783	4,5-4,7	45^{0}C	88	β-CD
Bacillus sp AL-6 (alcalofílico)	7,0-10,0	60^{0}C	74	γ-CD
Bacillus cereus NCIMB 13123	5,0	40^{0}C	-	α-CD
Bacillus sp INMIA T-6 (termofílico)	6,5	55^{0}C	38	α-CD
Bacillus sp INMIA T42 (termofílico)	6,5	55^{0}C	35	β-CD
Bacillus sp INMIA A7/1 (alcalofílico)	6,0	50^{0}C	44	β-CD
Bacillus sp INMIA 1919	4,0	50^{0}C	42	α-CD
Bacillus halophilus INMIA 3849	7,0	60^{0}C-62^{0}C	71	β-CD
Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes EM1	4,5-7,0	80^{0}C-85^{0}C	68	β-CD
Bacillus ohbensis sp. nov. C-1400	5,0	55^{0}C	80	β-CD

(fonte modificada: TONKOVA, 1988)

ABELYAN et al.(2002) publicaram um estudo sobre o efeito de pH e da temperatura na atividade e estabilidade da CGTase de vários microrganismos, incluindo uma linhagem fúngica. O estudo apontou que as enzimas de microrganismos mesofílicos (*B. macerans* BIO-2m, *B. circulans* BIO-3m, *B.*

coagulans BIO-13m e *B. licheniformis* BIO-9m) e termofílicos (*B. coagulans* B-4018 e *B. licheniformis* B-4025) exibiram máxima atividade específica para valores de pH na faixa de 5,5 a 7,0 (a única exceção foi a enzima de *B. stearothermophilus* B-4006, cujo pH ótimo foi de 8,5). Já as linhagens alcalofílicas (*B. alcalophilus* B-3103 e *B. alcalophilus* BA-4229) apresentaram um pH ótimo entre 8,0–9,0. As linhagens halofílicas (*B. halophilus* BIO-12H e *B. halophilus* BIO-13H) tiveram CGTases com pH ótimo na faixa de 6,0-7,0 e o actinomiceto *Thermoactinomyces vulgaris* Tac-3554 apontou um pH ótimo de 6,0-7,0. O pH de estabilidade de todas as enzimas estudadas se encontram entre 5,5-9,0. Para as CGTases isoladas de grupos halofílicos e mesofílicos, a temperatura ótima observada foi de 55^{0}C. Os grupos termofílicos e alcalofílicos tiveram suas enzimas com temperatura ótima entre 60^{0}C-65^{0}C. Uma temperatura ótima alta (75^{0}C) foi relatada para duas enzimas provenientes do *Bacillus alcalophilus* B-3103 e do actinomiceto *Thermoactinomyces vulgaris* Tac-3554. Uma temperatura de estabilidade alta foi exibida para CGTases dos grupos termofílicos e alcalofílicos, enquanto as enzimas de halofílicos e mesofílicos apresentaram uma rápida inativação a temperaturas que excedessem 58^{0}C-60^{0}C.

IV - CONCLUSÃO

Para o meio A (com peptona e extrato de levedura), o substrato polvilho doce apresentou uma ótima produção, superando a produção do substrato controle, além de aparentemente ser um substrato que produz um extrato enzimático bruto com CGTase e ausente de proteases.

Notou-se que o meio B (sem peptona e extrato de levedura) tendo fubá como substrato, teve uma produtividade considerável, e sugere ser uma alternativa viável e mais barata para a produção de CGTase.

Na fermentação em estado sólido (FES) os resultados obtidos apontaram o substrato farelo de trigo e este associado a fubá ou a farelo de mandioca como promissora fonte de carbono para a produção de CGTase neste tipo de fermentação.

De modo geral, foi observado que a fermentação submersa, meio A, foi a mais significativa para produção de CGTase pelo microrganismo em estudo, na maioria dos substratos usados. Entretanto, a fermentação submersa (meio B) com fubá e a fermentação em estado sólido com farelo de trigo mais fubá como substrato, merecem maiores estudos pois apresentaram uma significativa produção da enzima CGTase.

A avaliação estatística pela Análise de Variância e pelo Teste de Tukey aplicados no experimento onde se variou temperatura de fermentação e concentração do substrato polvilho apontou a temperatura 35ºC e 30ºC como as



melhores temperaturas e, as concentrações de substrato 2% e 3% como as mais significativas para a produção da enzima.

A caracterização do extrato enzimático bruto CGTase proveniente da linhagem do *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 produzida em polvilho doce (3%), a 35^{0}C, indicou o melhor pico de atividade em pH 7,0. A enzima mostrou-se relativamente estável na faixa de pH 5,0-8,5. A temperatura ótima de atuação da enzima foi de 55º-60ºC. Quanto à estabilidade térmica, a enzima manteve uma atividade de 100% até a temperatura de 50ºC, sendo que já a 55ºC sofreu um decréscimo de 25% em sua atividade e foi completamente inativada a 80ºC.

V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELYAN, V.A., BALAYAN, A.M., MANUKYAN, L.S., AFYAN, K.B., MELIKSETYAN, V.S., ANDREASYAN, N.A., MARKOSYAN, A.A. Characteristics of cyclodextrin production using cyclodextrin glucanotransferases from various groups of microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 38 (6), p. 527-535, 2002.

ABELYAN, V.A., BALAYAN, A.M., GHOCHIKYAN, V.T., MARKOSYAN, A.A. Transglycosylation of stevioside by cyclodextrin glucanotransferases of various groups of microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiolog.,* v. 40 (2), p. 129-134, 2004.

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, p.188.

ALVES PRADO, H. F., HILÁRIO, E., GOMES, E., DA SIILVA, R. Seleção de microrganismos produtores de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produção e caracterização da enzima. *Brazilian Journal of Food Technology,* v. 5, p. 189-196, 2002.

BENDER, H. Production, characterization, and application of cyclodextrins. *Advances in Biotechnological Processes*. v.6, p. 31-71, 1986.

CHAROENLAP, N., DHARMSTHITI, S., SIRISANSANEEYAKUL, S., LERTSIRI, S. Optimization of cyclodextrin production from sago starch. *Bioresource Technology*, v.92, p.49-54, 2004.

DAMASO, M.C.T., ANDRADE, C.M.M.C., PEREIRA JR, N. Use of corncob for endoxyanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* IOOC-4145. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.84, p. 821-834, 2000.

DIAS, A.A.M., ANDRADE, C.M.M.C., LINARDI, V.R. Production of amylases by Cândida in liquid and semisolid fermentation. *Revista de Microbiologia*. v. 23, p. 189-193, 1992.

GAWANDE, B.N., SINGH, R.K., CHAUHAN, A.K., GOEL, A., PATKAR, A.Y. Optimization of cyclodextrin glycosyltransferase production from *Bacillus firmus*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.22, p.288-291, 1998.

GAWANDE, B.N., SONAWANE, A.M., JOGDAND, V.V., PATKAR, A.Y. Optimization of cyclodextrin glycosyltransferase production from *Klebsiella pneumoniae* AS-22 in batch, fed-batch and continuous cultures. *Biotechnology Progress*, v. 19, p. 1697-1702, 2003.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

HATREE, E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry* , v 48, p 422-427, 1972.

KEMBHAVI, A. A.; KULKARNI, A.; PANTI, A. Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM N° 64. *Applied Biochemistry and Biotechnology,* n. 38, p. 83 – 92, 1993.

LEE, J. H.; CHOI, K. H.; LEE, Y. S.; KWON, I.B. and 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.

MÄKELÄ, M. J., KORPELA, T. K., PUISTO, J. AND LAAKSO, S. V. Nonchromatographic cyclodextrin assays: evaluation of sensitivity, and conversion mixture applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* v. 36, p. 83-88, 1988.

MARTINS, R. F., HATTI-KAUL, R. A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkaaliphile *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, p. 116-124, 2002.

MARTINS, R. F., HATTI-KAUL, R. *Bacillus agaradhaerens* LS-3C cyclodextrin glycosyltransferase: activity and stability features. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, p. 819-827, 2003.

MATIOLI, G.; ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. *Ciclodextrinas: e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais*. Maringá: Eduem, 2000, p. 124.

NAKAMURA, N., HORIKOSHI, K. Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase-producing alkalophilic *Bacillus* sp. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.40, p.753-757, 1976.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PSZCZOLA, D. E. Production and potential food applications of cyclodextrins. *Food Technology*. January, p.96-100, 1988.

RAMAKRISHNAA, S.V., SASWATHI, N., SHEELA, R., JAMUNA, R. Evaluation of solid, slurry, and submerged fermentations for the production of cyclodextrin glycosyltransferase by *Bacillus cereus*. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 16 (5), p. 441-444, 1994.

unesp

ROSSO, A.M., FERRROTTI, S.A., KRYMKIEWICZ, N., NUDEL, B.C. Optimization of batch culture conditions for cyclodextrin glucanotransferase production form *Bacillus circulans* DF 9R. *Microbial Cell Factories*, 2002. Disponível em: <http://www.microbialcellfactories.com/content/l/l/3>, consultado em: 2/02/2004.

SHIBUYA, T., AGA, H., WATANABE, H., SONODA, T., KUBOTO, M., FUKUDA, S., KURIMOTO, M., TSUJISAKA, Y. Transglycosylation of glycosyl residues to cyclic tetrasaccharide by *Bacillus stearothermophillus* cyclomaltodextrin glucanotransferase using cyclomaltodextrin as the glycosyl donor. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.67, n.5, p.1094-1100, 2003.

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.

TONKOVA, A. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme and Microbial Technology,* v.22, p.678-686, 1998.

UITDEHAAG, J.C.M., VAN DER VEEN, B.A., DIJKHUIZEN, L., DIJKSTRA, B.W., Catalytic mechanism and product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase, a prototypical transglycosylase from the α-amylase family. *Enzyme and Microbial Technology,* v.30, p.295-304, 2002.

VAN DER MAAREL, M.J.E.C., VAN DER VEEN, B.A., UITDEHAAG, J.C.M., LEEMHUIS, H., DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family. *Journal of Biotechnology,* v. 94, p.137-155, 2002.

VAN DER VEEN, B.A., UITDEHAAG, J.C.M., DIJKSTRA, B.W., DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochimica et Biophysica Acta,* v. 1543, p.336-360, 2000.

VAN DER VEEN, B.A., LEEMHUIS, H., KRALJ, S., UITDEHAAG, J.C.M., DIJKSTRA, B.W., DIJKHUIZEN, L. Hydrophobic amino acid residues in the acceptor binding site are main determinants for reaction mechanism and specificity of cyclodextrin-glycosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry,* v. 276 (48), p.44557-44562, 2001.

VETTER, D., THORN, W. Chain length specificity of cyclodextrin glycosyltransferase. *Starch/Stärke*. v. 44, p.229-233, 1992

YU, E. K. C.; AOKI, H. AND MISAWA, M. Specific alpha-cyclodextrin production by a novel thermostable cyclodextrin glycosyltransferase. *Applied Microbiology and Biotechnology,* v.28, p. 377-379, 1988.

CAPÍTULO III

APLICAÇÃO DA ENZIMA CGTase DE *BACILLUS* sp SUBGRUPO *ALCALOPHILUS* E16 EM PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO.

I - INTRODUÇÃO

A enzima ciclodextrina-glicosil-transferase (CGTase, EC 2.4.1.19), que possui a capacidade única de formação de ciclodextrinas (CDs) a partir do amido (VAN DER VEEN et al., 2000). Ela catalisa a conversão do amido em

ciclodextrinas por meio de reações reversíveis de transglicosilação intramolecular (ciclização). Exibe, ainda, atividade em reações de transglicosilação intermolecular (acoplamento e desproporcionamento) e, em menor intensidade, em reações de hidrólise de amido (VAN DER VEEN et al., 2001; VAN DER MAAREL et al., 2002 MARTINS & HATTI-KAUL, 2003; CHAROENLAP et al., 2004).

A CGTase é uma enzima monomérica, com peso molecular da ordem de 74,5 kD e que apresenta uma seqüência de aminoácidos que revela uma similaridade estrutural com a enzima α-amilase, sendo por isso considerada uma enzima da família das amilases (VETTER & THORN, 1992; UITDEHAAG et al.; 2002). É uma enzima composta de uma única cadeia de polipeptídios com aproximadamente 650 aminoácidos. Essa enzima não possui ligações intramoleculares por pontes de dissulfeto, mas necessita de cálcio para manter sua atividade catalítica (MATIOLI et al.; 2000).

As CGTases são enzimas importantes porque produzem as ciclodextrinas, sendo esta a base de sua aplicação industrial. As ciclodextrinas são moléculas cíclicas formadas por monômeros de glicoses, unidos por ligações glicosídicas α-1,4. As CDs mais conhecidas são do tipo α-, β- e γ- CD, consistindo de seis, sete e oito monômeros de glicose, respectivamente. Estes monômeros estabelecem interações intermoleculares, formando um anel (figura 1), conferindo rigidez à molécula de ciclodextrina (PSZCZOLA, 1988, VAN DER VEEN et al., 2000; SHIBUYA et al., 2003).

unesp

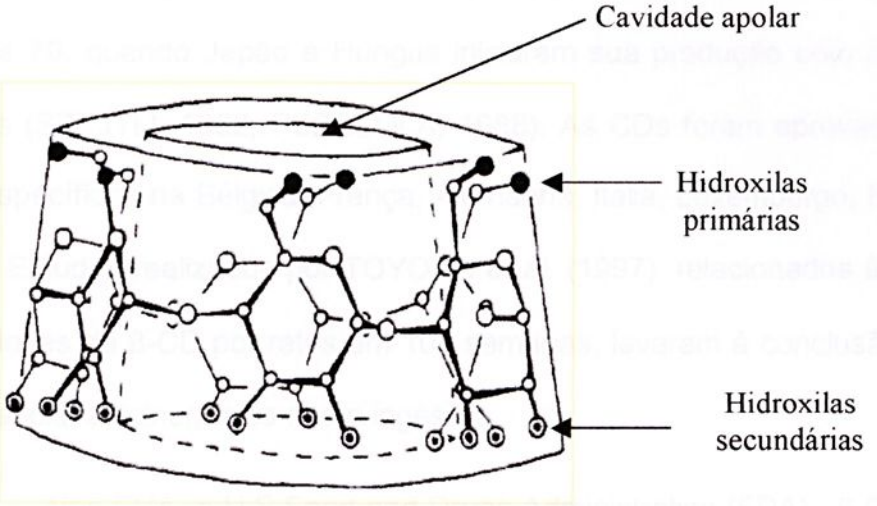


Figura 1: Aspecto da estrutura anelar de uma ciclodextrina (PSZCZOLA, 1988).

A característica mais extraordinária das CDs é sua habilidade de formar complexos de inclusão com uma variedade de compostos sólidos, líquidos e gasosos, isto é, o aprisionamento de várias moléculas externas (moléculas hóspedes) dentro da cavidade de uma CD (molécula hospedeira). Tal característica deve-se à estrutura geométrica das ciclodextrinas, com a cavidade interna hidrofóbica e a região externa hidrofílica, sendo possível à formação de complexos de inclusão cristalinos com uma variedade de substâncias. Esse fenômeno pode melhorar as propriedades químicas e físicas da molécula encapsulada (BENDER, 1986; VAN DER VEEN et al., 2000; SINGH et al., 2002). A necessidade mínima para a formação desse complexo de inclusão é que a molécula hóspede deve se adequar inteiramente, ou ao menos parcialmente, dentro da cavidade da CD (MATIOLI et al.; 2000).

As CDs passaram a ser utilizadas na indústria alimentícia a partir da década de 70, quando Japão e Hungria iniciaram sua produção com propósitos comerciais (SZEJTLI, 1982; PSZCZOLA, 1988). As CDs foram aprovadas como aditivos específicos na Bélgica, França, Alemanha, Itália, Luxemburgo, Holanda e Espanha. Estudos realizados por TOYODA et al. (1997) relacionados à ingestão de altas doses de β-CD por ratos em 104 semanas, levaram à conclusão de não haver potencial carcinogênico nesta ingestão.

Nos EUA, o U.S.Food and Drugs Administration (FDA), β-CD (2001) e γ-CD (2000) conferiu o titulo de "Substances Generally Recognized as Safe" (GRAS), e foram liberadas para o uso como aditivos em alimentos e fármacos. Todos os três tipos de CDs (α, β e γ) são aprovados na Hungria, Japão e Holanda como aditivos diretos em alimentos e medicamentos não-controlados. Na Austrália, a Australia Food Standards Code, permite o uso da β-CD para a extração de colesterol em ovos, mas não na complexação de aromas (PSZCZOLA, 1988; STARNES, 1990; SHUKLA, 1991; ALLEGRE & DERATANI, 1994, ALVES-PRADO, 2000).

No Brasil, o uso de ciclodextrina é encontrado no medicamento brexin® , antigo cicladol®, onde temos o complexo β-CD-piroxicam. No mercado brasileiro ainda, é permitido pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) a venda e o consumo de aromas complexados em β-CD.

A utilização de ciclodextrina complexada a fármacos, aromas e inseticidas vem sendo pesquisada no Brasil. Na UNICAMP, em 2001, foi apresentado um estudo sobre o uso de ciclodextrinas como carreadora de praziquantel (fármaco utilizada no tratamento de esquistossomose e outros helmintos), para melhorar a biodisponibilidade do principio ativo do fármaco que é pouco solúvel (JESUS et al., 2001) e, em 2003, o estudo de inclusão de bioaromas de gorgonzola em β-CD foi apresentado em tese de doutorado (MARTINS, 2003). Ainda, na UEM, BERGAMASSO (2003) pesquisou a redução da perda de sulfluramida por sublimação na produção de inseticida, por meio do aumento da estabilidade desta molécula via inclusão molecular com ciclodextrinas.

Um dos principais campos de aplicação das CDs na indústria de alimentos, com relação à inclusão de componentes, está relacionada à inclusão de agentes aromatizantes, freqüentemente de alto valor comercial, e à extração do colesterol de certos alimentos, por meio do processo de inclusão deste em CDs. Outras aplicações na indústria de alimentos estão relacionadas a: adoçantes, extratos de plantas, óleos, vitaminas e anti-sépticos. Na prática, a inclusão pode aumentar a estabilidade da molécula hóspede frente ao calor, levando à diminuição da volatilidade ou aumentando a resistência térmica. Pode, também, aumentar a estabilidade frente à oxidação e, ainda, diminuir o poder irritante ou disfarçar o gosto amargo e cheiros desagradáveis de determinados compostos. Para compostos relativamente insolúveis em água, a inclusão pode melhorar a solubilidade e a cinética de dissolução (SINGH et al., 2002).

unesp

Em adição à produção de ciclodextrinas, pesquisas recentes tem também concentrado o uso de CGTase como catalisadora de reações de acoplamento e desproporcionamento para a transferência de oligossacarídeos de um substrato doador, como o amido ou a própria ciclodextrina para várias moléculas aceptoras, resultando em um novo componente glicosilado (VAN DER VEEN et al., 2000, SHIBUYA et al., 2003).

ABELYAN et al. (2004) relataram a ação de CGTases, provenientes de diversos grupos de microrganismos, na glicosilação do steviosídeo. Este composto, isolado da planta *Stevia rabaudiana*, possui baixas calorias e tem alto poder adoçante (250 a 300 vezes mais doce que o açúcar), mas possui um residual gosto amargo e baixa solubilidade. A transglicosilação catalisada pela CGTase resultou na diminuição do amargor do composto como o aumento de sua solubilidade.

Ha ainda, relatos da utilização da CGTase na indústria alimentícia na preparação de massas de produtos panificação, onde a incorporação da enzima na massa provocaria o aumento do volume do produto de panificação. (VAN DER VEEN et al., 2000; VAN DER MAAREL et al., 2002).

VAN EIJK & MUTSAERS, em 1999, patentearam um processo de utilização da enzima CGTase na massa de produtos de panificação, em substituição ao uso de ciclodextrinas, com o intuito de promover um maior volume e melhor aeração na massa desses produtos, eliminando assim os inconvenientes da utilização direta de β-CDs em massas de panificação que, apesar de

promoverem um aumento do volume desses produtos e uma melhor aromatização, apresentam problemas de tornarem a massa extremamente pegajosa e portanto de difícil manuseio das máquinas envolvidas na produção desses produtos de panificação.

Mais recentemente, são encontrados trabalhos onde a enzima CGTase é utilizada em produtos de panificação com o intuito de retardar o envelhecimento desses produtos (LEE et al., 2002; SHIM et al., 2004) e para melhorar a reologia e a qualidade da farinha de arroz, utilizada na produção de produtos de panificação para pessoas que possuem intolerância ao glúten. (GUJRAL et al., 2003).

Nenhum trabalho ou patente foi encontrado utilizando a enzima CGTase com o intuito de melhorar a retenção de aroma em produtos de panificação, especialmente bolos, por meio da complexação destes aromas com ciclodextrinas produzidas na massa pela enzima.

Assim, neste trabalho objetivou-se a aplicação de uma enzima CGTase semi-purificada em produtos de panificação, visando a produção de ciclodextrinas diretamente na massa destes produtos, e ainda, observar se houve indícios de inclusão do aroma com as ciclodextrinas presentes nas massas.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1 – Microrganismo.

O microrganismo utilizado foi isolado por ALVES-PRADO (2000) no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (IBILCE/UNESP) e identificado como *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello" – Campinas – SP.

2 - Enzima.

Foi utilizado o extrato enzimático (CGTase) produzido pelo *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 em fermentação submersa.

3 – Meio de Cultivo para Pré-Inóculos:

Para os pré-inóculos, utilizou-se o meio proposto por ALVES-PRADO (2000) composto por 1,35% de amido solúvel (Synth); 0,49% de peptona (BioBrás); 0,59% de extrato de levedura (BioBrás); 0,1% de K_2HPO_4; 1,3% de Na_2CO_3 (adicionado separadamente após resfriamento), pH final 10,10. O tempo de cultivo foi de 48h, 37ºC, com agitação de 150rpm.

4 - Produção da CGTase em Fermentação Submersa.

Para a produção da CGTase foi utilizado o meio proposto por ALVES-PRADO (2000) composto por 1,35% de amido solúvel(Synth); 0,49% de

peptona (BioBrás); 0,59% de extrato de levedura (BioBrás); 0,1% de K_2HPO_4; 1,25% de Na_2CO_3 (adicionado separadamente após resfriamento); pH 10,10. A fermentação foi desenvolvida em erlenmeyers de 500mL, contendo 100mL de meio, os quais foram inoculados com 10mL de pré inóculo de 24h. A fermentação se deu a 35°C sob agitação de 180rpm por 48h. O material fermentado foi centrifugado a 10.000xg, por 15 minutos, sob refrigeração (5ºC). O sobrenadante, livre das células, foi utilizado para as análises enzimáticas e purificação.

5 - Determinação da Atividade da CGTase.

A atividade da CGTase foi analisada pelo método dextrinizante descrito por FUWA (1954) e PONGAWASDI & YAGISAWA (1987) com algumas modificações e pelo método CD-fenolftaleína baseado no proposto por MÄKELÄ et al (1988).

5.1- Método Dextrinizante:

A reação foi composta por 0,1mL da solução enzimática, convenientemente diluída, adicionada a 0,3mL de solução de amido solúvel a 0,5%, em tampão acetato 0,1M, pH 5,5. Após a incubação a 55°C, por 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 4,0mL de solução de HCl 0,2M. Em seguida, a reação recebeu 0,5mL de reativo de Iodo (0,30% de KI e 0,03% de I_2).

A mistura de reação foi diluída com 10mL de água destilada. O controle foi preparado conforme o processo descrito, substituindo-se o volume de

enzima pelo volume equivalente de água. A absorvância foi determinada a 700nm 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.

5.2 - Método CD-fenolftaleína

0,1mL de solução enzimática foi adicionada a 0,8mL de solução de (1,0%) maltodextrina (Aldrich), em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,5. Após incubação, a 55°C por 10 minutos, a reação foi paralisada com a adição de 4,0mL de solução de Na_2CO_3 0,25M. Em seguida, acrescentou-se 0,1mL de solução de fenolftaleína (50% etanol) 1mM.

Para a solução controle seguiu-se os mesmos procedimentos acima, com exceção da solução enzimática que foi adicionada apenas no momento da leitura. A absorvância foi determinada em 550nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1µmol de β-ciclodextrina, por minuto e por mL de solução enzimática.

6 – Determinação de Proteínas .

Para determinar a concentração de proteínas no extrato enzimático foi usado o método Hartree-Lowry (HARTREE, 1972), usando soro albumina bovina como padrão. Na tabela I são indicados os reagentes utilizados:

Tabela I: Reagentes usados no método Hartree-Lowry.

REAGENTE A	REAGENTE B	REAGENTE C
0,4g de $KNaC_4H_4O_6.4H_2O$ (7mM), 20g de Na_2CO_3 (0,81M), 100mL de NaOH (0,5N), completar p/ 200mL c/ H_2O.	0,4g de $KNaC_4H_4O_6.4H_2O$ (7mM), 0,2g $CuSO_4.5H_2O$ (0,04M), 2mL NaOH (0,5N) 18mL de H_2O.	diluir 1 volume de Folin Ciocalteau (Sigma) com 15 volumes de água.
Estocagem: 2 a 3 meses em temperatura ambiente e frasco de plástico.	Estocagem: 2 a 3 meses em temperatura ambiente e frasco de plástico	Estocagem: preparar diariamente 16mL ou múltiplos deste, não estocar.

A mistura de reação foi preparada com 1mL da amostra de proteína convenientemente diluída adicionada a 0,9mL do reagente A . A mistura da reação foi incubada a 50°C, por 10 minutos em banho-maria. Em seguida, resfriou-se a amostra à temperatura ambiente e adicionou-se 0,1mL do reagente B. Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, a reação recebeu 3mL do reagente C e foi incubada a 50°C, por 10 minutos em banho-maria. O branco foi feito seguindo-se todos os procedimentos descritos acima mas, substituindo a amostra de proteína por água. A absorvância foi determinada em espectrofotômetro a 650nm.

7 – Determinação de Proteases.

Para determinar a concentração de proteases no extrato enzimático foi usado o método modificado de KEMBHAVI et al., 1993.

A reação consistiu de: 0,2mL de solução enzimática adicionada a 0,8mL de solução de caseína a 1,0%, em tampão acetato 0,1M, pH 5,5. Após incubação a 37°C, por 60 minutos, a reação foi paralisada com a adição de 1,0mL de solução de TCA 10%. Em seguida, a amostra foi resfriada em banho de gelo por 30 minutos e depois centrifugada a 6.000xg por 5 minutos. O branco consistiu de 1mL de água mais 1mL de solução de TCA 10% e o controle recebeu a solução enzimática apenas após a incubação a 37ºC, sendo um controle para cada amostra. A absorvância foi determinada em 280nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que conduzia à variação de 0,01 de absorvância.

8 - Purificação Parcial da CGTase.

8.1 - Concentração da CGTase Presente no Extrato Bruto:

A CGTase presente no extrato bruto foi concentrada por precipitação com sulfato de amônio até 80% de saturação (v/v), durante a noite a 4°C. O precipitado foi centrifugado, ressuspendido e dialisado em tampão Tris-HCl 20mM, pH 7,5. Depois a enzima bruta concentrada foi filtrada em membrana de 0,45µm de poro da Millipore e armazenada sob refrigeração.

8.2 - Cromatografia de troca iônica:

A enzima precipitada foi submetida à cromatografia de troca iônica contendo a resina aniônica Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia, Sweden). A coluna X/K 50/20 da Pharmacia, apresenta em seu leito um volume de 50mL de resina. A resina foi equilibrada com o mesmo tampão, durante uma noite. Para esse processo cromatográfico foi utilizado o equipamento de alta pressão, AKTÄ purifier (Amersham Pharmacia Bioscience, Sweden). Para a eluição da enzima foi utilizado o tampão Tris-HCl 20mM, pH 7,5, com um fluxo de 1mL/min, sendo coletadas amostras de 5mL do líquido eluído, por tubo, em coletor de frações Frac100 (Pharmacia, Sweden). Para a eluição da proteína foi usado um gradiente salino de 0 a 0,5M de NaCl em 6 a 8 volumes de coluna (VC).

9 – Hidrólise do Amido de Trigo.

9.1- Extração do Amido de Trigo:

O amido de trigo utilizado foi extraído manualmente de farinha de trigo por meio de lavagens sucessivas da farinha, onde a água da lavagem foi armazenada em béqueres e deixada em repouso por 24h, para decantação do amido de trigo. Após a decantação do amido, o sobrenadante foi descartado e o amido secado em estufa a 40ºC por 12h. Após a secagem o amido foi triturado em almofariz (DANIEL, 1978).

9.2 – Hidrólise:

Foram preparadas soluções de amido de trigo contendo 2g de amido em um volume final de 100mL de tampão acetato 0,1 M, pH 5,5 (p/v). A solução foi autoclavada por 10 minutos e em seguida, foi adicionada 0,6mL de enzima CGTase (22U/mL). A hidrólise deu-se a 55^{0}C sob agitação de 100rpm.

Foram retirados 3mL de amostras do hidrolisado em diferentes intervalos de tempo: 0', 5', 10',15',20',40',1h,1,5h, 2h, 4h, 8h, 12h e 24h, para análise da atividade enzimática. Todo o experimento foi realizado em duplicata.

10 - Aplicação da Enzima nos Produtos de Panificação.

10.1 – Aplicação da CGTase em Pães:

Foram preparadas massas de pães contendo: margarina (8g); sal (8g), açúcar cristal (18g); 3,0g de fermento biológico; 70g de farinha de trigo, 25mL de água. A massa foi dividida em duas partes iguais, uma parte recebeu 1 mL de CGTase (12 U/mL) e a outra parte recebeu 1mL de água destilada e foi utilizada para o pão controle. Foram obtidos, assim, pães com aproximadamente 65g antes do forneamento.

A massa de cada pão ficou 20 minutos em repouso, para a atuação do fermento, e posteriormente, foram forneados a uma temperatura de 180ºC por 30 minutos. Foram preparados pães em duplicata com e sem a enzima.

10.2 – Aplicação da CGTase em Bolos:

Foram usadas no preparo dos bolos massas semiprontas (Boa Sorte) onde foi acrescentado 2 ovos e 150mL de leite. A massa foi dividida em partes iguais com 40g cada, e posteriormente, após o acréscimo da enzima, foram novamente subdivididas em porções menores de 20g cada e colocadas em formas de empadas para serem forneadas. O forneamento dos bolos se deu à temperatura de 180ºC por 20 minutos.

10.2.1 – Ensaio para a Determinação da Quantidade de Enzima a ser Usada em Bolos:

A massa foi preparada como descrito no item 10.2 e foram separadas desta cinco porções (40g cada). Quatro partes de massa receberam um volume crescente de enzima CGTase (12U/mL) sendo estes: 0,4mL, 0,8mL, 1,2mL e 1,6mL de enzima, e uma quinta parte foi usada como controle onde não foi adicionada enzima. As massas foram colocadas para o forneamento em formas de empada contendo 20g de massa para cada forma. Foram preparados bolos em duplicata para todos os ensaios.

10.2.2 – Ensaio utilizando CGTase e Agentes Aromatizantes em Bolos:

Realizou-se um ensaio para os bolos com enzima CGTase semipurificada e agente aromatizante de limão onde, duas partes de massa (40g cada) receberam cada uma 1,6mL de flavor de limão (Siamara), e em somente

uma delas foi adicionado 1,6mL de enzima CGTase (12U/mL) e a outra, que foi usada como controle, recebeu 1,6mL de água destilada. As massas foram colocadas para o forneamento em formas de empada contendo 20g de massa para cada forma. Foram preparados bolos em duplicata para todos os ensaios.

10.2.3 – Aplicação da CGTase da linhagem E16 e da CGTase Comercial em Bolos com Agentes Aromatizantes:

Um ensaio foi realizado para comparação da ação da enzima CGTase da linhagem E16 e a CGTase comercial (Toruzyme®), ambas semipurificadas como descrito no item 8.2, e com aromatizante de limão. Foram utilizadas massas preparadas como descrito no item 10.2 onde, quatro partes de massa (20g cada) foram reservadas para o ensaio. Todas as quatro porções receberam cada uma 1,0mL de flavor de limão (Siamara).

As duas primeiras porções de massa (20g cada) foram utilizadas para o estudo da enzima da linhagem E16, sendo que a primeira porção recebeu 1,0ml da enzima CGTase ativa (22U/mL) e a outra, que foi usada como controle, recebeu 1,0mL da mesma enzima só que inativada (fervura por 10 minutos). As massas foram colocadas para o forneamento em formas de empada contendo 20g de massa.

Nas outras duas últimas porções de massa (20g cada) foram usadas a CGTase Comercial (Toruzyme®). A primeira porção recebeu 1,0ml da enzima Comercial ativa (22U/mL) e a outra, que foi usada como controle, recebeu 1,0mL

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto
T. 1407/05

da mesma enzima inativada (fervura por 10 minutos). As massas foram colocadas para o forneamento em formas de empada contendo 20g de massa.

11 - Análise das CDs produzidas na Massa.

Depois de forneados, amostras dos produtos de panificação foram homogeneizadas em um almofariz com água e Na_2CO_3. Em seguida, a solução final foi centrifugada e o sobrenadante separado para a realização da quantificação de CDs produzidas. A quantidade de CDs produzidas foi expressa com relação ao peso seco do produto.

11.1 - Teste qualitativo: Colorimétrico CD- fenolftaleína:

Amostras de cada produto de panificação (pães e bolos) com e sem enzima, foram embebidas em 8mL de uma solução de Na_2CO_3 0,25M com 0,2mL de solução fenolftaleína 2mM (50% de etanol) e observada a pigmentação da massa. As amostras controles foram comparadas com as amostras com CGTase, e a comparação se deu com relação ao decréscimo da intensidade da cor rosa na massa que ocorre quando a CD esta presente e se complexa com a fenolftaleína.

11.2- Teste quantitativo: Método CD-fenolftaleina:

Para os pães: Foram maceradas em almofariz 2,5g de cada amostra de pão, com e sem enzima, acrescidos de 4mL água e 4mL solução de Na_2CO_3. 0,25M. A pasta liquida e lisa produzida foi centrifugada 10.000xg por 15 minutos sob refrigeração (5ºC), e o sobrenadante foi retirado para dosagem de CDs. A reação

para análise das CDs foi realizada colocando 4mL do sobrenadante em tubos de ensaio e adicionando 0,1mL de solução de fenolftaleína 1mM (50% de etanol) e determinada a absorvância das amostras em 550nm. A quantidade de CDs foi definida de acordo com o descrito no item 5.2.

Para os bolos: Foram maceradas em almofariz 7,5g de cada amostra de bolo, com e sem enzima, acrescidos de 18mL de água e 12mL de solução de Na_2CO_3, 0,25M. A pasta liquida e lisa produzida foi centrifugada 10.000xg por 20 minutos sob refrigeração a 5ºC, e o sobrenadante foi retirado para a dosagem de CDs. A quantidade de CD foi expressa como descrito para os pães.

12 – Análise da Retenção de Aroma pelas CDs produzidas na Massa do Bolo.

Amostras dos bolos (2g) produzidos no item 10.2.3, foram maceradas e peneiradas e acondicionadas em frascos de vidro com tampas de borracha e selados com parafilme, a fim de permitirem análises do tipo "Headspace". Estas foram analisadas por "Headspace" em cromatografia gasosa - FID em aparelho HP 5890 serie II acoplado a detector de ionização de chama e coluna FFPA (25 m, 0,25mm di, 0,3μ filme) com gás nitrogênio (20 psig) e um forno programado com temperatura inicial de 50ºC por 5 minutos seguidos de aumenta de 10ºC por minuto até 220ºC e mantida a esta temperatura por 5 minutos. A temperatura do detector foi de 250ºC. Antes das aplicações as amostras foram aquecidas a 50ºC. Um volume de 0,5mL de gases de cada amostra foi injetado com split (1:20) com seringas de 1,0mL no cromatógrafo.

III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

1- Purificação da Enzima.

O uso da CGTase parcialmente purificada teve o objetivo de evitar a presença de outras enzimas tais como amilases e proteases, as quais podem trazer problemas quanto às propriedades de textura e organolépticas aos produtos de panificação.

A CGTase obtida por fermentação submersa foi concentrada com sulfato de amônio até 80% de saturação. Em seguida, foi dialisada em tampão Tris-HCl 20Mm, pH 7,5. Assim a CGTase foi submetida à cromatografia de troca iônica em resina Q Sepharose® Fast Flow (Pharmacia, Sweden), como descrito no item 8.2 do Materiais e Métodos. A figura 1 apresenta o perfil de eluição das proteínas presentes na solução enzimática, observando-se apenas um pico de atividade para a CGTase. Verificou-se que a CGTase foi eluída numa concentração salina de 0,18M de NaCl.

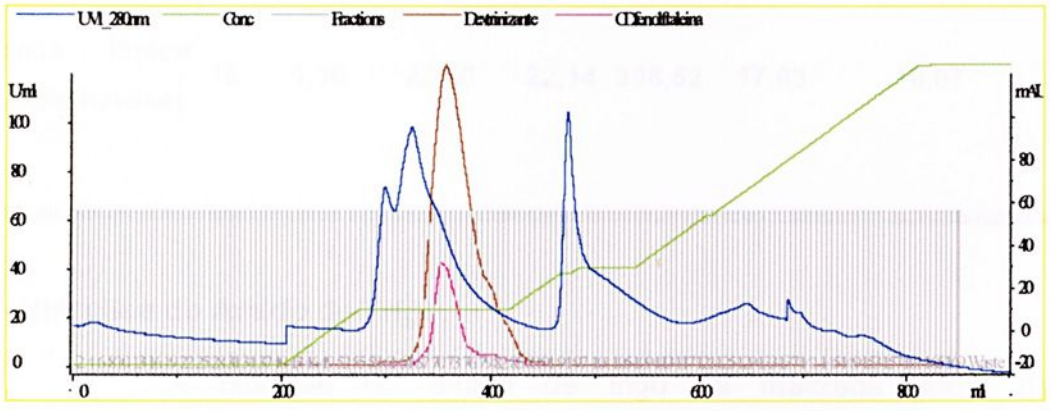


Figura 1: Perfil de eluição da CGTase em cromatografia de troca iônica Q Sepharose.

Observando o perfil de eluição obtido neste estudo é possível supor que esta etapa de purificação foi eficiente no isolamento da CGTase. Alguns autores relataram a purificação da CGTase em apenas uma etapa de purificação (MARTINS & HATTI-KAUL, 2002; PONGSAWASDI & YAGISAWA, 1988). O resumo das etapas para a purificação da CGTase é apresentado na tabela II

Tabela II: Resumo das etapas para purificação da CGTase.

	PROTEÍNA			ATIVIDADE CD - FENOLFTALEÍNA			FATOR DE PURIFICAÇAO	REND. (%)
	V (mL)	mg/mL	mg total	U/mL	U total	Específica		
Extrato Bruto	**1500**	**1,97**	**2955,00**	**2,09**	**3135,00**	**1,06**	**1**	**100**
Concentração por $(NH_4)_2SO_4$	**31**	**5,20**	**161,20**	**35,16**	**1089,96**	**6,76**	**6,38**	**34,8**
Troca lônica (Q-Sepharose)	**18**	**1,30**	**23,40**	**22,14**	**398,52**	**17,03**	**16,07**	**12,7**

2- Hidrolise do Amido de Trigo.

A hidrólise do amido de trigo foi realizada como descrito anteriormente no item 9 do Materiais e Métodos, e teve como finalidade estudar a

ação da CGTase sobre esse tipo de amido, importante em processos de panificação. A figura 2 apresenta os dados obtidos pelo método dextrinizante e CD-fenolftaleina

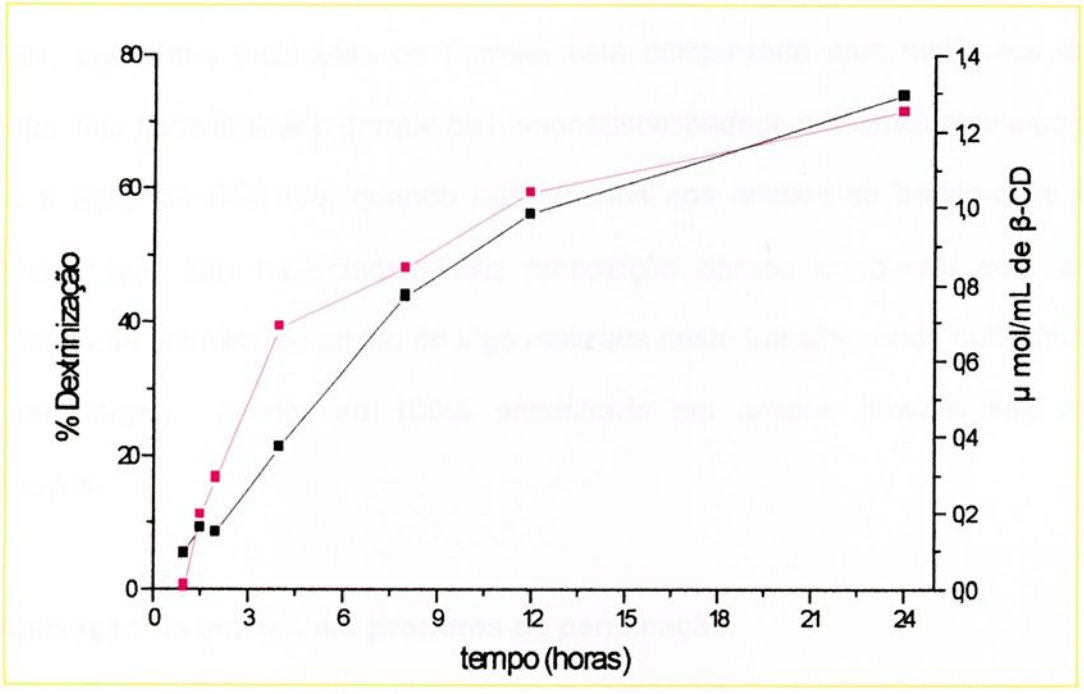


Figura 2: Curva de hidrólise do amido de trigo gelatinizado. (--■--) porcentagem de dextrinização, (--■--) produção de ciclodextrinas.

Com relação ao primeiro método, a porcentagem de dextrinização máxima encontrada para o amido de trigo foi de 75% em 24h. Para a quantificação de ciclodextrinas o maior valor encontrado foi de 1,3 µmol/ml de β-ciclodextrina em 24h. Estes dados foram comparados com os obtidos por ALVES-PRADO et al. (2000) para hidrólise de amidos de outras fontes vegetais usando a CGTase do *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, o rendimento obtido com amido de trigo foi

próximo ao obtido com amido de milho gelatinizado, que apresentou 80% dextrinização, mas foi inferior aos rendimentos obtidos com os amidos de batata-doce e mandioca, que foram de praticamente 100% de dextrinização.

Ainda de acordo com ALVES-PRADO et al. (2000), em amidos de cereais, parte das moléculas de amilose está complexada com moléculas de lipídeos. Isto pode indicar o porque da menor suscetibilidade dos amidos de trigo e milho a ação da CGTase, quando relacionados aos amidos de batata-doce e mandioca que são tubérculos. Essa proposição parece corroborar com os resultados da hidrólise do amido de trigo realizada neste trabalho, onde obtivemos um rendimento inferior ao 100% encontrado em amidos provenientes de tubérculos.

3– Aplicação da enzima em produtos de panificação.

3.1– Aplicação da CGTase em Pães:

As análises dos pães demonstraram que houve a atuação da CGTase. Os pães sem enzima, usados como controle apresentaram uma coloração superficial mais escura, quando comparados aos pães com enzima. De alguma forma a CD produzida reduziu a intensidade da reação de Maillard durante o forneamento. É possível que pela reação de desproporcionação a CGTase tenha reduzido o número de redutores presentes na massa reduzindo a reação de Maillard que proporciona a cor típica em produtos forneados (figura 3).

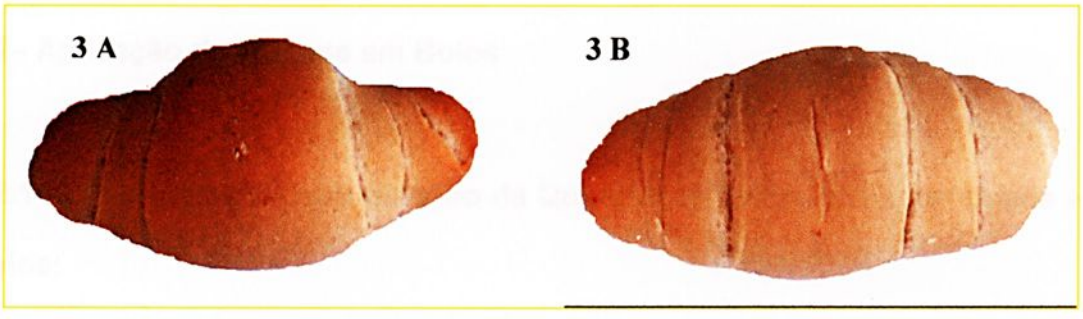


Figura 3 – Pães após forneamento: (3 A) sem enzima (controle), (3B) com enzima.

Por meio do teste qualitativo comprovou-se a ação da CGTase com formação de CDs. A coloração dada pela solução de fenolftaleína + Na_2CO_3 foi mais clara na fatia do pão com a enzima do que a coloração apresentada na fatia do pão sem enzima (figura 4).

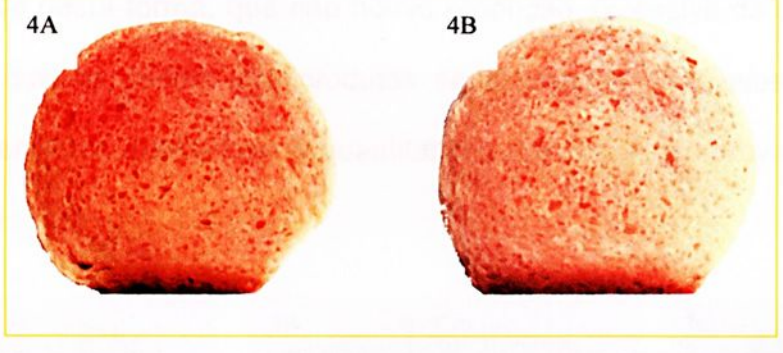


Figura 4 – Teste qualitativo em fatia de pães forneados com fenolftaleína + Na_2CO_3, (4A) sem enzima (controle), (4B) com enzima

Com o teste quantitativo, baseado no método CD-fenolftaleína, analisou-se os extratos das massas de pães com enzima e sem enzima e foi possível identificar a presença da CD. Sendo que em média, para cada 100g de pão (bs) houve uma produção de 16mg de CD. Esta concentração, corresponde a aproximadamente 0,02% de CD no pão. Tal concentração é bem menor que a de 2% para produtos forneados, permitida pelo FDA (HEDGES & McBRIDE, 1999). Assim, tal concentração de CD não traria problemas para o consumo destes pães.

3.2– Aplicação da CGTase em Bolos

3.2.1– Ensaio para a Determinação da Quantidade de Enzima a ser Usada em Bolos:

Foi realizado um ensaio procurando-se observar o efeito da concentração da CGTase na massa dos bolos. Assim, foram preparados bolos com 0,4mL, 0,8mL, 1,2mL e 1,6mL de CGTase. Comparando-se os aumentos de concentração de CGTase na massa dos bolos com o controle (figura 5), observou-se que não houve alteração visual no interior da massa após forneamento, admitindo-se desta forma, que não houve produção excessiva de dextrinas o que faria com que os miolos dos produtos se tornassem pegajosos (SHEPPARD, 1986). As análises qualitativas e quantitativas dos bolos comprovaram a atuação da CGTase.

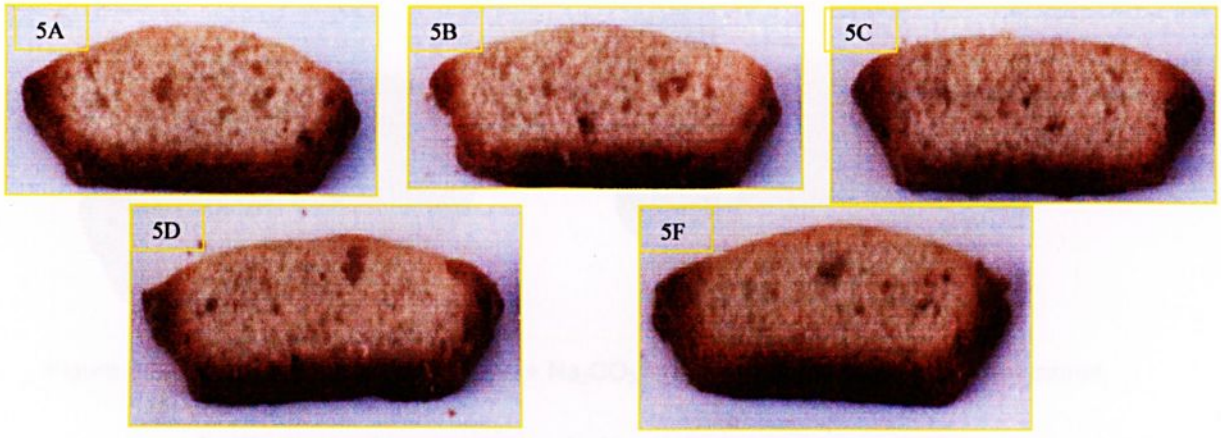


Figura 5: Fatias das massas dos bolos sem e com o gradiente de CGTase. (5A) sem enzima; (5B) 0,4mL; (5C) 0,8mL; (5D) 1,2mL e (5F) 1,6mL de CGTase

O teste quantitativo, baseado no método CD-fenolftaleína, foi aplicado para a análise dos extratos das massas de bolos com enzima e sem enzima. Foi possível identificar a presença da CD nas massas de bolo que receberam as maiores concentrações de CGTase. Nas concentrações menores de enzima não foi possível detectar a formação de CDs. A produção de CDs, baseada no peso seco, nos bolos com 1,2mL de enzima foi de 6,3mg de CD e nos com 1,6mL de enzima de 7,0mg de CD para cada 100g de bolo (bs). Em média, a concentração encontrada corresponde a aproximadamente 0,007% de CD no bolo.

Pelo teste qualitativo (item 11.1 do Materiais e Métodos) foi possível também constatar a ação da CGTase com formação de CDs. A coloração dada pela solução de fenolftaleína + Na_2CO_3 apresentou–se mais clara nos bolos com maior quantidade de enzima do que no bolo controle (figura 6).

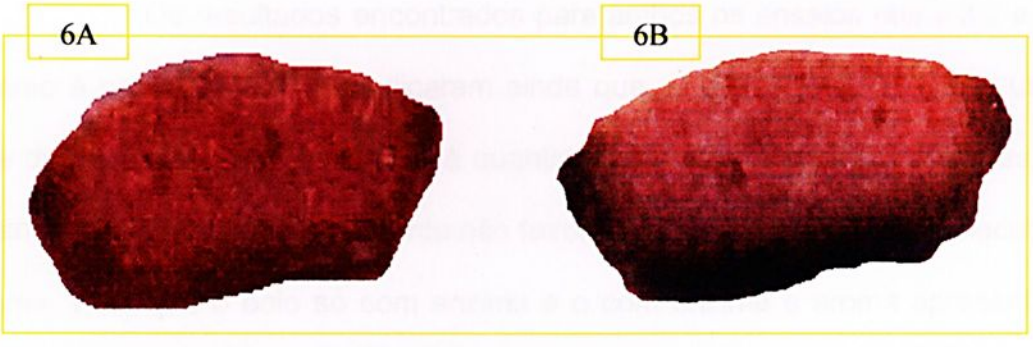


Figura 6 – Teste qualitativo (fenolftaleína + Na_2CO_3): (6A) controle, (6B) c/ 1,6mL de enzima.

A diferença de cor entre o bolo controle e o com enzima apresentou-se mais sutil que nos pães, e pode ser aferida a quantidade de β-CDs encontrada nas massa dos bolos, que foi na ordem de 7mg por 100g de bolo (bs), já nos pães

a quantidade de β-CDs encontrada foi na ordem de 16mg por 100g de pão (bs), o que é mais que o dobro. Esta maior quantidade de ciclodextrinas encontrada no ensaio com pães parece estar relacionada com o maior tempo de atuação da enzima CGTase nos pães devido à massa deste ter que permanecer um período em repousou antes do forneamento para a atuação do fermento.

3.2.2- Ensaio utilizando CGTase e Agentes Aromatizantes em Bolos:

Também se realizou um ensaio de produção de bolos com aroma e CGTase (1,6mL) e, com aroma sem CGTase como controle. Neste ensaio também foi comprovada a produção de CDs tanto visualmente pelo método colorimétrico, quanto pelo método quantitativo. A análise pelo método quantitativo apresentou uma produção de 7,3mg de CD para 100g de bolo (bs) para a massa dos bolos com aroma e enzima.

Os resultados encontrados para ambos os ensaios (itens 3.2 e 3.3), quanto à produção de CD, indicaram ainda que, a atividade da CGTase usada, que diretamente esta relacionada à quantidade de CDs a serem produzidas, não foram adequadas e aparentemente não favoreceram a encapsulação molecular do aroma, visto que o bolo só com enzima e o com enzima e aroma apresentaram quantidades bem próximas de produção de CD (7mg e 7,3mg de CD, respectivamente). Caso houvesse a encapsulação, ao se realizar a análise das massas pelo método CD-fenolftaleína, seriam esperadas quantidades menores de CDs nos bolos com enzima e aroma em comparação aos bolos apenas com

enzima. Como o método usado se baseia na encapsulação da fenolftaleína nas CDs livres, no bolo com aroma haveria menos moléculas livres de CD para encapsular a fenolftaleína.

A aparente ausência de encapsulação molecular do aroma com as CDs presentes nas massas do bolo, parece estar relacionada com a baixa produção de CD encontrada neste ensaio. BHANDARI et al. (1998) descreveu procedimentos para encapsulação de aroma de limão com β-CD. A concentração usada de CD foi de 15g de β-CD para 500ml de solução água/etanol (2:1), ou seja, uma concentração de 3% de CD. Nos ensaios com aroma a concentração encontrada foi de 0,0073% de CD, quantidade bem inferior à sugerida por BHANDARI.

3.2.3- Aplicação da CGTase da linhagem E16 e da CGTase Comercial em Bolos com Agentes Aromatizantes:

Um segundo ensaio com bolos e aroma foi realizado para verificarmos se havia diferença na produção de CDs na massa dos bolos usando para isso duas CGTases semipurificadas como descrito no item 8.2 do Materiais e Métodos. Assim, foram preparados quatro tipos de bolos com aroma de limão, cujas duas primeiras massas foram usadas para a CGTase da linhagem E16 sendo que, uma das massas de bolo recebeu 1,0mL de enzima CGTase ativa e a segunda (controle) 1,0mL de enzima CGTase inativada como descrito no item 10.2.3.

As outras duas massas de bolos utilizadas no experimento receberam: a primeira 1,0mL da CGTase comercial ativa e a segunda (controle) 1,0mL de CGTase comercial inativada como descrito mencionado acima. Neste ensaio, ambas as CGTases empregadas apresentavam 22U/mL de atividade, essa atividade maior foi usada para verificar se haveria uma melhor produção de CDs nas massas.

Comparando-se a atuação das duas CGTases empregadas nas massas dos bolos com seus respectivos controles pelo método CD-fenolftaleina foi constatada a produção de CDs por ambas as enzimas (figura 7), sendo a produção da CGTase da linhagem E16 foi da ordem de 66mg por 100g de bolo (bs), já nos bolos com a enzima comercial a quantidade de β-CDs encontrada foi da ordem de 76mg por 100g de bolo (bs).

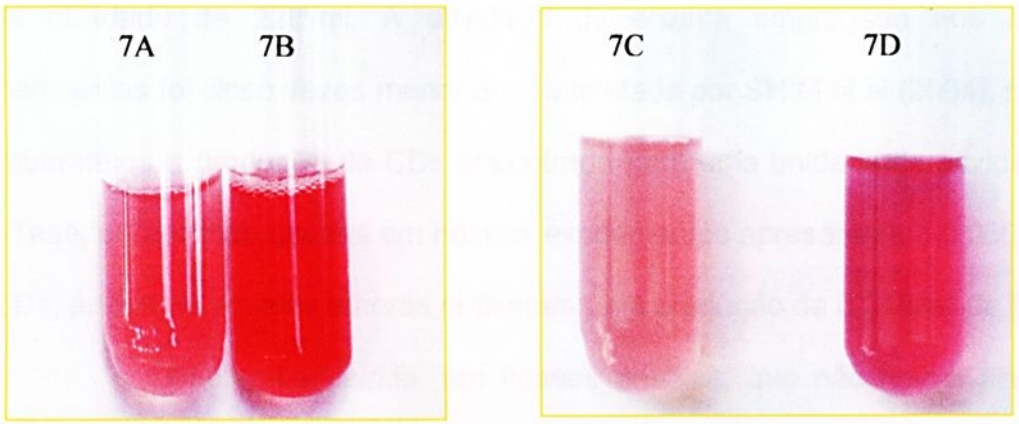


Figura 7 – Teste quantitativo (fenolftaleína + Na_2CO_3): (7A) reação CGTase E16, (7B) reação controle da E16; (7C) reação enzima comercial; (7D) reação controle da enzima comercial.

Em média, a concentração encontrada corresponde a aproximadamente 0,07% de CD no bolo com enzima da linhagem E16 e 0,08%

para a enzima comercial. Tais concentrações são menores que os 2% permitidos pelo FDA para produtos de panificação (HEDGES & McBRIDE, 1999), e encontram-se dentro do limiar aconselhado ao consumo humano e portanto, não oferece risco à saúde . Assim, tais concentrações de CD não trariam problemas para o consumo destes bolos.

Na literatura relatos recentes do uso de CGTase em produtos de panificação vêm sendo encontrados. SHIM et al., em 2004, relatou o uso de uma CGTase proveniente do *Bacillus* sp I-5 *alcalofílico* aplicada em pães, cuja produção de ciclodextrina no interior da massa foi de 213mg por 100g de pão. A enzima aplicada apresentava uma atividade de 120U/mL. Em nossos experimentos a produção de β-CDs encontrada ficou aproximadamente na ordem de 70mg por 100g de pão (bs), sendo que as enzimas utilizadas apresentavam uma atividade de 22U/ml. A atividade da enzima empregada nos nossos experimentos foi cinco vezes menor que a relatada por SHIM et al.(2004), mas ao compararmos a produção de CDs encontrada para uma unidade de atividade de CGTase, as enzimas usadas em nossos experimentos apresentaram 0,030mg de β-CDs, enquanto aqueles autores obtiveram uma produção de 0,018mg de β-CDs.

Observou-se ainda, em nossos ensaios, que não houve alteração visual externa ou do interior da massa após forneamento (figuras 8.1 e 8.2), admitindo-se portanto, que não houve produção excessiva de dextrinas com a utilização da CGTase diretamente na massa, o que faria com que os miolos dos bolos se tornassem pegajosos e grudentos devido a essas dextrinas favorecerem

uma maior retenção de água no interior dos produtos de panificação (SHEPPARD, 1986).

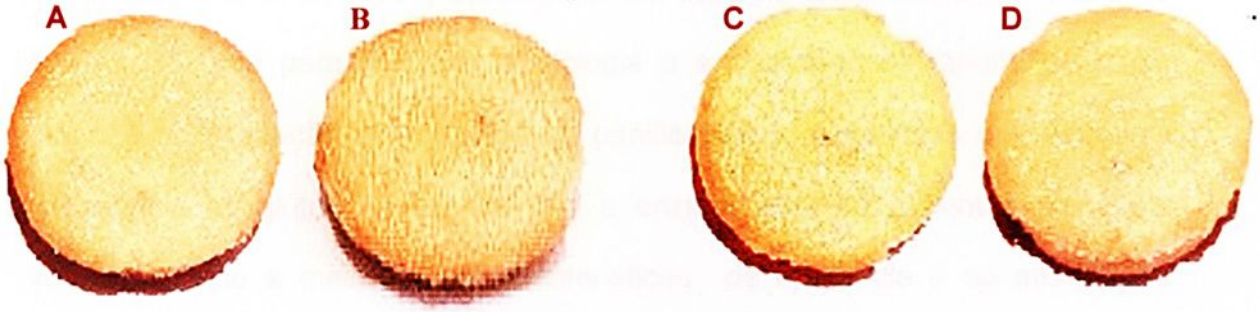


Figura 8.1 – Aspecto externo dos bolos após forneamento: (A) CGTase da linhagem E16; (B) controle E16; (C) CGTase Comercial; (D) controle CGTase comercial.

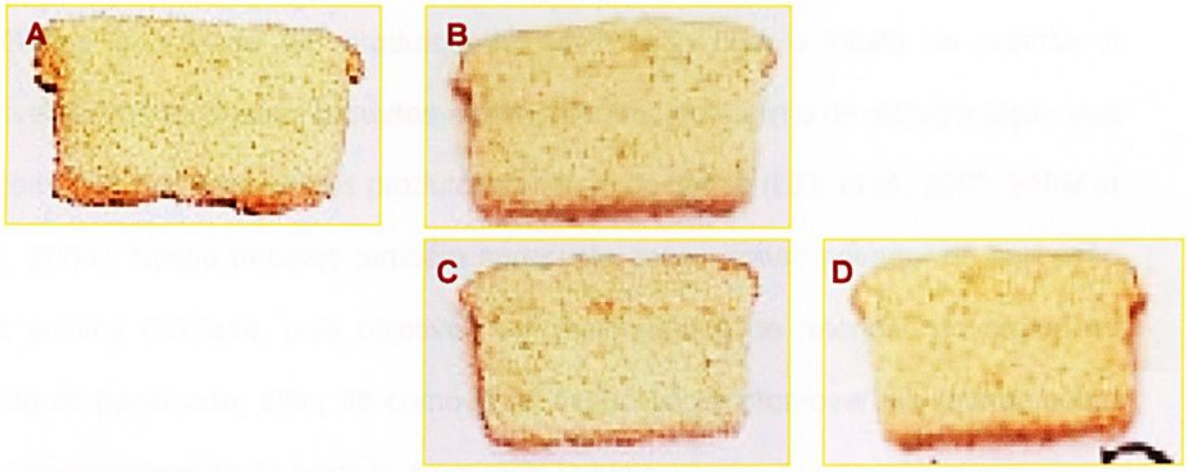


Figura 8.2 – Aspecto interno dos bolos após forneamento: A) CGTase da linhagem E16; (B) controle E16; (C) CGTase Comercial; (D) controle CGTase comercial.

A aplicação da enzima CGTase com o intuito de melhorar as propriedades dos produtos de panificação é recente, somente são encontrados trabalhos referentes aos últimos dez anos.

O uso da enzima CGTase na massa de produtos de panificação com o intuito de promover um maior volume e melhor aeração na massa desses

produtos, tendo ainda como conseqüência uma melhora da aromatização característica desses produtos foi patenteada por VAN EIJK & MUTSAERS, em 1999. GUJRAL et al. (2003) apresentou um trabalho onde é relatado o uso da enzima CGTase para melhorar a reologia e a qualidade da farinha de arroz, utilizada na produção de produtos de panificação para pessoas que possuem intolerância ao glúten. Neste trabalho a enzima além de promover um maior volume, ajudou a melhorar as características de aparência e do miolo após forneamento.

Mais recentemente, são encontrados trabalhos onde a enzima CGTase é utilizada em produtos de panificação com o intuito de retardar o envelhecimento desses produtos através de um decréscimo da retrogradação que ocorre naturalmente nestes produtos ao longo do tempo (LEE et al., 2002; SHIM et al., 2004). Nosso trabalho também apresenta esse caráter inovador da aplicação da enzima CGTase, pois objetivou um maior tempo de retenção do aroma no produto panificado, além de como já foi citado poder promover um retardamento no envelhecimento do produto e um maio volume.

4– Análise da Retenção de Aroma pelas CDs produzidas na Massa do Bolo.

Na tentativa de determinar o potencial do efeito das ciclodextrinas presente na massa dos bolos quanto ao perfil da liberação do aroma de limão, foi iniciado um estudo preliminar envolvendo análises instrumentais dos produtos de

panificação (bolos com e sem as enzimas CGTases da linhagem E16 e comercial) utilizados no ensaio descrito no item anterior.

As amostras foram analisadas por "Headspace" em cromatografia gasosa, onde podemos notar que o perfil das amostras de bolos com a enzima CGTase apresentaram picos relativamente menores ao serem comparados com os respectivos controles que também continham o aroma de limão (figuras 9 e 10).

Estes perfis nos deram indícios que nas massas onde as ciclodextrinas estavam presentes à liberação do aroma de limão foi menor do que nas amostras sem ciclodextrinas, indicando uma provável e possível inclusão do aroma com estas ciclodextrinas. Estudos mais conclusivos, neste sentido, deverão ser continuados posteriormente a esta dissertação.

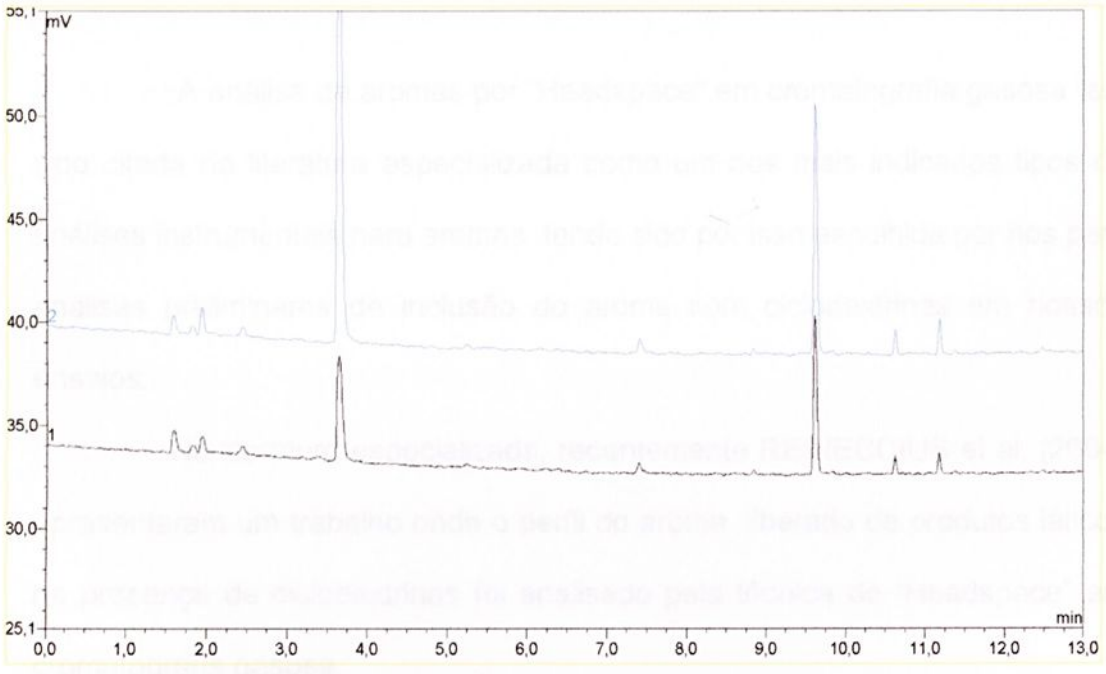


Figura 9: Perfil da enzima CGTase da linhagem E16 em CG. (——) amostra controle; (——) amostra c/ a enzima.

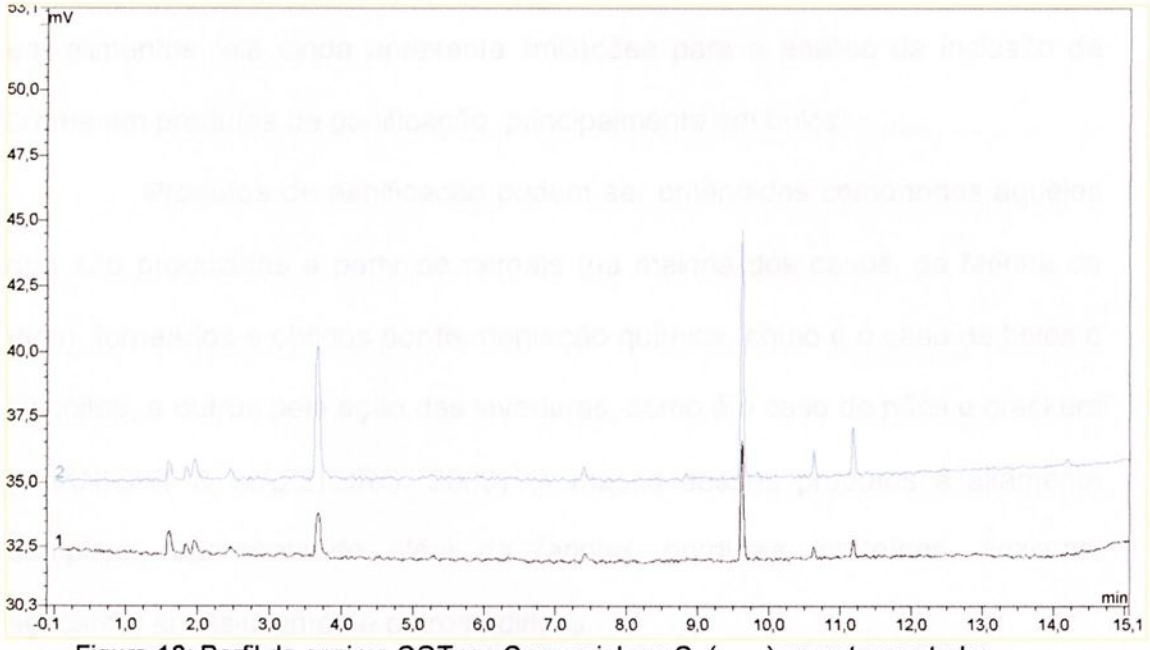


Figura 10: Perfil da enzima CGTase Comercial em C. (——) amostra controle; (——) amostra c/ a enzima.

A análise de aromas por "Headspace" em cromatografia gasosa tem sido citada na literatura especializada como um dos mais indicados tipos de análises instrumentais para aromas, tendo sido por isso escolhida por nos para análises preliminares de inclusão do aroma com ciclodextrinas em nossos ensaios.

Na literatura especializada, recentemente REINECCIUS et al. (2004) apresentaram um trabalho onde o perfil do aroma liberado de produtos láticos na presença de ciclodextrinas foi analisado pela técnica de "Headspace" em cromatografia gasosa.

Apesar desta técnica ser a mais indicada para a análise de aroma em alimentos, ela ainda apresenta limitações para a análise da inclusão de aroma em produtos de panificação, principalmente em bolos.

Produtos de panificação podem ser entendidos como todos aqueles que são produzidos a partir de cereais (na maioria dos casos, da farinha de trigo), forneados e obtidos por fermentação química, como é o caso de bolos e biscoitos, e outros pela ação das leveduras, como é o caso de pães e crackers (McKNIGHT & MAZZIEIRO, 2000). A massa desses produtos é altamente complexa, apresentando além da farinha, gorduras, proteínas, enzimas, açúcares, emulsificantes e outros aditivos.

As ciclodextrinas são capazes de formar complexos com substâncias sólidas, líquidas e gasosas. De fato, ha vários relatos da inclusão de ciclodextrinas com gorduras, óleos e triglicerídeos. Em adição, ciclodextrinas também podem se complexar com proteínas, principalmente as com caráter mais hidrofóbico (GUJRAL et al., 2003). Portanto esses componentes, que estão presentes nos produtos de panificação, acabam competindo com as moléculas de aroma para inclusão com ciclodextrinas. Para uma ação mais efetiva da inclusão de aroma com ciclodextrinas nestes produtos, novos estudos devem ser realizados para definição de uma metodologia mais apropriada a esta finalidade.

unesp

IV - CONCLUSÃO

A hidrólise do amido de trigo pela ação da CGTase mostrou um rendimento próximo ao encontrado na literatura para o amido de milho mas menor quando comparado aos amidos de batata-doce e mandioca.

O perfil de eluição da CGTase, obtido na cromatografia de troca iônica, sugere que essa etapa de purificação, usando uma coluna com resina aniônica, foi eficiente no isolamento da CGTase das demais proteínas da solução enzimática

Foi constatado que o emprego da enzima CGTase diretamente no processo de fabricação de pães e bolos resulta em produção de ciclodextrinas na massa.

A utilização da enzima CGTase diretamente na massa dos produtos de panificação não apresentou problemas relacionados à produção excessiva de dextrinas. E ainda, estudos preliminares indicaram uma possível complexação dos aromas com as ciclodextrinas presentes nas massas dos produtos de panificação.

Este primeiro estudo foi interessante para mostrar que o emprego direto de CGTase pode ser uma estratégia viável para inclusão de aroma em produtos de panificação, mas que problemas de interferências em função da complexidade dos componentes da massa, precisam ser contornados para um resultado mais eficiente.

unesp

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABELYAN, V.A., BALAYAN, A.M., GHOCHIKYAN, V.T., MARKOSYAN, A.A. Transglycosylation of stevioside by cyclodextrin glucanotransferases of various groups of microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiolog.,* v. 40 (2), p. 129-134, 2004.

ALLEGRE, M., DERATANI, A. Cyclodextrin uses: from concept to industrial reality. *Agroo Food Industry Hi Tech.*, January/February, p. 9-17, 1994.

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, p.188.

BENDER, H. Production, characterization, and application of cyclodextrins. *Advances in Biotechnological Processes*. v.6, p. 31-71, 1986.

BERGAMASCO, R.C. Complexação de sulfluramida em ciclodextrinas. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, 2003, p.74.

BHANDARI, B.R., D'ARCY, B.R. THI BICH, L.L. Lemon oil to β-cyclodextrin ratio effect on the inclusion efficiency of β-cyclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 1494-1499, 1998

CHAROENLAP, N., DHARMSTHITI, S., SIRISANSANEEYAKUL, S., LERTSIRI, S. Optimization of cyclodextrin production from sago starch. *Bioresource Technology*, v.92, p.49-54, 2004.

DANIEL, A.R. *Bakery materials and methods.* 4ªEd. London, Applied Science Publishers, 1978, p 523.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amilose as the substrate. *Journal of Biochemistry*, v. 41, p. 583-603, 1954

GUJRAL, H.S., GUARDIOLA, I., CARBONELL, J.V., ROSELL, C.M. Effect of cyclodextrinase on dough rheology and bread quality from rice flour. *Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.3814-3818, 2003

HATREE, E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, v 48, p 422-427, 1972.

HEDGES, A., McBRIDE, C. Utilization of β-cyclodextrin in food. *Cereal Foods World*, v. 44, n 10, p. 700-704. 1999.

JESUS, M.B., ALVES PINTO, L.M., DE PAULA, E. Caracterização do complexo sólido praziquantel em β-ciclodextrina. Congresso Interno de Iniciação Cientifica da Unicamp, 2001.

KEMBHAVI, A. A.; KULKARNI, A.; PANTI, A. Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM N° 64. *Applied Biochemistry and Biotechnology,* n. 38, p. 83 – 92, 1993.

LEE, S.H.; KIM, Y.W.; LEE, S.; AUH, J.H., YOO, S.S., KIM, T.J., KIM, J.W., KIM, S.T., RHO, H.J., CHOI, J.H., KIM, Y.B., PARK, K.H. Modulation of cyclizing activity and thermostability of cyclodextrin glucanotransferase and its application as an antistaling enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* v.50, p.1411-1415, 2002.

MÄKELÄ, M. J., KORPELA, T. K., PUISTO, J., LAAKSO, S. V. Nonchromatographic cyclodextrin assays: evaluation of sensitivity, and conversion mixture applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* v. 36, p. 83-88, 1988.

MARTINS, F. Estudo da processo de encapsulação do bioaroma de gorgonzola em β-ciclodextrina e em lipossomas. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2003, p.174.

MARTINS, R. F., HATTI-KAUL, R. A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkaaliphile *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, p. 116-124, 2002.

MARTINS, R. F., HATTI-KAUL, R. *Bacillus agaradhaerens* LS-3C cyclodextrin glycosyltransferase: activity and stability features. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, p. 819-827, 2003.

MATIOLI, G.; ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. *Ciclodextrinas: e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais*. Maringá: Eduem, 2000, p. 124.

McKNIGHT, I., MAZZIEIRO, G. Aplicação das enzimas amilolíticas em panificação. *Higiene Alimentar,* v.14 (72), p.35-46,2000.

PONGSAWASDI, P. AND YAGISAWA, M. Screening and identification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing bacteria. *Journal Fermentation Technology*. v.65, n.4, p. 463-467, 1987.

PSZCZOLA, D. E. Production and potential food applications of cyclodextrins. *Food Technology*. January, p.96-100, 1988.

REINECCIUS, T.A., REINECCIUS, G.A., PEPPARD, T.L. Potential for β-cyclodextrin as partial fat replacer in low-fat foods. *Journal of Food Science*, v.69 (4), p.334-341, 2004.

SHEPPARD, G. The production and uses of microbial enzymes in food processing. *In Progress in Industrial Microbiology*. ED. M. R. ADAMS. Elsevier. v. 23, p. 237-283, 1986.

SHIBUYA, T., AGA, H., WATANABE, H., SONODA, T., KUBOTO, M., FUKUDA, S., KURIMOTO, M., TSUJISAKA, Y. Transglycosylation of glycosyl residues to cyclic tetrasaccharide by *Bacillus stearothermophillus* cyclomaltodextrin glucanotransferase using cyclomaltodextrin as the glycosyl donor. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.67, n.5, p.1094-1100, 2003.

SHIM, J.H., KIM, Y.W., KIM, T.J., CHAE, H.Y., PARK, J.H., CHA, H., KIM, J.W., KIM, Y.R., SCHAEFER, T., SPENDLER, T., MOOM, T.W., PARK, K.H. Improvement of cyclodextrin glucanotransferase as an antistaling enzyme by error-prome PCR. *Protein Engineering, Design & Selection,* v.17, n.3, p.205-211, 2004.

SHUKLA, T. P. Industrial research on cyclodextrins. *Cereal Foods World*. v.36, n.4, p.387, 1991.

SINGH, M., SHARMA, R., BANERJEE, U.C. Biotechnological applications of cyclodextrin. *Biotechnology Advances,* v.20, p.341-359, 2002.

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.

TOYODA, K., SHODA, T., UNEYAMA, C., TAKADA, K., TAKAHASHI, M. Carcinogenicity study of β-cyclodextrin in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, v.35, p.331-336, 1997.

UITDEHAAG, J.C.M., VAN DER VEEN, B.A., DIJKHUIZEN, L., DIJKSTRA, B.W., Catalytic mechanism and product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase, a prototypical transglycosylase from the α-amylase family. *Enzyme and Microbial Technology,* v.30, p.295-304, 2002.

VAN DER MAAREL, M.J.E.C., VAN DER VEEN, B.A., UITDEHAAG, J.C.M., LEEMHUIS, H., DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family. *Journal of Biotechnology,* v. 94, p.137-155, 2002.

VAN DER VEEN, B.A., UITDEHAAG, J.C.M., DIJKSTRA, B.W., DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochimica et Biophysica Acta,* v.1543, p.336-360, 2000.

VAN DER VEEN, B.A., LEEMHUIS, H., KRALJ, S., UITDEHAAG, J.C.M., DIJKSTRA, B.W., DIJKHUIZEN, L. Hydrophobic amino acid residues in the acceptor binding site are main determinants for reaction mechanism and specificity of cyclodextrin-glycosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry,* v. 276 (48), p.44557-44562, 2001.

VAN EIJK, J.H., MUTSAERS, J.H.G. Process for increasing the volume of baked product. *Patente application US5916607*, 1999.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

VETTER, D., THORN, W. Chain length specificity of cyclodextrin glycosyltransferase. *Starch/Stärke*. v. 44, p.229-233, 1992.