

## PROPRIEDADES DA CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE PRODUZIDA POR *BACILLUS FIRMUS* ALCALOFÍLICO

Regiani Barbieri Mazoni\*  
Cristiane Mariowaki\*  
Flávio Faria de Moraes\*\*  
Gisella Maria Zanin\*\*  
Graciette Matioli\*\*\*

MAZONI, R. B.; MARIOWAKI, C.; MARAES, F. F.; ZANIN, G. M.; MATIOLI, G.; Propriedades da Ciclodextrina Glicosiltransferase Produzida por *Bacillus Firmus* Alcalofílico. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 4(3): 235-242, 2000.

**RESUMO:** Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos formados por um número variável de unidades de glucose, unidas entre si por ligações  $\alpha$ -1,4. As CDs mais comuns contém 6, 7 ou 8 unidades de glucose e são denominadas  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD respectivamente. Elas possuem a capacidade de encapsular outras moléculas no interior de sua cavidade cônica. As CDs são produzidas a partir do amido pela ação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). Um novo bacilo alcalofílico, *Bacillus firmus*, produtor de CGTase com alta atividade, foi isolado de solo brasileiro. Este trabalho apresenta o estudo de algumas propriedades desta CGTase, tais como: sua atividade dextrinizante e a diluição em que esta atividade é máxima; e a Dextrose Equivalente (D.E.) de amido de milho que proporciona maior produção de CDs pela enzima. O estudo da atividade dextrinizante se baseou na metodologia de WILSON & INGLEDEW (1982), e utilizou amido 0,2% e reagente de iodo. As diluições realizadas da enzima foram 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400. As absorbâncias dos controles e amostras foram lidas a 620 nm. Para se conhecer a D.E. em que se produz maior quantidade de CDs, seguiu-se a metodologia de LIMA et al. (1998). Foram realizados quatro testes a 50°C/24 h referentes as D.E. 2, 5, 10 e 15, utilizando em cada teste 50 mL de solução de amido de milho hidrolisado, pH 8 e  $1 \times 10^{-3}$  mg/mL de CGTase de *Bacillus firmus*. São relatados os seguintes resultados: a diluição da enzima 1:100 foi a que proporcionou a melhor atividade dextrinizante (1498,37 U/mL); e a solução de D.E. 15 foi a que apresentou maior produção de  $\beta$ -CD, sendo que a produção de  $\gamma$ -CD foi praticamente a mesma para todas as D.E. testadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** bacilos alcalofílicos; ciclodextrina; CGTase; ciclodextrina glicosiltransferase

## PROPERTIES OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE PRODUCED BY ALKALOPHYLIC *BACILLUS FIRMUS*

MAZONI, R. B.; MARIOWAKI, C.; MARAES, F. F.; ZANIN, G. M.; MATIOLI, G.; Properties of Cyclodextrin Glycosyltransferase Produced by Alkalophylic *Bacillus firmus*. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 4(3): 235-242, 2000.

**ABSTRACT:** Cyclodextrins (CDs) are cyclical oligosaccharides formed by a variable number of residues of glucose, united to each other by connections  $\alpha$ -1,4. The most common CDs contain 6, 7 or 8 units of glucose and they are denominated the  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -CD respectively. They have the capacity to encapsulate other molecules inside your conical cavity. The CDs are produced from the starch by the action of the enzyme cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase). A new bacillus alkalophylic, *Bacillus firmus*, producer of CGTase with high activity, was isolated from Brazilian soil. This work presents the study of some properties of this CGTase, such as: its dextrinizing activity and the dilution in that this activity is maximum; and Dextrose Equivalent (D.E.) of cornstarch that provides larger production of CD for the enzyme. The study

\* Acadêmica de Iniciação Científica do Curso de Farmácia da Universidade Estadual de Maringá

\*\* Docente do Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá

\*\*\* Docente do Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá

Endereço: Graciette Matioli. UEM, Departamento de Farmácia e Farmacologia, Av. Colombo, 5790, Bloco P02 - 87020-900, Maringá-Pr. E-mail:gmatioli@uem.br

of the dextrinizing activity was based on the methodology of WILSON & INGLEDEW (1982), and it used starch 0,2% and iodine reagent. The accomplished dilutions of the enzyme were 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 and 1:400. The absorbance of the controls and samples were read to 620 nm. To know D.E. in which larger amount of CD is produced, the methodology of LIMA et al. (1998) was proceeded. Four tests were accomplished 50°C/24 h referring D.E. 2, 5, 10 and 15, using in each test 50 mL of solution of hydrolyzed cornstarch, pH 8 and  $1 \times 10^{-3}$  mg/mL of CGTase of *Bacillus firmus*. The following results are related: the dilution of the enzyme 1:100 was the one that provided the best dextrinizing activity (1498,37 U/mL); and the solution of D.E. 15 was the one that presented larger b-CD production, and the g-CD production was practically the same to all the D.E. tested.

**KEY WORDS:** alkalophilic bacillus; cyclodextrin; CGTase; cyclodextrin glycosyltransferase.

### Introdução

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos constituídos de um número variável de unidades de glucose (geralmente de 6 a 8) unidos por ligações  $\alpha$ -1,4. As CDs são obtidas pela degradação do amido com a enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) (DUCHÊNE et al., 1984; LEE & KIM, 1991; ROMBERGER & HELGUERA, 1999). O anel formado por cada CDs é mais hidrofílico externamente e relativamente hidrofóbico no seu interior. Em meio líquido ou eventualmente sólido, as CDs são capazes de formar compostos de inclusão com numerosas moléculas (SZEJTLI, 1988; ROMBERGER & HELGUERA, 1999).

Na prática, a inclusão pode aumentar a estabilidade da molécula hóspede frente ao calor e redução da volatilidade. Também pode proporcionar maior resistência térmica e a oxidação. Para produtos em solução, a hidrólise pode, em certos casos, ser reduzida (DUCHÊNE & VAUTION, 1986). Estas propriedades fazem das CDs uma grande atração para um variado número de aplicações industriais. Elas são usadas em alimentos, fármacos, cosméticos, pesticidas, tecnologia química, química analítica, etc. (DUCHÊNE et al., 1984, DUCHÊNE & VAUTION, 1986; PSZCZOLA, 1988; BEKERS et al., 1991; ROMBERGER & HELGUERA, 1999).

Para substâncias relativamente insolúveis em água, a inclusão pode melhorar sua solubilidade ou a sua cinética de dissolução. Em função da constante de estabilidade do composto de inclusão formado, uma melhor passagem do princípio ativo pelas membranas pode ser observado. "In vivo", isto pode ser traduzido por um aumento da biodisponibilidade, com um aumento simultâneo da eficácia terapêutica (BEKERS et al., 1991).

A complexação de fármacos com as moléculas de CDs depende fundamentalmente de três propriedades: (i) hidrofobicidade, (ii) tamanho relativo

da molécula e, (iii) geometria em relação à cavidade da CD, ou seja, a configuração estérica. Comumente, uma molécula hóspede é encapsulada no interior da cavidade de uma molécula simples de CD para formar um complexo de inclusão da forma 1:1 (CD:hóspede). Contudo, quando uma molécula hóspede é muito longa para se acomodar em uma cavidade e sua outra extremidade também é responsável para formação do complexo, podem ser formados complexos de inclusão do tipo 1:2, 2:1, 3:1, 3:2, 4:5, etc. (BECKERS et al., 1991).

Em solução aquosa, a cavidade interna da CD é ocupada pelas moléculas de água, as quais são energeticamente desfavoráveis (interação polar-apolar) e, portanto, podem ser prontamente substituídas pela molécula hóspede apropriada, de polaridade menor que da água. Após a encapsulação, a superfície externa da CD parece melhorar as propriedades físico-químicas do complexo formado. Este complexo é aparentemente estável e, em condições fisiológicas, dissocia-se facilmente tornando a molécula hóspede disponível para exercer sua função biológica (BECKERS et al., 1991).

Entre as CDs, a mais utilizada é a  $\beta$ -CD devido à facilidade de obtenção industrial e o baixo custo de produção em relação às demais. Ela é considerada não tóxica por via oral, contudo, quando administrada por via intravenosa causa efeitos hemolíticos e nefrotóxicos, com alterações patológicas nas células epiteliais do túbulo proximal renal. Portanto, a administração da  $\beta$ -CD por esta via deve ser feita com muita cautela. Os valores de DL50, obtidos em estudos de toxicidade realizados em ratos, foram de 12 g/kg por via oral, de 0,9 a 1,5 g/kg por via subcutânea, de 0,9 a 1,2 g/kg por via intraperitoneal e de 0,8 g/kg por via intravenosa (BENDER, 1986).

Vários fármacos têm sido submetidos à complexação com a  $\beta$ -CD na tentativa de melhorar as propriedades físico-químicas (estabilidade, solubili-

dade), biodisponibilidade, tolerabilidade e reduzir seus efeitos colaterais (DUCHÊNE & VAUTION, 1986; KOROLKOVAS, 1991). Entre os fármacos complexados estão o ácido acetil salicílico, naproxeno, piroxicam, cetoconazol, ibuprofeno, cetoprofeno, furosemida, tolbutamida, albendazol, etc. (SZEJTLI & SZENTE, 1996).

O primeiro microrganismo descrito na literatura como produtor de CGTase foi o *Bacillus amylobacter*, com o qual Villiers *apud* FRENCH (1957) produziu as primeiras "dextrinas de Schardinger". Em 1939 Schardinger *apud* SZEJTLI (1988) definiu o *Bacillus macerans* como um bom produtor de CGTase.

Desde a descoberta da CGTase no meio de cultura de *B. macerans* em 1939, a produção dessa enzima tem sido estudada em diversas linhagens de bactérias, tais como: *B. megaterium*, *B. macerans*, *Klebsiella pneumoniae* e *B. stearothermophilus*. As enzimas obtidas, a partir desses microrganismos apresentam diferentes propriedades, tais como: estabilidade térmica, pH ótimo, peso molecular e capacidade de formação de CDs (HORIKOSHI, 1988). A grande maioria das CGTases isoladas produzem, preferencialmente,  $\alpha$  e/ou  $\beta$ -CD, com traços de  $\gamma$ -CD (JAMUNA *et al.*, 1993).

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: (i)  $\alpha$ -CGTase que é principalmente produtora de  $\alpha$ -CD nos instantes iniciais da reação, e dentre essas destaca-se a CGTase extracelular isolada de *B. macerans*, e (ii)  $\beta$ -CGTase, cuja ação direciona-se inicialmente para formação de  $\beta$ -CD (ENGLBRECHT, *et al.*, 1990). Quando maltodextrina 10% foi usada como substrato, a CGTase de *Bacillus firmus*, isolada de solo brasileiro e caracterizada neste trabalho, produziu CDs numa razão  $\gamma$ - para  $\beta$ -CD de 0,156 e uma pequena quantidade de  $\alpha$ -CD, portanto, é uma  $\beta$ -CGTase (MORI *et al.*, 1994).

Devido ao grande número de aplicações das CDs, o interesse nas mesmas tem aumentado muito, e por conseqüência, sua produção. O avanço tecnológico na produção das CDs tem proporcionado reduções significativas nos seus custos. Contudo, várias das aplicações só poderão ocorrer em escala industrial se os custos das CDs reduzirem ainda mais (MATIOLI *et al.*, 1998). Uma das formas de reduzir estes custos seria a seleção de cepas com capacidade de produzir CGTases específicas com alta seletividade para  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ -CD, facilitando, assim, o

processamento. A pesquisa da CGTase e seleção de cepas têm seguido este caminho (HORIKOSHI, 1988).

Este trabalho apresenta algumas propriedades da CGTase de *Bacillus firmus*, microrganismo alcalofílico isolado de solo brasileiro (MATIOLI, *et al.*, 1996; MATIOLI, *et al.*, 1998). Estudou-se a atividade dextrinizante da enzima e verificou-se em que diluição esta atividade foi máxima. Também estudou-se o comportamento da enzima frente ao substrato amido de milho com diferente Dextrose Equivalentes e determinou-se em que D.E. ocorreu a maior produção de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD.

## Material e Método

**Enzima.** CGTase foi obtida de microrganismo alcalofílico isolado de solo brasileiro (*Bacillus firmus*, cepa n<sup>o</sup> 37). O microrganismo foi cultivado em 5 L de meio líquido, pH 10, com a seguinte composição (% p/v): amido solúvel 2,0; polipeptona 0,5; extrato de levedura 0,5; K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,02; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,0. O cultivo foi realizado a 37°C durante 6 dias, com agitação de 150 rpm. As células foram removidas por centrifugação a 8800xg/10 minutos. O sobrenadante livre de células foi misturado com sulfato de amônio (80% de saturação), sendo a mistura mantida a 4°C por 48 h. O precipitado obtido foi separado por centrifugação a 8800xg por 30 minutos sob refrigeração. Em seguida, dissolveu-se o precipitado em solução tampão Tris-HCl, pH 8,0 (0,01 M). A enzima foi purificada através de coluna de cromatografia de afinidade bioespecífica usando gel de Sepharose 6B e  $\beta$ -CD como ligante. A enzima purificada foi concentrada por ultrafiltração, dialisada 5 vezes com tampão Tris-HCl, pH 8,0 (0,01M), para remover moléculas menores que 30 kD, e estocada sob refrigeração até sua utilização (MATIOLI, 1997; MATIOLI *et al.*, 1998). O teor de proteína da CGTase, determinado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) foi igual a 0,0324 mg de proteína/mL de solução estoque.

**Atividade dextrinizante.** O estudo da atividade dextrinizante se baseou na metodologia de WILSON & INGLEDEW (1982). Uma solução de amido solúvel (Sigma) 0,2% foi preparada em tampão Tris-HCl, pH 8,0 (5 mM) e aquecido a 40°C. A solução trabalho do reagente de iodo foi preparada a partir de 0,5 mL de solução estoque (0,5% I<sub>2</sub> em 5% de KI) em 250 mL de água deionizada, contendo 2,5 mL de HCl 5N. Para o ensaio, 1,0 mL da solução de enzima convenientemente diluída foi co-

locada em tubos amostra com rosca (16 por 150 mm) contendo 2,0 mL de solução de amido 0,2% previamente aquecidos a 50°C. A reação ocorreu a 50°C por 10 minutos. A enzima foi inativada e a reação interrompida colocando-se os tubos amostra em banho fervente por 5 minutos. Os tubos foram resfriados e alíquotas de 0,2 mL foram coletadas e acrescidas de 5,0 mL de solução trabalho de reagente de iodo. A leitura foi realizada espectrofotometricamente a 620 nm contra um branco (0,2 mL de água destilada em 5,0 mL de reagente de iodo). Para preparação dos tubos controle 1,0 mL da enzima diluída inativada em banho fervente por 5 minutos foi adicionada no lugar da enzima ativa. Para preparação do padrão 1,0 mL de água destilada foi adicionada no lugar da enzima ativa. As diluições realizadas da enzima foram: 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400. O cálculo da atividade dextrinizante, a partir das absorvâncias (Abs) dos controles e amostras, foi realizado com base na seguinte equação:  $U/mL = [Abs(\text{controle}) - Abs(\text{amostra}) / Abs(\text{controle})] \times 40 \times D$ , onde D é o fator de diluição da enzima, 40 representa 4,0 mg de amido no tubo de reação por 10 min/50°C e U é a quantidade de enzima que hidrolisa 0,1 mg de amido em 10 minutos de reação a 50°C quando 4,0 mg de amido está presente.

**Dextrose equivalente:** Preparação do amido liqüefeito 10% (p/v) em diferentes D.E.: 100 mL da solução de amido de milho 10% foi preparada e o pH foi ajustado para 6,0. Aqueceu-se à solução até 60°C e adicionou-se 3,0 mL da enzima  $\alpha$ -amilase Termamyl-Novo 120L diluída 100 vezes. Um novo aquecimento foi realizado até a temperatura de 95°C. As D.E. 2, 5, 10 e 15 foram obtidas hidrolisando o amido a 95°C em tempos pré-estabelecidos, conforme metodologia de LIMA *et al.* (1998). A reação foi interrompida adicionando-se HCl 1 N à solução e submetendo-a a ebulição. Resfriou-se a temperatura ambiente, e o pH foi corrigido para 8,0. **Produção das CDs:** os testes de conversão de substrato em CDs foram realizados em reatores batelada de capacidade de 50 mL com a enzima CGTase de *Bacillus firmus*. O ensaio foi realizado a 50°C por 24 horas, solução de amido de milho 10% (p/v) hidrolisado até D.E. 2, 5, 10 e 15 e 1 mg/L de enzima purificada (0,0324 mg proteína/mL). As amostras de 1 mL foram coletadas em intervalos de tempo regulares (de 1 em 1 hora) em tubos de ensaio com rosca contendo 1 mL de água destilada, os quais foram imediatamente fechados e colocados em ba-

nho fervente por 5 minutos para inativação da enzima. A  $\beta$ -CD produzida na reação foi determinada pelo método da extinção da cor da fenoltaleína a 550nm, que ocorre após a complexação com a  $\beta$ -CD e a concentração de  $\gamma$ -CD foi determinada pelo método colorimétrico do verde de bromocresol, sendo o aumento da cor da solução determinado a 620 nm (HAMON & MORAES, 1990).

## Resultados

Na Tabela 1 estão apresentadas as absorvâncias lidas a 620 nm dos tubos controle e amostra, referentes a cada diluição, bem como a atividade dextrinizante. Para o tubo padrão foi obtida uma absorvância de 0,327. A diluição da enzima na qual se encontra sua melhor atividade dextrinizante corresponde a metade da absorvância do padrão, ou seja, quando metade do substrato foi consumido. Para a CGTase de *Bacillus firmus* a diluição de 1:100 é a que mais se aproximou da metade da absorvância do padrão, e, o valor da atividade dextrinizante nesta diluição foi de 1498,37 U/mL, ou seja, 46.245,99 U/mg. Na Figura 1 pode-se observar a representação gráfica da absorvância dos tubos amostra em função das diluições analisadas.

O comportamento das diferentes D.E. na produção de  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD pela CGTase de *Bacillus firmus*, em 24 h de ensaio, pH 8,0, 50°C e 1 mg/L de enzima purificada está representado nas Figuras 2 e 3, respectivamente. Como pode ser observada na Figura 2, a solução de D.E. 15 foi a que apresentou melhor produção de  $\beta$ -CD (12,08 mM em 24 h), contudo, a produção de  $\gamma$ -CD (aproximadamente 1,65 mM em 24 h) foi praticamente a mesma para todas as D.E. testadas.(Figura3).

## Discussão

A atividade da enzima CGTase pode ser determinada por diversos métodos analíticos, mas devido a presença de outras enzimas (pulanase ou  $\alpha$ -amilase) nos meios de fermentação onde são produzidas as CGTases, não é muito fácil determinar sua atividade. Um método específico, confiável e de rotina ainda não está disponível. A determinação da atividade da enzima CGTase pode ser baseada na formação da CD ou no consumo do amido (SZEJTLI, 1988).

Os estudos de MÄKELÄ & KORPELA (1988) têm mostrado que a atividade enzimática da CGTase depende: (i) do número de unidades de glucose presentes nas cadeias de oligossacarídeos que

fazem parte dos diferentes substratos, como amido, dextrina, oligossacarídeos puros; (ii) da concentração de enzima, pois o substrato pode provocar uma inibição da enzima quando a mesma está em concentrações relativamente baixas e, (iii) da composição do substrato, pois glucose e maltose têm, particularmente, interferências marcantes.

Fuwa *apud* SABIONI (1991) determinou a Unidade Enzimática (U) e a atividade da CGTase pela medida da atividade dextrinizante da enzima. A CGTase convenientemente diluída era incubada com o amido solúvel por 10 minutos. A reação era paralisada com adição de HCl. Depois a solução recebia iodo e a absorbância determinada a 700 nm. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir em 10% por minuto a intensidade da cor azul do complexo iodo-amido. A mesma metodologia foi utilizada por YIM (1996).

Posteriormente, foram desenvolvidos diversos métodos baseados no decréscimo da intensidade da cor do complexo iodo-amido e, neste caso, o método fundamenta-se na avaliação do consumo de substrato. A desvantagem dessa técnica é que só pode ser aplicada quando se trabalha com CGTase pura, pois a presença de enzimas hidrolíticas pode diminuir a intensidade da cor do complexo iodo-amido (SZEJTLI, 1988).

A propriedade complexante das CDs tem sido mais e mais explorada e testes colorimétricos baseados na formação dos complexos CD-moléculas orgânicas têm sido desenvolvidos para determinação enzimática. A formação do complexo produz uma variação da densidade ótica de uma solução, a qual pode ser medida espectrofotometricamente (DELBORG, 1991).

Neste trabalho, pesquisou-se a atividade da CGTase de *Bacillus firmus* através da medida da atividade dextrinizante da enzima. Verificou-se que a diluição da enzima na qual se obteve a melhor atividade dextrinizante foi 1:100. O valor da atividade dextrinizante nesta diluição foi de 1.498,37 U/mL, ou seja, 46.245,99 U/mg (atividade específica). A CGTase de *Bacillus lentus* estudada por SABIONI (1991) apresentou uma atividade específica de 33.700 U/mg. Portanto, menor que da CGTase de *Bacillus firmus* estudada neste trabalho.

Para a determinação da Dextrose Equivalente (D.E.) que proporciona maior produção de CDs pela enzima CGTase de *Bacillus firmus*, foi utilizado o substrato amido de milho. Esta escolha teve

por base o trabalho de MATTOLI (1997), o qual concluiu, após análise de vários substratos, que amido de milho apresentou maior produção de CDs pela enzima.

Atualmente, são conhecidos três tipos de reações catalisadas pela CGTase: ciclização, acoplamento e desproporcionamento. As CDs são produzidas a partir do processo conhecido como ciclização ou transglicosilação intramolecular e, neste processo, o substrato deve conter acima de seis unidades de glucose, e ainda estar na sua forma helicoidal (BENDER, 1986). Se o substrato tiver peso molecular inferior a seis unidades de glucose e superior à maltose, a CGTase é capaz de sintetizar o fato oligômeros de maior peso molecular até superior a seis unidades de glucose, através das reações de desproporcionamento e então, produzir CDs (MÄKELÄ & KORPELA, 1988). A reação de acoplamento, também conhecida como transglicosilação intermolecular, consiste na abertura do anel da CD com transferência dos maltooligossacarídeos produzidos para moléculas receptoras. Esta reação ocorre na presença de CDs e certos co-substratos, existindo uma certa competição entre esta reação e aquela de ciclização (BENDER, 1985; KLEIN *et al.*, 1992; NAKAMURA *et al.*, 1994).

Segundo VILLETE *et al.* (1990), substratos com baixa dextrose equivalente (pequeno grau de hidrólise) favorecem a produção de  $\beta$ -CD. Porém, quando o substrato apresenta maior valor de D.E. (aproximadamente 12), existe a possibilidade de formação de complexo enzima-substrato improdutivo para a reação de ciclização, mas capaz de realizar as reações de acoplamento, na qual a  $\beta$ -CD é destruída.

Altas concentrações de substrato (amido) resultam em menores custos operacionais, pois aumenta-se a produção por unidade de volume do reator, porém o rendimento de CDs diminui. Uma concentração ótima de amido (aproximadamente 30% p/v) representa um compromisso de vários fatores. Quando amido não modificado é usado como substrato, somente concentrações abaixo de 5% podem ser aplicadas. Acima deste valor, ocorre retrogradação do amido e um precipitado insolúvel é formado, prejudicando a produção de CDs. Uma hidrólise parcial do amido melhora sua solubilidade e reduz a viscosidade das soluções, mas uma hidrólise excessiva tem efeito adverso, pois aumenta a quantidade de glucose e maltose presentes, que são inibidores da produção de CDs (SZEJTLI, 1988).

ARMBRUSTER & KOOI (1969) patentearam um processo para a produção de CDs a partir de amido de milho ceroso a 30% (p/v), previamente hidrolisado com  $\alpha$ -amilase, e apresentando uma D.E. de 0,4 a 25,5. Observaram que rendimentos em CDs superiores a 40% eram obtidos quando utilizavam uma D.E. entre 0,4 e 6,0. Para D.E. de 25,5, obtiveram um rendimento de apenas 2%.

Segundo LIMA *et al.* (1998) a produção de  $\beta$ -CD pela CGTase de *Bacillus alcalofílico* modificado geneticamente, diminuiu com o aumento nos valores de D.E. de 2 a 25, sendo que os melhores resultados foram obtidos com os valores de D.E. entre 2 e 10.

Também KIM *et al.* (1993) salientaram de que quando se trabalha com altas concentrações de amido é necessário reduzir a viscosidade da solução por meio de uma pré-hidrólise parcial, por exemplo, com ácidos ou com a enzima  $\alpha$ -amilase, ou ainda com uma pequena quantidade de CGTase.

Este trabalho, no qual foi utilizada a enzima  $\alpha$ -amilase para hidrolisar o amido de milho, resultou num valor de D.E. 15 como o melhor para a produção de  $\beta$ -CD, sendo que após 24 h de ensaio a produção foi de 12,08 mM. Este valor de D.E. está um pouco acima daqueles encontrados na literatura.

### Conclusão

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho foi possível conhecer algumas propriedades da CGTase de *Bacillus firmus* cepa 37.

A enzima estudada apresentou uma boa atividade dextrinizante, sendo 27% maior que aquela obtida da enzima CGTase de *Bacillus lentus* estudada por SABIONI (1991).

Após a hidrólise do amido de milho com a enzima  $\alpha$ -amilase e conversão do substrato em CDs, o valor de D.E. 15 foi o que apresentou melhor produção de  $\beta$ -CD. Este resultado representa a possibilidade de emprego de amido pré-hidrolisado como substrato para produção de CDs pela CGTase de *Bacillus firmus*, pois segundo SZEJTLI (1988) uma hidrólise parcial do amido melhora sua solubilidade e reduz a viscosidade das soluções, e, por consequência, permite o emprego de altas concentrações de substrato. Este fato resulta em menores custos operacionais, uma vez que se aumenta a produção por unidade de volume do reator.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacio-

nal de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas.

### Referências bibliográficas

- ARMBRUSTER, F. C.; KOOI, E. R. Production of cyclodextrin. U.S. Patent N° 3, 425, 910. 1969. 5p.
- BEKERS, O. *et al.* Cyclodextrins in the Pharmaceutical Field. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 17:1503-1549, 1991.
- BENDER, H. Studies on the inhibition by malto-oligosaccharides of the cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M 5 al with glycogen. *Carbohydrate Research*, 153:291-302, 1985.
- BENDER, H. Production, characterization and application of CDs. *Advances Biotechnological Processes*, 6:31-71, 1986.
- 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*, 72:248-254, 1976.
- DELBOURG, M. F. - *Modulation de l'activité de cyclodextrine glucosyltransférases en présence de polyéthylène glycol*. Compiègne, França: UTC, 1991. 140 p. Tese (Doutorado), Université de Technologie de Compiègne, 1991.
- DUCHÊNE, D.; DEBRUÈRES, B.; BRÉTILLON, A. Les Cyclodextrines Nature, Origine, et Intérêt en Pharmacie Galénique. *Labo-Pharma - Probl. Tech.* 32:842-850, 1984.
- DUCHÊNE, D.; VAUTION, C. Les cyclodextrines: une possibilité d'amélioration des qualités pharmacotechniques des principes actifs. *Les Entretiens du Carla - Tome VII*, Conférence donnée le 24 juin 1986.
- ENGLBRECHT, A. *et al.* Biochemical and genetic characterization of CGTase from an alkalophilic bacterium forming primarily  $\gamma$ -cyclodextrin by affinity chromatography. In: DUCHÊNE, D. *Minutes of the 5th International Symposium on Cyclodextrins*. Paris: Editions Santé, 1990. p. 25-31.
- FRENCH, D. The Schardinger dextrins. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 12:189-260, 1957.
- HAMON, V.; MORAES, F. F. DE Etude Préliminaire a L'immobilisation de la CGTase Wacker. Laboratoire de Technologie Enzymatique, Université de Technologie de Compiègne. Relatório de pesquisa, 1990.
- HORIKOSHI, K. Enzymology and molecular genetics of CD-forming enzymes. In: HUBER, O.; SZEJTLI, J. *Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 7-17.
- JAMUNA, R. *et al.* Synthesis of cyclodextrin glucosyl transferase by *Bacillus cereus* for the production of cyclodextrins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 43:163-176, 1993
- KIM, T. J.; LEE, Y. D.; KIM, H. S. Enzymatic production of cyclodextrins from milled corn starch in an ultrafiltration membrane bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 41:89-94, 1993.
- KLEIN, C. *et al.* Catalytic center of cyclodextrin glycosyltransferase derived from X-ray structure analysis combined with site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 31:8740-8746, 1992.
- KOROLKOVAS, A. Molecular inclusion and cyclodextrin: properties and therapeutic applications. *Farmalab* 2, 1991.
- LEE, J.; KIM, H. S. Enhancement of enzymatic production of cyclodextrin by organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, 13:499-503, 1991
- LIMA, H. O. S.; MORAES, F. F. DE; ZANIN, G. M.  $\beta$ -Cyclodextrin Production by Simultaneous Fermentation and Cyclization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70-72:789-804, 1998.
- MÄKELÄ, M.; KORPELA, T. K. Determination of the catalytic activity of cyclomaltodextrin glucanotransferase by maltotriose-methylorange assay. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 15:307-318, 1988.
- MATIOLI, G. *et al.* Screening for Gamma-CGTase. In: SZEJTLI, J.; SZENTE, L. *Proceeding of the Eighth International Symposium on Cyclodextrins*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996. p. 55-58.
- MATIOLI, G. *Seleção de microrganismo e caracterização de sua enzima ciclodextrina glicosiltransferase*. Curitiba: UFPr, 1997. 240p. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, 1997.

MATIOLI, G. *et al.* Production and purification of CGTase of Alkaliphilic *Bacillus* isolated from Brazilian soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70-72:267-275, 1998.

MORI, S. *et al.* Purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp n° 9605. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 58:1968-1972, 1994.

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

PSZCZOLA, D. E. Production and Potential Food Applications of Cyclodextrins. *Food Technology*, 42:96-100, 1988.

ROMBERGER, M.; HELGUERA L. I. Sabores y colores en prisión. *Alimentos Procesados*, 18:34-38, 1999.

SABIONI, J. G. *Produção e caracterização da ciclodextrina glicosiltransferase do Bacillus lentus alcalofílico*. Campinas: UNICAMP, 1991. 106 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, 1991.

SZEJTLI, J. *Cyclodextrins Technology*. Dordrecht: Academic Publishers, 1988. p. 79-185.

SZEJTLI, J.; SZENTE, L. Proceedings of the Eight International Symposium on Cyclodextrins. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 1996. 685 p.

VILLETE, J. *et al.* Isolation and mechanism of action of the cycloglucosyl transferase from *Bacillus circulans*. In: DUCHÊNE, D. *Minutes of the 5th International Symposium on Cyclodextrins*. Paris: Editions Santé, 1990. p. 32-38.

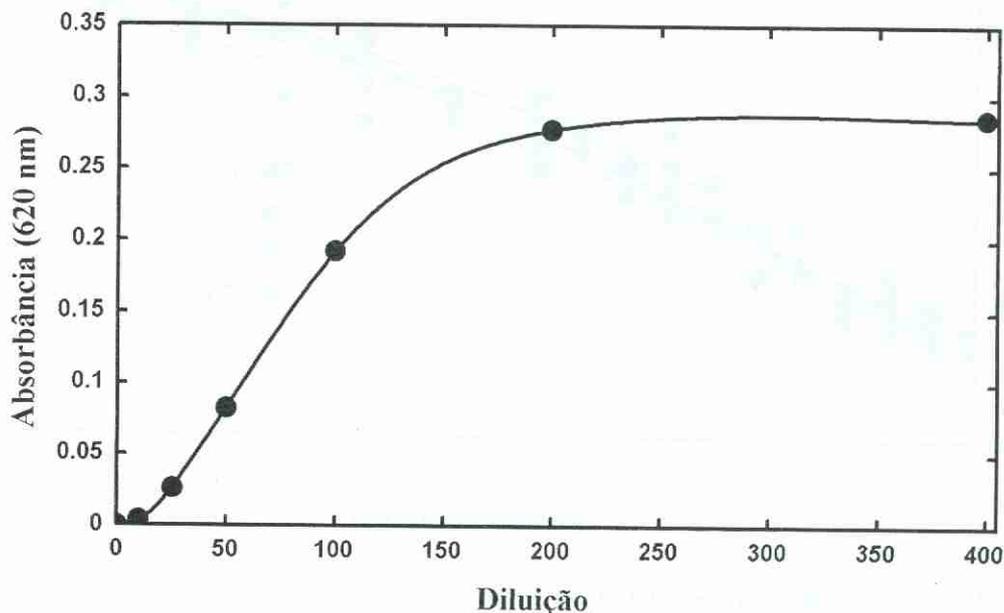
WILSON, J. J.; INGLEDEW, W. M. Isolation and Characterization of *Schwanniomyces alluvius* Amylolytic Enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(2):301-307, 1982.

YIM, D. K. *Caracterização de ciclodextrina glicosiltransferase de Bacillus firmus n° 324 alcalofílico - produção de ciclodextrinas ramificadas*. Campinas: UNICAMP, 1996. 108 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, 1996.

Recebido em: 14/06/2000  
 Aceito em: 17/12/2000

**TABELA 1** - Absorbância dos tubos controle e amostra, lidas a 620 nm, para cada diluição realizada da enzima CGTase de *Bacillus firmus* cepa 37, e suas respectivas atividades dextrinizante.

Diluição da Enzima CGTase <i>B. firmus</i>	Tubo Controle (620 nm)	Tubo Amostra (620 nm)	Atividade Dextrinizante (U/mL)
1:10	0,317	0,004	394,95
1:25	0,318	0,026	918,24
1:50	0,311	0,083	1466,23
1:100	0,307	0,192	1498,37
1:200	0,324	0,277	1160,49
1:400	0,329	0,285	2139,81



**FIGURA 1** - Representação gráfica da absorbância dos tubos amostra em função da diluição da enzima CGTase de *Bacillus firmus* cepa 37.

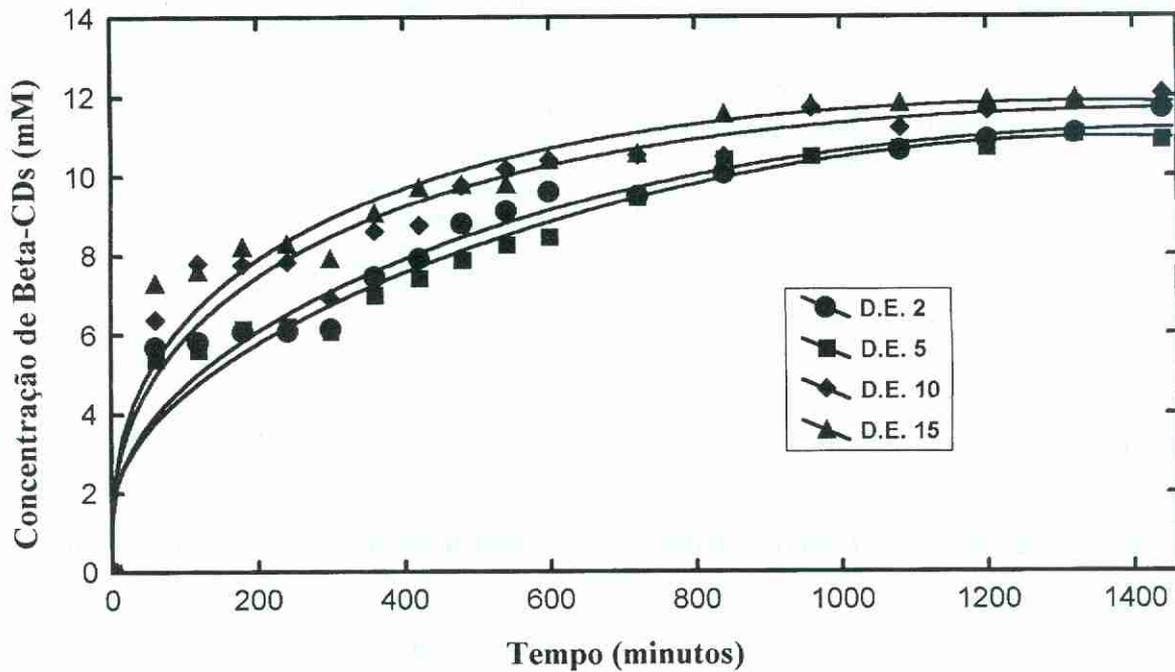


FIGURA 2 - Produção de  $\beta$ -CD pela CGTase de *Bacillus firmus* cepa 37 a 50°C/24h quando da utilização do substrato amido de milho com diferentes D.E. (2,5,10 e 15).

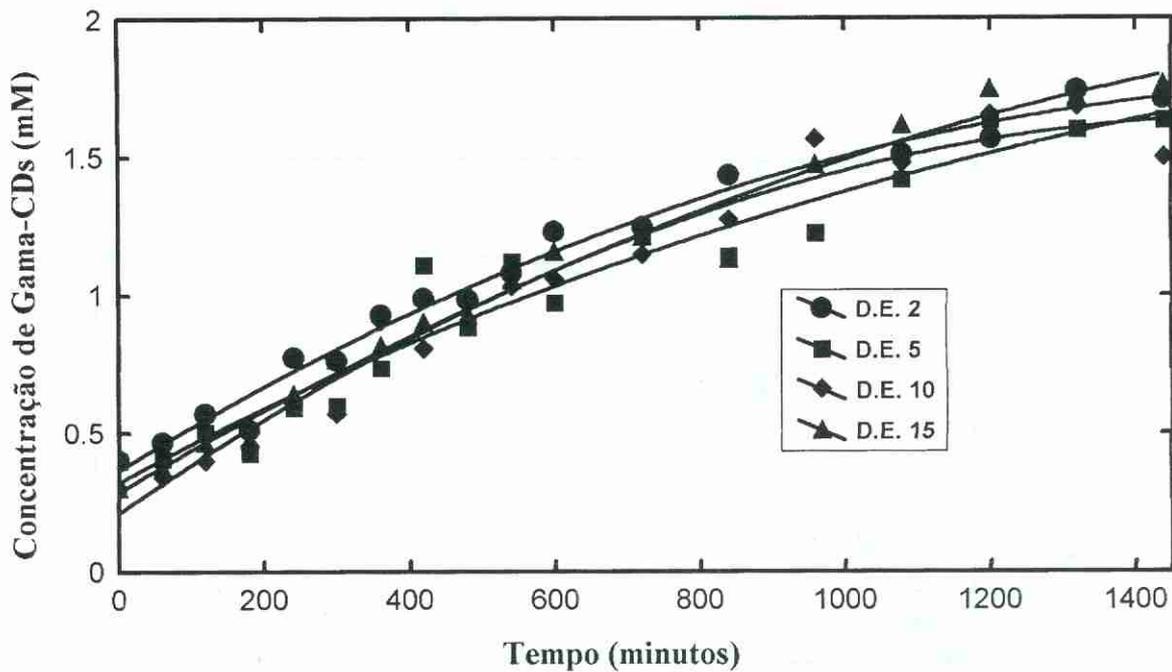


FIGURA 3 - Produção de  $\gamma$ -CD pela CGTase de *Bacillus firmus* cepa 37 a 50°C/24h quando da utilização do substrato amido de milho com diferentes D.E. (2,5,10 e 15).