

# Metodologia de seleção de cepas para produção da ciclodextrina glicosiltransferase e para purificação da enzima

Glauciane de Lara Costa, Rúbia Pazzetto, Franciele Brol e Graciette Matioli\*

Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: gmatioli@uem.br

**RESUMO.** As ciclodextrinas (CDs) são maltooligosacarídeos, produzidas a partir do amido, pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase). Esta pesquisa teve por objetivo estabelecer metodologias de seleção de cepas para produção de CGTase e para purificação da enzima. Os microrganismos foram selecionados a partir de 53 análises de solos de cultura de amido, em placas contendo meio de cultivo específico, para seleção de cepas produtoras de CGTase. As enzimas foram obtidas com cultivo destes microrganismos em meio líquido. As atividades enzimáticas das CGTases foram determinadas pelos métodos espectrofotométricos e precipitação com tricloroetileno. A cepa isolada do solo de aveia foi a que apresentou maior atividade [ $0,1864 \mu\text{mol de } \beta\text{-CD (min mL)}^{-1}$ ]. Esta cepa foi utilizada para a produção da enzima em escala laboratorial e purificação em cromatografia de afinidade biospecífica. A cepa selecionada nesta pesquisa abre novas perspectivas para produção de enzima e CDs em escala industrial.

**Palavras-chave:** ciclodextrina, glicosiltransferase, CGTase.

**ABSTRACT. Strains selection methodology for cyclodextrin glycosyltransferase production and enzyme purification.** Cyclodextrins (CDs) are maltooligosaccharides produced from starch by cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) enzyme. This research aimed at establishing method for strains selection for CGTase production and enzyme purification. The microorganisms were selected from 53 analyses of starch cultures soils on plates containing specific culture medium for strains selection that produce CGTase. The enzymes were obtained by culturing these microorganisms in liquid medium. The enzyme activity was determined with photospectrometric methods and precipitation with trichloroethylene. The strain isolated from oat soil was the one that showed the highest activity [ $0.1864 \mu\text{mol of } \beta\text{-CD (min mL)}^{-1}$ ]. This strain was used for enzyme production in laboratory scale and purification by biospecific affinity chromatography. The strain selected in this research opens new perspectives for enzymes production and CDs in industrial scale.

**Key words:** cyclodextrin, glycosyltransferase, CGTase.

## Introdução

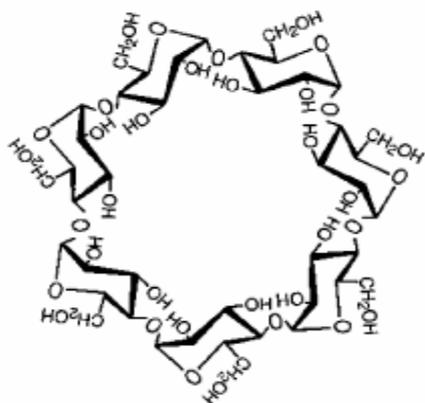
As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, constituídos de seis ( $\alpha$ -ciclodextrina), sete ( $\beta$ -ciclodextrina), oito ( $\gamma$ -ciclodextrina) ou mais unidades glicopiranosil, unidas por ligação  $\alpha$ -(1,4). São também conhecidas como cicloamilose, ciclomaltose e dextrinas de Schardinger. São produzidas como o resultado de uma reação de transglicosilação intramolecular a partir da degradação do amido pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) (Del Valle, 2004). Geralmente, é formada uma mistura de CDs, e a razão entre  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD é dependente da origem da enzima. Dentro das condições normais, a  $\beta$ -CD é produzida em maior quantidade, em alguns casos,  $\alpha$ -CD, mas  $\gamma$ -CD é muito raramente produzida com

altos rendimentos (Szejtli, 1988; Matioli *et al.*, 2000; Gawande e Patkar, 2001). A seleção de cepas que produzem CGTases específicas, com alta seletividade para uma das CDs, facilitaria muito o processamento industrial e reduziria os custos de produção (Bekers *et al.*, 1991). Deve-se destacar a importância da  $\gamma$ -CD, que apresenta a vantagem de ter maior diâmetro da cavidade e uma solubilidade em água muito maior que a  $\alpha$ -CD e a  $\beta$ -CD. A maior cavidade interna permite a complexação de moléculas maiores de grande interesse farmacológico, e a maior solubilidade facilita a preparação de soluções mais concentradas dos princípios ativos de interesse bioquímico (Szejtli, 1988).

A característica mais notável das CDs é a capacidade de formar complexos de inclusão, com ampla variedade

de compostos sólidos líquidos e gasosos (Del Valle, 2004). Elas têm forma de cone truncado, com cavidade interior, cujo tamanho e forma são determinados pelo número de unidades de glucose (Duchêne *et al.*, 1984; Lee e Kim, 1991; Matioli *et al.*, 2000). Nestes complexos, a molécula hóspede ajusta-se dentro da cavidade da molécula de CD hospedeira (Del Valle, 2004). Normalmente, as substâncias encapsuladas apresentam maior estabilidade térmica e química e, assim, têm resistência aumentada frente a fatores ambientais prejudiciais como oxigênio, luz e calor (Bergamasco *et al.*, 2005). Por meio da complexação, pode-se também aumentar a solubilidade das moléculas hóspedes, mascarar sabores desagradáveis de medicamentos e controlar a volatilidade e sublimação (Del Valle, 2004).

As CDs têm inúmeras aplicações industriais, pois possuem cavidade apolar que favorece a encapsulação de uma grande variedade de moléculas orgânicas (Figura 1) (Tardioli *et al.*, 2006). São usadas em alimentos, em medicamentos, em cosméticos, em produtos domésticos, em pesticidas, em tecnologia química, em química analítica e em outros (Bergamasco *et al.*, 2005). Também, as CDs apresentam toxicidade relativa bastante baixa, considerando que, somente quando a  $\beta$ -CD é administrada por via parenteral, pode causar a hemólise de eritrócitos e nefrotoxicidade, por causa da formação de complexo de baixa solubilidade com o colesterol, que se precipita em nível renal (Bekers *et al.*, 1991). Além disso, estudos têm demonstrado que somente em quantidades negligenciáveis de CDs e seus complexos são capazes de permear membranas lipofílicas, tal como mucosa gastrointestinal e pele (Del Valle, 2004; Duchêne e Loftsson, 2007).



**Figura 1.** Estrutura química da  $\beta$ -ciclodextrina.

A produção da CGTase tem sido estudada em diversas linhagens de bactérias. As enzimas obtidas a

partir desses microrganismos apresentam diferentes propriedades, tais como: estabilidade térmica, pH ótimo, massa molar e capacidade de formação de CDs (Horikoshi, 1988). A produção de CGTase é normalmente realizada em condições aeróbias e em reator batelada com agitação. O tempo de cultura depende da velocidade de crescimento do microrganismo. No geral, o cultivo demora de dois a três dias, à temperatura de 30 a 37°C, para os mesófilos; e superior a 50°C, para os termófilos. A faixa de pH varia de seis a dez dias (Delbourg, 1991).

Considerando as recentes pesquisas no campo das CDs, a presente pesquisa teve por direcionamento estabelecer metodologias de seleção de cepas para produção de CGTase e para purificação da enzima.

## Material e métodos

### Seleção de microrganismos produtores de CGTase

Para a seleção dos microrganismos produtores de CGTase, foram feitas 53 análises de 14 amostras de solos de culturas que contêm amido, coletadas no município de Maringá e região noroeste do Estado do Paraná, tais como: solos de plantações de milho, batata, mandioca, soja, trigo, sorgo, aveia e canola.

A técnica de 'screening', para isolar microrganismos produtores de CGTase, foi baseada no meio de Nakamura e Horikoshi (1976), para cepas alcalofílicas, conforme Tabela 1. Este meio foi suplementado com corante a fim de facilitar a detecção das referidas cepas, pois o corante forma complexo com a CD, e um halo claro é formado ao redor das colônias de microrganismos produtores de CGTase. O corante utilizado foi o vermelho do congo, o qual é específico para  $\gamma$ -CD, possibilitando a pesquisa de microrganismo cuja CGTase poderia fornecer maior produção desta CD (Matioli *et al.*, 1998).

**Tabela 1.** Constituintes dos meios de cultivo.

Constituinte	Meio sólido (%)	Meio líquido (%)
Amido solúvel	1,00	2,00
Polipeptona	0,50	0,50
Extrato de levedura	0,50	0,50
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,10	0,10
MgSO <sub>4</sub>	0,02	0,02
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,00	1,00
Vermelho do congo	0,01	-
Agar	1,50	-

Cada amostra foi diluída em água destilada estéril, mantida em banho a 80°C, por 10 minutos, a fim de eliminar as formas vegetativas e ativar a esporulação. Posteriormente, um volume apropriado destas suspensões foi inoculado superficialmente em placas que contêm o meio de cultivo sólido,

constituído conforme Tabela 1.

As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C, por 72 horas. Após este período, as colônias que produziram maior halo foram associadas a cepas produtoras de maior quantidade de CGTase. Foram feitos repiques destas colônias em placas, contendo o mesmo meio e incubados a 37°C, por 24 horas, com a finalidade de aumentar o inóculo.

#### Determinação da produção da CGTase e da sua atividade

As CGTases, produzidas pelas cepas isoladas, foram obtidas por meio do cultivo destes microrganismos em meio líquido. O cultivo foi feito em frascos de erlenmeyer, contendo 100 mL de meio, durante 120 horas, a 37°C, sob agitação (150 rpm). Cessada a agitação, foram retiradas alíquotas de 15 mL dos erlenmeyers, e estas foram centrifugadas por 20 minutos, a 6.000 rpm, em temperatura de 4°C, para a eliminação das células microbianas. Os sedimentos obtidos foram desprezados, e os sobrenadantes utilizados para realizar os testes de atividade e doseamento de proteína. As cepas isoladas que obtiveram maiores valores de atividade enzimática da CGTase foram inoculadas em terra estéril para manutenção dos microrganismos.

Foram realizadas dosagens colorimétricas das CDs com fenolftaleína (PHE) para quantificação de  $\beta$ -CD, e verde de bromocresol (BCG), para quantificação da  $\gamma$ -CD, com base na particularidade das CDs ao formarem complexos com numerosas moléculas orgânicas.

A atividade enzimática das CGTases foi determinada pelo método espectrofotométrico estudado por Hamon e Moraes (1990).

O cálculo da atividade enzimática foi realizado pela equação abaixo:

$$A = \frac{K' \cdot V_R \cdot D}{V_E}$$

em que:

A = atividade enzimática em  $\mu\text{mol CD (min mL)}^{-1}$ ;

D = diluição da enzima;

K' = inclinação da reta de concentração de CDs em função do tempo ( $\text{mmol min}^{-1} \text{L}^{-1}$ );

$V_E$  = volume da enzima diluída para o teste descrito,  $V_E = 1,0 \text{ mL}$ ;

$V_R$  = volume de reação para o teste descrito,  $V_R = 2,0 \text{ mL}$ .

Portanto, considerando-se as condições do teste descrito, concluiu-se que:

$$A = \frac{K' \left[ (10^3 \mu\text{mol min}^{-1} 10^{-3} \text{ mL}) 2 \text{ mL} \cdot D \right]}{1 \text{ mL}}$$

em que:

$A = 2 \cdot K' \cdot D \text{ } [\mu\text{mol CD (min x mL de enzima)}^{-1}]$ ;

$A = U \text{ mL}^{-1}$ .

A atividade específica é expressa em termos da atividade por miligramas de proteína ( $U \text{ mg}^{-1}$ ). A determinação da concentração de proteína, neste trabalho, foi pelo método de Bradford (1976).

#### Determinação de $\beta$ -ciclodextrina

A concentração de  $\beta$ -CD foi medida pela descoloração de uma solução de fenolftaleína, a 550 nm, a qual ocorre depois da complexação com a CD. Na preparação da curva de calibração de  $\beta$ -CD, os dados de absorbância, em função da concentração de  $\beta$ -CD, foram ajustados, levando em consideração a Teoria da Complexação da  $\beta$ -CD com a fenolftaleína, desenvolvida por Hamon e Moraes (1990). A equação da reta ajustada aos pontos de  $[\beta\text{-CD}]/[1-(\text{ABS}/\text{ABS}_0)]$  e  $\text{ABS}/\text{ABS}_0$  fornece os coeficientes (a) linear e (b) angular que possibilitam construir a curva-padrão pela seguinte equação:

$$[\beta\text{-CD}] = \left[ 1 - \left( \frac{\text{ABS}}{\text{ABS}_0} \right) \right] \left[ a + \left( \frac{\text{ABS}_0 \cdot b}{\text{ABS}} \right) \right]$$

em que:

$\text{ABS}_0$  é a absorbância a 550 nm que representa a ausência de  $\beta$ -CD;

ABS a absorbância da amostra a 550 nm.

#### Determinação de $\gamma$ -ciclodextrina

Na determinação da  $\gamma$ -CD, foi utilizado o corante verde de bromocresol, o qual permite a determinação da atividade enzimática da CGTase, baseando-se no princípio da inclusão molecular, conforme metodologia de Hamon e Moraes (1990).

#### Determinação de proteínas

A proteína presente no meio de cultivo e no sobrenadante, após centrifugação, foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford, no qual se emprega o corante azul de Comassie (Bradford, 1976).

#### Determinação da atividade enzimática de $\beta$ -CGTase pelo método Ciclodextrina-Tricloroetileno

O método Ciclodextrina-Tricloroetileno (CD-TCE) baseia-se na precipitação de CDs pelo tricloroetileno (TCE) e foi desenvolvido por Nomoto *et al.* (1984). Foram somente analisadas,

neste ensaio, as enzimas que apresentaram boa atividade pelo método espectrofotométrico.

### Produção da CGTase em escala laboratorial

Após a seleção de uma cepa com produção elevada de CGTase, esta foi utilizada para a produção da enzima em escala laboratorial. Para tanto, a cepa mantida em solo foi dissolvida em água estéril e semeada nas placas, contendo meio sólido (Tabela 1), com a finalidade de obter quantidade suficiente de microrganismos para preparação do inóculo. Após o crescimento das colônias, estas foram semeadas em 250 mL de meio líquido (Tabela 1), e uma alíquota foi retirada para verificação da turbidez no espectrofotômetro. A leitura foi feita no comprimento de onda de 660 nm. Procedeu-se a adição de colônias até a obtenção de um valor de absorbância próximo de 1. O frasco foi mantido a 37°C, por 48 horas, sob agitação (120 rpm). Este cultivo foi utilizado como inóculo para cinco novos frascos contendo 1 L do mesmo meio. O inóculo, para cada frasco, foi de 50 mL. Todos os frascos foram incubados a 37°C, por cinco dias, sob agitação (120 rpm). Ao término deste período, foi retirada uma alíquota do meio para a determinação de proteína e atividade enzimática. Posteriormente, os conteúdos destes cinco frascos foram reunidos num único volume, e as células foram separadas por centrifugação, a 6000 rpm, durante 20 minutos, sob refrigeração. O líquido sobrenadante foi reservado para os procedimentos seguintes, após ter sido retirada uma alíquota para determinação de proteína e atividade enzimática.

### Obtenção da enzima bruta por precipitação protéica

Ao sobrenadante obtido com a centrifugação citada no item anterior, foi adicionado sulfato de amônio sólido, até atingir 80% de saturação. A mistura foi mantida a 4°C, por 48 horas. O precipitado, assim obtido, foi separado por centrifugação a 6000 rpm, por 20 minutos, sob refrigeração e, em seguida, ressuspensionado em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. O volume final obtido foi de 120 mL. Este material foi mantido a 4°C até sua utilização.

### Purificação da enzima por cromatografia de afinidade biospecífica

Seguindo a metodologia de Berna *et al.* (1996), uma coluna de cromatografia de afinidade biospecífica (CAB) foi montada. Para todo o processo cromatográfico, foi usado um fluxo de 24 mL h<sup>-1</sup> e uma coluna de cromatografia líquida 1,0 x 30 cm, com jaqueta (Sigma). A coluna foi conectada a um banho termostatizado e circulação externa de

água (4°C). Foi utilizada uma bomba peristáltica na saída da coluna para regular o fluxo e coletar as amostras para um coletor de frações Advantec, modelo SF2120.

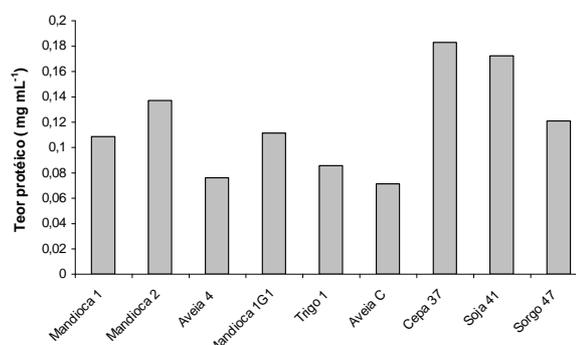
### Resultados e discussão

Foram isoladas 30 cepas a partir das análises feitas nas 14 amostras diferentes de solo coletadas. Todas as cepas isoladas apresentaram alguma atividade enzimática. As cepas selecionadas dos solos de mandioca, aveia, trigo e soja apresentaram os maiores valores de atividade enzimática, algumas apresentaram atividade enzimática semelhante à cepa de *Bacillus firmus* cepa 37 (Matioli *et al.*, 1998), e duas apresentaram atividade superior a esta (Tabela 2). Com exceção da cepa 41, isolada de solo de soja, os valores de atividade obtidos para  $\gamma$ -CD apresentaram-se pouco significativos.

**Tabela 2.** Atividade enzimática das cepas selecionadas.

Cepa	Atividade Enzimática [ $\mu\text{mol de CD (min mL)}^{-1}$ ]	
	Atividade $\beta$ -CD	Atividade $\gamma$ -CD
Aveia C1	0,057	0,039
Aveia C2	0,056	0,044
Aveia 4	0,101	0,014
Aveia 6	0,086	0,056
Aveia 7	0,186	0,050
37	0,116	0,004
Mandioca 1	0,044	0,007
Mandioca 1G1	0,066	0,007
Mandioca 2A	0,098	0,024
Mandioca 2B	0,104	0,035
Soja 41	0,125	0,135
Sorgo 47	0,071	0,090
Trigo 1	0,083	0,016

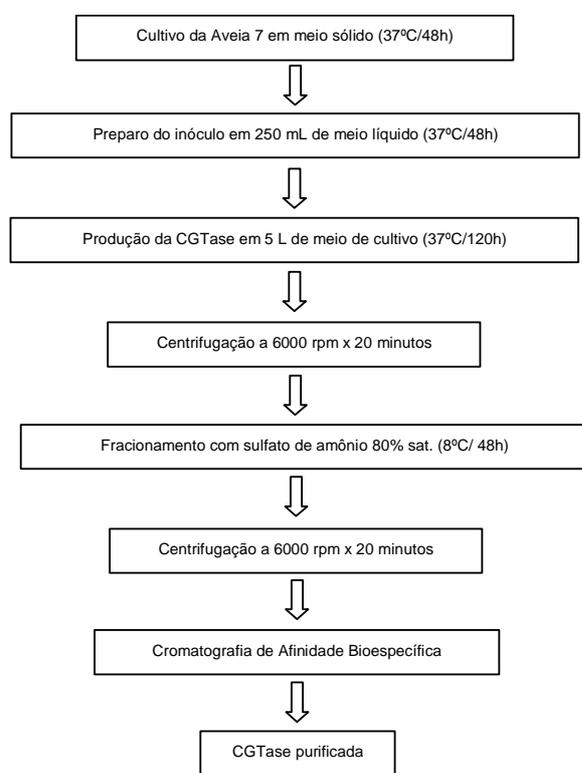
A determinação do teor protéico do meio demonstrou elevada produção de enzimas pelas cepas isoladas, o que não significaria necessariamente alta produção de CGTase (Figura 2). Entretanto, como os resultados de atividade enzimática foram elevados, o teor protéico do meio pode estar relacionado à alta produção enzimática.



**Figura 2.** Teor de proteína do sobrenadante.

No método CD-TCE, a formação do precipitado branco indica a presença de CDs, complexadas com o tricloroetileno. Das várias CGTases testadas por este método, as que apresentaram considerável atividade, ou seja, as que apresentaram atividade CD-TCE igual  $2^5$  foram as CGTase produzidas pela cepa isolada de solo de sorgo (cepa Sorgo 47) e duas isoladas de solo de mandioca (cepas Mandioca 2A e Mandioca 2B). A cepa isolada do solo de aveia (cepa Aveia 7) foi a que apresentou maior atividade, pois obteve precipitado até a diluição  $2^7$ . Esse resultado permitiu comprovar o alto valor de atividade enzimática de  $\beta$ -CGTase encontrado para esta cepa pelo método colorimétrico.

O fluxograma de produção e purificação da CGTase, produzida pela cepa Aveia 7, está representado na Figura 3.

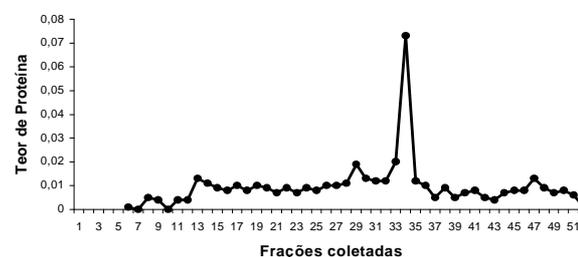


**Figura 3.** Fluxograma de produção e purificação da CGTase produzida pela cepa Aveia 7.

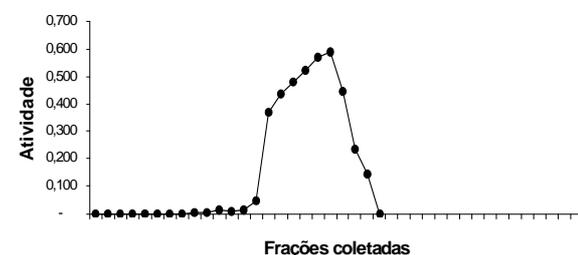
Os meios de cultura que contêm a CGTase, produzida pela cepa Aveia 7, foram reunidos em um único volume de 5000 mL. Este meio apresentou teor de proteína de  $0,018 \text{ mg mL}^{-1}$ . Seguiu-se, então, a centrifugação. Obteve-se volume aproximado de 4.500 mL de sobrenadante, o qual apresentou teor de proteína de  $0,013 \text{ mg mL}^{-1}$ . A este sobrenadante, adicionou-se sulfato de amônio 80% de saturação. Após 48 horas, a  $8^\circ\text{C}$ , foi realizada uma nova

centrifugação e foi recolhido o sedimento, o qual foi suspenso em 100 mL de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0). O teor de proteína, neste material, foi de  $0,052 \text{ mg mL}^{-1}$ , e a atividade enzimática foi de  $0,1904 \text{ U mg}^{-1}$ .

Depois de coletadas as alíquotas de 4,0 mL durante a eluição, estas foram submetidas à análise de atividade e teor de proteína (Figura 4 e 5). Pôde-se observar a formação de um pico de proteína durante a eluição (Figura 4) e quando da determinação da atividade enzimática (Figura 5), observou-se alta atividade no pico correspondente àquele de maior teor protéico durante a eluição. O valor de atividade específica foi de  $21,9108 \text{ } \mu\text{mol de } \beta\text{-CD mg}^{-1} \text{ de proteína}$ .



**Figura 4.** Teor de proteína das frações coletadas.



**Figura 5.** Atividade de  $\beta$ -CD das frações coletadas.

## Conclusão

Uma ótima atividade enzimática foi obtida para as CGTases produzidas pelas cepas isoladas dos solos de mandioca, aveia e soja.

A CGTase produzida pela cepa Aveia 7, escolhida neste estudo para produção e purificação por apresentar maior atividade enzimática, foi purificada por meio dos métodos de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de afinidade bioespecífica. Esta cepa abre novas perspectivas para produção de enzima e CDs em escala industrial.

A metodologia de seleção de cepas produtoras de CGTase mostrou-se bastante viável, enquanto que a metodologia de produção e purificação da CGTase, apesar de bastante trabalhosa, permitiu a recuperação da enzima na sua forma pura.

**Referências**

- BEKERS, O. *et al.* Cyclodextrins in the pharmaceutical field. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York, v. 17, p. 1503-1549, 1991.
- BERGAMASCO, R.C. *et al.* Sulfluramid volatility reduction by  $\beta$ -cyclodextrin. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, D.C., v. 53, p. 1139-1143, 2005.
- BERNA, P. *et al.* One-step affinity purification of recombinant cyclodextrin glycosyltransferase by (Cu, Zn tandem column) immobilized metal ion affinity chromatography. *Nat. Cell Biol.*, London, v. 15, p. 521-535, 1996.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, Zürich, v. 72, p. 248-254, 1976.
- DELBOURG, M.F. *Modulation de l'activité de cyclodextrine glucosyltransférases en présence de polyéthylène glycol.* 1991. Tese (Doutorado)–Université de Technologie de Compiègne, França, 1991.
- DEL VALLE, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.*, Salamanca, v. 39, p. 1033-1046, 2004.
- DUCHÊNE, D. *et al.* Les cyclodextrines nature, origine et intérêt en pharmacie galénique. *Labo-Pharma - Probl. Tech.*, Paris, v. 32, p. 843-850, 1984.
- DUCHÊNE, D.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 320, p. 1-11, 2007.
- GAWANDE, B.N.; PATKAR, A.Y. Purification and properties of a novel raw starch degrading-cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS-22. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v. 28, p. 735-743, 2001.
- HAMON, V.; MORAES, F.F. *Etude Préliminaire a L'immobilisation de la CGTase WACKER.* Compiègne: Laboratoire de Technologie Enzymatique, Université de Technologie de Compiègne, 1990. (Relatório de pesquisa).
- HORIKOSHI, K. Enzymology and molecular genetics of CD-forming enzymes. *In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CYCLODEXTRINS*, 4., 1988. Dordrecht. *Proceedings...* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 7-17.
- LEE, J.; KIM, H.S. Enhancement of enzymatic production of cyclodextrin by organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v. 13, p. 499-503, 1991.
- MATIOLI, G. *et al.* Production and purification of CGTase of alkalophilic bacillus isolated from brazilian soil. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Totowa, v. 70-72, p. 267-275, 1998.
- MATIOLI, G. *et al.* *Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais.* Maringá: Eduem, 2000. p. 3-5.
- NAKAMURA N.; HORIKOSHI, K. Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase-producing alkalophilic *Bacillus* sp. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, D.C., v. 40, p. 753-757, 1976.
- NOMOTO, M. *et al.* Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic bacterium of Taiwan. *Agric. Biol. Chem.*, Tokyo, v. 48, p. 1337-1338, 1984.
- SZEJTLI, J. *Cyclodextrin technology.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988.
- TARDIOLI, P.W. *et al.* Characterization of *Thermoanaerobacter* cyclomaltodextrin glucanotransferase immobilized on glyoxyl-agarose. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v. 39, p. 1270-1278, 2006.

Received on February 16, 2006.

Accepted on July 04, 2007.