CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE, PRODUÇÃO, AÇÃO E APLICAÇÃO

CLAUDIO LIMA AGUIAR*

A presente revisão de literatura sobre ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) discute sua produção, ação e aplicação. Concluiu-se que os produtos obtidos pela hidrólise do amido com CGTase apresentam grande utilidade e funcionalidade, muito embora sejam necessários estudos complementares para viabilizar sua produção em larga escala.

1 CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE

O uso de enzimas em processos industriais tem sido amplamente discutido e cerca de 2500 reações diferentes, catalisadas por enzimas estão listadas no International Union Handbook of Enzyme Nomenclature. Estima-se que 80% das enzimas sejam produzidas por fermentação e muitas destas adicionadas em detergentes ou utilizadas no processamento de amido e de produtos lácteos. O processamento de amido constitui-se numa das muitas aplicações da tecnologia enzimática. Nesta revisão discutiu-se a ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, E.C. 2.4.1.19), responsável pela formação de moléculas cíclicas (ciclodextrinas), a partir da hidrólise do amido entre outras reações de transglicosilação.

1.1 PRODUÇÃO

O amido, polissacarídeo de fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$ e massa molecular entre 60 e 1000 KDa, é encontrado freqüentemente nos vegetais (arroz, milho, trigo, batata, mandioca). Formado pela condensação de moléculas de α -glicose pode ser processado por enzimas denominadas amilases, resultando em diferentes produtos como oligossacarídeos e açúcares livres. Usa-se amilase como termo genérico, muito embora existam diferentes frações

* MSc., Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP.
(e-mail: claguiar@yahoo.com.br / claguiar@fea.unicamp.br).

como a α -amilase (amilase dextrinogênica) e a β -amilase (amilase sacarogênica) (KARLSON, 1970), entre outras como a ciclodextrina glicosiltransferase.

A ciclodextrina glicosiltransferase tem despertado interesse industrial devido à sua capacidade de produzir moléculas cíclicas, denominadas ciclodextrinas (CD), dextrinas de Schardinger ou ainda, cicloamiloses. Estas são moléculas cíclicas que contêm de seis a doze unidades de glicose. As ciclodextrinas foram descobertas em 1891, quando Villiers reportou seu aparecimento em batatas. Em 1904, Schardinger as caracterizou como oligossacarídeos cíclicos e identificou o *Bacillus macerans* como sendo a bactéria que produzia enzima capaz de modificar o amido em CD, a ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). Desta forma, as ciclodextrinas começaram a ser chamadas de dextrinas de Schardinger. Em 1938, Freudenberg confirmou sua estrutura cíclica e a habilidade de formar complexos de inclusão (PSZCZOLA, 1988). Ciclodextrina glicosiltransferase (EC 2.4.1.19, CGTase, α -1,4-D-glicano-4- α -D-(1,4- α -D-glicano)-transferase) é detectada, exclusivamente, em bactérias e predominantemente em *Bacillus* spp, tendo grande interesse para a indústria devido à produção de CD (CHANG et al., 1998; LARSEN et al., 1998; FOGARTY & KELLY, 1990; THATAI et al., 1999; ABDEL-NABY et al., 2000).

Algumas bactérias produzem extracelularmente CGTase, tais como: *Bacillus* 38-2, *Bacillus* sp. 1011, *Bacillus circulans*, *Bacillus macerans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus ohbensis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Klebsiella pneumoniae* M5al, *Micrococcus* sp. (FOGARTY & KELLY, 1990), *Bacillus lentus* alcalofílico (SABIONI, 1994) e *Bacillus firmus* (GAWANDE et al., 1999), com diferentes características dependendo do microrganismo produtor (Tabela 1).

Diferentes fontes de carbono são utilizadas para produção de CGTase de fonte bacteriana. POCSI et al. (1998) verificaram alta produção desta enzima na presença de amido solúvel e maltoheptose, muito embora a suplementação do meio com maltoligossacarídeos cíclicos tenha dobrado a produção enzimática quando comparada àquela obtida com sacarídeos lineares.

A produção de CGTase por *Klebsiella pneumoniae* AS-22 foi otimizada após análise de diferentes fatores como, fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e microelementos, bem como pH e temperatura iniciais. Produção enzimática de 21,4 UI.mL⁻¹, após 28 horas de incubação, foi alcançada em meio constituído de 49,3 g/L de dextrina, 20,6 g/L de peptona, 18,3 g/L de extrato de levedura, 6,7 g/L de dihidrogeno-O-fosfato de amônio e 0,5 g/L de sulfato de magnésio (GAWANDE et al., 1999). Um microrganismo capaz de produzir altos níveis de CGTase extracelular foi isolado de "kimchi". GAWANDE et al. (1998) obtiveram atividade máxima de CGTase

igual a 7,05 UI.mL⁻¹, usando *Bacillus firmus* em meio com amido de milho, extrato de levedura e pH inicial de 9,8.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DE ALGUMAS CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE

Microrganismo	CGTase (EC 2.4.1.19)			Referências
	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Massa molecular (KDa)	
<i>Bacillus lentus</i> <i>Bacillus firmus</i>	10,3 5,5-8,5 7-11 7	- 65 10 60	- 78 (SDS-PAGE) 82 (Gel filtração)	GAWANDE et al., 1999
<i>Archae B1001</i>	5-5,5	90-110	83	TACHIBANA et al., 1999
<i>Bacillus sp.</i>	6,6	65	68	THATAI et al., 1999
<i>Paenibacillus sp. F8</i>	7,5-8	50-60	72	LARSEN et al., 1998
<i>Bacillus sp.</i>	-	-	77-78	MATIOLI et al., 1998
<i>Thermoanaerobacter sp.</i>	6	90-95	-	NORMAN & JORGENSEN, 1992; PEDERSEN et al., 1995
<i>Bacillus sp. S-6</i>	7 6-10	40 >45	- -	JUN et al., 1998
Bactéria n. 76	5,4	50	-	SALVA et al., 1997
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ET1	6	80	66,8	CHUNG et al., 1998
<i>Bacillus circulans</i> DF9R	4,5-7,5	55	78	MARECHAL et al., 1996
<i>Brevibacterium sp. 9605</i>	7	50	-	MORI et al., 1995
<i>Bacillus macerans</i>	5-6	-	79	FOGARTY & KELLY, 1990
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	6	-	68	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> M5al	6-7,2	-	68	
<i>Bacillus 38-2</i>	4,6-9,5	-	88	
<i>Bacillus megaterium</i>	5-5,7	-	-	
<i>Micrococcus sp.</i>	5-8	-	88	
<i>Bacillus sp.</i>	5,5	-	-	KOMETANI et al., 1994a
<i>Bacillus firmus</i>	7,5-8,5	65	75	YIM et al., 1997

Bacilos alcalofílicos que produzem CGTase foram isolados de solo brasileiro, os quais metabolizavam γ e β -ciclodextrinas na razão de 0,156 e, menor quantidade de α -ciclodextrina, usando 10% de maltodextrina, a 50 °C e pH 8,0 por 22 horas de incubação (MATIOLI et al., 1998).

JUN et al. (1998) obtiveram CGTase de *Bacillus sp. S-6* em meio (pH 8,0) contendo, amido solúvel (0,5%), extrato de levedura (1%), carbonato de

sódio (1%), fosfato dibásico de potássio (0,1%) e sulfato de magnésio (0,01%) a 37 °C, após 40 horas de incubação.

ALLISON & MACFARLANE (1990) reportam que, a perda na produção enzimática pelo uso de algumas fontes complexas de nitrogênio orgânico é percebida e que a inibição da biossíntese enzimática estaria relacionada com certos aminoácidos. Por outro lado, o uso de nitrogênio inorgânico ((NH₄)₂SO₄, NaNO₃) mostraram baixos níveis de CGTase (56,9-70,2 UI.mL⁻¹).

ABDEL-NABY et al. (2000) verificaram que a adição de farinha de aveia (5-10 g.L⁻¹, p/v) não apresentou efeito na produção enzimática. De forma oposta, JAMUNA et al. (1993) afirmam obter CGTase em função de traços de aminoácidos essenciais e vitaminas presentes na aveia. Na Tabela 2 são mostradas algumas fontes de nitrogênio e as atividades de CGTase encontradas.

TABELA 2 - PRODUÇÃO DE CGTase EM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO

Fonte de nitrogênio	CGTase (UI.mL ⁻¹)	Referências
^a Caseína	96,09	ABDEL-NABY et al., 2000
^a Peptona	99,80	
^a Extrato de levedura	90,26	
^a Soja	89,40	
^a Extrato de carne	78,00	
^a Soro de queijo	87,27	
^a NaNO ₃	70,38	
^a (NH ₄) ₂ SO ₄	56,90	
^b Extrato de soja desengordurada	^c 43,00	SABIONI & PARK, 1992
^b Extrato de carne	^c 67,00	
^b Uréia	^c 10,00	
^b Peptona	^c 30,00	

^a Concentração final de nitrogênio foi 1,0 g N.L⁻¹, utilizando *Bacillus amyloliquefaciens*.

^b Concentração final de nitrogênio de 1,0%, utilizando *Bacillus lentus*.

^c Atividade de liquefação do amido.

UI.mL⁻¹ = quantidade de enzima que forma 1 µmol de açúcares redutores (como glicose) por minuto a 60 °C (ABDEL-NABY et al., 2000).

É possível, pelas condições de cultivo, aumentar a quantidade de enzimas como CGTase produzida por *Bacillus* sp. isolada de solo, cuja atividade de 7,5 UI.mL⁻¹ após 24 horas de incubação passou para 22 UI.mL⁻¹ com a otimização das condições de cultura. Observou-se que, macronutrientes como Ca⁺² apresentam pouco efeito sobre a atividade enzimática, enquanto que uréia numa concentração de 10 mM aumentou a atividade

em 200% (THATAI et al., 1999). Por outro lado, foi percebido que CaCl_2 ajuda a estabilizar a enzima quanto ao pH (SALVA et al., 1997).

A adição de CoCl_2 , ZnSO_4 e MgCl_2 (0,1%, p/v) ao meio de cultura mostrou cerca de 20, 27 e 5% de perda na atividade de CGTase, respectivamente. Por outro lado, adição de CaCl_2 (0,15%, p/v) evidenciou 9% de aumento da produção enzimática (119 UI.mL^{-1}), embora no nível de 0,4% (p/v) tenha ocorrido perda de 11,8% na atividade (ABDEL-NABY et al., 2000). Para YIM et al. (1997) a presença de CaCl_2 (1 mM) promoveu aumento na termoestabilidade (55 para 70°C) da CGTase de *Bacillus firmus*. A presença de HgCl_2 , CuSO_4 , CoCl_2 ou ZnSO_4 inibiu a enzima quando o meio continha mais de 1 mM destes compostos, sendo que 5 mM de FeSO_4 também inibiu sua atividade. Outras substâncias (EDTA, p-hidroximercuribenzoato, bissulfato de sódio, L-cisteína, azida sódica, 2-mercaptoetanol, N-bromosuccinimida, arsenato de sódio) não promoveram inibição enzimática, nas concentrações de 1 e 5 mM. SABIONI & PARK (1992) notaram forte inibição da atividade enzimática por íons de Co^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} e Fe^{+2} (5 mM). PCMB (p-cloromercuribenzoato) não afetou a atividade, indicando que a enzima não apresenta grupo sulfidríla ($-\text{SH}$) no seu sítio ativo.

A busca por microrganismos tolerantes às condições extremas tem sido uma das frentes de pesquisa sobre a CGTase, visando maior facilidade de aplicação industrial.

1.2 AÇÃO

CGTase é uma enzima da família das amilases (UITDEHAAG et al., 1999) que catalisa duas reações reversíveis mostradas na Figura 1.

FIGURA 1 – REAÇÕES CATALISADAS POR CGTase BACTERIANA

Onde: Gn, Gm...cadeias de α -1,4-D-glicopiranosil com n e o unidades de D-glicopiranosil.
x...parte da cadeia de α -1,4-D-glicopiranosil

Fonte: FOGARTY & KELLY, 1990.

A CGTase catalisa transglicosilação intramolecular (ciclização) e intermolecular (ligação, desproporcionamento), bem como apresenta atividade hidrolítica sobre amido e ciclodextrinas. Na ciclização, a enzima converte amido e α -1,4-glicanos em ciclodextrinas, as quais são amplamente utilizadas em alimentos, fármacos e outros produtos químicos (TONKOVA, 1998). A reação de transglicosilação da CGTase é operada pelo mecanismo "Ping-Pong", fato verificado por NAKAMURA et al. (1994a).

A seqüência de aminoácidos que estão associados à atividade enzimática da CGTase tem sido estudada. KURIKI et al. (1995) pesquisaram, por exemplo, a seqüência de aminoácidos de quatro regiões, entre α -amilase, CGTase, pululanase, iso-amilase, neo-pululanase, α -amilase-pululanase, α -glicosidase, ciclodextrinase, oligo-1,6-glicosidase, dextrano-glicosidase, amilomaltase e enzima desramificadora do glicogênio. Muitas destas enzimas demonstraram extensão relativa às funções de hidrólise e transglicosilação e, especificidade para ligações glicosídicas dos tipos α -1,4 ou α -1,6.

As atividades de ciclização e amilolítica da CGTase de *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* foram seriamente diminuídas após tratamento com reagentes químicos que modificaram a composição de aminoácidos essenciais à atividade catalítica da enzima por estarem ligados aos sítios ativos. Os tratamentos com reagente de Woodward (WRK), N-bromosuccimida (NBS) e dietilpirocarbonato (DEPC) modificaram os resíduos de ácidos aspártico e glutâmico, triptofano e histidina, respectivamente. Triptofano foi associado à ligação enzima-substrato, que influencia a atividade catalítica. Histidina influenciou, da mesma forma, a ligação ao substrato, mas a modificação da histidina apresentou efeito negativo sobre o pH ótimo e sua estabilidade (SHIN et al., 1999). O pH ótimo da CGTase de *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 é determinado pelo aminoácido Glu258.

As enzimas amilolíticas, amilases e CGTase estão relacionadas, funcional e estruturalmente, com CGTase contendo dois grupos (D e E) comparáveis aos três grupos (A, B e C) das amilases. O resíduo de aminoácido 196 (numeração da CGTase de *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1) ocupa posição dominante no sítio-ativo da enzima. Todas as amilases estudadas contém pequeno resíduo nesta posição (Gli, Leu, Ser, Thr ou Val), em contraste às CGTases que apresentam resíduo aromático (Tyr ou Phe) nesta posição. A proteína mutante F196G Delta DE mostrou-se similar à proteína de amilase em termos da identidade do resíduo 196, além do que, o mutante evidenciou redução da temperatura ótima. Comparada à CGTase parental, as atividades de ciclização, ligação e desproporcionamento foram drasticamente reduzidas no mutante, mas sua atividade sacarificante dobrou, alcançando níveis mais elevados que aqueles reportados para a CGTase parental. Sob condições industriais,

CGTase converte amido em 35% de CD e 11% de oligossacarídeos (glicose, maltose e maltotriose), enquanto o mutante F196G Delta DE converteu amido em 21% de CD e 18% de oligossacarídeos lineares (WIND et al., 1998).

CHANG et al. (1998) estudaram a estrutura molecular da CGTase a partir de diversos mutantes de *Bacillus macerans*. A CGTase consiste em cinco grupos globulares de A à E. Para entender melhor o papel do grupo E na catálise foram efetuados diferentes experimentos. A remoção do grupo E resultou na inativação da enzima. A adição de seis aminoácidos entre os grupos D e E causou diminuição na atividade e termoestabilidade. A substituição de E por grupo similar de glicoamilase I de *Aspergillus awamori* causou drástica queda na atividade, indicando a necessidade do correto alinhamento da cadeia. Substituindo-se o resíduo 634 de tirosina (Tyr 634) por fenilalanina ocorreu pouco efeito na atividade ou termoestabilidade, enquanto que a substituição por glicina resultou no aumento de 25% da ciclização específica e da atividade amilolítica comparada à atividade da enzima original. Logo, o grupo E é importante para a estabilidade e integralidade da CGTase.

KUBOTA et al. (1994) determinaram a estrutura tridimensional dos cristais de CGTase e notaram a presença de quatro grupos globulares. Estruturas dos grupos N-terminal, A e B, foram similares àqueles da α -amilase. Por mutagênese e alinhamento seqüencial confirmaram que a composição do sítio-ativo envolvia os grupamentos Asp225, Asp324 e Glu253 e, que dois resíduos hidrofóbicos de fenilalanina, Phe179 e Phe255, compunham o centro catalítico como sítio receptor para a transglicosilação.

Para analisar o papel dos grupos C e D na ciclização da CGTase de *Bacillus stearothermophilus* NO2, dois plasmídios (pkB1 Delta C300 e pkB1 Delta D96) foram construídos. A CGTase mutada, pkB1 Delta C300, produziu menor quantidade de α , β e γ -CD que a CGTase parental. Entretanto, pkB1 Delta D96 mostrou produção de CD similar a da CGTase parental. A produção de α , β e γ -CD não foi afetada pelas deleções, quando comparada àquela da CGTase parental. A temperatura ótima da CGTase-pkB1 Delta C300 diminuiu de 60 para 55 °C e, o pH ótimo da CGTase-pkB1 Delta D96 aumentou de 6,0 para 7,0. A termoestabilidade para ambas mutantes não se alternaram. Estes resultados sugerem que não há nenhuma ligação entre os grupos C e D e a atividade de ciclização da enzima, entretanto são importantes para propriedades enzimáticas como, produtividade e pH ótimo ou partição da estrutura terciária da CGTase (JEON et al., 1998).

Três resíduos de histidina (His140, His233 e His327) de CGTase de *Bacillus* sp. 1011 foram associados à atividade enzimática. A atividade de ciclização foi mantida mas ocorreu alteração na razão de produção de α , β , γ -CD, quando estes resíduos foram substituídos por asparagina

(NAKAMURA et al., 1993). Os resíduos Phe183 e Phe258 de CGTase estão envolvidos no grupo receptor e desempenham importante papel na ciclização de cadeias de amilose, enquanto o resíduo Phe283 está relacionado com a estabilização da enzima em seu estado de transição (NAKAMURA et al., 1994b).

STROKOPYTOV et al. (1995) observaram que o resíduo Glu257 da CGTase de *Bacillus circulans* 251 age como doador de prótons e Asp229 funciona como base geral ou nucleófilo, enquanto Asp328 está envolvido na ligação com substrato e pode ser importante para elevar o pKa do Glu257.

JEANG & LIN (1994) estudaram a inativação de CGTase de *Bacillus macerans* e observaram que a dependência de seis resíduos de histidina foi marcante. Análise espectral da CGTase indicou que α -CD previniu a modificação de quatro destes resíduos e que quatro resíduos de histidina, ligados ao sítio ativo, estão envolvidos na ação catalítica da enzima. Por outro lado, MOSI et al. (1998) investigaram os mecanismos de inibição de CGTase através de mutantes de *Bacillus circulans*. O estudo envolveu a inibição por acarbose. Este polissacarídeo, inibidor de α -glicosidases, reduz a absorção de açúcares no trato gastrointestinal (STROKOPYTOV et al., 1995). Entretanto, o cálcio apresentou efeito estabilizante sobre a atividade de CGTase de *Paenibacillus* sp. F8 (LARSEN et al., 1998), como também observado por ABDEL-NABY et al. (2000).

Diferentes são as propostas de ação catalítica da CGTase, que variam de acordo com o microrganismo produtor.

1.3 APLICAÇÃO

Ciclodextrina glicosiltransferase pode ser aplicada na hidrólise de amido, formação de CD e diversos compostos a partir da transglicosilação, para diferentes fins, tanto na indústria de alimentos quanto farmacêutica.

Alfa-amilase e CGTase são enzimas importantes na sacarificação de amido e, tem sido observado que a combinação de ambas promove acréscimo na produção de açúcares livres (DEL RIO et al., 1997). CGTase pode ser aplicada na hidrólise de amido para obtenção de sacarídios fosforilados, que são capazes de reagir com minerais como cálcio, magnésio e ferro para formar complexos, que previnem a insolubilização destes minerais na alimentação animal (KAMASAKA et al., 1999).

CGTase pode ser aplicada na transglicosilação de esteviosídeos, utilizando-se maltodextrina como co-substrato. KIM & YOOK (1997) consideraram os efeitos da concentração de CGTase (0,05 e 0,4%) sobre a porcentagem de transglicosilação. A formação de glicosil-esteviosídeo e rebandiosídeo A foi

significativamente afetada pela temperatura, proporção maltodextrina: esteviosídeo, pH, equivalente de dextrose (DE) de maltodextrina e concentração do esteviosídeo. As condições ótimas encontradas para o processo foram: temperatura de 80 °C, razão maltodextrina: esteviosídeo igual a 1, pH 6,0 e DE de 15, quando se obteve glicosil-esteviosídeo, com poder adoçante superior ao esteviosídeo.

Glicosil-hesperidina, estabilizante natural de pigmentos para alimentos, pode ser obtido enzimaticamente pela reação convencional de transglicosilação da hesperidina (solução 8,2 mM) com amido solúvel (5%) e CGTase (2 U/mL). Verificou-se, no entanto, que β -CD e pH alcalino foram efetivos para a solubilização da hesperidina e a quantidade de glicosil-hesperidina formada pela CGTase com 5% de β -CD a pH 10 foi cerca de 50 vezes maior que a formada com amido solúvel em pH 5,0 (KOMETANI et al., 1995). CGTase de *Bacillus* sp. alcalofílico produziu monoglicosídeo de hesperidina e uma série de seus oligoglicosídeos pela transglicosilação da hesperidina e amido solúvel. A formação de glicosídeo foi maior em pH alcalino, por ocorrer maior solubilização da hesperidina. O glicosídeo foi identificado como sendo 4- α -D-glicopiranosil-hesperidina, com efeito estabilizante de pigmento amarelo de frutas da *Gardenia jasminoides* contra radiações ultra-violeta (KOMETANI et al., 1994a), muito embora vários pigmentos naturais sejam estabilizados contra radiação ultravioleta com glicosil-hesperidina (KOMETANI et al., 1995; KOMETANI et al., 1994b).

Efeitos de álcoois alifáticos como etanol, n-butanol e n-decanol sobre a formação de ciclodextrina por CGTase foram estudados, sendo que a adição de n-butanol causou aumento na produção de α -CD (SHIRAIISHI et al., 1989).

LIMA et al. (1998) obtiveram β -ciclodextrina a partir de amido hidrolisado pela fermentação e ciclização simultânea (SFC), usando CGTase. A fermentação proporcionou a eliminação da glicose e maltose, inibidores da produção de CD, enquanto que o etanol aumentou a produção. Uma solução 10% (p/v) de amido de mandioca, liquefeita com α -amilase, foi incubada com CGTase usando: somente enzima; etanol (de 1 a 5%) e *Saccharomyces cerevisiae* (12% p/v) seguidas de SFC, mais nutrientes. As condições de reação foram: 38 °C, pH 6,0 e 3,3 mL/L de CGTase. A produção de β -CD diminuiu com o aumento no equivalente de dextrose (DE), sendo que a máxima produção foi obtida para DE igual a 3,54. Este efeito inibitório é menor quando se utiliza a fermentação e ciclização simultâneas.

KIM et al. (1997) estudaram a utilização de xilitol, inositol, sorbitol, maltitol e lactitol, como aceptores de grupos glicosídicos através da transglicosilação com CGTase. A síntese de glicosil-maltitol, usando amido

como doador de grupo glicosídico e maltitol como aceptor, mostrou-se alta e dois produtos foram identificados, maltotriol e maltotetraol.

A produção de uma série de glicosil-trealoses através da transglicosilação com ciclomaltohexose como doador e trealose como receptor de grupos glicosídicos foi observada pela aplicação de CGTase de *Bacillus stearothermophilus* (KURIMOTO et al., 1997). Outro composto, glicosil-ramnose, foi produzido pela glicosilação de ramnose por CGTase de *Bacillus* sp. alcalofílico (KOMETANI et al., 1996).

A ligação de glicose e 6-deoxi-6-iodo-ciclomaltoheptose pela CGTase, na presença de glicoamilase, seguida por acetilação produz maltoligossacarídios (APPARU et al., 1995). Glicosilação de hidroquinona por CGTase foi verificada por FUNAYAMA et al. (1997), muito embora neste caso maior eficiência tenha sido obtida com CGSase (glicosil sintetase) para produzir α -glicosil-hidroquinona. A glicosilação de D-catequina por CGTase produz o composto D-catequina-3'-O- α -D-glicopiranosídeo, que inibe tirosinase de cogumelos em presença de 5,8 mM do composto (FUNAYAMA et al., 1993).

Betun-3-il- β -D-celobiosídeo foi sintetizado a partir de betulina e brometo de hepta-O-acetil- α -D-celobiosil por transglicosilação de CGTase de *Bacillus macerans*. Os produtos obtidos pela reação enzimática foram: betulin-3-il- β -D-(4-O- β -D-maltosil)-glicosídeo e betulin-3-il-8-D-(4-O- β -D-maltotriosil)-glicosídeo (OHARA & HISHIYAMA, 1994).

CGTase imobilizada é capaz de catalisar a conversão de α -CD para β -CD e maltoligossacarídeo ou β -CD para α -CD e maltoligossacarídeo. A conversão aumenta com a quantidade de CGTase aplicada. A adição de glicose, maltose e sacarose como aceptores no substrato contendo CD resultou na aceleração da degradação de CD comparado ao substrato de CD somente (OKADA et al., 1994a). A conversão de α -CD a β -CD e monooligossacarídios (MOS) ou β -CD a α -CD aumentou com o acréscimo da quantidade de CGTase imobilizada em membrana capilar e, a adição de glicose, maltose e sacarose como aceptores na solução de substrato, contendo ciclodextrina resultou no aceleramento da decomposição de CD comparado ao meio contendo somente CD. Dados demonstram que CGTase imobilizada pode ser usada como catalisador intermolecular na transglicosilação entre substratos de baixa massa molecular, regulando a quantidade de enzima e o tempo de residência no reator de mistura (OKADA et al., 1994b).

A enzima produzida pelo *Bacillus* sp. S-6 sintetizou o ácido 2-O- α -D-glicopiranosil-L-ascórbico (AA-2G) pela reação de transglicosilação com amido como doador e L-ascórbico como aceptor (JUN et al., 1998; AGA et al., 1991).

2 CICLODEXTRINAS

Ciclodextrinas são os produtos mais discutidos na utilização de CGTase pela indústria atualmente. As ciclodextrinas (CDs) são cíclicas, maltoligossacarídeos não-redutores, produzidas pela hidrólise do amido pela CGTase. As principais frações apresentam seis, sete ou oito unidades de α -1,4-D-glicopiranoses, sendo designadas como: α -ciclodextrina (ciclohexaamilose, ciclomaltohexanose, α -CD), β -ciclodextrina (cicloheptaamilose, ciclomaltoheptaose, β -CD), γ -ciclodextrina (ciclooctaamilose, ciclomaltooctaose, γ -CD), respectivamente. As quantidades relativas de cada uma depende do tipo e fonte de enzima usada, podendo ser obtida pela presença de compostos orgânicos (FOGARTY & KELLY, 1990). A estrutura circular das CD consiste em exterior hidrofílico e uma cavidade central hidrofóbica. A propriedade mais notável das CD é sua capacidade de formar compostos de inclusão em solução aquosa, na qual moléculas de dimensões compatíveis são incluídas dentro da cavidade da ciclodextrina sem formação de ligações covalentes. Todas as moléculas encapsuladas são acomodadas, desde hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos apolares à compostos polares como ácidos e aminas. Compostos de inclusão com ciclodextrinas apresentam potencial para as indústrias alimentícia, farmacêutica, de fermentações e química fina, na preparação, separação e purificação, bem como encapsulação de produtos como fragrâncias, fármacos (esteróis) e liberação controlada de compostos biologicamente ativos (medicamentos e pesticidas). Formam complexos estereoespecíficos e podem ser usadas na separação de enantiômeros. Como enzimas, as ciclodextrinas apresentam propriedades catalíticas específicas (FOGARTY & KELLY, 1990; SABIONI, 1994; PSZCZOLA, 1988). As propriedades físicas das ciclodextrinas são apresentadas na Tabela 3.

TABELA 3 - PROPRIEDADES FÍSICAS DAS CICLODEXTRINAS

Propriedades	α -CD	β -CD	γ -CD
Solubilidade a 25 °C em água (g/100 mL)	14,5	1,85	23,2
Massa molecular relativa	972	1135	1297
Diâmetro da cavidade (Å)	5,0	6,2	7,9
Comprimento (Å)	7,9	7,9	7,9
Rotação específica, $[\alpha]_D^{25}$	+150,5	+162,5	+177,4

Fonte: FOGARTY & KELLY (1990); PSZCZOLA (1988).

Ciclodextrinas podem ser usadas para estabilizar emulsões, espumas e materiais que sejam sensíveis à luz, oxigênio ou calor. Podem ser empregadas no controle da volatilidade e potenciais aromáticos de especiarias ou podem aumentar a solubilidade de substâncias hidrofóbicas. Apresentam habilidade para modificar o sabor, aroma, a textura ou cor, aumentando o espectro de usos de diversas substâncias

(PSZCZOLA, 1988). Pode-se obter vitamina A a partir do β -caroteno, extraído de vegetais, por meio de processos catalíticos, nos quais a ciclodextrina funciona como bom modelo de enzima. A utilização de β -CD como modelo de enzimas possibilitou a obtenção do retinal e da vitamina A (Figura 2) com bons rendimentos (SOUZA e SILVA & SOUZA, 1997).

FIGURA 2 – SÍNTESE DE RETINOL E RETINAL A PARTIR DE β -CAROTENO E β -CICLODEXTRINA

As ciclodextrinas têm sido objeto de especial atenção devido às suas propriedades de encapsular espécies iônicas ou moleculares e orientá-las em sua cavidade bem definida. Na fotoquímica, o uso de ciclodextrinas multicromofóricas (β -CDa) como microrreatores aptos a induzir fotorreações advém da possibilidade de associar “antenas” multicromofóricas (moléculas cromofóricas associadas a ligantes) às ciclodextrinas modificadas (FERREIRA & SOUZA, 1997).

Dentre os biomarcadores, os hopanos e esteranos são particularmente importantes em razão das riquezas de informações que suas estruturas podem fornecer, pois estão presentes em todas as épocas geológicas relacionadas à formação de petróleo, indicando assim origem bacteriana (hopanos) e ambiente deposicional marinho e hipersalino (esteranos). A encapsulação destes compostos pelas ciclodextrinas é de vital importância para a indústria petrolífera, pois permite estabelecer a origem e o ambiente deposicional da matéria orgânica, evolução térmica, vias de migração, correlações entre óleos e rochas geradoras e biodegradação (RODRIGUES et al., 1997).

A redução do teor de colesterol é percebida na presença de β -CD e muito embora outros fatores e condições interfiram, cerca de 94% de colesterol podem ser removidos (AHN & KWAK, 1999). A β -CD pode ser aplicada como surfactante na preparação de emulsões de polimetacrilato de butila, substituindo surfactantes tradicionais, embora a velocidade de polimerização seja menor (RIMMER & TATTERSALL, 1999). Pode promover a separação eficiente e aumentar o sinal de quimioluminescência, na separação de alcalóides por eletroforese capilar combinada com quimioluminescência on-line com permanganato (GONG et al., 1999). Devido à sua habilidade em formar complexos com medicamentos, γ -CD é de grande importância para formulações farmacêuticas. Este fato pode ser observado após administração

intravenosa, quando a concentração de γ -CD rapidamente diminui no plasma, sendo a molécula provavelmente distribuída pelos tecidos. Somente 50% da γ -CD ingerida é recuperada na urina, sugerindo degradação enzimática e/ou estocagem tecidual (CREMINON et al., 1999).

Ciclomaltohexose (α -CD), ciclomaltoheptose (β -CD) e ciclomaltooctose (γ -CD) são comumente pesquisados. Já a produção de ciclomaltononaose (δ -CD) por CGTase não tem sido extensamente estudada. Sua produção foi verificada por LARSEN et al. (1998) com CGTase de *Paenibacillus* sp. F8, numa proporção de 0,09:1:0,25:0,14 em relação, respectivamente, à α , β , γ , δ -CD. Incubação prolongada resultou em diminuição na proporção de δ -CD e aumento na proporção de α e β -CD, sugerindo que o substrato modelo deste ensaio foi mais facilmente degradado pela CGTase deste microrganismo.

3 CONCLUSÃO

As grandes possibilidades de aplicação da CGTase e do principal produto obtido de sua ação, as ciclodextrinas, explicam o interesse na produção em larga escala desta enzima e na definição dos parâmetros necessários para aumentar a produção de γ -CD. Esta teria maior aplicação industrial, possibilitando encapsulação de moléculas maiores. Estudos têm sido desenvolvidos com este intuito, tanto para melhoramento das condições de cultivo, ou modificação genética de diversas cepas, quanto na modificação da própria enzima pela engenharia protéica.

Abstract

The present review discuss about production, action, and application of the ciclodextrin glucosyltransferase (CGTase, E.C. 2.4.1.19). It was concluded that the products obtained by hydrolysis of the starch with CGTase showed great usefulness and functionality, whereas it is necessary complementary studies to make possible its production in wide scale.

REFERÊNCIAS

- 1 ABDEL-NABY, M. A.; REYAD, R. M.; ABDEL-FATTAH, A. F. Biosynthesis of cyclodextrin glucosyltransferase by immobilized *Bacillus amyloliquefaciens* in batch and continuous cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 5, p. 1-9, 2000.

- 2 AGA, H.; YONEYAMA, M.; SAKAI, S.; YAMAMOTO, I. Synthesis of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 1751-1756, 1991.
- 3 AHN, J.; KWAK, H. S. Optimizing cholesterol removal in cream using beta-cyclodextrin and response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 4, p. 629-632, 1999.
- 4 ALLISON, C.; MACFARLANE, G. T. Regulation of protease production in *Clostridium sporogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 11, p. 3485-3490, 1990.
- 5 APPARU, C.; DRIGUEZ, H.; WILLIAMSON, G.; SVENSSON, B. Chemoenzymatic synthesis of 6-omega-S-alpha-D-glucopyranosyl-6-omega-thiomaltooligosaccharides. Their binding to *Aspergillus niger* glucoamylase G1 and its starch-binding domain. **Carbohydrate Research**, v. 277, n. 2, p. 313-320, 1995.
- 6 CHANG, H.; IRWIN, P. M.; NIKOLOV, Z. L. Effects of mutations in the starch-binding domain of *Bacillus macerans* cyclodextrin glycosyltransferase. **Journal of Biotechnology**, v. 65, n. 2-3, p. 191-202, 1998.
- 7 CHUNG, H. J.; YOON, S. H.; LEE, M. J.; KIM, M. J.; KWEON, K. S.; LEE, I. W.; KIM, J. W.; OH, B. H.; LEE, H. S.; SPIRIDONOVA, V. A.; PARK, K. H. Characterization of a thermostable cyclodextrin glucanotransferase isolated from *Bacillus stearothermophilus* ET1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 952-959, 1998.
- 8 CREMINON, C.; DJEDAINI-PILARD, F.; VIENET, R.; PEAN, C.; GROGNET, J. M.; GRASSI, J.; PERLY, B.; PRADELLES, P. A new specific enzyme immunoassay allowing an efficient pharmacokinetic evaluation of gamma-cyclodextrin after intravenous administration to rats. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 9, p. 1407-1411, 1999.
- 9 DEL RIO, G.; MORETT, E.; SOBERON, X. Did cyclodextrin glycosyltransferase evolve from alpha-amylases? **FEBS Letters**, v. 416, n. 2, p. 221-224, 1997.
- 10 FERREIRA, L. B.; SOUZA, J. D. F. Síntese de estruturas supramoleculares para dispositivos conversores de luz. In: CONGRESSO NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5., 1997, Recife. **Anais...** Recife: UFPe, 1997. 210 p.

- 11 FOGARTY, W. M.; KELLY, C. T. Recent advances in microbial amylases. In: **Microbial Enzymes and Biotechnology**. London: Elsevier Applied Science, 1990. cap. 3, p. 71-132.
- 12 FUNAYAMA, M.; ARAKAWA, H.; YAMAMOTO, R. Enzymatic synthesis of hydroquinone-glucoside. **Seibutsu Kogaku Kaishi**, v. 75, n. 3, p. 177-180, 1997.
- 13 FUNAYAMA, M.; NISHINO, T.; HIROTA, A.; MURAO, S.; TAKENISHI, S.; NAKANO, H. Enzymatic synthesis of (+)-catechin-alpha-glucoside and its effect on tyrosinase activity. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, n. 10, p. 1666-1669, 1993.
- 14 GAWANDE, B. N.; GOEL, A.; PATKAR, A. Y.; NENE, S. N. Purification and properties of a novel raw starch degrading cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 4, p. 504-509, 1999.
- 15 GAWANDE, B. N.; SINGH, R. K.; CHAUHAN, A. K.; GOEL, A.; PATKAR, A. Y. Optimization of cyclomaltodextrin glucanotransferase production from *Bacillus firmus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 4, p. 288-291, 1998.
- 16 GONG, Z. L.; ZHANG, Y.; ZHANG, H.; CHENG, J. K. Cappillary eletrophoresis separation and permanganate chemiluminescence on-line detection of some alkaloids with beta-cyclodextrin as an additive. **Journal of Chromatography A**, v. 855, n. 1, p. 329-335, 1999.
- 17 JAMUNA, R.; SASWATHI, N.; SHEELA, R.; RAMAKRISHMA, S. V. Synthesis of cyclodextrin glucosyl transferase by *Bacillus cereus* for the production of cyclodextrin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 43, p. 163-169, 1993.
- 18 JEANG, C. L.; LIN, Y. W. Evidence for the presence of essential histidines on cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus macerans*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 19, p. 85-92, 1994.
- 19 JEON, S. J.; NAM, S. W.; YUN, J. W.; SONG, S. K.; KIM, B. W. Effect of C- or D-domain deletion on enzymatic properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* NO2. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 152-157, 1998.
- 20 JUN, H. K.; JO, Y. B.; KIM, S. J.; BAE, K. M. Some properties and optimal culture conditions of cyclodextrin glucanotransferase of *Bacillus* sp. S-6 isolated from kimchi. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, v. 27, n. 4, p. 609-617, 1998.

- 21 KAMASAKA, H.; OKADA, S.; KUSAKA, K.; YAMAMOTO, K.; YOSHIKAWA, K. **Phosphorylated saccharide and method for producing the same**. US Patent 5,861,048, Jan. 1999.
- 22 KARLSON, P. Glicosídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos. In: BIOQUÍMICA. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1970. Cap. 17, p. 351-375.
- 23 KIM, J. R.; YOOK, C. Optimization of transglucosylation reaction of stevioside. **Korean Journal of Food Science and Technology**, v. 29, n. 2, p. 249-254, 1997.
- 24 KIM, T. K.; PARK, D. C.; LEE, Y. K. Synthesis of glucosyl-sugar alcohols using glycosyltransferases and structural identification of glucosyl-maltitol. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, n. 5, p. 310-317, 1997.
- 25 KOMETANI, T.; TERADA, Y.; NISHIMURA, T.; NAKAE, T.; TAKII, H.; OKADA, S. Acceptor specificity of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* species and synthesis of glucosyl rhamnose. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, n. 7, p. 1176-1178, 1996.
- 26 KOMETANI, T.; TERADA, Y.; NISHIMURA, T.; TAKII, H.; OKADA, S. Synthesis of hesperidin glycosides by cyclodextrin glucanotransferase and stabilization of the natural pigments. **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology**, v. 42, n. 5, p. 376-382, 1995.
- 27 KOMETANI, T.; TERADA, Y.; NISHIMURA, T.; TAKII, H.; OKADA, S. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from an alkaline *Bacillus* species and transglycosylation at alkaline pHs. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 3, p. 517-520, 1994a.
- 28 KOMETANI, T.; TERADA, Y.; NISHIMURA, T.; TAKII, H.; OKADA, S. Transglycosylation to hesperidin by cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* species in alkaline pH and properties of hesperidin glycosides. **Bioscience, Biotechnonology and Biochemistry**, v. 58, n. 11, p. 1990-1994, 1994b.
- 29 KUBOTA, M.; MATSUURA, Y.; SAKAI, S.; KATSUBE, Y. Three-dimensional structure of cyclodextrin glucanotransferase and its reaction mechanism. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 41, n. 2, p. 245-253, 1994.

- 30 KURIKI, T.; TAKATA, H.; IMANAKA, T.; OKADA, S. Alpha-amylase family enzymes. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, v. 69, n. 8, p. 1029-1032, 1995.
- 31 KURIMOTO, M.; TABUCHI, A.; MANDAI, T.; SHIBUYA, T.; CHAEN, H.; FUKUDA, S.; SUGIMOTO, T.; TSUJISAKA, Y. Synthesis of glycosyl-trehaloses by cyclomaltodextrin glucanotransferase through the transglycosylation reaction. **Bioscience, Biotechnonology and Biochemistry**, v. 61, n. 7, p. 1146-1149, 1997.
- 32 LARSEN, K. L.; DUEDAHL-OLESEN, L.; CHRISTENSEN, H. J. S.; MATHIESEN, F.; PEDERSEN, L. H.; ZIMMERMANN, W. Purification and characterisation of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus* sp. F8. **Carbohydrate Research**, v. 310, n. 3, p. 211-219, 1998.
- 33 LIMA, H. O. S.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, M. Beta-cyclodextrin production by simultaneous fermentation and cyclization. **Applied Biochemistry and Biochemistry**, v. 70-72, p. 789-804, 1998.
- 34 MARECHAL, L. R.; ROSSO, A. M.; MARECHAL, M. A.; KRYMKIEWICZ, N.; FERRAROTTI, A. S. Some properties of a cyclomaltodextrin-glucanotransferase from *Bacillus circulans* DF9R type. **Cellular and Molecular Biology**, v. 42, n. 5, p. 659-664, 1996.
- 35 MATIOLI, G.; ZANIN, G. M.; GUIMARÃES, M. F.; DE MORAES, F. F. Production and purification of CGTase of alkalophylic *Bacillus* isolated from Brazilian soil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, p. 267-275, 1998.
- 36 MORI, S.; GOTO, M.; MASE, T.; MATSUURA, A.; OYA, T.; KITAHATA, S. Reaction conditions for the production of gamma-cyclodextrin by cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp. No. 9605. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, n. 6, p. 1012-1015, 1995.
- 37 MOSI, R.; SHAM, H.; UITDEHAAG, J. C. M.; RUITERKAMP, R.; DIJKSTRA, B. W.; WITHERS, S. G. Reassessment of acarbose as a transition state analogue inhibitor of cyclodextrin glycosyltransferase. **Biochemistry**, v. 37, n. 49, p. 17192-17198, 1998.
- 38 NAKAMURA, A.; HAGA, K.; YAMANE, K. Four aromatic residues in the active-center of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. 1011. Effects of replacements on substrate-binding and cyclization characteristics. **Biochemistry**, v. 33, n. 33, p. 9929-9936, 1994a.

- 39 NAKAMURA, A.; HAGA, K.; YAMANE, K. The transglycosylation reaction of cyclodextrin glucanotransferase is operated by a PING-PONG mechanism. **FEBS Letters**, v. 337, n. 1, p. 66-70, 1994b.
- 40 NAKAMURA, A.; HAGA, K.; YAMANE, K. Three histidine residues in the active center of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. 1011: effects of the replacement on pH dependence and transition-state stabilization. **Biochemistry**, v. 32, n. 26, p. 6624-6631, 1993.
- 41 NORMAN, B. E.; JORGENSEN, S. T. *Thermoanaerobacter* sp. CGTase: its properties and application. **Journal for Starch and its Related Carbohydrates and Enzymes**, v. 39, n. 2, p. 101-108, 1992.
- 42 OHARA, S.; HISHIYAMA, S. Utilization of triterpenoids. 1. Synthesis of betulin glycosides by cyclodextrin glycosyltransferase. **Mokuzai Gakkaishi**, v. 40, n. 4, p. 444-451, 1994.
- 43 OKADA, T.; ITO, M.; HIBINO, K. Intermolecular transglycosylating reaction of cyclodextrin glucanotransferase immobilized on capillary membrane. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 3, p. 264-267, 1994a.
- 44 OKADA, T.; ITO, M.; HIBINO, K. Immobilization of cyclodextrin glucanotransferase on capillary membrane. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 3, p. 259-263, 1994b.
- 45 PEDERSEN, S.; JENSEN, B. F.; JORGENSEN, S. T. Enzymes from genetically modified microorganisms. **Genetically Modified Foods**, v. 605, p. 196-208, 1995.
- 46 POCSI, I.; NOGRADY, N.; LIPTAK, A.; SZENTIRMAI, A. Cyclodextrins are likely to induce cyclodextrin glycosyltransferase production in *Bacillus macerans*. **Folia Microbiologica**, v. 43, n. 1, p. 71-74, 1998.
- 47 PSZCZOLA, D. E. Production and potential food applications of cyclodextrins. **Food Technology**, v. 42, n. 1, p. 96-100, 1988.
- 48 RIMMER, S.; TATTERSALL, P. I. Emulsion polymerization in the presence of beta-cyclodextrin. **Polymer**, v. 40, n. 24, p. 6673-6677, 1999.
- 49 RODRIGUES, J. M. G.; MOTA, A. C.; SOUZA, J. D. F. Encapsulação molecular de marcadores biológicos responsáveis pela identidade genética do petróleo. In: CONGRESSO NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5., 1997, Recife. **Anais...** Recife: UFPe, 1997. 210 p.

- 50 SABIONI, J. G. Uma molécula de muitas possibilidades. **Ciência Hoje**, v. 18, n. 102, p. 14-15, 1994.
- 51 SABIONI, J. G.; PARK, Y. K. Production and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus*. **Starch/Stärke**, v. 44, n. 6, p. 225-229, 1992.
- 52 SALVA, T. D. G.; DE LIMA, V. B.; PAGAN, A. P. Screening of alkalophilic bacteria for cyclodextrin glycosyltransferase production. **Revista de Microbiologia**, v. 28, n. 3, p. 157-164, 1997.
- 53 SHIN, H. D.; KIM, C.; LEE, Y. H. The roles of tryptophan and histidine residues in the catalytic activities of β -cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus* var. alkalophilus. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 62-69, 1999.
- 54 SHIRAISHI, F.; KAWAKAMI, K.; MARUSHIMA, H.; KUSUNOKI, K. Effects of aliphatic alcohols on formation of cyclodextrin from soluble starch by *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase. **Starch**, v. 41, n. 11, p. 417-420, 1989.
- 55 SOUZA E SILVA, P. T.; SOUZA, J. D. F. Síntese da vitamina A catalisada por β -ciclodextrinas. In: CONGRESSO NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5., 1997, Recife. **Anais...** Recife: UFPe, 1997. 210 p.
- 56 STROKOPYTOV, B.; PENNINGA, D.; ROZEBOOM, H. J.; KALK, K. H.; DIJKHUIZEN, L.; DIJKSTRA, B. W. X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with acarbose. Implications for the catalytic mechanism of glycosidases. **Biochemistry**, v. 34, n. 7, p. 2234-2240, 1995.
- 57 TACHIBANA, Y.; KURAMURA, A.; SHIRASAKA, N.; SUZUKI, Y.; YAMAMOTO, T.; FUJIWARA, S.; TAKAGI, M.; IMANAKA, T. Purification and characterization of an extremely thermostable cyclomaltodextrin glucanotransferase from a newly isolated hyperthermophilic archeon, a *Thermococcus* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 1991-1997, 1999.
- 58 THATAI, A.; KUMAR, M.; MUKHERJEE, K. J. A single step purification process for cyclodextrin glucanotransferase from a *Bacillus* sp. isolated from soil. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 35-47, 1999.
- 59 TONKOVA, A. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 8, p. 678-686, 1998.

- 60 UITDEHAAG, J. C. M.; MOSI, R.; KALK, K. H.; VAN DER VEEN, B. A.; DIJKHUIZEN, L.; WITHERS, S. G.; DIJKSTRA, B. W. X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glucosyltransferase elucidate catalysis in the alpha-amylase family. **Nature Structural Biology**, v. 6, n. 5, p. 432-436, 1999.
- 61 WIND, R. D.; UITDEHAAG, J. C. M.; BUITELAAR, R. M.; DIJKSTRA, B. W.; DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin product specificity and pH optima of the thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 10, p. 5771-5779, 1998.
- 62 YIM, D. G.; SATO, H. H.; PARK, Y. H.; PARK, Y. K. Production of cyclodextrin from starch by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* and characterization of purified enzyme. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 402-405, 1997.