

## Obtaining Cyclodextrins by *Bacillus firmus* strain 37

### Obtenção de Ciclodextrinas, por *Bacillus firmus* Cepa 37

Títulos abreviados:

*Obtaining Cyclodextrins*

*Obtenção de Ciclodextrinas*

Maicon Ramon Bueno<sup>1\*</sup>, Luana Thais Varize<sup>2</sup>, Camila Braga Martins<sup>1</sup>, Fernando Pereira Calderaro<sup>1</sup>, José Eduardo Olivo<sup>1</sup> e Gisella Maria Zanin<sup>1</sup>

#### ABSTRACT

The Cyclomaltodextrin-glucoamylase (CGTase) is the only enzyme capable to convert starch into Cyclodextrins (CDs) by the cyclization of straight chains. Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides containing a minimum of 6 units of D-(+)-glucopyranose linked by alpha-1,4. They are capable of forming inclusion complexes with a variety of guest molecules in solution. With the exploratory objective of increasing production of CGTase for obtain Cyclodextrins it was held a cultivation of *Bacillus firmus* CEPA 37 in batch reactor with pulses of starch at 48, 96 and 200 hours of culture. It was observed maintaining pH 8.9 and 10, there was good substrate consumption and a good cell growth (approximately 8 g/L). The enzymatic activity of CGTase peaked at 0.11 U/ml after 59 and 200 hours of cultivation, and a specific activity compared with gamma-CD of 1.4 U/mg protein to 200 hours of cultivation. There was a quantity increasing of soluble proteins in the culture media after the pulse of starch, indicating that the microorganism searched sources of nitrogen since the source of carbon was supplemented but the nitrogen not. The pulses of starch also favored the cell growth

**Keywords:** soluble starch, *Bacillus firmus*, CGTase, pulse.

#### RESUMO

A Ciclomaltodextrina-Glucanotransferase (CGTase) é a única enzima capaz de converter amido em ciclodextrinas (CDs) pela reação de ciclização das cadeias lineares. Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos contendo um mínimo de 6 unidades de D-(+)-glicopiranosose unidas por ligações alfa-1,4. Possuem capacidade de formar complexos de inclusão com grande variedade de moléculas hóspedes em solução. Com o objetivo exploratório de aumentar a produção da CGTase para obtenção de CDs, realizou-se cultivo de *Bacillus firmus* CEPA 37, em reator batelada com pulsos de amido durante 48, 96 e 200 horas de cultivo. Observou-se a manutenção do pH entre 8,9 e 10, houve um bom consumo de substrato e um bom crescimento celular (em torno de 8 g/L). A atividade enzimática de CGTase atingiu um pico de 0,11 U/mL após 59 e 200 horas de cultivo, bem como uma atividade específica com relação a gama-CD de 1,4 U/mg de proteínas com 200 horas de cultivo. Houve aumento da quantidade de proteínas solúveis no meio de cultura após os pulsos de amido, indicando que o micro-organismo buscou formas de disponibilizar nitrogênio para si, uma vez que a fonte de carbono foi suplementada e a de nitrogênio não. Os Pulsos de amido também favoreceram o crescimento celular.

**Palavras-chave:** amido solúvel, *Bacillus firmus* CEPA 37, ciclodextrinas, pulso

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá– Departamento de Pós Graduação em Engenharia Química  
CEP 87020360 Maringá – Paraná

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Maringá– Departamento de Graduação em Engenharia Química  
CEP 87020360 Maringá – Paraná

Autor para correspondência: mramonbueno@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

A degradação enzimática do amido geralmente resulta na produção de glicose, maltose, maltotriose, etc., isto é, maltooligômeros de cadeias lineares ou ramificadas, conhecidos como dextrinas. Esse tipo de degradação do amido é um processo de hidrólise em que o produto resultante provém da quebra da ligação glicosídica acompanhada da adição de uma molécula de água, contudo, se o amido é degradado por uma enzima do tipo glicosiltransferase (CGTase), o produto resultante da quebra da cadeia é submetido a uma reação intramolecular sem a participação da molécula de água. Produtos cíclicos de ligação alfa-1,4 são formados se a enzima for uma ciclomaltodextrina glucanotransferase, e são conhecidos como ciclodextrinas (FRÖMMING; SZEJTLI, 1994; DEL VALLE, 2004; COSTA et al., 2007).

Astray et al, (2009), descreveram as ciclodextrinas (CDs) como substâncias cristalinas, homogêneas e não higroscópicas, que podem ser consideradas como cápsulas vazias, de um determinado tamanho molecular, com a capacidade de formar complexos de inclusão com uma grande variedade de compostos. As CDs são oligossacarídeos cíclicos não redutores compostos principalmente por 6, 7 e 8 unidades de glicose, as quais são denominadas de alfa, beta e gama-CDs, respectivamente, (MATIOLI et al, 2008, ROSA; SAVARIZ 2005, JUNIOR et al, 2007).

Devido à reação de ciclização, a extremidade redutora e não redutora se ligam, de forma que todas as CDs são não redutoras. Elas apresentam uma cavidade interna hidrofóbica e a região externa hidrofílica. Tal característica favorece sua interação com uma variedade de substâncias, formando complexos de inclusões que alteram as características físicas e químicas da molécula hóspede. Na ciclização, a enzima converte amido e alfa-1,4 glicanos em ciclodextrinas, as quais são amplamente utilizadas em alimentos, fármacos e outros produtos químicos (TONKONVA, 1998; ROSA & SAVARIZ 2005; CAO et al., 2005).

Segundo Bertolini et al (1998), alguns dos efeitos da encapsulação de compostos por CDs são a proteção contra oxidação, degradação pela luz, calor, perdas por volatilidade, a redução ou eliminação de sabores ou odores desagradáveis, estabilização de drogas, cores, vitaminas,

aromatizantes e saborizantes, a produção de emulsões, o aumento de solubilidade de produtos fármacos e alteração de características químicas.

A CGTase catalisa as reações de transglicosilação intramolecular (ciclização) e intermolecular (ligação, desproporcionamento), bem como apresenta atividade hidrolítica sobre amido e ciclodextrinas, (JOGDAND, 2008). A reação de transglicosilação da CGTase é operada pelo mecanismo “PingPong”, fato verificado por Nakamura, Haga e Yamanake (1994).

Gawande et al. (1999) obteve atividade máxima de CGTase igual a 7,05 UI/mL, usando *Bacillus firmus* em meio com amido de milho, extrato de levedura e pH inicial de 9,8. O *B. firmus* cepa 37 é um micro-organismo alcalofílico, foi isolado de solo brasileiro, e apresentou maior atividade em testes de precipitação (Matioli et al, 1998; SANTOS et al, 2013).

Uma das formas de estudar a cinética fermentativa quanto ao crescimento celular é utilizando a velocidade específica de crescimento celular ( $\mu_X$ ), que é uma relação entre a taxa de crescimento celular ( $dX/dt$ ) e a concentração celular em cada ponto da fermentação (GADEN, 1959).

Com o objetivo exploratório de aumentar a produção da CGTase para formação de Ciclodextrinas, realizou-se cultivo de *B. firmus* CEPA 37, em reator batelada com pulsos de amido em 48, 96 e 240 horas fermentação.

## MATERIAL E MÉTODOS

Primeiramente o micro-organismo, *B. firmus* CEPA 37, já isolado e adequadamente armazenado, foi semeado em um total de 12 placas de Petri contendo meio semi-sólido, cuja composição está apresentada na Tabela 1, (SANTOS et al, 2013). As placas foram mantidas em estufa incubadora a 37 °C por 72 horas, para o desenvolvimento das células no estado vegetativo. Após 72 horas, a massa celular presente nas placas foi coletada e transferida asépticamente para o pré-inóculo, cuja composição assemelha-se ao meio semi-sólido, exceto Agar. Adicionou-se a enzima alfa-amilase ao pré-inóculo e também ao meio de cultivo, fazendo com que parte do amido de milho fosse degradado a açúcar fermentescível, disponível ao micro-organismo para seu consumo imediato. O pré-inóculo foi colocado em agitador rotativo, onde permaneceu por 48 horas a 37 °C e sob agitação de 150 rpm. Na sequência uma alíquota do pré-inóculo

(aproximadamente 150 mL) foi transferida para o fermentador já com o meio de cultivo preparado e devidamente esterilizado. Amostras do pré-inóculo também foram coletadas para análises posteriores.

Tabela 1 Composição do meio semi-sólido, pré-inóculo e meio de cultivo em reator de batelada, utilizados durante o cultivo do *Bacillus firmus* CEPA 37.

Componentes p/v)	(% Semi-sólido	Pré-Inóculo	Meio de Cultivo
Amido de milho	1,0	1,0	4,0
Peptona	0,5	0,5	1,0
Extrato de Levedura	0,5	0,5	2,0
MgSO <sub>4</sub>	0,02	0,02	0,02
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1	0,1	0,1
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,0	1,0	1,0
Ágar	1,5	-	-

Como fonte de íons utilizados para o estudo da síntese de CGTase nos ensaios de fermentação e para os meios de cultivos temos magnésio, potássio e sódio, na forma de sais: MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Synth), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Reagens), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (NEON). Como fontes de nitrogênio orgânico, utilizou a peptona bacteriológica do fornecedor HIMEDIA. A Peptona Bacteriológica é preparada por digestão enzimática de carne fresca selecionada, com as seguintes especificações: Nitrogênio total: mínimo 11,5%; nitrogênio  $\alpha$ -amino: mínimo 3%; umidade: máximo 5%; cinzas: máximo 10%; cloreto de sódio: máximo 5%; pH (solução 1%): 6,6  $\pm$  0,5. Utilizou-se também o extrato de levedura do mesmo fornecedor (HIMEDIA). O Extrato de levedura em pó é preparado secando o extrato obtido de células de levedura (*Saccharomyces*) especialmente cultivadas para este propósito, segundo o fornecedor, segue abaixo as especificações: Nitrogênio total: 11,5%; nitrogênio  $\alpha$ -amino: 4%; cinzas: 13,0%; cloreto de sódio: 3,0%; perda na secagem: 4,0 %; triptofano: presente

Os dados acima foram obtidos no site do fornecedor.

Para a preparação da curva padrão para as dosagens de Ciclodextrina foi utilizada a Beta-ciclodextrina e Gama-ciclodextrina, sendo a primeira obtida

do fornecedor Roquette (Kleptose®), com teor de umidade de 15,479% e a segunda do fornecedor Wacker-Chemie GmbH (Cavamax®), com teor de umidade de 6,8%.

Para uso geral nas análises e preparações de soluções utilizou-se os reagentes apresentados na Tabela 2. Todos os reagentes utilizados apresentam grau analítico P.A

Tabela 2: Reagentes de uso geral utilizados para análises e preparação de soluções.

Reagente	Fornecedor
DNS	-
Ácido Fosfórico-Orto 85%	NEON
Agar	Invitrogen
Albumina Bovina	SIGMA A-2153
Brilhante de Coomassie	Thermo Scientific
CaCl <sub>2</sub>	NEON
Enzima $\alpha$ -amilase Termamyl 2X	Novozymes
Etanol ~ 95%	NEON
Fenolftaleína Pura	Quimibrás
Frutose	Reagen
Glicose	Reagen
HCl	NEON
NaHCO <sub>3</sub>	Vetec
NaOH	NEON
Tris(hidroximetil)amino-metano	MERCK
Verde de Bromocresol	Biotec
Vermelho do Congo	Biotec

O cultivo em batelada foi realizado em biorreator BioFlo III por um período de 340 horas a 37 °C, 300 rpm, com controle de pH acima de 8,5 e

aeração de 1 vvm. Após 48, e 96 horas de cultivo, uma alíquota de aproximadamente 50% do meio de cultivo, foi substituída por uma solução de amido estéril (pulso) com concentração de 2,0 %, após as 200 horas de cultivo, uma alíquota de aproximadamente 70% do meio de cultivo foi substituída por uma solução de amido estéril, com a mesma concentração do primeiro pulso.

Através da Figura 2 pode-se notar que a concentração de açúcares estava muito baixa próximo das 200 horas, por isso a necessidade do terceiro pulso ser mais representativo em termos de volume da solução de amido aplicada. Amostras de 20 mL foram retiradas a cada 8 horas, sendo centrifugadas. As frações líquidas foram analisadas e o precipitado ressuspenso para análise de concentração celular, com leitura direta em espectrofotômetro (VIS- Shimadzu 1203) a 610 nm, conforme descrito por OLIVO (1985).

Para análise de açúcares redutores totais, as amostras foram submetidas a um processo prévio de hidrólise ácida (FALCONE; MARQUES, 1965, SANTOS et al, 2013), com posterior neutralização e reação com DNS (ácido 2,5-dinitrosalicílico), procedendo-se a leitura espectrofotométrica a 600 nm. Para a medida do teor de proteínas solúveis, utilizou-se o método colorimétrico de Bradford (1976) (SANTOS et al, 2013).

A atividade enzimática foi determinada pelo método das velocidades iniciais envolvendo a complexação da beta-ciclodextrina, produzida pela enzima CGTase com a fenolftaleína (HAMON; MORAES, 1990; TARDIOLI et al., 2006, SANTOS et al, 2013) e também pela complexação da gama-ciclodextrina com o corante de verde de bromocresol conforme metodologia descrita por Kato e Horikoshi (1984) e modificada por Hamon e Moraes (1990).

Após as análises, as curvas de concentração celular (X), consumo de substrato (S), atividade enzimática (A), atividade específica (AE), Proteínas Solúveis (PS) e pH foram construídas.

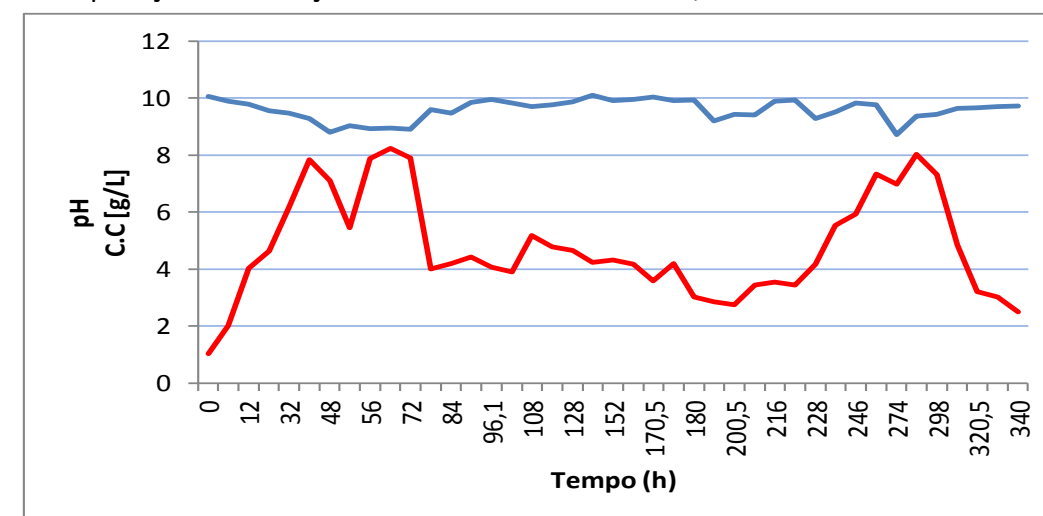
Para determinação da curva de velocidade específica de crescimento celular ( $\mu X$ ), os valores experimentais de concentração celular foram submetidos a um tratamento de dados no Matlab®, sendo encontrada uma curva de ajuste por interpolação e gerados novos dados para cada 4h de

fermentação, tendo estes dados seguido a tendência dos valores experimentais. Os valores interpolados foram aplicados em uma planilha do Excel® contendo o método de LeDuy Zajic (1973), apresentada por Hiss e Gombert (2001), de determinação de  $\mu X$ . Estes valores foram então utilizados para gerar o gráfico das velocidades específicas de crescimento celular.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra que os valores de pH permaneceram acima de 8,5 durante as 340 horas de cultivo do *B. firmus* CEPA 37, uma condição essencial para o desenvolvimento deste micro-organismo alcalofílico. Tais resultados demonstraram a eficácia do tampão carbonato de sódio, que está relacionada com a adição de quantidades proporcionais do referido tampão ao amido de milho no meio de cultivo inicial.

Figura 1. Variação de pH ( — ) durante o cultivo em batelada do *Bacillus firmus* CEPA 37 contendo tampão carbonato de sódio e Concentração Celular (C.C — ), com aplicações de solução de amido de milho em 48, 96 e 200 horas.

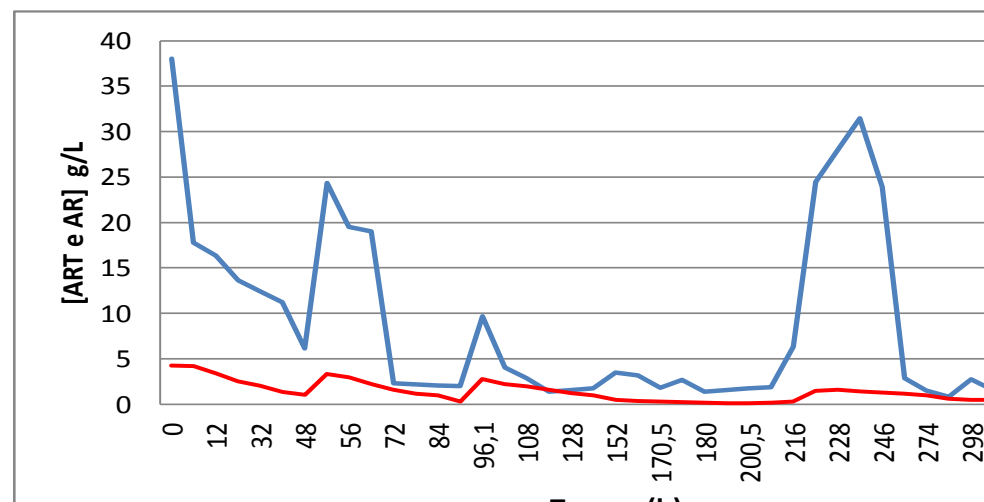


Quanto à concentração celular (Figura 1), observa-se um ligeiro aumento após os pulsos de amido aplicados, atingindo valores de 8,24 e 8,03 g/L em

59 e 254 horas respectivamente. É interessante notar que, quando os níveis de açúcares redutores estão baixos, há queda na concentração celular, e ao aplicar o pulso de amido, há recuperação na atividade de multiplicação celular, fato que já era esperado devido à disponibilidade de açúcares para o consumo, visível também na Figura 2. Nota-se também um rápido consumo de amido logo após a aplicação dos pulsos.

Observa-se na Figura 2 que as concentrações de açúcares redutores mantiveram-se baixas (inferiores a 5 g/L) durante todo o cultivo, e as concentrações de açúcares redutores totais reduziram acentuadamente, nas primeiras 48 horas e nos tempos de 48, 96 e 200 horas, quando a solução de amido foi adicionada ao meio de cultivo. Estes tempos de cultivo também foram acompanhados de ligeiro aumento e posterior redução das concentrações de açúcares redutores. Tais resultados evidenciam a atividade metabólica, uma vez que houve hidrólise do polissacarídeo em açúcares redutores, e a subsequente utilização destes açúcares pelo *B. firmus* cepa 37, em poucas horas após cada adição de amido.

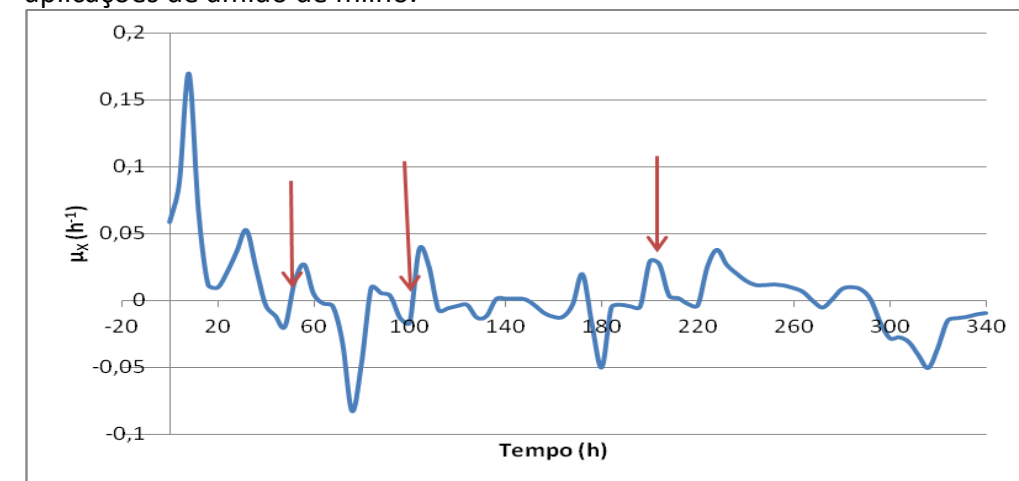
Figura 2. Variação da concentração de açúcares redutores (AR —) e açúcares redutores totais (ART —) durante o cultivo em batelada do *Bacillus firmus* CEPA 37, com aplicações de solução de amido de milho em 48, 96 e 200 horas.



Na Figura 3 são apresentados os valores de velocidade específica de crescimento celular ( $\mu_x$ ) onde as setas indicam os pulsos de amido. Se a fermentação for dividida em quatro partes, sendo a primeira antes do primeiro pulso de amido (48h), a segunda entre o primeiro e o segundo pulso de amido (de 48 a 96h), a terceira entre os segundo e o terceiro pulso de amido (de 96 a 200h) e a quarta parte após o terceiro pulso de amido (após 200h), como apresentado na Figura 4. Observa-se que o máximo valor de  $\mu_x$  ocorre na primeira fase, em que há ampla disponibilidade de nutrientes, sem acúmulo de metabólitos secundários prejudiciais ao crescimento.

Verifica-se também que nas demais partes da fermentação há picos e vales de valores de  $\mu_x$ , se destacando a recuperação da velocidade específica de crescimento celular logo após o primeiro e segundo pulsos de amido, mostrando o aumento da capacidade de multiplicação do *B. firmus* logo após a adição de fonte de carbono.

Figura 3 – Velocidade específica de crescimento celular ( $\mu_x$ ) com a indicação das aplicações de amido de milho.



Se a fermentação for dividida em quatro partes, sendo a primeira antes do primeiro pulso de amido (48h), a segunda entre o primeiro e o segundo pulso de amido (de 48 a 96h), a terceira entre os segundo e o terceiro pulso de amido (de 96 a 200h) e a quarta parte após o terceiro pulso de amido

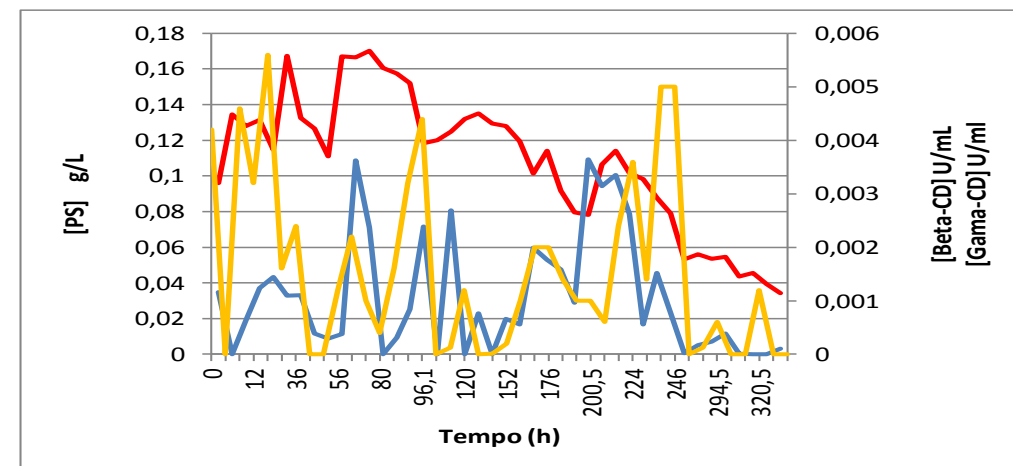
(após 200h), como apresentado na Figura 4, observa-se que o máximo valor de  $\mu X$  ocorre na primeira fase, em que há ampla disponibilidade de nutrientes, sem acúmulo de metabólitos secundários prejudiciais ao crescimento. Verifica-se também que nas demais partes da fermentação há picos e vales de valores de  $\mu X$ , se destacando a recuperação da velocidade específica de crescimento celular logo após o primeiro e segundo pulsos de amido, mostrando o aumento da capacidade de multiplicação do *B. firmus* logo após a adição de fonte de carbono.

Em seguida a esta recuperação, há queda dos valores de  $\mu X$ , podendo ser justificada pela falta de outros nutrientes no meio de cultura (como fonte de nitrogênio, por exemplo), de maneira que o micro-organismo procura uma forma de obtê-la, algo que se verifica observando a curva de concentração de proteínas solúveis, pois após cada pulso de amido, há mudança da tendência da curva de proteínas solúveis, ou seja, há aumento da concentração de proteínas solúveis no meio de cultura (Figura 4). Provavelmente, o *B. firmus* produziu proteases para solubilizar as proteínas presentes no meio de cultura, pois a fonte de nitrogênio não foi suplementada durante a fermentação.

O terceiro pulso de amido ocorreu em um pico de  $\mu X$ , mas o que tudo indica é que neste momento, havia algum fator desfavorável, havendo demora na recuperação da velocidade de crescimento, verifica-se um aumento da concentração de proteínas solúveis após 200h de cultivo também. Como a fermentação já está bem avançada, provavelmente há acúmulo de metabólitos secundários que prejudicam o desenvolvimento celular, por isso, a simples suplementação de fonte de carbono, não garante uma recuperação prolongada do crescimento celular. Na Figura 5 estão representadas as variações da concentração de proteínas solúveis no decorrer da fermentação. Esta análise é importante, pois a atividade enzimática específica é dada pela razão entre a atividade enzimática e a concentração de proteínas solúveis no meio. Verifica-se que houve aumento da concentração de proteínas solúveis no início da fermentação, sendo que os valores apresentaram tendência de queda a partir 96h de cultivo. Como o *B. firmus* apresentou recuperação da atividade de crescimento após os pulsos de amido, ou seja, depois de acrescentar fonte

de carbono, é provável que o mesmo tenha consumido as proteínas solúveis disponíveis para utilizar como fonte de nitrogênio para seu crescimento, uma vez que este nutriente não foi repostado ao longo da fermentação.

Figura 4. Variação da concentração de proteínas solúveis (PS —) e variação da Atividade Enzimática, sendo que a atividade máxima para a gama-CGTase foi em torno de 0,11 U/mL, onde (—) representa a concentração de Beta-Ciclodextrina e (—) a concentração de Gama-Ciclodextrina em U/mL durante o cultivo em batelada do *Bacillus firmus* CEPA 37, com aplicações de solução de amido de milho em 48, 96 e 200 horas.

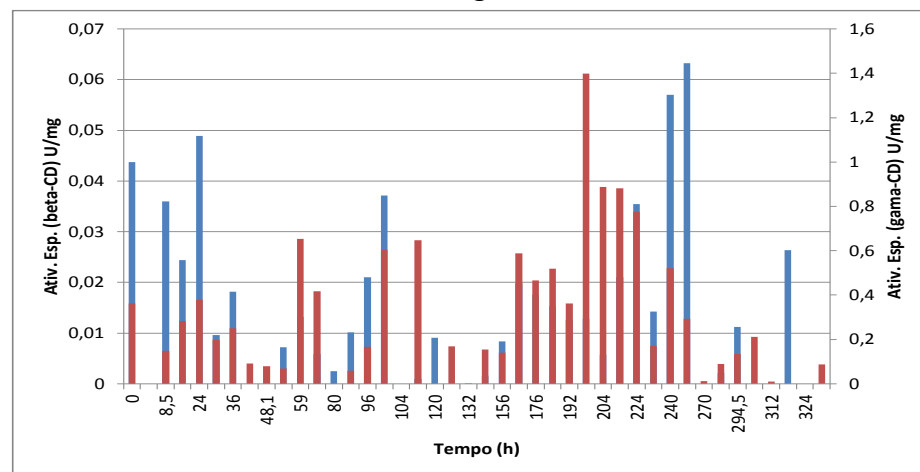


Na Figura 4 também são apresentadas as variações da atividade enzimática. É interessante notar que nestas condições de cultivo, o *B. firmus* produziu maior quantidade de gama-CGTase do que beta-CGTase, sendo que a atividade máxima para a gama-CGTase foi em torno de 0,11 U/mL. Na Figura 5 são apresentadas as atividades específicas, pode-se observar que a máxima atividade específica obtida foi de 1,4 U/mg de proteína com relação a gama-CD, observa-se também que, com relação a beta-CD, os resultados obtidos foram muito inferiores, atingindo um valor máximo de 0,06 U/mg de proteína.

Houve três fases de maior produção de gama-CGTase (Figura 5), ocorrendo logo após a suplementação de amido, após 48, 96 e 200h de cultivo, até 48h o micro-organismo produziu gama-CGTase, mas em menor

quantidade, desta maneira, pode-se verificar um comportamento de produção da enzima parcialmente associado ao crescimento celular. Outro fator que pode ter influenciado na menor produção de gama-CGTase no início da fermentação foi a elevada concentração de amido (próximo a 40 g/L), pois sabe-se que o amido exerce efeito inibitório na produção de CGTase, como o consumo de amido foi alto, e a suplementação se deu em menor concentração do que a inicial (20 g/L), o meio de cultura provavelmente passou a apresentar condições favoráveis para a produção de CGTase pelo *B. firmus* CEPA 37. Por outro lado, a maior disponibilidade de amido no início da fermentação favoreceu desenvolvimento do micro-organismo, de maneira que a concentração celular atingiu valores próximos a 8,0 g/L em 36h de cultivo, antes do primeiro pulso de amido.

Figura 5. Variação da Atividade Enzimática Específica. Onde (■) representa a atividade específica de Beta-Ciclodextrina e (■) a atividade específica de Gama-Ciclodextrina, ambas dadas em U/mg.



Desta forma, mesmo os experimentos sendo em caráter exploratório, buscando encontrar melhores condições de fermentação para alcançar melhores níveis na produção da enzima CGTase para a obtenção de Ciclodextrinas, permitiu concluir que os pulsos de amido aplicados resultaram em efeitos positivos sobre o crescimento celular, a quantidade

de açúcares redutores disponíveis no início da fermentação e em cada pulso de amido foram rapidamente consumidos, evidenciando alta atividade metabólica pelo micro-organismo *B.firmus* CEPA 37, da mesma forma, observa-se que houve bom crescimento celular.

A atividade enzimática de CGTase atingiu picos de 0,11 U/mL em 59 e 200 horas de cultivo, com uma atividade específica de 1,4 U/mg de proteínas com relação a gama-CD em 200 horas de cultivo. Com relação a produção de beta-CD, a atividade foi menos representativa alcançando valor máximo de 0,06 U/mg de proteínas em 246 horas de cultivo, isto evidencia que as condições de cultivo utilizadas favoreceram a produção de gama-CGTase ao invés de beta-CGTase.

Outro ponto importante que pode ser destacado é que pode ter havido consumo das proteínas solúveis do meio de cultura, como forma de reposição de fonte de nitrogênio, adotada pelo micro-organismo, o que também evidencia a elevada atividade metabólica do *B. firmus* CEPA 37 nestas condições de cultivo.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá e a CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio recebido para desenvolvimento deste trabalho

#### REFERÊNCIAS

- ASTRAY,G. et al. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**,v.23,nº 7,p. 1631-1640, 2009.
- BRADFORD, M. M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BERTOLINI,A.C.;CEREDA,M.P;CHUZEL,G. Fécula e farelo de mandioca como substrato na produção de ciclodextrinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v.18,n.2,p.224-229,1998.
- CAO, X.; JIN, Z.; WANG, X.; CHEN, F. A novel cyclodextrin glycosyltransferase from an alkalophilic *Bacillus* species: purification and characterization. **Food Research International**, v. 38, n. 3, p. 309-314, 2005.

COSTA, G. L.; PAZZETTO, R.; BROL, F.; MATIOLI, G. Metodologia de seleção de cepas para produção da ciclodextrina glicosiltransferase e para purificação da enzima. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 29, n. 1, p. 45-50, 2007.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1033-1046, 2004

FALCONE, M.; MARQUES, A. B., Estudo sobre as condições de hidrólise do HCl na dosagem de açúcares redutores totais (A.R.T.). **Tecnologia de Alimentos e Bebidas**, v. 4, p. 24-30, 1965.

RÖMMING, K. H. e SZEJTLI, J. - **Cyclodextrins in Pharmacy**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 224 p., 1994.

GADEN, E. L. Jr. Fermentation Process Kinetics. **Journal of Biochemical and Microbiology Technology and Engineering**, v. 1, n.4, p. 413-429, 1959.

GAWANDE, B. N.; GOEL, A.; PATKAR, A. Y.; NENE, S. N. Purification and properties of a novel raw starch degrading cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 4, p. 504-509, 1999.

HAMON, V. & MORAES, F. F. **Etude Preliminare a L'Immobilisation de L'Enzime CGTase WACKER**. Relatório de Pesquisa, Laboratoire de Technologie Enzymatique, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France, 234 p., 1990.

HISS, H., GOMBERT, A.K. Cinética de Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. (coords) **Biotechnologia Industrial vol. 2 – Engenharia Bioquímica**, São Paulo : Edgard Blucher, 2001, Cap. 6, p.93-122.

JUNIOR, A,S,C.; FERNANDES,V,C.; DENADAI,A,M,L.; MILLÁN,R,D,S.; ALVES,R,J, Caracterização físico-química de complexos de insulina:dimetil-b-ciclodextrina e insulina:hidroxipropil-b-ciclodextrina e avaliação da influência do tipo de complexo na produção de microesferas biodegradáveis. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**,v.43, nº 4, 2007.

KATO, T.; HORIKOSHI, K., Colorimetric Determination of  $\gamma$ -Cyclodextrin. **Analytical Chemistry**, v. 56, p. 1738-1740, 1984.

LEDUY, A., ZAJIC, J.E. A Geometrical Approach for Differentiation of an Experimental Function at a Point: Applied to Growth and Product Formation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 15, n. 4, p. 805-810, 1973

MATIOLI,G.; MAZZER, C.;FERREIRA,L,R.;RODELLA,J,R,T.;MORIWAKI,C., Cyclodextrin production by *Bacillus firmus* strain 37 immobilized on inorganic matrices an alginate gel. **Biochemical Engineering Journal**, v.41, p.79-86, 2008.

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

NAKAMURA, A.; HAGA, K.; YAMANE, K. Four aromatic residues in the activecenter of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. 1011. Effects of replacements on substratebinding and cyclization characteristics. **Biochemistry**, v. 33, n. 33, p. 9929- 9936, 1994.

OLIVO, J. E. **Efeito da Concentração Inicial de Microrganismos (*S.cerevisiae*) e da Recirculação de Células em Parâmetros Cinéticos de Processos Simultâneos de Sacarificação e Fermentação de Meios Preparados a Partir de Farinha de Raspa de Mandioca**. Dissertação (Mestrado). Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.

ROSA,M,F.;SAVARIZ,F,C.; Síntese e estudo da fotoestabilidade de derivados azalactônicos encapsulados em  $\beta$ -ciclodextrina, **Eclética Química**, v.30, nº 4, 2005.

SANTOS,J,B,C; ZANIN,G,M; OLIVO,J,E; Influence of culture medium pH on the production of CGTase by *Bacillus firmus* Strain No. 37. **Acta Scientiarum**, v.35, nº 3, 2013.

SAVERGAVE,L,S.; DHULE,S,S.; JOGDAND,V,V.;NENE,S,N.; GANDRE, R,V. Production and single step purification of cyclodextrin glycosyltransferase from alkalophilic *Bacillus firmus* by ion exchange chromatography. **Biochemical Engineering Journal**, v.39, p. 510–515, 2008.

TARDIOLI, P. W.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Characterization of *Thermoanaerobacter cyclomaltodextrin* glucanotransferase immobilized on glyoxil-agarose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 6, p. 1270-1278, 2006.

TONKOVA, A. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 22, n. 8, p. 678-686, 1998.

<http://www.himedialabs.com.br/produtos acessado em 21/04/2014 20:12>

RECEIVED 21 NOV 2013

ACCEPTED 19 MAY 2014