

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

MAYCON CARVALHO RIBEIRO

**BIOPROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE EM SOLOS DE BIOMAS
BRASILEIROS**

Orientador: Prof. Dr. André Corrêa Amaral.

GOIÂNIA
2014

MAYCON CARVALHO RIBEIRO

**BIOPROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE EM SOLOS DE BIOMAS
BRASILEIROS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Goiás, como parte das exigências do Programa de
Pós- Graduação em Genética e Biologia
Molecular, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. André Corrêa Amaral

**GOIÂNIA-GO
2014**

MAYCON CARVALHO RIBEIRO

BIOPROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE EM SOLOS DE BIOMAS BRASILEIROS

Dissertação defendida e aprovada em 04 de agosto de 2014, pela banca examinadora
constituída pelos professores:

Prof. Dr. André Corrêa Amaral
(Orientador)

Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

Prof. Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes

GOIÂNIA-GO
2014

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família: Juvenal, Meridalva, Daniel, Amanda e Oziane, por todo apoio, incentivo, paciência e carinho durante toda minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

Serei eternamente grato aos meus pais, que nunca mediram esforços para que eu tivesse a melhor educação possível. Por seu amor, encorajamento e exemplos de honestidade.

Aos meus irmãos, que sempre me incentivaram a continuar com meus projetos. Estão sempre presentes nas melhores lembranças.

À minha companheira, que está ao meu lado durante os bons e maus momentos. Sempre compreensiva e disposta a ajudar.

Aos amigos, que mesmo distantes continuam guardados no peito.

Ao meu orientador e grande amigo Dr. André Corrêa Amaral, por toda confiança, apoio, ensinamentos, paciência e disponibilidade para tirar dúvidas e repassar conhecimentos. Fico feliz em poder conviver e realizar projetos ao seu lado.

Ao professor Dr. José Daniel, pelos conselhos, conhecimentos, e acolhimento em seu laboratório sempre que precisei. À todos os amigos do LAMAB, em especial ao Bruno, por sua amizade e auxílio fornecidos para a realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Éverton Kort, que sempre se mostrou gentil e solícito com nosso trabalho.

Aos técnicos do Multiusuários, Elaine e Alex, por toda ajuda e gentileza em me ensinar a usar os equipamentos necessários á minha pesquisa. As amigas Keili e Ariana pela imensa ajuda com as ferramentas da biologia molecular.

Aos queridos amigos do LANAB, pela convivência e pelo carinho. Em especial aos amigos Ismail e Samuel, pelo companheirismo dentro e fora do laboratório.

Ao CAPES, por me conceder a bolsas para realização do meu projeto de pesquisa em tempo integral. Ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade e pela formação.

“Só com o coração conseguimos ver corretamente. O essencial é invisível aos olhos.”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) é uma enzima industrial importante, sendo a única capaz de converter o amido e glucanos afins em oligossacarídeos cíclicos chamados ciclodextrinas (CDs). O arranjo das unidades de glicose na formação da CD resulta em uma molécula com a forma de cone, com interior hidrofóbico e superfície hidrofílica. Este arranjo das moléculas de glicose permite seu uso como molécula hospedeira na formação de complexos de inclusão com compostos orgânicos e inorgânicos. Este mecanismo é vantajoso na proteção de moléculas contra luz, calor e condições oxidantes e também possibilita melhorar a solubilidade de compostos hidrofóbicos. Ciclodextrinas são utilizadas desde a indústria de alimentos até a farmacêutica, em sistemas de liberação controlada de drogas e imobilização de compostos tóxicos para proteção ambiental. As CGTase são principalmente produzidas por bactérias do gênero *Bacillus*, encontradas degradando substratos ricos em amido. O objetivo deste estudo foi identificar, isolar, selecionar e caracterizar linhagens de bactérias produtoras de CGTase a partir de amostras de solo de diferentes regiões do Brasil bem como calcular o índice enzimático destas bactérias em substratos de baixo custo. Com a realização deste trabalho, foi possível identificar 17 bactérias produtoras da enzima ciclodextrina glicosiltransferase, sendo que nove delas apresentaram valores para índice enzimático acima de 1,5. Destas, todas foram caracterizadas como sendo *Bacillus* gram positivos. A bioprospecção de bactérias em solos de diferentes culturas possibilitou a identificação de bactérias que poderão ser usadas em estudos para a produção da ciclodextrina glicosiltransferase e posterior aplicação pelas mais diversas indústrias.

Palavras-chave: Ciclodextrina glicosiltransferase, bioprospecção, índice enzimático.

ABSTRACT

Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) is an important industrial enzyme for being the only one able to convert starch and related glucans in cyclic oligosaccharides called cyclodextrins (CDs). The arrangement of the glucose units in the formation of CD results in a molecule with the shape of a cone, with hydrophobic interior and hydrophilic surface. This arrangement of glucose molecules in CDs allows its use as a host molecule in the formation of inclusion complexes with organic and inorganic compounds. This mechanism is advantageous in protecting the guest molecule from light, heat and oxidizing conditions and also enable the "dissolution" of compounds of low solubility in aqueous media. Cyclodextrins are used from the food industry to the pharmaceutical, in controlled drug delivery systems and immobilization of toxic compounds for environmental protection. The CGTases are mainly produced by bacteria of the genus *Bacillus*, found degrading starch rich substrates. The aim of this study was to identify, isolate, select and characterize strains of CGTase-producing bacteria from soil samples from different regions of Brazil as well as calculate the enzymatic production of these bacteria on low-cost substrates. With this work, it was possible to identify 17 bacteria producing cyclodextrin glycosyltransferase enzyme, with nine of them had values above 1.5 for enzymatic production. Of these, all were characterized as gram positive *Bacillus*. Bioprospecting of bacteria in soils of different cultures led to the identification of bacteria that may be used in studies for the production of cyclodextrin glycosyltransferase and subsequent implementation by various industries.

Keywords: Cyclodextrina Glycosyltransferase, bioprospecting, production enzymatic.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
Obtenção das Ciclodextrinas Glicosiltransferase	7
Obtenção de Bactérias Produtoras de CGTases	9
OBJETIVOS	11
Objetivo Geral	11
Objetivos Específicos	11
ANEXO 1	12
ANEXO I: Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico <i>Journal of Biotechnology</i> .	12
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE CICLODEXTRINASE EM BIOMAS BRASILEIROS	13
RESUMO	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1 - Coleta das amostras dos solos	17
2.2 - Identificação das bactérias produtoras de CGTase no solo	17
2.3 - Caracterização morfo-tintorial das bactérias isoladas	18
2.4 - Cálculo da Produção de CGTase em diferentes fontes de amido	19
2.5 - Manutenção das cepas selecionadas	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
3.1 - Identificação das bactérias produtoras de CGTase	21
3.2 - Caracterização morfo-tintorial	23
3.3 - Avaliação da capacidade de produção da ciclodextrina glicosiltransferase pelas bactérias em diferentes fontes de amido	25
3.4 - Produção enzimática das bactérias	26
3.5 - Potencial de produção enzimática em diferentes fontes de amido	29
4. CONCLUSÃO	36
5. REFERÊNCIAS	37
CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

INTRODUÇÃO

O amido é um polímero de glicose com alto peso molecular, produzido pelas plantas como estoque de carbono para obtenção de energia. É armazenado na forma de grânulos nos diferentes tecidos vegetais, tais como de batata e mandioca. Nessa condição, os polímeros de glucano apresentam-se como amilopectina altamente ramificada e amilose linear. Estas moléculas servem como fontes de energia para algumas espécies de bactérias que as convertem extracelularmente em polímeros menores que podem ser facilmente metabolizados (Veen *et al*, 2000; Qi e Zimmermann, 2005).

Muitas dessas bactérias produzem uma série de enzimas para a degradação do amido. Devido à capacidade de algumas dessas enzimas em modificar estas moléculas elas são comumente aplicadas na indústria, seja pela modificação de suas moléculas ou pela síntese de produtos a partir de sua degradação. Tais características tornaram estas enzimas alvo de interesse científico, tanto para se entender melhor o seu mecanismo bem como sua especificidade a certos substratos e metabólitos específicos (Veen *et al*, 2000). Dentre as enzimas que tem sido identificadas e caracterizadas, podemos destacar as α -amilases, glucoamilases e ciclodextrinas glicosiltransferase (Qi e Zimmermann, 2005).

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), também conhecida por ciclodextrina glucanotransferase e ciclomaltodextrina glucanotransferase, tem atraído particular interesse devido à sua capacidade de formar compostos cíclicos chamados ciclodextrinas (CDs) a partir do amido (Bender, 1986; Tankova, 1998). A classificação química da CGTase (EC 2.4.1.19) é 1,4- α -D-glucano 4- α -D-(1,4- α -D-glucano)-transferase. A CGTase é uma hexosiltransferase pertencente ao grupo das

transferases, catalisando reações de transglicosilação, sendo capaz de hidrolisar o amido (Qi e Zimmermann, 2005; Cheng *et al*, 2011) (**Figura 1**).

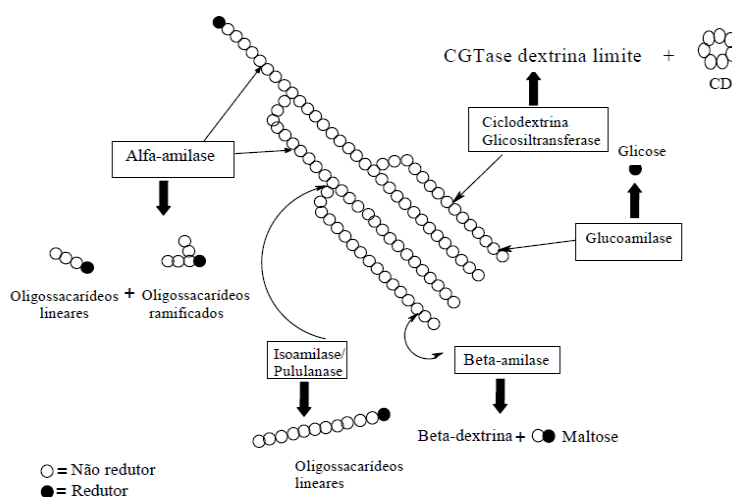


Figura 1. Ação das enzimas envolvidas na degradação do amido. (●) Molécula de glicose com extremidade reductora; (○) Molécula de glicose sem a extremidade reductora. As setas indicam a preferência pela quebra na molécula de amido (Adaptado Van Der Veen, 2010).

As CGTases são produzidas principalmente por bactérias do gênero *Bacillus* (Alves-Prado *et al*, 2002), como *B. macerans*, *B. circulans*, *B. clarkii*, *B. megaterium*, *B. firmus* e *B. lentus* (Biewer *et al*, 2002). Também foi relatada a produção de CGTase por *Paenibacillus illinoisensis* ZY-08 (Lee *et al*, 2012). No Brasil, foram descritos os seguintes microrganismos produtores de CGTases *Bacillus lentus* (Sabioni e Park, 1992), *Bacillus circulans* n°76 (Salva *et al*, 1997), linhagem n°37 e linhagem n°41 (Matioli *et al*, 1998). Esses microrganismos são encontrados degradando substratos ricos em amido, tais como trigo, soja, fubá, mandioca e batata (Matioli *et al*, 1998). Em ambientes naturais, certas bactérias e archaeas presumivelmente excretam CGTases sobre o substrato de amido, convertendo-o em CD, e assim evitando a sua

utilização por outros microorganismos concorrentes. Esta é provavelmente uma medida evolutiva que visa à competição por alimento (Leemhuis *et al*, 2009).

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos formados pela união de moléculas de D-glicose através de ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$, obtidas a partir da degradação enzimática do amido (**Figura 2**).

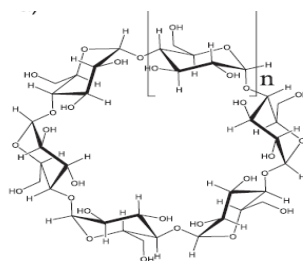


Figura 2. Esquema representativo das ciclodextrinas (CD's). Os derivados α , β e γ -CD são definidos por $n=1$, 2 e 3, respectivamente (Britto *et al*, 2004).

A CGTase catalisa principalmente reações de transglicosilação, como reações de ciclização, acoplamento e desproporcionamento (**Figura 3**). A reação de desproporcionamento é também promovida por muitos outros membros da família α -amilase e pode ser considerada um padrão de reação da enzima. A reação de ciclização é própria da CGTase e resulta na formação de uma CD, onde a parte do doador que foi clivada também atua como aceptor. A CGTase também catalisa a reação inversa e é chamada de reação de acoplamento (Qi e Zimmermann, 2005; Carneiro *et al*, 2006).

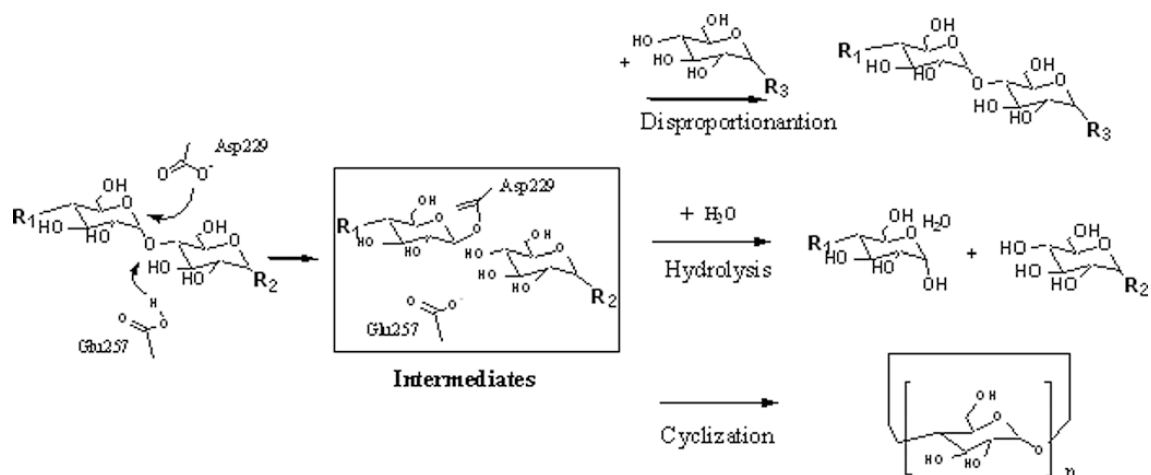


Figura 3. Esquema do mecanismo de reação da CGTase. R₁, R₂ e R₃ representam os diferentes resíduos de glicose; e n representa o número de resíduos de glicose ($n \geq 6$) (Qi e Zimmermann, 2005).

As CDs mais conhecidas são as α , β e γ -ciclodextrinas, constituídas por 6, 7 e 8 resíduos de glicose, respectivamente (Gawande *et al*, 1998; Kim e Robyt, 2000; Drunkler *et al*, 2001) (**Figura 4**). Estruturalmente, as CDs assemelham-se a “cones truncados”, apresentando o lado mais largo formado pelas hidroxilas secundárias em C-2 e C-3 e a face mais estreita constituída pelas hidroxilas primárias ligadas em C-6.

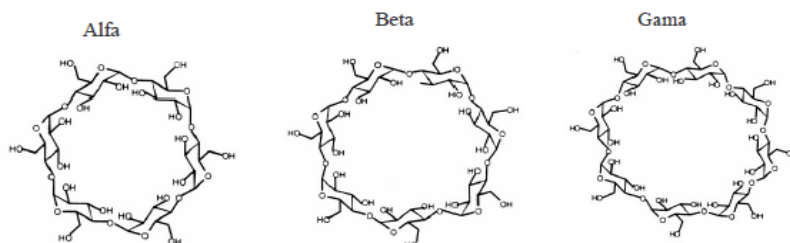


Figura 4. Estrutura da α -CD, β -CD e γ -CD, com 6, 7 e 8 monômeros de glicose, respectivamente (Adaptado Alves-Prado *et al*, 2006).

O tamanho da cavidade das ciclodextrinas é determinado pelos números de unidades de glicose. O aspecto hidrofóbico do interior da cavidade das CDs é definido pelos átomos de oxigênio envolvidos nas ligações glicosídicas (em C-1 e C-4) e os átomos de hidrogênio ligados em C-3 e C-5 (**Figura 5**).

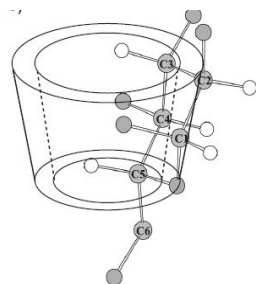


Figura 5. Representação esquemática da estrutura tridimensional das CD's, mostrando as características estruturais definidas pelo arranjo das unidades de glicose (Brito *et al*, 2004).

Já o aspecto hidrofílico das CDs se dá pela presença de hidroxilas livres em sua superfície (Terada *et al*, 1997; Saltão *et al*, 2001; Brito *et al*, 2004) (**Figura 6**).

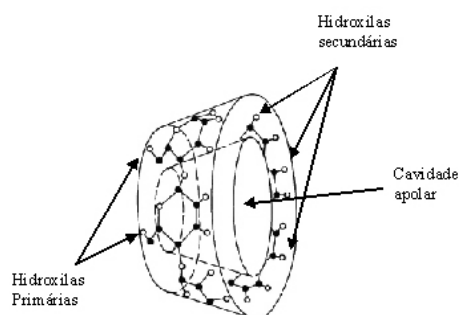


Figura 6. Representação esquemática da estrutura tronco-cônica das ciclodextrinas e de suas hidroxilas livres (Sá-Barreto e Cunha-Filho, 2008).

É exatamente essa disposição das moléculas de glicose nas CDs que permite sua utilização como molécula hospedeira na formação de complexos de inclusão (Terada *et al*, 1997; Saltão *et al*, 2001). Os complexos de inclusão são compostos moleculares com a estrutura característica de um aduto, em que um composto (designado de hospedeiro) incorpora no seu interior um outro, o hóspede (**Figura 7**). Há, no entanto, fatores que condicionam a formação de complexos de inclusão.

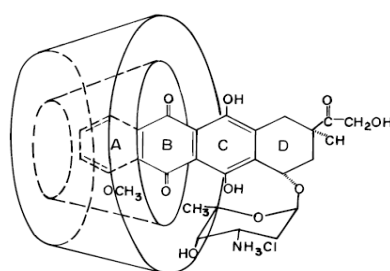


Figura 7. Esquema de um complexo de inclusão entre a molécula de CD e a molécula hóspede (Loftsson e Brewster, 1996).

O requisito mínimo para que se forme um complexo de inclusão é a compatibilidade de tamanhos e geometrias entre a cavidade da ciclodextrina e o hóspede. Há casos em que apenas uma parte da estrutura da molécula fica dentro na cavidade. Deve-se, também, considerar o caráter hidrofóbico da substância a ser incorporada. Nestes casos, a existência de hidroxilas livres em sua superfície e de uma cavidade hidrofóbica possibilita a “dissolução” de compostos de baixa solubilidade em meio aquoso (Loftsson e Brewster, 1996; Saltão *et al*, 2001; Brito *et al*, 2004).

As características particulares das ciclodextrinas tem levado a sua aplicação em diferentes áreas, percorrendo desde a indústria de alimentos até a farmacêutica,

passando pela têxtil, de cosméticos e inclusive para biorremediação. Uma importante aplicação farmacológica destas CDs é na possibilidade de obtenção de formulações farmacológicas para fármacos com propriedades físicas e químicas diferentes sem, no entanto, alterar o seu princípio ativo. Esse mecanismo é particularmente vantajoso por proteger a molécula hóspede da luz, calor ou condições oxidantes (Vielle *et al*, 2001).

Estas moléculas também são utilizadas para reduzir a volatilidade de moléculas de odor em perfumes e aromatizantes por controlar a liberação do aroma. Na indústria química, as CDs são usadas na separação de enantiômeros, para retirar produtos químicos tóxicos de resíduos líquidos e na biorremediação do solo. Outras aplicações envolvem a supressão de sabores indesejáveis e a retirada de compostos, como o colesterol dos alimentos. (Loftsson e Brewster, 1996; Terada *et al*, 1997; Matioli *et al*, 2001; Brito *et al*, 2004; Tesfai *et al*, 2012).

Apesar das vantagens obtidas pelo uso das CDs na indústria em geral, há ainda o problema do elevado custo de produção da CD que deve-se ao elevado custo das CGTases utilizadas no processo, sendo esse o principal limitador do uso industrial das CDs. Assim, por questões econômicas, torna-se indispensável pesquisas que visam a redução de custos de produção e uso das CGTases e CDs em escala comercial (Alves-Prado *et al*, 2002).

Obtenção das Ciclodextrinas Glicosiltransferases

Procedimentos para produção industrial dessa enzima foram otimizados usando-se tanto linhagens selvagens quanto geneticamente modificadas visando-se a produção de diferentes tipos de CGTases. Diversos métodos são aplicados para aumentar a produção da CGTase. O primeiro refere-se à otimização das condições

de cultivo da linhagem bacteriana produtora da enzima, incluindo a otimização do meio de crescimento. O segundo método seria a expressão heteróloga do gene da CGTase em um hospedeiro adequado, sendo que a super expressão desse gene é um fator importante para aumentar a produção da enzima. Cerca de 50% das CGTases produzidas comercialmente são obtidas por processos de produção heteróloga (Qi e Zimmermann, 2005).

Todas as CGTases conhecidas a partir de várias fontes naturais produzem combinações de α -, β - e γ -ciclodextrinas e malto-oligossacarídeos em diferentes proporções, rendimentos e especificidade do produto de acordo com a natureza, origem da CGTase e parâmetros bioquímicos usados na produção, como fermentação e uso de células imobilizadas em ágar ou quitosana (Mori *et al*, 1995; Kamaruddin *et al*, 2005; Alves-Prado *et al*, 2007; Abdel-Naby *et al*, 2011).

As dificuldades tecnológicas para produção da CGTase, como elevado custo e insuficiente pureza, impossibilitaram sua utilização em nível industrial até pouco tempo atrás. Nas últimas décadas, os grandes investimentos em pesquisa superaram estes primeiros entraves e tornaram viável a utilização das CDs na indústria (Sá-Barreto e Cunha-Filho, 2008).

Devido a suas diversas aplicações, a produção e utilização das CDs apresentam um forte crescimento mundial. Apesar da redução dos custos de produção, a busca por enzimas com melhor especificidade, atividade e redução nos custos de produção continuam. A CGTase normalmente produz uma mistura de CDs, então selecionar cepas que produzem enzimas específicas que originam α , β ou γ -CD, facilitaria o processamento e reduziria os custos de produção. Isso torna a pesquisa da CGTase, por meio do isolamento e seleção de linhagens produtoras, extremamente importante (Matioli *et al.*, 2000; Abdel-Naby *et al*, 2011).

Obtenção de Bactérias Produtoras de CGTases

A tecnologia enzimática, área que ganhou muita atenção nas últimas décadas, concilia o desenvolvimento tecnológico com a utilização de matérias primas renováveis e preservação ambiental (Lima *et al.*, 2001; Bon *et al.*, 2008).

Devido à diversidade de espécies e abundância, além do exercício de uma ampla variedade de funções metabólicas, grande parte da microbiota do solo é composta por bactérias. Essas executam um papel fundamental nos ciclos de degradação de macromoléculas, decomposição de matéria orgânica e na conservação da fertilidade edáfica, podendo levar ao aumento da disponibilidade de nutrientes (Sousa, 2012).

Devido à diversidade de espécies e abundância, além do exercício de uma ampla variedade de funções metabólicas, grande parte da microbiota do solo é composta por bactérias. Essas executam um papel fundamental nos ciclos de degradação de macromoléculas, decomposição de matéria orgânica e na conservação da fertilidade edáfica, podendo levar ao aumento da disponibilidade de nutrientes (Sousa, 2012).

A aplicação metodológica para a busca de novos insumos de fontes naturais, particularmente bacteriana, explorando as fortes pesquisas sobre a biodiversidade mundial, vem crescendo e sendo aprimorada nos últimos anos (Piza, 2009). A bioprospecção é um método de localizar, avaliar e explorar a biodiversidade de determinado local (Sant'ana, 2002).

De acordo com a Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001, Bioprospecção é “atividade exploratória que visa identificar componente do patrimônio genético e/ou informação sobre conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial” (Andrade, 2006; Pereira e Lima, 2008). Essa definição

pode ser interpretada como sendo uma busca científica por atributos funcionais provenientes de seres vivos, como organismos em todo ou parte, genes, enzimas e compostos, que confirmem um potencial econômico e uma viabilidade de produção industrial ou comercial ao desenvolvimento de um produto ou processo (Andrade, 2006; Saccaro Júnior, 2011).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Selecionar e caracterização bactérias produtoras de ciclodextrina glicosiltransferase em solos de diferentes biomas brasileiros.

Objetivos Específicos

- Isolar bactérias de amostras de solos dos estados de Goiás, Minas Gerais e Rio Grande do Sul;
- Realizar a caracterização morfo-tintorial das bactérias isoladas;
- Calcular o índice enzimático para as bactérias isoladas;
- Caracterizar por microscopia eletrônica de varredura a bactéria com melhor rendimento de produção da enzima;
- Avaliar a capacidade de produção da enzima ciclodextrina glicosiltransferase em diferentes fontes de amido.

ANEXO 1

ANEXO I: Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico *Journal of Biotechnology*.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
CICLODEXTRINASE EM BIOMAS BRASILEIROS

Maycon Ribeiro¹, Ismail Eş¹, Samuel Rodrigues dos Santos Junior³, César Ramos
Rocha Filho³ José Daniel Gonçalves Vieira², André Corrêa Amaral^{3, *}

¹*Post Graduation in Molecular Biology and Genetics, Institute of Biological Science,
Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil.*

²*Department of Microbiology, Institute of Tropical Pathology and Public Health,
Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil.*

³*Biotechnology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University
of Goiás, Goiânia, GO, Brazil.*

**Corresponding author:*

*Address: Instituto de Patologia Tropical e Saude Publica, Universidade Federal de
Goias, Rua 235, S/N, Setor Universitario, Goiania, GO, Brazil.*

Phone: +55 62 8171-9282

E-mail: amaral.nanobiotech@gmail.com

RESUMO

Ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) é uma enzima industrial importante, sendo a única capaz de converter o amido e glucanos afins em oligossacarídeos cíclicos chamados ciclodextrinas (CDs). O arranjo das unidades de glicose na formação da CD resulta em uma molécula com a forma de cone, com interior hidrofóbico e superfície hidrofílica. Este arranjo das moléculas de glicose permite seu uso como molécula hospedeira na formação de complexos de inclusão com compostos orgânicos e inorgânicos. Este mecanismo é vantajoso na proteção de moléculas contra luz, calor e condições oxidantes e também possibilita melhorar a solubilidade de compostos hidrofóbicos. Ciclodextrinas são utilizadas desde a indústria de alimentos até a farmacêutica, em sistemas de liberação controlada de drogas e imobilização de compostos tóxicos para proteção ambiental. As CGTase são principalmente produzidas por bactérias do gênero *Bacillus*, encontradas degradando substratos ricos em amido. O objetivo deste estudo foi identificar, isolar, selecionar e caracterizar linhagens de bactérias produtoras de CGTase a partir de amostras de solo de diferentes regiões do Brasil bem como calcular o índice enzimático destas bactérias em substratos de baixo custo. Com a realização deste trabalho, foi possível identificar 17 bactérias produtoras da enzima ciclodextrina glicosiltransferase, sendo que nove delas apresentaram valores para índice enzimático acima de 1,5. Destas, todas foram caracterizadas como sendo *Bacillus* gram positivos. A bioprospecção de bactérias em solos de diferentes culturas possibilitou a identificação de bactérias que poderão ser usadas em estudos para a produção da ciclodextrina glicosiltransferase e posterior aplicação pelas mais diversas indústrias.

Palavras-chave: Ciclodextrina glicosiltransferase, bioprospecção, índice enzimático.

1. INTRODUÇÃO

O amido é um polímero de glicose com alto peso molecular, produzido pelas plantas como estoque de carbono para obtenção de energia. É armazenado na forma de grânulos nos diferentes tecidos vegetais, tais como de batata e mandioca. Nessa condição, os polímeros de glucano apresentam-se como amilopectina altamente ramificada e amilose linear. Estas moléculas servem como fontes de energia para algumas espécies de bactérias que as convertem extracelularmente em polímeros menores que podem ser facilmente metabolizados (Veen et al, 2000; Qi e Zimmermann, 2005).

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), também conhecida por ciclodextrina glucanotransferase e ciclomaltodextrina glucanotransferase, tem atraído particular interesse devido à sua capacidade de formar compostos cíclicos chamados ciclodextrinas (CDs) a partir do amido (Bender, 1986; Tankova, 1998). A classificação química da CGTase (EC 2.4.1.19) é 1,4- α -D-glucano 4- α -D-(1,4- α -D-glucano)-transferase. A CGTase é uma hexosiltransferase pertencente ao grupo das transferases, catalisando reações de transglicosilação, sendo capaz de hidrolisar o amido (Qi e Zimmermann, 2005; Cheng et al, 2011).

As CGTases são produzidas principalmente por bactérias do gênero *Bacillus* (Alves-Prado et al, 2002), como *B. macerans*, *B. circulans*, *B. clarkii*, *B. megaterium*, *B. firmus* e *B. lentus* (Biwer et al, 2002). Também foi relatada a produção de CGTase por *Paenibacillus illinoisensis* ZY-08 (Lee et al, 2012). No Brasil, foram descritos os

seguintes microrganismos produtores de CGTases *Bacillus lentus* (Sabioni e Park, 1992), *Bacillus circulans* n°76 (Salva et al, 1997), linhagens 37 e 41 (Matioli et al, 1998). Esses microrganismos são encontrados degradando substratos ricos em amido, tais como trigo, soja, fubá, mandioca e batata (Matioli et al, 1998).

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos formados pela união de moléculas de D-glicose através de ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$, obtidas a partir da degradação enzimática do amido. As CDs mais conhecidas são as α , β e γ -ciclodextrinas, constituídas por 6, 7 e 8 resíduos de glicose, respectivamente, e estruturalmente assemelham-se a “cones truncados” (Gawande et al, 1998; Kim e Robyt, 2000; Drunkler et al, 2001). O tamanho da cavidade das ciclodextrinas é determinado pelos números de unidades de glicose. O aspecto hidrofóbico do interior da cavidade das CDs é definido pelos átomos de oxigênio envolvidos nas ligações glicosídicas e os átomos de hidrogênio. Já o aspecto hidrofílico das CDs se dá pela presença de hidroxilas livres em sua superfície (Terada et al, 1997; Saltão et al, 2001; Brito et al, 2004).

É exatamente essa disposição das moléculas de glicose nas CDs que permite sua utilização como molécula hospedeira na formação de complexos de inclusão. Os complexos de inclusão são compostos moleculares com a estrutura característica de um aduto, em que um composto (designado de hospedeiro) incorpora no seu interior um outro, o hóspede (Terada et al, 1997; Saltão et al, 2001). Estas características fazem com que estas moléculas sejam aplicadas em diferentes áreas, destacando-se as indústrias de alimentos até a farmacêutica, passando pela têxtil, de cosméticos e inclusive para biorremediação. Uma importante aplicação farmacológica destas CDs é a possibilidade de obtenção de formulações farmacológicas para fármacos

com propriedades físicas e químicas diferentes sem, no entanto, alterar o seu princípio ativo (Vielle et al, 2001).

O objetivo deste trabalho foi identificar e investigar a produção de ciclodextrina glicosiltransferase por bactérias isoladas de solos de biomas brasileiros em diferentes meios contendo fontes de amido.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - *Coleta das amostras dos solos*

A bioprospecção das bactérias foi feita em 17 amostras de solos que foram coletadas de plantações de mandioca, batata-doce, banana e hortaliças nas cidades de Silvânia em Goiás, Guanhães, Milho Verde e São João Evangelista em Minas Gerais e Gravataí no Rio Grande do Sul. As amostras de solos foram coletadas a uma profundidade de 20 cm e acondicionadas em recipientes estéreis. O critério para a escolha dos solos de onde foram retiradas as amostras, foi baseado nos solos em que são cultivadas plantas ricas em amido.

2.2 - *Identificação das bactérias produtoras de CGTase no solo*

Para a identificação e isolamento das bactérias, foi retirado um grama de cada amostra de solo que foi peneirada e acondicionada individualmente em frascos contendo 10 mL de água destilada esterilizada. Os frascos contendo as amostras foram submetidos a um ciclo de uma hora de repouso, seguido por 10 minutos em banho-maria a 80 °C e então novamente colocados em repouso por mais uma hora. Ao fim destas etapas os frascos contendo as amostras foram homogeneizados vigorosamente durante 1 minuto. Com o auxílio de uma pipeta, e em ambiente estéril, foram retirados 100 µL de cada uma das soluções e semeadas em placas de

Petri contendo meio mínimo adaptado de Nakamura e Horikoshi, 1976. O meio mínimo é constituído por 0,03% de fenolftaleína, 2% de amido solúvel, 0.5% de extrato de levedura, 0.5% de triptona, 0.02% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.02% de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.1% de K_2HPO_4 , 0.1% $(NH_4)_2SO_4$, 1.5% de ágar (w/v) e nistatina na concentração final 5 mg/L, com o pH ajustado para 9,5.

As placas semeadas foram incubadas em uma estufa à temperatura de 30 °C durante 48 horas ou até identificar a formação de halos amarelados nas placas de Petri. A identificação dos halos amarelados, devido ao complexo fenolftaleína-CGTase, indica a presença de bactérias produtoras de CGTases.

Todos os procedimentos foram feitos em triplicata. As colônias positivas após o período de incubação foram coletadas e repicadas no mesmo meio de cultura descrito anteriormente, visando o seu isolamento. Foram realizados esgotamentos por repiques para a obtenção de colônias bacterianas isoladas de cada amostra de solo.

2.3 - Caracterização morfo-tintorial das bactérias isoladas

A caracterização morfo-tintorial realizada pela coloração de Gram foi usada para identificar a morfologia e o tipo de parede celular das bactérias selecionadas. Esta etapa é importante tanto para a identificação da bactéria quanto para as próximas etapas de caracterização molecular das bactérias. Para a identificação das características morfológicas das cepas foi realizada a técnica de coloração de Gram (Stinghen *et al.*, 2007) e posteriormente a sua análise por meio de microscopia óptica de transmissão com aumento de mil vezes. Em ambiente e condições estéreis, com o auxílio da alça de platina retirou-se uma porção do meio de cultura contendo a cepa de interesse seguindo-se pelo esfregaço em uma lâmina

histológica para observação em microscopia óptica. Após esta etapa de preparo do esfregaço foi feita a fixação pelo calor passando-se lentamente o lado contrário da lâmina contendo o esfregaço pela chama do bico de Bunsen. O próximo passo foi adicionar o cristal de violeta sob a superfície da lâmina e aguardar por 1 minuto, seguido da adição de lugol também por 1 minuto e após este período foi feita a lavagem da lâmina com água destilada. Posteriormente, foi aplicado álcool para retirar o excesso de corante, seguida por outra lavagem com água destilada. Por último, adicionou-se fucsina e após 30 segundos foi realizada a última lavagem com água destilada. As lâminas foram observadas e fotografadas usando microscópio óptica com captura de imagem.

Para investigar a morfologia das bactérias selecionadas, foi escolhida uma bactéria que apresentou alto valor para o índice enzimático. Esta bactéria foi processada pelo Laboratório de Microscopia do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás. A visualização estrutural da célula foi feita por microscopia eletrônica de varredura foi realizada usando-se o equipamento Jeol, JSM – 6610 equipado com EDS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, WA, USA).

2.4 - Cálculo da Produção de CGTase em diferentes fontes de amido

Inúmeras metodologias foram descritas de forma a facilitar a seleção e o isolamento de microrganismos excretadores de hidrolases. Estas metodologias são principalmente baseadas em cultivos dos microrganismos em meio sólido, onde o meio específico apresenta a capacidade de identificar a produção de uma determinada enzima (Stamford *et al*, 1998). Uma destas metodologias foi utilizada para o isolamento de microrganismos produtores de ciclodextrina glicosiltransferase, conforme descrito abaixo.

A capacidade de produção de CGTase pelos microrganismos isolados foi determinado pelo cálculo do índice enzimático (IE). O cálculo que determina o IE consiste na divisão do diâmetro médio do halo de degradação (HD) do substrato pelo diâmetro médio da colônia (DC), onde o halo amarelado ao redor da colônia aumenta proporcionalmente em tamanho e intensidade à capacidade de produção da CGTase pelo microrganismo (Stamford *et al*, 1998).

Para o cálculo do IE, foram pipetados 25 µL de cada uma das suspensões contendo a colônia bacteriana diluída em caldo BHI em um multi-inoculador de Steer. O multi-inoculador de Steer assemelha-se a um carimbo para inocular volumes precisos da suspensão de bactérias na superfície do meio mínimo descrito anteriormente. As placas foram colocadas para secar por 10 minutos em temperatura ambiente no fluxo laminar e incubadas a 30 °C. Após 24, 48 e 72 horas foram feitas medições dos diâmetros das colônias e dos halos para calcular o valor do índice enzimático usando a Equação 1. Este ensaio foi feito em triplicata.

$$\text{Índice enzimático (IE)} = \frac{\text{Diâmetro do halo de degradação (HD)}}{\text{Diâmetro da colônia (DC)}} \quad \textbf{Equação 1}$$

O critério usado para classificar as bactérias isoladas como sendo boas produtoras da enzima ciclodextrina glicosiltransferase foram aquelas que apresentaram valor de índice enzimático maior ou igual a 1,5. Este valor foi descrito anteriormente por (Lealem e Gashe, 1994) como referência para classificar microrganismos produtores de enzimas exoamilases.

Para avaliar qual seria o melhor substrato no qual as bactérias isoladas apresentariam a melhor atividade catalítica, foram utilizados três diferentes substratos ricos em amido: amido P.A., mandioca e fécula de batata. Para isso, com

o auxílio do repicador de Steer, inoculou-se uma alíquota de amostra dos isolados em uma placa de Petri contendo o meio sólido adicionado de fenolftaleína. As medições dos halos formados foram feitas após 24, 48 e 72 horas contados a partir da inoculação. Para a análise da capacidade de produção da enzimática utilizou-se o meio de cultura descrito por Nakamura e Horikoshi, 1976, onde apenas a fonte de amido foi substituída. Em seguida, calculou-se a média entre os valores dos índices enzimáticos obtidos nos diferentes períodos (24, 48 e 72 horas) para verificação das linhagens com melhores potenciais para produção enzimática de acordo com cada fonte de carbono.

2.5 - Manutenção das cepas selecionadas

As cepas bacterianas que apresentaram produção satisfatória da enzima CGTase, foram posteriormente repicadas das placas contendo meio mínimo para tubos Falcons contendo caldo BHI pH 10 (5 mL por tubo). Em seguida os tubos foram levados para o shaker de bancada a 30 °C a 150 rpm durante 48 horas. Após o período de incubação foi feito o estoque das cepas em glicerol 85% (850 µL do caldo BHI contendo a cepa bacteriana em um eppendorf de 2 mL contendo 150 µL de glicerol esterilizado) e mantidas a -4 °C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Identificação das bactérias produtoras de CGTase

Por meio da bioprospecção de bactérias produtoras da enzima ciclodextrina glicosiltransferase em amostras de solos de diferentes culturas, permitiu selecionar 17 linhagens bacterianas produtoras da enzima ciclodextrina glicosiltransferase. A

seleção foi feita com base na capacidade das bactérias em converter o amido e a fenolftaleína presentes no meio de cultura mínimo. A atividade da CGTase é vista como um halo amarelado ou incolor em um fundo vermelho devido à formação do complexo de inclusão fenolftaleína-ciclodextrina (Park *et al.*, 1989)

Como pode ser observado na Figura 1, no primeiro *screening*, podem ser identificadas a formação de halos amarelados, indicando que na amostra analisada, tem a presença de bactérias que secretam a enzima ciclodextrina glicosiltransferase. Desta forma, apenas as colônias que apresentaram a formação de um halo amarelado de aspecto brilhante foram selecionadas para as etapas posteriores do projeto. Para garantir que apenas as bactérias de interesse fossem selecionadas, foram feitos pelo menos cinco repiques consecutivos realizados em intervalos de 48 horas, as colônias isoladas foram cultivadas em meio BHI que permitiu o crescimento da cultura pura, observado pela turgidez do meio. O cultivo de células em BHI também permitiu a realização da coloração de Gram, congelamento em glicerol e o cálculo do índice enzimático.

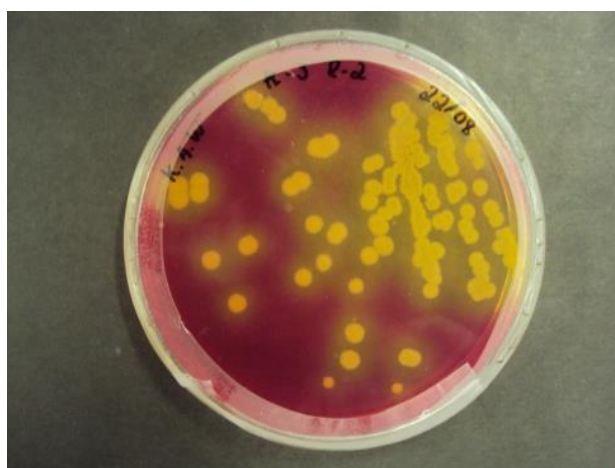


Figura 1. Halo amarelado rodeando as colônias bacterianas indicando a conversão do amido presente no meio de cultura pela reação entre a fenolftaleína e a CGTase.

3.2 - Caracterização morfo-tintorial

Para investigar as características morfo-tintoriais das bactérias selecionadas, as mesmas foram submetidas à coloração de Gram e análises por microscopia eletrônica de varredura. A coloração de Gram permitiu caracterizar todas as bactérias como sendo Gram positivas. Na Figura 2A está exemplificada a caracterização pelo método de Gram da bactéria S4. Este ensaio foi realizado para, além da visualização microscópica do microrganismo, também possibilitar a identificação do tipo de parede celular e com isto, padronizar os procedimentos necessários para a extração do material genético e posterior sequenciamento genômico. Na Figura 2B, a imagem por microscopia eletrônica de varredura confirma a amostra como sendo Bacilo. Nossos achados corroboram com o estudo de Aguiar (2001), o qual demonstrou uma exclusividade bacteriana e predominância do gênero *Bacillus* como microrganismos produtores da enzima ciclodextrina glicosiltransferase.

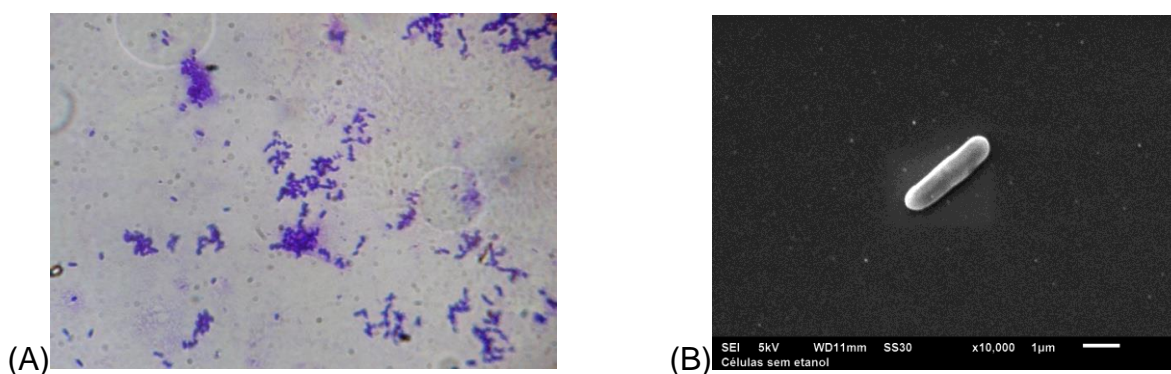


Figura 2. (A) Fotomicrografia representativa de todas as amostras isoladas e caracterizadas pela coloração de Gram. Todas as colônias selecionadas são *Bacillus* Gram positivos. Observação em microscópio óptico com aumento de 1000

X. **(B)** Fotomicrografia representativa de todas as amostras isoladas. Observação em Microscópio Eletrônico de Varredura com aumento de 10.000 x.

Os 17 isolados de bactérias selecionados receberam os códigos de acordo com os solos de onde elas foram obtidas e estão listadas na Tabela 1. Do total, seis foram oriundas do solo de mandioca, uma de banana, três de quiabo, três de cenoura, duas de milho verde e duas de batata-doce. O total de linhagens isoladas demonstra o enorme potencial da diversidade microbiana, com capacidade de produção de CGTase, encontradas em diversas regiões do Brasil.

Tabela 1: Identificação e origem do solo de cada isolado selecionado.

Isolados	Origem da Amostra
Cepa S1	Mandioca
Cepa S2	Quiabo
Cepa S3	Quiabo
Cepa S4	Banana
Cepa S5	Quiabo
Cepa S6	Mandioca
Cepa S7	Mandioca
Cepa S8	Cenoura
Cepa S9	Cenoura
Cepa S10	Cenoura
Cepa S11	Milho Verde
Cepa S12	Milho Verde

Cepa M1	Batata-doce
Cepa M2	Batata-doce
Cepa A13	Mandioca
Cepa A21	Mandioca
Cepa A23F	Mandioca

3.3 - Avaliação da capacidade de produção da ciclodextrina glicosiltransferase pelas bactérias em diferentes fontes de amido

Para avaliar o potencial de produção da enzima ciclodextrina glicosiltransferase das bactérias selecionadas, as mesmas foram cultivadas em meio de cultura mínimo e foi calculado o seu índice enzimático. De acordo com Rezende e colaboradores, o cálculo do índice enzimático é um dos parâmetros semi-quantitativos mais utilizados na avaliação da produção de enzimas por determinados microrganismos em meio sólido (Rezende, 2009). As bactérias consideradas produtoras de enzimas extracelulares, quando cultivadas em meio de cultura específico secretam a enzima no meio para degradar o substrato. À medida em que a colônia cresce, ocorre a degradação deste substrato e, por meio de indicadores presentes no meio, no caso a fenolftaleína, pode ser observado o aumento de um halo ao redor da colônia. Na Figura 3, pode ser observada a correlação direta entre o diâmetro do halo formado e a habilidade de degradação do substrato e, de acordo com a equação 1, calculando-se o diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia, resulta no valor para o índice enzimático. Trabalhos na literatura propõem que valores para índice enzimático $\geq 1,5$ (Lin *et al.*, 1991) ou $\geq 2,0$ (Lealem e Gashe, 1994) devam ser usados para se avaliar a capacidade do microrganismo em degradar amido em meio sólido pela secreção de enzimas. Das colônias isoladas, 17 cepas bacterianas

demonstraram um índice enzimático significativo, às quais tiveram o seu potencial avaliado em diferentes fontes de amido.

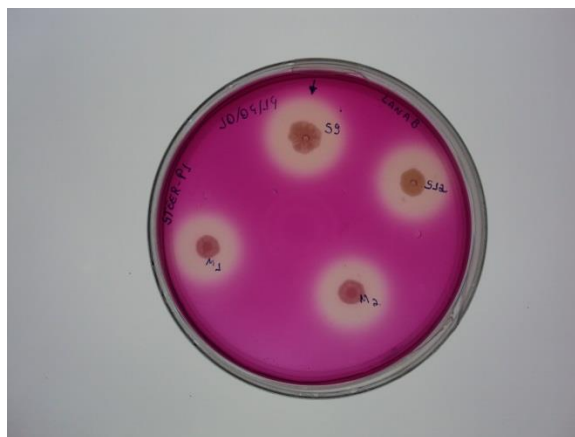


Figura 3. O índice enzimático (IE) é calculado pela divisão entre o diâmetro do halo de degradação (HD) e o diâmetro da colônia (DC).

3.4 - Produção enzimática das bactérias

Para identificar as fontes de amido nas quais as bactérias apresentam maior capacidade de secreção da enzima ciclodextrina glicosiltransferase, o índice enzimático foi calculado substituindo-se a fonte de carbono no meio mínimo para amido P.A., batata e mandioca. Na Tabela 2 podem ser observados os valores das médias calculadas para o índice enzimático em três diferentes tempos de cultivo: 24, 48 e 72h.

Tabela 2: Cálculo da produção de CGTase pelo cálculo do índice enzimático usando diferentes fontes de amido: amido P.A. (industrial), batata e mandioca. Os valores expressam a média do índice enzimático calculado nos três tempos avaliados: 24, 48 e 72h.

Isolados	AMIDO	BATATA	MANDIOC	Origem da Amostra
	P.A.		A	
Cepa S1	2,33	*	*	Mandioca
Cepa S2	*	*	*	Quiabo
Cepa S3	*	*	*	Quiabo
Cepa S4	3,89	3,3	3,5	Banana
Cepa S5	*	*	*	Quiabo
Cepa S6	2,43	*	*	Mandioca
Cepa S7	2,56	*	*	Mandioca
Cepa S8	1,9	2,5	2,7	Cenoura
Cepa S9	2,31	2,4	2,2	Cenoura
Cepa S10	1,84	*	2,5	Cenoura
Cepa S11	*	*	2,8	Milho Verde
Cepa S12	*	2,4	2,4	Milho Verde
Cepa M1	2,7	2,4	2,6	Batata-doce
Cepa M2	2,92	2,3	2,6	Batata-doce
Cepa A13	*	*	*	Mandioca
Cepa A21	*	*	*	Mandioca
Cepa A23F	*	*	*	Mandioca

*Não apresentou crescimento.

De acordo com a Tabela 1, pode ser possível observar que algumas bactérias selecionadas apresentaram capacidade de converter o amido a partir das três fontes testadas (S4, S8, S9, M1, M2). Entretanto, alguns isolados, apesar de terem sido

selecionados em um primeiro momento, não apresentaram a capacidade de conversão nos tempos analisados (S2, S3, S5, A13, A21, A23F) ou apresentaram crescimento em apenas uma (S1, S6, S7, S11) ou duas (S10, S12) fontes de amido. Isto sugere que as linhagens que não exibiram produção de CGTase, necessitando de maior período de tempo para adaptação ao meio e à fonte de carbono presente, para então, iniciar a secreção da enzima.

As linhagens que não apresentaram a capacidade de conversão nos tempos analisados foram levadas à geladeira para posterior descarte e então começaram a exibir atividade enzimática. Soares e colaboradores analisando linhagens mutantes do fungo *Aspergillus nidulans*, observaram halos pequenos, menores que 2,0 durante o cultivo em estufa pelo período de 48 horas (Soares *et al.*, 2010). Contudo, ao guardarem as placas refrigeradas a 4 °C perceberam o aumento no tamanho do halo, mesmo após 10 dias, sugerindo que o microrganismo continuava retirando nutrientes do meio de cultivo, metabolizando, então, o amido ainda disponível (Soares *et al.*, 2010). Pode-se inferir então, que a refrigeração pode melhorar a ação das amilases ou então proporcionar uma condição estressante para o fungo, de forma que ele degrada e consome mais compostos do que o normal pela superexpressão de genes capazes de produzir mais enzimas e promover a obtenção de energia. Partindo desse princípio, sugere-se um maior estudo para verificar se há maior desempenho na degradação do amido quando as linhagens são acondicionadas sob baixa temperatura durante alguns dias. Os fungos analisados foram mantidos à temperatura de 25 °C, não representando condição de estresse para os mesmos. Assim, tal fato pode ter influência para a produção de amilases.

Para a seleção daqueles isolados considerados bons produtores da enzima ciclodextrina glicosiltransferase, foram consideradas as bactérias que apresentaram

valores para o índice enzimático $\geq 2,0$. De acordo com Lealem e Gashe, valores acima de 2,0 indicam que estes microrganismos são bons produtores de enzimas extracelulares em meio sólido (Lealem e Gashe, 1994). A maioria das bactérias isoladas apresentou para o índice enzimático acima deste valor para pelo menos uma das fontes de amido (Tabela 1).

Ainda de acordo com a Tabela 1, quatro apresentaram valores para o índice enzimático $\geq 2,0$ (S4, S9, M1, M2) para as diferentes fontes de amido testadas. Isto indica a versatilidade destas bactérias, podendo ser exploradas para fins de aplicação industrial. Destas, merece destaque a cepa S4 obtida a partir de amostras de solo de plantação de banana de uma cidade do interior de Minas Gerais. Esta cepa apresentou índice enzimático acima de 3,0 para todas as fontes de amido testadas, sugerindo ser uma excelente produtora da enzima ciclodextrina glicosiltransferase além de possuir ampla capacidade de adaptação a diferentes substratos.

3.5 - Potencial de produção enzimática em diferentes fontes de amido

As enzimas estão entre os produtos microbianos mais importantes obtidos para a necessidade humana (Pandey *et al*, 1999) e são, em geral, mais úteis que as enzimas derivadas de plantas e animais, porque apresentam grande variedade da atividade catalítica, maior rendimento, fácil manipulação genética, produção não dependente de variações sazonais e rápido crescimento em meio de cultura. Também são mais estáveis que as enzimas de fontes animais e vegetais, mais fáceis de serem trabalhadas e seguras (Rao *et al.*, 1998).

A seleção de novos microrganismos produtores enzimáticos é talvez o maior obstáculo na comercialização de novas enzimas. Entretanto, a otimização das

condições de cultivo, assim como, a escolha de linhagens de microrganismos apropriadas, podem levar a uma melhor produção enzimática e redução de custos (Carvalho, 2007).

Para avaliar a capacidade de conversão enzimática de cada um dos isolados que foram selecionados e que apresentaram crescimento $\geq 2,0$ em todas as fontes de amido, foram calculados os índices enzimáticos nestas diferentes fontes em função do tempo.

As enzimas são sensíveis às variações da concentração de íons hidrogênio do meio. Existe uma zona de pH para qual a atividade enzimática é máxima. Normalmente, cada enzima possui um pH ótimo porque, como outras proteínas, estas possuem muitos grupos ionizáveis, pertencentes a resíduos de aminoácido da molécula, de maneira que as trocas de pH podem alterar sua conformação, sua capacidade de união com o substrato e a atividade catalítica dos grupos que formam o sítio ativo. De forma similar, os grupos ionizáveis do substrato podem ser afetados pelo pH, já que possuem estados de ionização diferentes, de acordo com o pH, influenciando a formação do complexo enzima-substrato (Thys, 2004).

A velocidade de uma reação enzimática, aumenta com a temperatura até um determinado valor, observando-se, a partir daí, um decréscimo acentuado, decorrente da desativação térmica das proteínas (Fonseca e Teixeira, 2007).

A concentração de substrato afeta diretamente a velocidade das reações enzimáticas. A velocidade de uma reação catalisada por enzima aumenta conforme aumenta a concentração de substrato, até a velocidade máxima ser atingida (Lenninger, 2007).

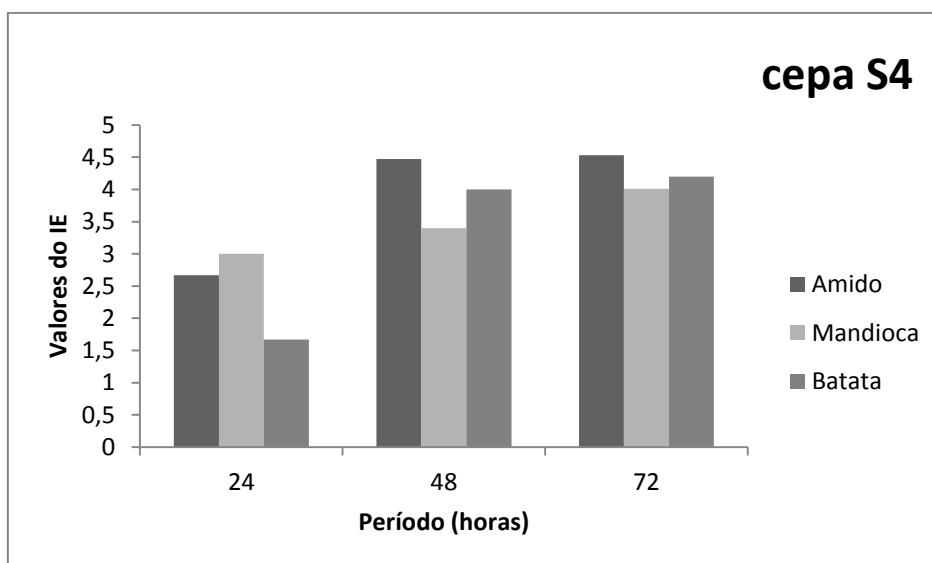


Figura 4: Índice enzimático da Cepa S4 para as 3 fontes de carbono (amido P.A., mandioca e fécula de batata), medidos com 24, 48 e 72 horas.

Segundo a Figura 4, as médias dos índices enzimáticos da cepa S4 aumentaram ao longo do tempo para as três fontes de amido presentes no meio mínimo. Esse isolado apresentou valores mais elevados na presença do amido P.A. como fonte de carbono. Essa constatação pode estar relacionada às condições edáficas, ou seja, as características do solo onde as bactérias foram inicialmente coletadas (Leake e Read, 1990). O solo onde a cepa S4 foi coletada pode apresentar condições físico-químicas e substratos semelhantes ao meio de cultura utilizado, justificando seu ótimo desempenho.

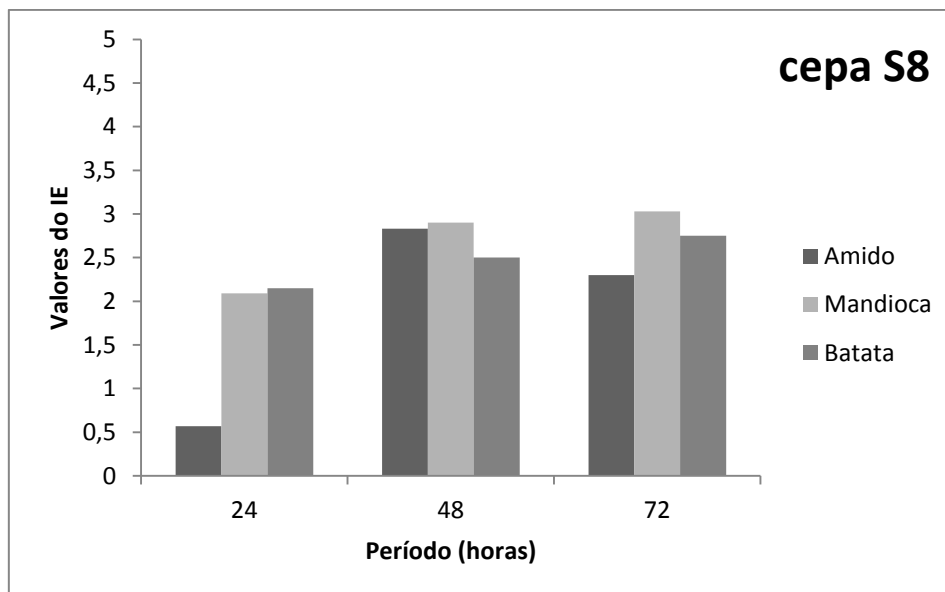


Figura 5: Índices enzimáticos da Cepa S8 para as 3 fontes de carbono (amido P.A., mandioca e fécula de batata), medidos com 24, 48 e 72 horas.

A Figura 5 mostra o desempenho da cepa S8 nos três substratos. Nos meios contendo mandioca e fécula de batata o isolado S8 apresentou valores crescentes ao longo do tempo. Sendo que o melhor desempenho foi demonstrado na presença da mandioca como substrato. Na presença do amido P.A. a cepa exibiu seu maior valor com 48 horas, diminuindo sua atividade na medida feita com 72 horas. Segundo (Kunamneni *et al.*, 2005), a produção enzimática, depois de um determinado tempo de crescimento, pode estar associada à necessidade de uma massa mínima de células para que o microrganismo consiga sintetizar suas enzimas.

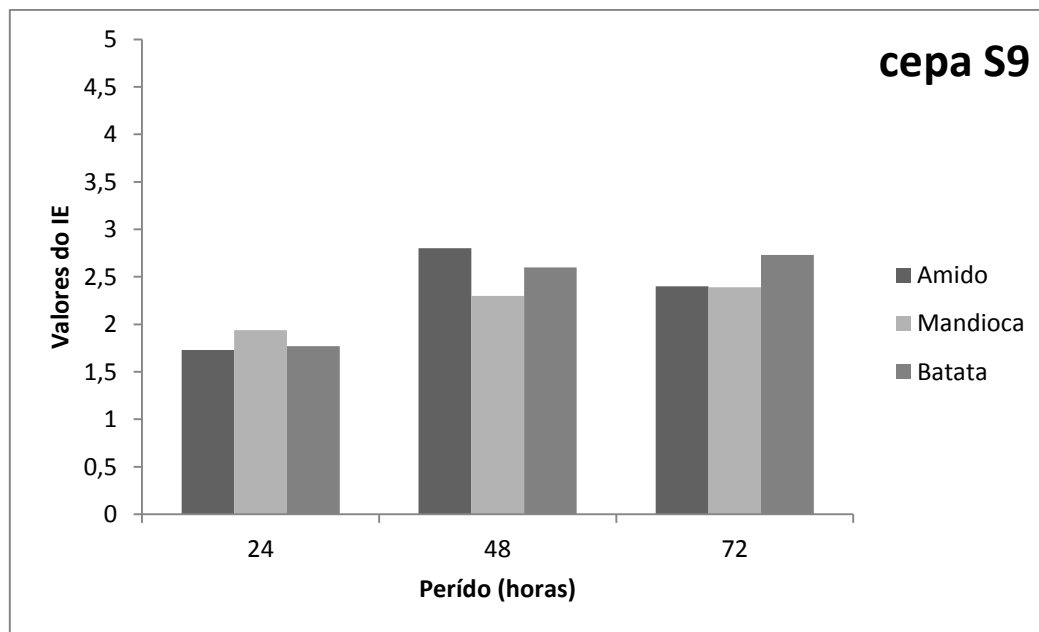


Figura 6: Índices enzimáticos da Cepa S9 para as 3 fontes de carbono (amido P.A., mandioca e fécula de batata), medidos com 24, 48 e 72 horas.

A Figura 6 mostra que a produção enzimática da cepa S9 apresentou valores crescentes para os meios contendo mandioca e fécula de batata como substrato. O que indica que o local de coleta do isolado deve apresentar condições semelhantes ao meio de cultura (Leake e Read,1990). O isolado apresentou seu maior valor (2,8) para o meio contendo amido P.A. como substrato na medida realizada no período de 48 horas. Porém apresentou redução de sua atividade enzimática na medida realizada com 72 horas. Tal decréscimo pode dever-se a redução do substrato disponível, devido à facilidade que a enzima do isolado S9 possui de converter o amido P.A. em fonte de energia.

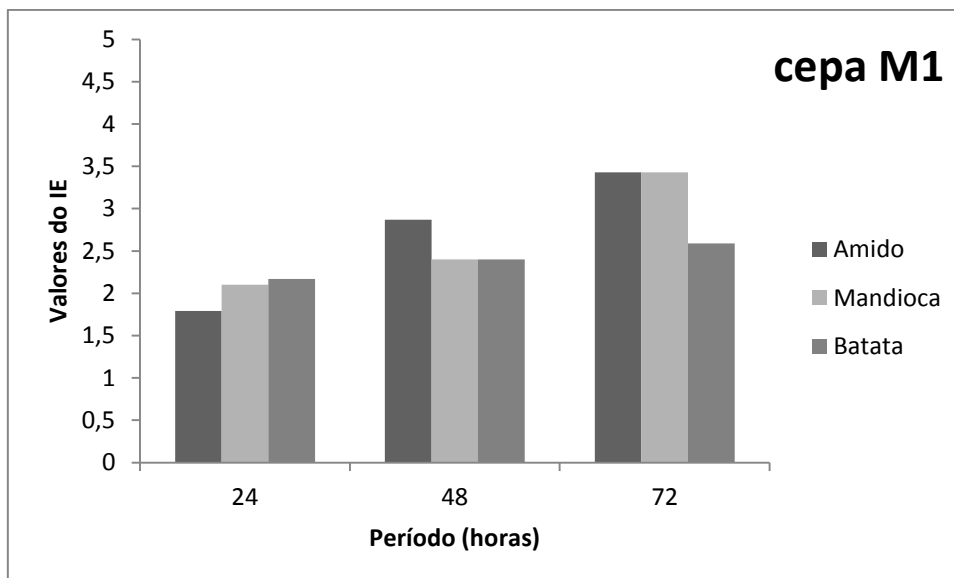


Figura 7: Índices enzimáticos da Cepa M1 para as 3 fontes de carbono (amido P.A., mandioca e fécula de batata), medidos com 24, 48 e 72 horas.

Como mostrado na Figura 7, o isolado M1 apresentou crescente atividade da enzima nos três substratos analisados. Tal verificação demonstra que o isolado adaptou-se muito bem às condições estabelecidas no experimento. Segundo (Thiry e Cingolani, 2002), diversos fatores devem ser considerados durante a produção de enzimas, tais como a composição do meio de cultivo, o substrato para a produção da enzima, a temperatura de incubação, o pH do meio de cultivo e de produção, a aeração e o uso de indutores, dentre outros.

Os valores mais elevados foram obtidos no período de 72 horas, tanto para amido P.A. como para mandioca, mostrando o potencial da cepa M1 para produção de enzima em diferentes fontes de amido.

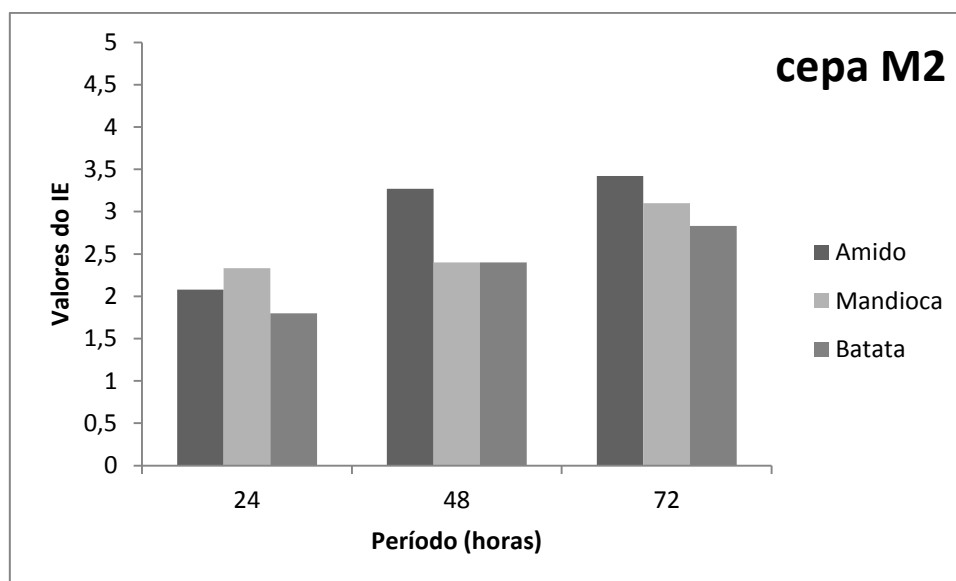


Figura 8: Índices enzimáticos da Cepa M2 para as 3 fontes de carbono (amido P.A., mandioca e fécula de batata), medidos com 24, 48 e 72 horas.

A cepa M2 apresenta valores crescentes de atividade enzimática nos meios com amido P.A. e com fécula de batata (Figura 8). Sendo o melhor desempenho notado com o amido P.A. Na presença de mandioca no meio mínimo, o isolado M2 apresentou valores semelhantes nas medidas realizadas com 24 e 48 horas, exibindo um aumento de atividade na medida realizada com 72 horas. Pode-se atribuir esse resultado a um período de 48 horas para adaptação, para então, aumentar sua atividade, de acordo com (Kunamneni *et al.*, 2005).

A influência da temperatura na produção de amilase tem sido relacionada com o crescimento dos organismos. Uma larga faixa de temperatura (35-80 °C) tem sido descrita para o crescimento ótimo de bactérias e produção de α -amilase (Lin *et al.*, 1998; Burhan *et al.*, 2003).

Os isolados precisam ser identificados e suas condições de cultivo para purificação da enzima, otimizadas. Características como funcionalidade e estabilidade da enzima, aspectos bioquímicos, assim como as melhores condições

de diferentes faixas de pH e temperatura, necessitam ser analisados para realmente determinar sua aplicação biotecnológica (Polizelli *et al.*, 2005).

4. CONCLUSÃO

A realização deste trabalho permitiu a identificação de 17 bactérias que apresentaram boa produção da enzima ciclodextrina glicosiltransferase. Esta enzima tem importante apelo biotecnológico e industrial em função da sua capacidade de converter fontes de amido em ciclodextrina. Esta molécula por sua vez, tem aplicações nos mais diversas áreas industriais, incluindo a farmacêutica, alimentícia, têxtil e cosmética.

Das bactérias selecionadas, pelo menos quatro delas apresentaram valores para o índice enzimático acima de 1.5 – valor que é preconizado na literatura como ponto de corte para a seleção de microrganismos produtores de enzimas extracelulares. Destas, a cepa S4, identificada em amostra de solo de cultivo de banana, apresentou valores para índice enzimático próximos de 4.0 para as três diferentes fontes de amido testadas. Das fontes de amido avaliadas, merecem destaque a mandioca e a batata, por serem matéria-prima de baixo custo, tornando a S4 um microrganismo atrativo para aplicações industriais.

Estudos complementares estão sendo realizados para se caracterizar molecularmente a bactéria S4 e sua imobilização em matrizes poliméricas para otimizar a produção da enzima ciclodextrina glicosiltransferase em biorreatores. Além disto, pretende-se realizar a expressão heteróloga do gene codificante para esta enzima proveniente da bactéria S4 em *Escherichia coli* visando aumentar a produção e a termoestabilidade desta enzima.

5. REFERÊNCIAS

Aguiar, C. L. (2001). Ciclodextrina glicosiltransferase, produção, ação e aplicação. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA)*, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 119-138.

Alves-Prado, H. F.; Hilário, E.; Gomes, E.; Da Silva, R. (2002). Seleção de Microrganismos Produtores de Ciclodextrina Glicosiltransferase (CGTase), Produção e Caracterização da Enzima. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.5, p.189-196.

Bender, H. (1986). Production, Characterization, and application of cyclodextrins. *Advances in Biotechnological Processes*, v.6, p.31-71.

Biwer, A.; Antranikian, G.; Heinzle, E. (2002). Enzymatic production of cyclodextrins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.59, p.609-617.

Britto, M. A. F. O.; Nascimento Jr., C. S.; dos Santos, H. F. (2004). Análise estrutural de ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos clássicos e quânticos. *Quimica Nova*, (27) 882-888.

Burhan, A.; Nisa, U.; Gokhan, C.; Omer, C.; Ashabil, A.; Osman, G. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, v. 38(10), p. 1397–403.

Carvalho, S.(2007). Pectinases produzida pelo agente biológico G088: extração e purificação. 100p. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Cheng, J.; Wu, D.; Chen, S.; Chen, J.; Wu, J. (2011). High-level extracellular production of α -cyclodextrin glycosyltransferase with recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(8), 3797–802.

Drunkler, D. A.; Fett, R.; Luiz, M. T. B. (2001) Utilização da β -ciclodextrina na minimização do “sabor caprino” no iogurte de leite de cabra. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de alimentos*, v. 19, n.1, jan./jun.

Fonseca, M. M.; Teixeira, J. A. (2007). *Reatores biológicos: fundamentos e aplicações*. Lisboa: Lidel, 483 p.

Gawande, B. N.; Singh, R. K.; Chauhan, A. K.; Goel, A.; Patkar, A. Y. (1998). Optimization of cyclomaltodextrin glucanotransferase production from *Bacillus firmus*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, p. 288-291.

Kim, Y. K.; Robyt, J. F. (2000). Enzyme modification of starch granules: formation and retention of cyclomaltodextrins inside starch granules by reaction of cyclomaltodextrin glucanotransferase with solid granules. *Carbohydrate Research*, v. 328, p. 509-515.

Kunamneni, A.; Permaul, K.; Singh, S. (2005) Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 100(2), p. 168–171.

Leake, J.R.; Read, D.L. (1990). Proteinase activity in mycorrhizal fungi. I. The effect of extracellular pH on the production and activity of proteinase by ericoid endophytes from soils of contrasted pH. *New Phytologist*, v. 115, p. 243-250.

Lealem, F.; Gashe, B. A. (1994). Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). *Journal of Applied Bacteriology* v.77.p.348-352.

Lee, Y. S.; Zhou, Y.; Park, D. J.; Chang, J.; Choi, Y. L. (2012). β -cyclodextrin production by the cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus illinoisensis* ZY-08: cloning, purification, and properties. *Microbiology Biotechnology* 29:865–873.

Lenninger, A. L. (2007). *Princípios de bioquímica*. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1232 p.

Lin, J. E.; Chang, D. C. N.; Shen, G. J. (1991). Correlations among several screening methods used for identifying wood-decay fungi that can degrade toxic chemicals. *Biotechnol. Tech.*, v.5, p. 275-280.

Lin, L.L.; Chyau, C.C.; Hsu, W.H. (1998) Production and properties of a raw starch-degrading amylase from the thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. TS-23. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 28(1), p. 61–68.

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. 72, p. 267-275.

Nakamura, N.; Horikoshi, K. (1976). Characterization and some culture conditions of a cyclodextrin-glycosyltransferase-producing alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.*, 40 (4), 753-757.

Pandey, A.; Selvakumar, P.; Soccol, C. R.; Nigam, P. (1999). Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, Bangalore, v. 77, n. 1, p. 149-162.

Park, C.S.; Park, K.H.; Kim, S.H. A rapid screening method for alkaline β cyclodextrin-methyl orange containing solid medium. *Agric. Biol. Chem.* **1989**, 53, 1167–1169.

Polizelli, M.L.; Rizzatti, A.C.; Monti, R.; Terenzi, H.; Jorge, J. Amorim, D. (2005). Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbial. Biotechnol. (Mini Review)*, v. 67, n. 5, p. 577-591.

Qi, Q.; Zimmermann, W. (2005). Cyclodextrin gluconotransferase: from gene to applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 66, 475–485.

Rao, M. B.; Tanksale, A. M.; Ghatge, M. S.; Deshpande, V.V. (1998). Molecular e Biotechnological aspect Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, New York, v. 62, n. 3, p. 579-635.

Rezende, E. F.; Couto, F. A.; Silva, D. M.; Batista, L. R. (2009) Atividade pectinolítica de fungos filamentosos isolados de grãos de café. In: VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Vitória, ES.

Sabioni, J. G.; Park, Y. K. (1992). Production and characterzation of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus lentus*. *Starch/ Stärke*, v. 44, p. 225-229.

Saltão, R.; Veiga, F. (2001). Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37, 1–17.

Salva, T. J. G.; Lima, V. B.; Pagan, A. P. (1997). Screening of alkalophilic bacteria for cyclodextrin glycosyltransferase production. *Revista de Microbiologia*, v. 28, p. 157-164.

Soares, I. A. et al. Identification of the amylolytic potential of mutant strains of the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* (2010). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 30, n. 3, p. 700-705.

Stamford, T. L. M.; Araújo, J. M.; Stamford, N. P. (1998). Enzymatic Activity of microorganisms isolated from yam bean legume (*Pachyrhizus erosus* L. Urban)

(*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 18, p. 382-385.

Terada, Y. M.; Yanase, H.; Takata, T.; Takaha, and Okada S. (1997). Cyclodextrins are not the major cyclic alpha-1,4-glucans produced by the initial action of cyclodextrin glucanotransferase on amylose. *J. Biol. Chem.* 272: 15729–15733.

Thiry, M.; Cingolani, D. (2002). Optimizing scale-up fermentation process.

Trends in Biotechnology, Amsterdam, v. 20, n. 3, p. 103-105.

Thys, R. C. S. (2004). Produção, caracterização, purificação e aplicação de uma protease produzida pelo microrganismo *Microbacterium* sp. kr10. 102 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

Veen, B. A. van der; Uitedehaag, J.; Dijkstra, B. W.; Dijkhuizen, L. (2000) Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochim Biophys Acta* 1543:336–360.

Vielle, C.; Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.65, p.30-31.

Stinghen, A. E. M.; Albini, C. A.; Souza, A. P. H. M. (2002). Coloração de Gram: Como fazer, interpretar e padronizar. Curitiba: Microscience. p. 70.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização deste projeto foi possível identificar 17 bactérias que apresentaram boa produção da enzima ciclodextrina glicosiltransferase com valores para o índice enzimático acima do que é preconizado na literatura para a bioprospecção destes microrganismos. Estudos complementares estão em andamento para que seja possível a identificação precisa da espécie de bactéria encontrada. Para isto, o DNA de todas as 17 bactérias foi extraído, a região 16S foi amplificada e o sequenciamento está em processo de finalização. Esta etapa é importante para que se conheça as espécies selecionadas. Dois outros projetos estão relacionados a este que visam aumentar a produção da enzima pela expressão heteróloga do gene codificante para a enzima e também pela imobilização desta bactéria em matrizes poliméricas visando a sua produção em biorreatores. A bioprospecção em solos brasileiros demonstrou ser uma alternativa importante para a seleção de microrganismos que produzam moléculas de interesse biotecnológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Naby, M. A.; El-Refai, H. A.; Abdel-Fattah, A. F. (2011). Biosynthesis of cyclodextrin glucosyltransferase by the free and immobilized cells of *Bacillus cereus* NRC7 in batch and continuous cultures. *Journal of Applied Microbiology*, v.111, p.1129-1137.

Aguiar, C. L. (2001). Ciclodextrina glicosiltransferase, produção, ação e aplicação. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA)*, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 119-138.

Alves-Prado, H. F.; Hilário, E.; Gomes, E.; Da Silva, R. (2002). Seleção de Microrganismos Produtores de Ciclodextrina Glicosiltransferase (CGTase), Produção e Caracterização da Enzima. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.5, p.189-196.

Alves-Prado, H. F.; Hilário, E.; Gomes, E.; Da Silva, R. (2007). Purification and Characterization of a Cyclomaltodextrin Glucanotransferase From *Paenibacillus campinasensis* Strain H69-3. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.137, p.41.

ANDRADE, P. P. (2006). Biodiversidade e Conhecimentos Tradicionais. *Revista Prismas: Dir., Pol. Pub. e Mundial*, Brasília, v. 3, n.1, p.03-32, jan./jun.

Artursson, V.; Jansson J. K. (2003). Use of Bromodeoxyuridine Immunocapture To Identify Active Bacteria Associated with Arbuscular Mycorrhizal Hyphae. *Applied and Environmental Microbiology*, 6208-6215.

Bender, H. (1986). Production, Characterization, and application of cyclodextrins. *Advances in Biotechnological Processes*, v.6, p.31-71.

Biwer, A.; Antranikian, G.; Heinzle, E. (2002). Enzymatic production of cyclodextrins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.59, p.609-617.

Bon, E. P. S.; Ferrara, M. A.; Corvo, M. L. (2008). *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência.

Britto, M. A. F. O.; Nascimento Jr., C. S.; dos Santos, H. F. (2004). Análise estrutural de ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos clássicos e quânticos. *Quimica Nova*, (27) 882-888.

Burhan, A.; Nisa, U.; Gokhan, C.; Omer, C.; Ashabil, A.; Osman, G. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, v. 38(10), p. 1397–403.

Carneiro, A. A.; Alves-Prado, H. F.; Gomes, E.; Silva, R. (2006). Escurecimento enzimático em alimentos: Ciclodextrinas como agente antiescurecimento. *Alimentos e Nutrição*. 17(3):345-52.

Carvalho, S.(2007). *Pectinases produzida pelo agente biológico G088: extração e purificação*. 100p. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Charoenlap, N.; Dharmsthiti, S.; Sirisansaneeyakul, S.; Lertsiri, S. (2004). Optimization of cyclodextrin production from sago starch. *Bioresour Technology*, v. 92, p. 49-54.

Cheng, J.; Wu, D.; Chen, S.; Chen, J.; Wu, J. (2011). High-level extracellular production of α -cyclodextrin glycosyltransferase with recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(8), 3797–802.

Drunkler, D. A.; Fett, R.; Luiz, M. T. B. (2001) Utilização da β -ciclodextrina na minimização do “sabor caprino” no iogurte de leite de cabra. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de alimentos*, v. 19, n.1, jan./jun.

Fonseca, M. M.; Teixeira, J. A. (2007). *Reatores biológicos: fundamentos e aplicações*. Lisboa: Lidel, 483 p.

Gawande, B. N.; Singh, R. K.; Chauhan, A. K.; Goel, A.; Patkar, A. Y. (1998). Optimization of cyclomalto-dextrin glucanotransferase production from *Bacillus firmus*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, p. 288-291.

Kamaruddin, K.; Illias, R. M.; Aziz, S. A.; Said, M.; Hassan, O. (2005). Effects of buffer properties on cyclodextrin glucanotransferase reactions and cyclodextrin production from raw sago (*Cycas revoluta*) starch. *Biotechnol. Applied Biochem.*, 41: 117-125.

Kim, Y. K.; Robyt, J. F. (2000). Enzyme modification of starch granules: formation and retention of cyclomaltodextrins inside starch granules by reaction of cyclomaltodextrin glucanotransferase with solid granules. *Carbohydrate Research*, v. 328, p. 509-515.

Kunamneni, A.; Permaul, K.; Singh, S. (2005) Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 100(2), p. 168–171.

Leake, J.R.; Read, D.L. (1990). Proteinase activity in mycorrhizal fungi. I. The effect of extracellular pH on the production and activity of proteinase by ericoid endophytes from soils of contrasted pH. *New Phytologist*, v. 115, p. 243-250.

Lealem, F.; Gashe, B. A. (1994). Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). *Journal of Applied Bacteriology* v.77.p.348-352.

Lee, Y. S.; Zhou, Y.; Park, D. J.; Chang, J.; Choi, Y. L. (2012). β -cyclodextrin production by the cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus illinoisensis* ZY-08: cloning, purification, and properties. *Microbiology Biotechnology* 29:865–873.

Leemhuis, H.; Kelly, R. M.; Dijkhuizen, L. (2009). Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications. *Appl Microbiology Biotechnology* 85:823–835.

Lenninger, A. L. (2007). Princípios de bioquímica. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1232 p.

Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schimedell, W. (2001). Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos, v. 3, Ed. Edgard Blücher, São Paulo.

Lin, L.L.; Chyau, C.C.; Hsu, W.H. (1998) Production and properties of a raw starch-degrading amylase from the thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. TS-23. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 28(1), p. 61–68.

Loftsson, T.; Brewster, M. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.*, New York, v. 85, n.10, p. 1017-1025.

Matioli, G.; Moriwaki, C.; Mazzoni, R. B.; Zanin, G. M.; Moraes, F. F. (2002). Estudos de parâmetros que influenciam na produção da enzima CGTase de *Bacillus firmus*, cepa nº 37. *Acta Scientiarum* 22(2):311-316.

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. 72, p. 267-275.

Mori, S.; Goto, M.; Mase, T.; Matsuura, A.; Oya, T.; Kitahata, S. (1995). Reaction conditions for the production of cyclodextrin by cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp nº 9605. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, v.59, p.1012–1015.

Moriwaki, C.; Mazzer, C.; Pazzeto, R.; Matioli, G. (2009). Produção, purificação e aumento da performance de ciclodextrina glicosiltransferase para produção de ciclodextrinas. *Química Nova*, v. 32, p. 2360-2366.

Muyzer, G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, Oxford, v.2, p. 317-322.

Nakamura, N.; Horikoshi, K. (1976). Characterization and some culture conditions of a cyclodextrin-glycosyltransferase-producing alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Biol. Chem.*, 40 (4), 753-757.

Pandey, A.; Selvakumar, P.; Soccol, C. R.; Nigam, P. (1999). Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, Bangalore, v. 77, n. 1, p. 149-162.

Pereira, A. M.; Lima, D. A. L. L. (2008). Acordos de bioprospecção e conhecimentos tradicionais: As lições de casos nacionais e internacionais. In: IV ENCONTRO NACIONAL DA ANPPAS, Brasília.

Piza, A. C. M. T. (2009). Isolamento, identificação fenogenotípica e potencial bioativo de microrganismos endofíticos intrinsecamente associados à *Miconia albicans* no Cerrado de São Carlos – SP. 2011. 53 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de São Carlos.

Polizelli, M.L.; Rizzatti, A.C.; Monti, R.; Terenzi, H.; Jorge, J. Amorim, D. (2005). Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbial. Biotechnol. (Mini Review)*, v. 67, n. 5, p. 577-591.

Qi, Q.; Zimmermann, W. (2005). Cyclodextrin gluconotransferase: from gene to applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 66, 475–485.

Rao, M. B.; Tanksale, A. M.; Ghatge, M. S.; Deshpande, V.V. (1998). Molecular e Biotechnological aspect Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, New York, v. 62, n. 3, p. 579-635.

Rezende, E. F.; Couto, F. A.; Silva, D. M.; Batista, L. R. (2009) Atividade pectinolítica de fungos filamentosos isolados de grãos de café. In: VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Vitória, ES.

Sá-Barreto, L. C. L.; Cunha-Filho, M. S. S (2008). Ciclodextrina: Importante Excipiente Farmacêutico Funcional. *Lat Am J Pharm.* 27(4):629-36.

Sabioni, J. G.; Park, Y. K. (1992). Production and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus lentus*. *Starch/ Stärke*, v. 44, p. 225-229.

Saccaro Júnior, N. L. (2011). A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada: Brasília.

Saltão, R.; Veiga, F. (2001). Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37, 1–17.

Salva, T. J. G.; Lima, V. B.; Pagan, A. P. Screening of alkalophilic bacteria for cyclodextrin glycosyltransferase production. (1997). *Revista de Microbiologia*, v. 28, p. 157-164.

Sant'ana, P. J. P. (2002). *Bioprospecção no Brasil, contribuições para uma gestão ética*. Brasília: Editora Paralelo, p.15.

Soares, I. A. et al. Identification of the amyolytic potential of mutant strains of the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* (2010). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 30, n. 3, p. 700-705.

Sousa, V. Y. K. (2012). *Bioprospecção de antimicrobianos entre bactérias ambientais e plantas medicinais da Amazônia*. 2012. 69 p. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária.

Stamford, T. L. M.; Araújo, J. M.; Stamford, N. P. (1998). Enzymatic Activity of microorganisms isolated from yam bean legume (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 18, p. 382-385.

Terada, Y. M.; Yanase, H.; Takata, T.; Takaha, and Okada S. (1997). Cyclodextrins are not the major cyclic alpha-1,4-glucans produced by the initial action of cyclodextrin glucanotransferase on amylose. *J. Biol. Chem.* 272: 15729–15733.

Tesfai, B. T.; Wu, D.; Chen S.; Chen, J.; Wu, J. (2012). Strategies for Enhancing Extracellular Secretion of Recombinant Cyclodextrin Glucanotransferase in *E. coli*. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 167, p. 897-908.

Thiry, M.; Cingolani, D. (2002). Optimizing scale-up fermentation process.

Trends in Biotechnology, Amsterdam, v. 20, n. 3, p. 103-105.

Thys, R. C. S. (2004). Produção, caracterização, purificação e aplicação de uma protease produzida pelo microrganismo *Microbacterium* sp. kr10. 102 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

Veen, B. A. van der; Uitedehaag, J.; Dijkstra, B. W.; Dijkhuizen, L. (2000) Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochim Biophys Acta* 1543:336–360.

Venturini, C. G.; Nicolini, J.; Machado, C.; Machado, V. G. (2008). Propriedades e Aplicações recentes das ciclodextrinas. *Quimica Nova*, v. 31, p. 360-368.

Vielle, C.; Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.65, p.30-31.

Stinghen, A. E. M.; Albini, C. A.; Souza, A. P. H. M. (2002). Coloração de Gram: Como fazer, interpretar e padronizar. Curitiba: Microscience. p. 70.