

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE PELA BACTÉRIA
ALCALÓFILA *Bacillus circulans* ATCC 21783: CULTIVO EM BATELADA,
BATELADA ALIMENTADA E ESTADO SEMI-SÓLIDO**

Flávia Santos Twardowski Pinto

Porto Alegre

2007

CIP - CATALOGAÇÃO INTERNACIONAL NA PUBLICAÇÃO

P659p Pinto, Flávia Santos Twardowski

Produção de ciclodextrina glicosiltransferase pela bactéria alcalófica *Bacillus circulans* ATCC 21783: cultivo em batelada, batelada alimentada e estado semi-sólido. / Flávia Santos Twardowski Pinto. Porto Alegre: UFRGS, 2007.

70f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, BR-RS, 2007. Plinho Francisco Hertz, Orient.; Simone Hickmann Flôres, Co-orient.

1. *Bacillus circulans* 2. Cultivo em batelada 3. Batelada alimentada e estado semi-sólido 4. Ciclodextrina glicosiltransferase I. Hertz, Plinho Francisco, Orient. II. Flores, Simone Hickmann, Co-orient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE PELA BACTÉRIA
ALCALÓFILA *Bacillus circulans* ATCC 21783: CULTIVO EM BATELADA,
BATELADA ALIMENTADA E ESTADO SEMI-SÓLIDO**

Flávia Santos Twardowski Pinto
(Engenheiro de Alimentos – UFRGS)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Porto Alegre
2007

Flávia Santos Twardowski Pinto

Engenheiro de Alimentos – UFRGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em: 28/02/2007
Pela Banca Examinadora:

Homologado em: 04/04/2007
Por

Plinho Francisco Hertz
Orientador – PPGCTA/UFRGS

Erna Vogt de Jong
Coordenador do Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos (PPGCTA)

Simone Hickmann Flores
Co-orientadora - UFRGS

Adriano Brandelli
Banca – UFRGS

Adriano Brandelli
Diretor do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos ICTA/UFRGS

Júlio Xandro Heck
Banca - UFRGS

Ranulfo Monte Alegre
Banca - UNICAMP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela benção da vida.

Ao professor Plinho Francisco Hertz pela fantástica orientação. Por ter participado intensamente na minha formação e me ensinado que o aprendizado é mais importante que belos resultados. Por jamais ter duvidado do projeto e de mim, instigando-me incessantemente.

À professora Simone Hickmann Flôres por mais uma vez ter-me mostrado as ferramentas estatísticas contribuindo imensamente para todo este trabalho. Foi amiga, conselheira e ótima mediadora.

Ao professor Marco Antônio Zachia Ayub pela contribuição imensurável a este trabalho e a minha formação pessoal.

A professora Rosane Rech pela solicitude.

A todos os colegas de laboratório pelo companheirismo e tolerância. Em especial ao Luís Henrique por ter me ensinado a desvendar os biorreatores.

À Ângela Cristina e Débora pela amizade, disponibilidade e ajuda que deram cor e alegria a estes quase dois anos de trabalho, apoiando-me sempre que mais precisei.

Aos colegas do PPGCTA pelos momentos inesquecíveis.

Aos meus bolsistas Carolina Elisa, Maurício e Karla meus mais sinceros agradecimentos. Em especial à Carolina pela autonomia, responsabilidade e flexibilidade contribuindo para o bom andamento dos trabalhos.

Aos meus pais por acreditaram no meu potencial e me impulsionaram a sempre dar o melhor de mim.

E, finalmente ao grande amor da minha vida, Eduardo pela paciência e compreensão. Por ter amenizado minha ansiedade apoiando-me sempre, nas decisões mais difíceis da minha vida: fazer o mestrado foi uma delas.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará

ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

PRODUÇÃO DE CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE PELA BACTÉRIA ALCALÓFILA *Bacillus circulans* ATCC 21783: CULTIVO EM BATELADA, BATELADA ALIMENTADA E ESTADO SEMI-SÓLIDO ¹

Autor: Flávia Santos Twardowski Pinto
Orientador: Prof. Plinho Francisco Hertz

RESUMO

A ciclodextrina glicosiltransferase [E.C. 2.4.1.19; CGTase] é uma enzima industrialmente importante, usada para produzir ciclodextrinas. Neste trabalho foi utilizado o planejamento experimental e a metodologia de superfície de resposta a fim de identificar as melhores condições para a produção de CGTase pela bactéria alcalófila *Bacillus circulans*. As melhores condições de temperatura e pH, para a produção de CGTase foram, respectivamente, 36 °C e 9,7. Em seguida, utilizando estes parâmetros otimizados, a produção de CGTase foi avaliada em cultivos submersos, batelada e batelada alimentada, e em cultivo semi-sólido (CSS), usando um resíduo fibroso de soja (SIFR) como substrato. Nos cultivos em batelada, a atividade máxima de CGTase obtida foi de 1155 U.mL⁻¹, em aerobiose. A produção de CGTase foi bastante influenciada pelo fluxo de ar e pela agitação, sendo que uma alta produtividade enzimática (155 U.(mLh)⁻¹) foi obtida em condições de aeração moderada (400 rpm para a velocidade de agitação e 1,7 vvm para o fluxo de ar). Com estes parâmetros otimizados, a produtividade de CGTase obtida em cultivo em batelada alimentada foi de 137 U.(mLh)⁻¹, com uma taxa de alimentação de 0,17 g.(Lh)⁻¹. O crescimento celular e a síntese de CGTase, usando o resíduo fibroso de soja como substrato apresentou um rendimento de 32.776 U.g_(SIFR)⁻¹. As diferentes abordagens utilizadas neste trabalho poderão ser aplicadas para a produção de outras enzimas amilolíticas e também para a produção de CGTase com outros substratos.

Key words: *Bacillus circulans*; cultivo em batelada, batelada alimentada e estado semi-sólido; ciclodextrina glicosiltransferase

^{1/} Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos (área de concentração Bioquímica), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, fevereiro de 2007.

PRODUCTION OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE BY ALKALOPHILIC *Bacillus circulans* ATCC 21783 ¹: BATCH, FED-BATCH AND SOLID STATE CULTIVATIONS

Author: Flávia Santos Twardowski Pinto
Supervisor: Prof. Plinho Francisco Hertz

ABSTRACT

Cyclodextrin glycosyltransferase [E.C. 2.4.1.19; CGTase] is an industrially important enzyme, which is used to produce cyclodextrins. In this study we report the use of experimental factorial design and response surface methodology to find the best conditions for CGTase production by alkaliphilic *Bacillus circulans*. The optimized calculated values for the tested variables were pH 9.7 and temperature 36°C. The CGTase production was further studied with the optimized process parameters on submerged cultivations (SC), batch or fed-batch, and solid-state cultivations (SSC) using soybean industrial fibrous residue (SIFR). The maximum CGTase activity obtained on batch cultivation was 1,155 U.mL⁻¹ under aerobic conditions. The CGTase production was strongly affected by air flow rate and agitation speed, showing high enzyme productivity (155 U.mL⁻¹h⁻¹) under moderate conditions of aeration (400 rpm for speed agitation and 1.7 vvm for air flow rate). With these optimized process parameters, CGTase productivity obtained on fed-batch cultivations was 137 U.mL⁻¹h⁻¹, with feeding rate at 0.17 g.L⁻¹h⁻¹. Cell growth and CGTase synthesis in SSC using soybean industrial fibrous residue as substrate was excellent, with CGTase yield of 32,776 U.g(SIFR)⁻¹. The different approaches used in this study may also find applications for the production of other starch-converting enzymes and also for other CGTase-producing substrates.

Key words: *Bacillus circulans*; batch, fed-batch and solid-state cultivation; cyclodextrin glycosyltransferase

¹/ Master of Science dissertation on Food Science and Technology, (Area of Biochemistry), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, February, 2007.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Ciclodextrinas.....	11
1.2 Ciclodextrina glicosiltransferase	14
1.3 Produção de ciclodextrina glicosiltransferase	18
1.4 Aplicação de planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta em biotecnologia	19
2 RESULTADOS	21
2.1 Production of cyclodextrin glycosyltransferase by alkaliphilic <i>Bacillus circulans</i> on submerged and solid-state cultivation	22
2.2 Batch and fed-batch production of cyclodextrin glycosyltransferase by alkaliphilic <i>Bacillus circulans</i>	44
3 DISCUSSÃO GERAL.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
APÊNDICES	67
APÊNDICE A	68
APÊNDICE B.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas das α -, β - e γ -clodextrinas.....	12
Figura 2: Estrutura e propriedades das ciclodextrinas.....	12
Figura 3: Representação esquemática das reações catalisadas pela ciclodextrina glicosiltransferase.	16
Figura 4: Reação de ciclização da ciclodextrina glicosiltransferase	17
2.1 Production of cyclodextrin glycosyltransferase by alkaliphilic <i>Bacillus circulans</i> on submerged and solid-state cultivation	
Figure 1: Contour plot for the effects of temperature and pH on CGTase activity of <i>B. circulans</i> ATCC 21783.....	40
Figure 2a: Production of CGTase on SC under optimized conditions: 600 rpm and air flow rate 2 vvm.....	41
Figure 2b: Production of CGTase on SC under optimized conditions: 400 rpm and air flow rate 1 vvm.....	42
Figure 3: Production of CGTase on SSC under optimized conditions.....	43
2.2 Production of cyclodextrin glycosyltransferase by alkaliphilic <i>Bacillus circulans</i> : batch and fed-batch cultivations	
Figure 1: Contour plot for the effects speed agitation and air flow rate on CGTase productivity of <i>B. circulans</i> ATCC 21783.....	54
Figure 2: Production of CGTase in run number 10 (400 rpm and 2 vvm):.....	55
Figure 3: Production of CGTase in run number 8 (400 rpm).....	56
Figure 4: Production of CGTase on fed-batch (400 rpm and 1.7 vvm).....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades das ciclodextrinas.....	13
2.1 Production of cyclodextrin glycosyltransferase by alkaliphilic <i>Bacillus circulans</i> on submerged and solid-state cultivation	
Table 1: Experimental design and results according to the 2 ² full factorial central composite design.....	37
Table 2: Analysis of variance (ANOVA) for the model regression for CGTase	38
2.2 Production of cyclodextrin glycosyltransferase by alkaliphilic <i>Bacillus circulans</i> : batch and fed-batch cultivations	
Table 1: Real values and coded levels, results for CGTase activity and k_{1a}	58

1 INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial juntamente com a exigência dos mercados consumidores por produtos seguros e de qualidade foram decisivos para o aumento do desenvolvimento de novos produtos com o intuito de melhorar a qualidade e aumentar a vida de prateleira dos mesmos. Por isso, o interesse da utilização de ciclodextrinas, principalmente no processamento de alimentos e em fármacos, vem crescendo com o decorrer dos últimos anos. Em 1998, a β -ciclodextrina passou a fazer parte da lista GRAS (generally recognized as safe), o que acarretou o aumento nas pesquisas sobre sua produção e utilização.

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos compostos de resíduos de glicose sintetizados exclusivamente pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase. Estes açúcares possuem hidroxilas na sua parte externa tornando-os solúveis em água ao passo que seu interior é hidrofóbico. Desta forma, as ciclodextrinas possuem a habilidade de formar complexos de inclusão, limitadas apenas por restrições estereoquímicas de sua cavidade interna rígida.

A encapsulação molecular de compostos lipofílicos e hidrofóbicos por ciclodextrinas melhora a estabilidade de aromas, vitaminas, cor e gorduras insaturadas presentes nos alimentos, aumentando a vida de prateleira destes e, algumas vezes, sua aceitabilidade. Outras aplicações podem ser identificadas na indústria farmacêutica, onde as ciclodextrinas são utilizadas *in natura* ou modificadas, como por exemplo pela adição de um grupamento metila em seu anel.

Por ser um aditivo multifuncional, as ciclodextrinas podem ser aplicadas na indústria de alimentos também como agente estabilizante. Como exemplo desta aplicação cita-se a encapsulação de compostos de cor do ketchup impedindo que ocorra oxidação durante o seu processamento que alcança 100°C. Outra aplicação da ciclodextrina é em hidrolisados de caseína de leite, uma fonte de proteína prontamente digerível. Neste caso, a adição de β -ciclodextrina à proteína hidrolisada elimina o residual amargo da mesma, não eliminando as propriedades nutricionais além de ampliar a aplicação industrial da proteína a outros alimentos.

O aumento da aplicação das ciclodextrinas em alimentos e fármacos faz com que a otimização da produção de CGTase seja essencial. Frente a essa necessidade este trabalho

visa, primeiramente, a avaliação das condições ótimas de produção enzimática em incubadora agitadora orbital, estudando duas fontes de carbono na síntese enzimática, e em uma segunda etapa, busca otimizar a produção de CGTase em biorreator em processo de batelada, testando também o crescimento e síntese enzimática em processo de cultivo de batelada alimentada e estado semi-sólido, abrindo portanto perspectivas para produção desta enzima em diversificados bioprocessos industriais.

1.1 Ciclodextrinas

Conforme o histórico de Pszczola (1988) foi Villiers, em 1891, o primeiro pesquisador a relatar a existência das ciclodextrinas (CDs) após hidrolisar o amido com a bactéria *Bacillus amylobacter*, denominando este composto como celulosina. Em 1904, Schardinger caracterizou as CDs como dextrinas de Schardinger identificando o *Bacillus macerans* como seu produtor. Em 1938, Freudenberg verificou a estrutura das CDs e detectou sua habilidade de formar complexos de inclusão. Tilden e Hudson (1939), descobriram que uma amilase era a responsável pela sua produção, comprovando que as CDs não eram produtos sintetizados durante o metabolismo microbiano, sendo compostos oriundos da ação extracelular de uma enzima microbiana. Somente na década de 50 é que as pesquisas sobre CDs começaram a aumentar.

As CDs são, portanto oligossacarídeos cíclicos compostos de unidades de glicose (α -D-glucopiranosose) unidas por ligações α -1,4. Existem três formas mais comuns de CDs que são classificadas de acordo com o número de resíduos glicosil na molécula: 6, 7 ou 8 unidades de glicose chamados de α , β e γ -CDs, respectivamente (Figura 1).

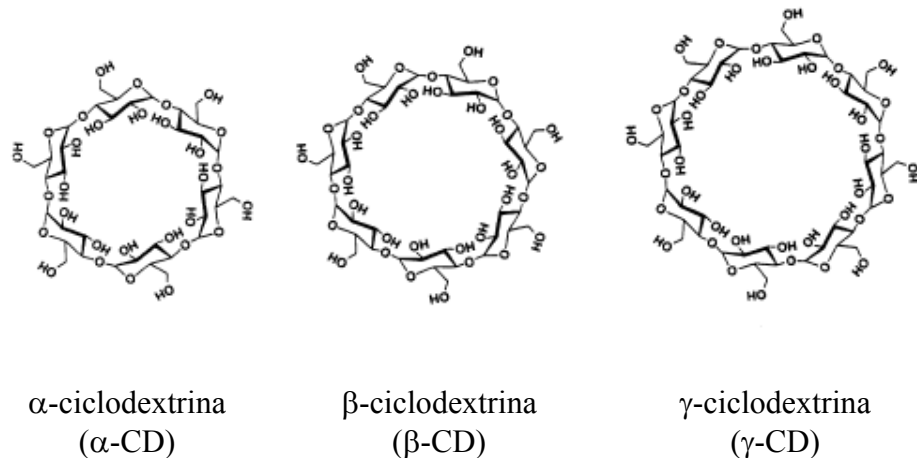


Figura 1: Estruturas das α -, β - e γ -ciclodextrinas

Fonte: FIEDLER; PAJATSCH; BÖCK (1996).

Estes oligossacarídeos são relativamente estáveis devido à ausência das unidades de glicose redutoras e não-redutoras além de serem resistentes a ação da maioria das exoamilases (TONKOVA, 1998).

A molécula de CD possui o exterior hidrofílico, podendo ser dissolvida em água e uma cavidade interna apolar, possibilitando às CDs a capacidade de formar complexos de inclusão com uma ampla variedade de moléculas hidrofóbicas (Figura 2) (VAN DER VEEN et al., 2000a).

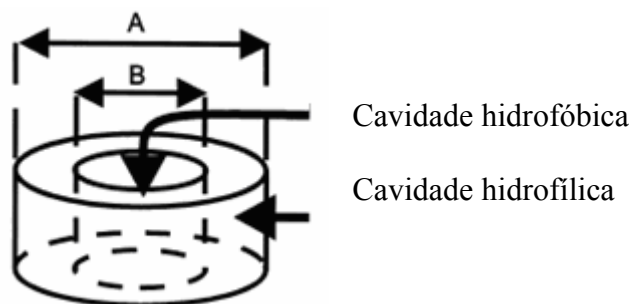


Figura 2: Estrutura e propriedades das ciclodextrinas: forma e propriedades tridimensionais;
Fonte: VAN DER VEEN et al. (2000a).

A complexação ocorre quando uma molécula hospedeira preenche totalmente ou em parte a cavidade interna da CD, podendo formar complexos com compostos sólidos, líquidos ou gasosos. Para tanto, o tamanho da molécula a ser encapsulada deve ser compatível com o

tamanho da cavidade interna da CD. Os complexos de inclusão são relativamente estáveis e facilmente separados das soluções devido a sua cristalinidade (PSZCZOLA, 1988).

A forma tridimensional e o tamanho das moléculas de CDs (tabela 1) nos fornecem importantes informações com respeito à formação dos complexos com compostos hidrofóbicos ou grupos funcionais. A formação destes complexos de inclusão ocorre a nível molecular e pode ocasionar trocas das propriedades físicas e químicas das moléculas incluídas, bem como a alteração do meio onde as moléculas de CDs estão. É importante ressaltar que dentre as CDs mais usualmente utilizadas, a β -CD apresenta a menor solubilidade, sendo industrialmente a mais facilmente recuperada através do processo de cristalização. Por isso, a produção de β -CD, atualmente, é a mais economicamente viável, sendo seu custo para aplicações industriais em torno de US\$ 5-6/kg. Já a α -CD e a γ -CD necessitam processos mais sofisticados de recuperação, sendo necessárias operações unitárias de purificação ficando o custo, respectivamente, em torno de US\$ 20-25/kg e US\$ 80-100/kg (SZENTE; SZEJTLI, 2004).

Tabela 1: Propriedades das ciclodextrinas

Característica	α -ciclodextrina	β -ciclodextrina	γ -ciclodextrina
Número de monômeros de glicose	6	7	8
Peso Molecular (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade em água (g/L - 25°C)	145	18,5	232
Diâmetro externo (Å)	14,6	15,4	17,5
Diâmetro interno (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Volume da cavidade interna (Å ³)	174	262	427

Fonte: Adaptada de VAN DER VEEN et al. (2000a).

As características destes oligossacarídeos cíclicos têm proporcionado uma ampla possibilidade de pesquisa relacionada ao estudo das diversas aplicações em química analítica, agricultura, biotecnologia, farmácia e cosméticos. Como consequência da formação de complexos de inclusão das CDs com as moléculas incluídas tem-se a estabilização de compostos sensíveis à luz ou oxigênio, estabilização de compostos voláteis, alteração de reatividade química e aumento da solubilidade (VAN DER VEEN et al., 2000a).

As β -CDs, CDs de tamanho intermediário, foram aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso alimentício em 1998. A microencapsulação de compostos

hidrofóbicos em β -CD vem sendo reconhecida, nos últimos anos, como um método eficiente para proteção de aromas e sabores contra a oxidação, degradação ao calor e evaporação na indústria de alimentos. Os produtos de inclusão nestas moléculas costumam apresentar maior vida de prateleira em comparação aos agentes encapsulantes utilizados pelo método de atomização, como por exemplo, os amidos modificados (SZENTE; SZEJTLI, 2004).

Na indústria alimentícia, as CDs podem ser utilizadas especificamente para: extrair componentes específicos através de separação líquido-líquido favorecendo a extração de componentes amargos de frutas cítricas ou proteínas hidrolisadas; extração de cafeína do café ou chá; compostos de aroma oleosos podem ser extraídos diretamente de fontes naturais, como alho e cebola, sem a necessidade da utilização de solventes ou de processo de destilação; remoção de colesterol da gordura do leite ou da gema de ovos; remoção de ácidos graxos livres de gorduras para melhorar as propriedades de frituras; encapsulação de vitaminas lipofílicas e vitaminas do complexo B para proteção contra oxidação, degradação térmica e reações com outros componentes e para estabilização de óleos essenciais voláteis de chá (CEREDA, 2003).

1.2 Ciclodextrina glicosiltransferase

A ciclodextrina glicosiltransferase [CGTase; 1,4- α -D-glucana: 1,4- α -D-glicopiranosil transferase; EC 2.4.1.19] é uma enzima da família 13 das α -amilases que possui a habilidade de converter o amido e seus substratos em ciclodextrinas. Um aspecto característico das enzimas da família das α -amilases é que todas utilizam o mecanismo de α -conservação, porém seu substrato ou especificidade de produto é largamente variável (VAN DER MAAREL et al., 2002). A principal diferença entre as CGTase e demais α -amilases é a presença de um domínio adicional na porção C-terminal da enzima (VAN DER VEEN et al., 2000a).

De acordo com VAN DER VEEN et al. (2000a), as enzimas da família das α -amilases possuem uma série de características em comum: agem sobre as ligações α -glicosídicas e hidrolisam esta ligação produzindo mono ou oligossacarídeos por hidrólise ou formam ligações α -1,4 ou ligações α -1,6 por transglicosilação; possuem estrutura $(\beta/\alpha)_8$ e possuem quatro regiões altamente conservadas na seqüência primária. Porém, uma enzima em particular da família das α -amilases, a CGTase destaca-se por possuir a habilidade de catalisar

reações de transglicosilação intramolecular e intermolecular (Figura 3). A reação de transglicosilação intramolecular, também chamada de ciclização, ocorre quando a cadeia de um oligossacarídeo linear (amido ou maltodextrina) é clivada e um novo açúcar com final redutor é transferido para o açúcar não redutor da mesma cadeia (Figura 4). Mais especificamente, o aminoácido Asp 229 da enzima liga-se ao oligossacarídeo linear formando um intermediário covalente e a cadeia linear passa a assumir a conformação cíclica (UITDEHAAG et al., 2002).

Esta enzima também catalisa duas reações de transglicosilação intermolecular designadas como acoplamento e desproporcionalização. A reação de acoplamento é reversa a ciclização e ocorre quando o anel da ciclodextrina é clivado e transferido para um substrato, o maltooligossacarídeo aceptor. A reação de desproporcionalização ocorre quando o maltooligossacarídeo linear é clivado e um novo açúcar com final redutor é transferido para um substrato de maltooligossacarídeo aceptor. A enzima possui ainda uma fraca atividade hidrolítica. (VAN DER VEEN et al., 2000b).

Ao contrário da pequena similaridade na estrutura primária das enzimas da família 13 (menor que 30 %), sua estrutura tridimensional é muito semelhante. As α -amilases geralmente possuem três domínios estruturais A, B e C, tendo a CGTase cinco domínios marcados de A a E. O domínio A é o domínio $(\alpha/\beta)_8$ catalítico, sendo este comum as enzimas da família da α -amilase e o mais conservado. O domínio B contribui com a ligação da enzima ao substrato (STROKOPYTOV et al., 1996; UITDEHAAG, 1999). Os domínios C e E tem conformação β e são especializados na ligação com o grão bruto do amido. A função do domínio D, que também possui conformação β , é ainda desconhecida (UITDEHAAG et al., 2002).

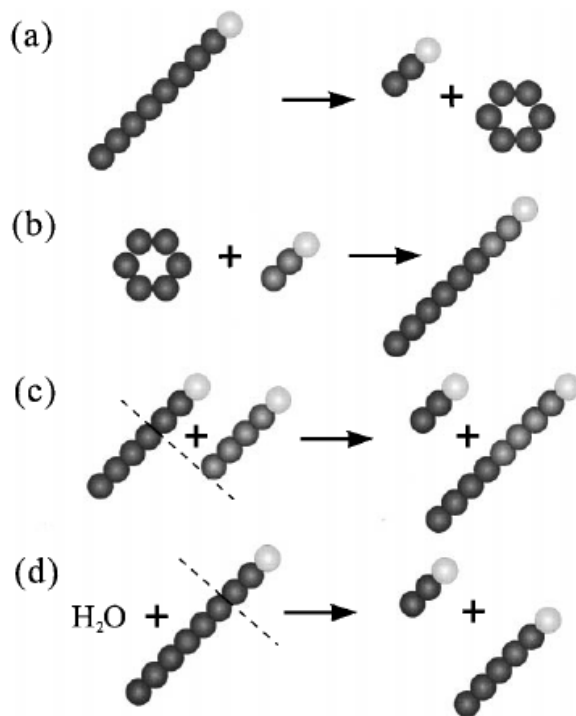


Figura 3: Representação esquemática das reações catalisadas pela ciclodextrina glicosiltransferase. As esferas representam os resíduos de glicose; os círculos claros indicam os finais redutores dos açúcares. Reações: (a) ciclização; (b) acoplamento; (c) desproporcionalização; (d) hidrólise.

Fonte: FIEDLER, PAJATSCH; BÖCK (1996).

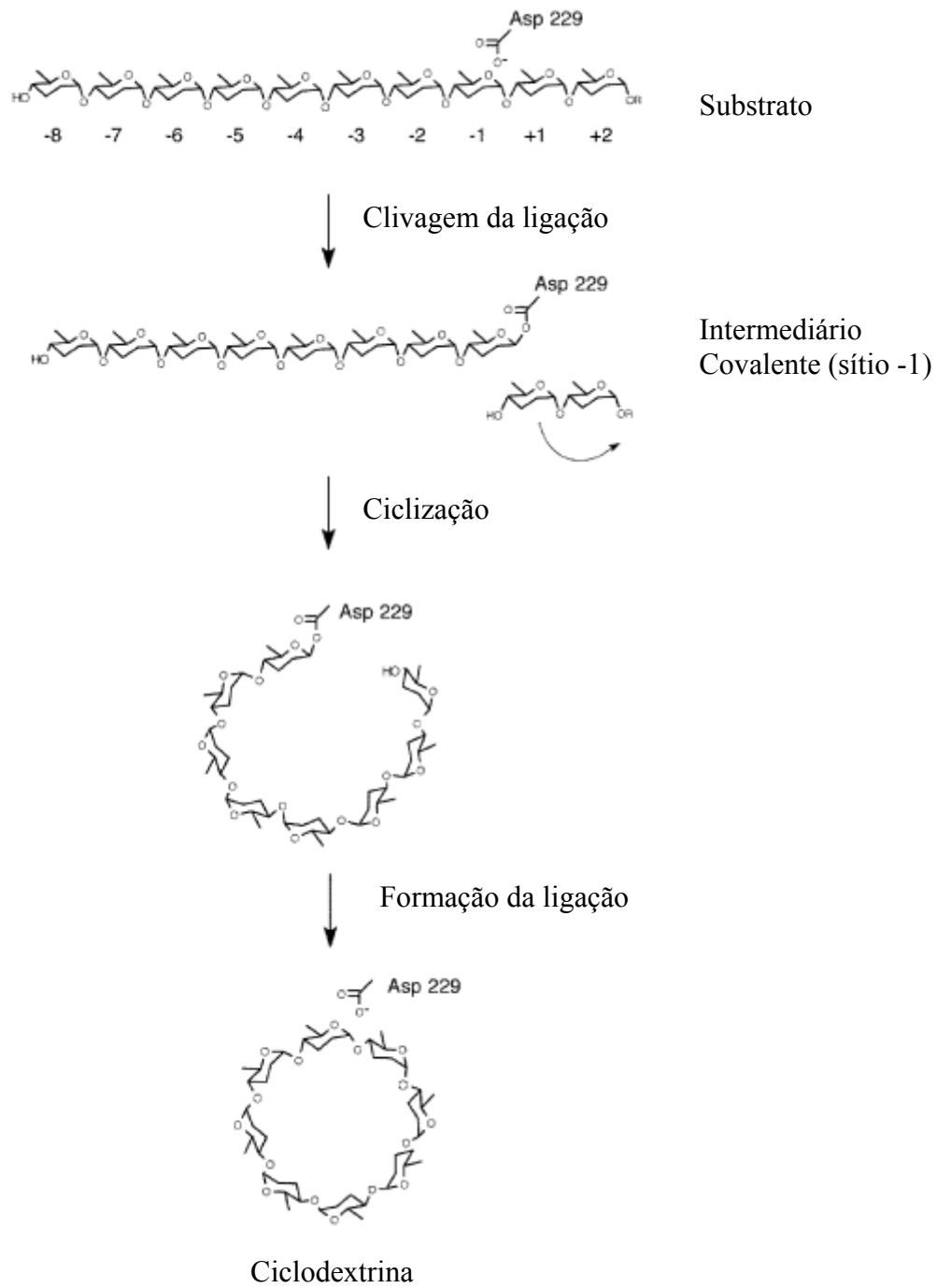


Figura 4: Reação de ciclização da ciclodextrina glicosiltransferase

Fonte: UITDEHAAG et al. (2002).

1.3 Produção de ciclodextrina glicosiltransferase

O substrato mais frequentemente utilizado para a produção da CGTase é o amido solúvel, sendo também utilizadas outras fontes de amido como farelo de trigo e caldo de maceração de milho. O amido é um polímero de alto peso molecular composto de moléculas de glicose unidas através de ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6. É encontrado em sementes ou raízes na forma de grânulos consistindo de dois tipos de polímeros, a amilopectina e a amilose. A amilopectina é altamente ramificada em ligações α -1,6, possuindo ligações α -1,4 com 15 a 45 resíduos de glicose. A amilose é linear consistindo de até 6000 resíduos de glicose com ligações glicosídicas α -1,4 (VAN DER MAAREL et al., 2002). Muitas plantas produzem amido para que este possa ser armazenado como fonte de carbono e energia (VAN DER VEEN et al., 2000a). Este amido pode ser encontrado, por exemplo, no arroz, milho, batata, mandioca.

Enquanto os organismos fotossintéticos têm a capacidade de retirar energia da luz solar, os demais precisam obter energia a partir de nutrientes presentes no ambiente (UITDEHAAG et al., 2002). Segundo van der Maarel et al. (2002), para que o amido seja utilizado, tanto pelo homem como por bactérias e fungos, é necessário à presença de enzimas que possuam a habilidade de degradação e síntese. A maioria das enzimas que transformam o amido pertence à família das α -amilases: a CGTase é uma delas e apresenta uma importância particular. Enzima extracelular, a CGTase é secretada por algumas bactérias com a finalidade de converter o amido em compostos que não poderão ser utilizados por microrganismos competidores, as ciclodextrinas (UITDEHAAG et al., 2002). São produzidas por bactérias, na sua maioria do gênero *Bacillus* mais usualmente em cultivo submerso de batelada (TONKOVA, 1998). A otimização de parâmetros de processos e diversificação nas formas de cultivo e de substrato passíveis de utilização são fatores que devem contribuir para a diminuição dos custos de produção em processos biotecnológicos (GAWANDE et al., 1998). No entanto, são poucos os trabalhos sobre a produção de CGTase em batelada alimentada (WEN et al., 1994; GAWANDE et al., 2003; PARK et al., 1997; ZAIN et al., 2007) e ainda mais raras as pesquisas usando os cultivos semi-sólidos (CSS) (RAMAKRISHNA, et al., 1994)

O CSS envolve a utilização de substratos insolúveis na ausência de água livre, onde o crescimento do microrganismo assemelha-se ao crescimento do mesmo, livre na natureza, em

sólidos úmidos (PANDEY, 2003). Uma das características interessantes no CSS é a simplicidade do meio de cultura, sendo normalmente utilizados resíduos agroindustriais, onde são necessários pequenos volumes de água para o crescimento do microrganismo e síntese dos metabólitos de interesse (VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2003). Pesquisas dirigidas à produção de enzimas, utilizando resíduos agroindustriais de baixo custo, visando à substituição das fontes convencionais de C e N, são importantes para viabilizar economicamente o uso das enzimas em escala comercial. Até o presente momento, foi verificado que a bactéria *Bacillus cereus* NCIMB 13123 foi capaz de crescer e produzir CGTase usando farelo de trigo como substrato em condições de CSS em frascos Erlenmeyer sem aeração (RAMAKRISHNA et al., 1994).

Os meios de culturas tradicionais para síntese de CGTase são compostos de amido como fonte de carbono, de nitrogênio e, muitas vezes, de vitaminas. O microrganismo *Bacillus cereus* NCIMB 13123 é capaz de sintetizar a CGTase a partir de outras fontes de carbono, como glicose e xilose, sendo estes melhores indutores que o amido (JAMUNA et al., 1993). Já as bactérias *Klebsiella pneumoniae* AS-22 (GAWANDE et al., 2003), *B. firmus* (GAWANDE et al., 1999), *B. macerans* (DEPINTO e CAMPBELL, 1967), *Klebsiella oxytoca* (FIEDLER et al., 1996), *B. circulans* NRRL B-380, *B. sphaerius* NRRL B-183, *Anaerobranca gottschalkii* (THIEMANN et al., 2004) são alguns exemplos de bactérias que sintetizam CGTase na presença de amido.

Existem ainda alguns estudos que relatam a produção de CGTase através de imobilização de células com alginato, encontrando-se somente linhagens de *Bacillus cereus* NCMI 13123 (JAMUNA et al., 1993), *Bacillus circulans* 21783 (SASWATHI et al., 1995), *Bacillus amyloliquefaciens* (ABDEL-NABY; REYAD; ABDEL-FATTAH, 1999). Segundo VASSILEVA et al. (2005), utilizando a imobilização das células de *Bacillus circulans* 21783 em matriz de ágar e membrana, a atividade e a produtividade enzimática são aumentadas em até 4,7 vezes e 2,9 vezes respectivamente.

1.4 Aplicação de planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta em biotecnologia

A utilização de ferramentas de otimização em bioprocessos tem aumentado com o decorrer dos anos frente à necessidade de otimizar processos e produtos, minimizando tempo

e custo bem como maximizando o rendimento, a produtividade e qualidade dos mesmos (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

A metodologia de superfície de resposta (RSM) é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais que foi introduzida por Box na década de cinquenta. Estas técnicas permitem considerar diferentes variáveis e as interações entre elas, utilizando um menor número de experimentos com a possibilidade de detectar o erro experimental, podendo otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo (NETO et al., 2001). Para tanto, deve-se: identificar os parâmetros que serão otimizados e as respostas que serão medidas; formular o plano experimental; ajustar o modelo matemático e finalmente estabelecer uma solução ótima (MONTEIRO, 1984).

Entre as estratégias utilizadas para aumentar a produção enzimática pelos microrganismos, a otimização das condições de cultivo destaca-se, sendo muitas vezes realizada pelo método tradicional de fixar diversas variáveis enquanto estuda-se outra (OH et al., 1995). Este método além de demandar um excessivo número de experimentos não verifica se existem interações entre as variáveis estudadas. Por isso, o planejamento experimental traz melhoria na qualidade da informação obtida através dos resultados uma vez que leva em consideração as variáveis estudadas individualmente bem como suas interações, diminuindo o número de experimentos, tempo e custo final do processo (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

2 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigos a serem submetidos para publicação nas revistas *Bioprocess and Biosystems engineering* e *Food Technology and Biotechnology*. Cada subtítulo deste capítulo corresponde a um destes artigos, já formatados de acordo com as normas das respectivas revistas.

2.1 Production of cyclodextrin glycosyltransferase by alkaliphilic *Bacillus circulans* on submerged and solid-state cultivation

Production of cyclodextrin glycosyltransferase by alkaliphilic *Bacillus circulans* in submerged and solid-state cultivation

Flávia Santos Twardowski Pinto, Simone Hickmann Flôres, Marco Antônio Záchia Ayub,

Plinho Francisco Hertz*

Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

Av. Bento Gonçalves, 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract

Cyclodextrin glycosyltransferase [E.C. 2.4.1.19; CGTase] is an industrially important enzyme, which is used to produce cyclodextrins. In this research, we report the use of experimental factorial design to find the best conditions of pH and temperature for CGTase production by *Bacillus circulans* var. *alkalophilus*. The optimized calculated values for the tested variables were, respectively, pH 9.7 and temperature 36 °C, with a CGTase activity of 615 U.mL⁻¹. The CGTase production was further studied with the optimized process parameters on submerged cultivations (SC) and solid-state cultivations (SSC) using soybean industrial fibrous residue (SIFR). The maximum CGTase activity obtained on SC was 1,155 U.mL⁻¹ under aerobic conditions. Cell growth and CGTase synthesis in SSC using soybean industrial fibrous residue as substrate was excellent, with CGTase activity of 32,776 U.g_(SIFR)⁻¹. These results strongly support the use of SIFR for CGTase production since it is a non-expensive residue.

Keywords: *Bacillus circulans*; submerged cultivation; solid-state cultivation; cyclodextrin glycosyltransferase

* Corresponding author. E-mail: plinho@ufrgs.br

1. Introduction

Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase; EC 2.4.1.19) is a bacterial enzyme of the α -amylase family (family 13) of glycosyl hydrolases that produces cyclodextrins from starch or starch-related substrates [1, 2]. Cyclodextrins (CDs) are cyclic α ,1-4 linked oligosaccharides mainly consisting of 6, 7 or 8 glucose residues (α -, β - or γ -cyclodextrin, respectively). They can easily form soluble inclusion complexes with a variety of hydrophobic organic substances being widely applied, particularly in pharmaceutical and food industries [3, 4].

Cyclodextrins are formed by CGTase through an intramolecular reaction of transglycosylation (cyclization), in which the enzyme cleaves the α ,1-4 glycosidic bond, while linking the reducing and non-reducing ends [5]. However, other two transglycosylation reactions and a weak hydrolyzing activity are also catalyzed [1, 2, 3, 6]. These reactions can be accomplished over a wide range of pH and temperatures, hence the growing industrial applications of CGTase [7, 8, 9].

CGTases are mainly produced by bacteria of the genus *Bacillus*, especially aerobic alkalophilic strains, being the temperature and the pH the most influential physical parameters for its production [8]. However, there are few studies regarding the effect of pH and temperature on the production of CGTases by *B. circulans*. Most of reports concerning the effect of these factors used conventional methods based on the “change-one-factor-at-a-time” in which one independent variable is studied while fixing all others at a specific level [10]. Factorial design makes possible the study of many factors simultaneously, while quantifying the effect of each of them and their possible interactions [11]. This technique is being applied in fermentation processes development in order to improve product yields, reduced process variability, time and overall costs [12, 13, 14].

CGTases are generally reported to be produced in aerobic batch submerged cultivations. In this systems, chemical composition of the culture medium is nearly homogeneous, thus it is important to consider the catabolite repression (CR) phenomenon [15]. It is known that the synthesis of CGTase can be repressed using mono- and disaccharides as carbon sources [2, 7, 16]. One way to avoid this problem is the use of fed-batch cultivations, where substrate can be fed in lower concentrations than those triggering CR. Wang et al. [16] reported that the application of exponential feeding mode in fed-batch can effectively reduce CR of γ -CGTase by *Bacillus macorous*. Another alternative for enzyme production is the use of solid-state cultivations (SSC), which seems to induce no catabolite repression, mainly because substrate availability to cells is controlled by the possible existence of microscopic gradients within the mass of cell aggregates, or the changes in cell permeability to sugars [15]. SSC usually requires low capital investments and allows the use of cheap agro-industrial by-products, such as soybean industrial fibrous residues (SIFR) derived from the process of isolated protein production [17].

In this research we investigated the production of CGTase by *B. circulans* in both submerged and solid-state cultivations. Primarily, we optimized the combined effects of temperature and pH on the enzyme production through experimental factorial design and the response surface methodology in order to develop a mathematical correlation model for these variables, which may be tested in both types of cultivations. Finally, we also evaluated the possibility of using soybean industrial fibrous residue (SIFR) for CGTase production. This is the first report on SIFR use for CGTase production.

2. Material and methods

2.1. Microorganism

B. circulans ATCC 21783, a β -CGTase producer strain, was used in this study [18, 19]. Stock cultures were maintained in suspension frozen in 25 % glycerol.

2.2 Media and inoculum

2.2.1 Submerged cultivations

The medium used throughout this work (standard medium) comprised, in g.L^{-1} , the following components: soluble starch or glucose, 2; peptone, 5; yeast extract, 5; MgSO_4 , 0.2; K_2HPO_4 , 1. Sterile sodium carbonate was used to adjust the medium pH after autoclaving. Cultures were grown in 500 mL Erlenmeyer flasks filled with 100 mL of standard medium (initial pH 9.8 - 10.0) at 37 °C in a rotatory shaker, 150 rpm, for 18 h. A volume corresponding to 5 % (v/v); $\text{OD}_{600\text{nm}}$, 1.0, was used as inoculum for submerged cultivation.

2.2.1 Solid-state cultivations

SSC inoculum medium consisted of 30 g.L^{-1} of SIFR, which composition is described elsewhere [17]. Sterile sodium carbonate was used to adjust the medium pH after autoclaving. Cultures were grown in 1 L Erlenmeyer flasks filled with 240 mL of medium (initial pH 9.8 - 10.0) at 37 °C in a rotatory shaker, 150 rpm, for 24 h.

2.3 Cultivation Procedures

2.3.1 Factorial design and statistical analysis

The effects of media pH and temperature of cultivation, which varied according to the experimental design, were studied in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of standard medium. Cultivations were carried out on a rotatory shaker at 150 rpm, for 12 h. All experiments were carried out in duplicates. A 2^2 full factorial central composite design was used to show the statistical significance of pH and temperature on production of CGTase. A total of 11 sets of experiments were employed in this study to determine the significance

factors affecting the CGTase activity (Table 1). In the statistical model, Y is the measured response and denotes units of CGTase activity. The coded settings were defined as follows (equation (1)):

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \quad (1)$$

where x_i is the coded value of the independent variable, X_i is the real value of the independent variable, X_0 is the real value of the independent variable in the central point, and ΔX_i is the step change value. The range and the level of the variables investigated in this study were given in table 2. The quadratic model for predicting the optimal point was expressed according to equation (2):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon \quad (2)$$

where, Y represents the response variable, β_0 is the interception coefficient, β_1 and β_2 are the linear terms, β_{11} and β_{22} are the quadratic terms, and x_1 and x_2 represent the studied variables. The statistical significance of the second-order model was evaluated by the F -test analysis of variance (ANOVA). Statistica for Windows 5.0 was used for regression and graphical analysis.

2.3.2 Submerged cultivation on bioreactors

Submerged batch cultures were performed in a lab scale 2 L stirred tank (Biostat B model, B. Braun Biotech International, Germany), filled with 1.5 L of sterile standard medium at 400 rpm, 1.0 vvm or 600 rpm, 2.0 vvm, for 12 h. Temperature and initial pH of bioreactors were set up accordingly with the optimized process parameters obtained in previous experiments.

The antifoam 204 (organic non-silicone Emulsiort, Sigma) was used for foaming control. All experiments were carried out in duplicate.

2.3.2 Solid-state bioreactors

SSC were carried out using a 500 mL packed-bed bioreactor, composed of a column with the solid substrate retained on a perforated base (60 mm diameter, 170 mm height), designed and built in our laboratory [17]. Bioreactors were loaded with 19.4 g of SIFR soaked in 120 mL of distilled water. After sterilization, SSC medium was mixed with 20 mL inoculum and put into the bioreactor. During cultivation, humidified sterile air was supplied at a constant flow of 500 mL.min⁻¹. Temperature and initial pH of bioreactors were set up accordingly with the optimized process parameters, for 96 h. All experiments were carried out in duplicates.

2.4. Analytical methods

Samples of submerged cultivations (10 mL) were centrifuged at 3,500 g for 15 min at 4 °C. The cell-free supernatant was used for the estimation of enzyme activity, total protein and for pH determinations.

2.4.1 CGTase activity assay

CGTase cyclization activity was determined using the phenolphthalein method assay [20] with modifications as follows. Reaction mixture, containing 26 mg of soluble starch in 0.65 mL of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.0), and 0.35 mL of crude enzyme was incubated at 60 °C for 15 min. The reaction was stopped by addition of 4 mL of 0.04 mM phenolphthalein dissolved in 125 mM Na₂CO₃ solution. The absorbance was then measured at 550 nm. A standard curve was prepared with β-CD. One unit of CGTase activity (U) was defined as the amount of enzyme that formed 1 μg of β-CD min⁻¹ under standard conditions. Enzyme was expressed as volumetric activity (U.mL⁻¹) in the culture medium and extract from SSC. Enzyme production by SSC was also expressed as units by weight of SIFR used in SSC medium [U.g_(SIFR)⁻¹].

2.4.2 Biomass

Biomass was quantified gravimetrically as dry weight of cells. Samples were centrifuged, washed twice with cold distilled water, and dried in pre-weighted plastic tubes at 80 °C to a constant weight in vacuum-ovens.

2.4.3 Enzyme extraction from SSC

Enzyme extraction from SSC was carried out by the addition of 140 mL of distilled water with agitation at 250 rpm for 40 min. The enzyme extract was then centrifuged at 15,000 g for 15 min. The supernatant was used as the source of enzymes.

2.4.4 Protein determination

Soluble protein concentration was determined according to the Lowry assay [21] against a standard curve of bovine serum albumin, fraction V (Sigma, USA).

3. Results and discussion

3.1 CGTase assay and Preliminary growth tests

CGTase activity by *B. circulans* ATCC 21783 was studied employing the method based on complexation of phenolphthalein. The phenolphthalein assay for determination of β -CD was successfully described in previous studies [20]. The formation of the inclusion complex causes a decrease in absorbance of the phenolphthalein solution in UV-visible region that is linearly correlated with the β -CD production. A variety of methods that use this principle has been published, however it is often difficult to assess the best conditions to assure linearity and reproducibility. With the modifications in the method for the enzymatic activity described in item 2.4, we were able to increase the concentration of β -CD maintaining the linearity of plot. Whereas other authors observed linearity up to 68 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ [22] or up to 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

[23], in the present study we found a linear absorbance of phenolphthalein in proportion to β -CD concentration up to $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($R^2=0.995$).

Previously to start the optimization experiments we tested whether glucose or starch would fit best as substrate for CGTase production. *B. circulans* was able to grow in both glucose and starch, but the CGTase activity could only be detected when starch was used. Gawande et al. [24] tested different sources of carbon for growing *B. firmus* and also observed that this strain grew well on almost all carbon sources but CGTase activity was expressed only when starch was in the medium.

3.1.1 Optimization of temperature and initial pH

Central composite design (CCD) and response surface methodology (RSM) were used to optimize the conditions of temperature and initial pH for CGTase production. The range and levels of experimental variables investigated in this study are given in table 1. In treatments 3, 4 and 11, where pH was set at 11.4 or higher, the microorganism did not grow. Central points (treatments 5, 6 and 7) showed the highest levels of CGTase activity (612 , 637 and 623 U mL^{-1} , respectively) in 12 h of cultivation (table 1). These results suggest that *B. circulans* ATCC 21783 has a higher CGTase production at a moderate temperature ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) and a strong basic pH (10.0). The highest CGTase activity, 637 U.mL^{-1} (treatment 5), was 21-fold higher than previously reported [22], using the same strain under same culture conditions, excepted by the starch concentration that was 5-fold higher than that used in this study. These results suggest that the low starch concentration used in the culture medium enables a reduction of the catabolic repression in *B. circulans*. Gawande and Patkar [25] explained that high concentrations of starch led to an accumulation of glucose and maltose in the culture medium that exert a repressive effect on CGTase synthesis [7]. This frequently occurs with the synthesis of extracellular bacterial enzymes [8]. Also, high concentrations of starch results in

strong medium acidification, which decreases cell growth rate and, consequently, the enzyme production [26].

RSM was employed for the determination of significant variables and to estimate the CGTase activity as a function of temperature and pH (to take into account the possible effects of medium acidification on cell growth and enzyme production) (table 2). The computed F -value for CGTase (15.49) was 3-fold higher than the F -value in statistic tables [13], indicating that the model was significant at high confidence level (95 %). The coefficient of determination R^2 of the model was calculated to be 0.9393 indicating that the model is able to explain a 93.93 % of the variability in the response. The significance of each coefficient was determined by Student's t -test and p -values. At 95 % probability level, the linear and quadratic coefficients of x_1 (temperature), x_2 (pH) and the interaction $x_1 \cdot x_2$ were found to be significant. Temperature and pH are more significant at the second order, indicating that even small variations in their values will alter CGTase production to a considerable extent. The second order polynomial model representing the CGTase activity production (Y) in the experimental region studied can be expressed by equation (3):

$$Y = 624.27 - 69.89x_1 - 115.87x_2 - 118.41x_1^2 - 292.68x_2^2 + 52.76x_1x_2 \quad (3)$$

Figure 1 shows contour plot for the independent variables (x_1 and x_2). Contour plot indicates that temperatures over 38.5 °C and pH below 9.0 cause reduction in CGTase activity. The optimum enzyme activity was obtained with temperatures between 33 and 38.5 °C and pH around 10.

The optimized values of selected variables were obtained by solving the regression equation 3. The optimized values of the test variables in coded units are as follows: $x_1 = -0.35$, $x_2 = -0.23$. The real values obtained by substituting the respective optimized values in equation 1

are: pH 9.7 and temperature 36 °C. The model predicts that the maximum CGTase production that can be obtained using the above values of variables is 649 U.mL⁻¹. The maximum enzyme activity obtained experimentally was 615 U.mL⁻¹, which is in close agreement with the model prediction.

3.1.2 Effects of aeration in submerged cultivations

The CGTase production in submerged batch cultivations was investigated using the process parameters optimized with factorial design of experiments. The results of these batches are shown in figure 2. In the submerged cultivation at 600 rpm and 2 vvm of air flow rate (figure 2b), the exponential growth lasted for 6 h and biomass grew faster than under the less aerated condition (400 rpm and 1 vvm, figure 2a) due to the rapid utilization of starch. Although biomass was 12 % higher, there was a reduction in CGTase synthesis (512 U.mL⁻¹) suggesting the occurrence of a catabolite repression due to sudden increase of malto-oligosaccharides in medium. Maximal enzyme production of 1,155 U.mL⁻¹ occurred with 400 rpm and 1 vvm of air flow rate and was 2.3 times higher than for the most aerated system. CGTase production seems to be partially growth-associated, where maximal enzyme concentration was observed during the stationary phase. A similar pattern has been observed in the production of CGTase by *Bacillus sp.* TS1-1 [27].

These results showed a direct application of optimized parameters in CGTase production on submerged bioreactors. The results concerning different speed agitation and air flow rate showed that aeration efficiency into the medium constitutes a decisive factor in growth and enzyme production, playing an important role in scale-up of bioprocess.

3.2 Solid-state cultivations

Although SSC systems appear as a promising technology for enzyme production, the production of CGTase has generally been carried out using submerged cultivations [16, 24] with only one report on CGTase production in SSC, with *B. cereus* growing in wheat bran

carried out in static shake flasks [28]. In the present study, it has been used SIFR to investigate the growth of *B. circulans* and CGTase production. The bioreactors that we used were aerated (see item 2.3.2) and the optimized process values of 36° C and pH 9.70 were used. The time course of SSC is shown in Figure 3. The pH of the medium decreased to 5.2 in 24 h remaining in range of 5.50-5.58 over the cultivation. The enzyme activity peaked at 48 h of cultivation, reaching a staggering amount of $32,776 \text{ U.g}_{(SIFR)}^{-1}$. These results suggest a very high production of CGTase by *B. circulans* in SSC using SIFR as substrate.

4. Conclusions

In this work, it was possible to determine the best pH and temperature for the CGTase production by *B. circulans* ATCC 21783 using experimental factorial design and response surface methodology for media with low concentrations of starch. The optimized process parameters were employed in submerged and solid-state bioreactors. In submerged batch cultures, the CGTase production was strongly affected by air flow rate and agitation speed, showing high enzyme activities under moderate conditions of aeration. Concerning SSC, our results showed the good potential for producing CGTase with SIFR, which is an abundant and cheap agro-industrial by-product, as the sole substrate. The very high enzyme production along with the fact that elution can be accomplished with water in small volumes, makes this system very promising, granting further studies on process scale-up. The different approaches used in this study may also find applications for the production of other starch-converting enzymes and also for other CGTase-producing substrates.

Acknowledgments

The authors wish to thank CAPES for the scholarship of the first author and CNPq for financial support of BiotecLab.

5. References

1. Uitdehaag JCM, Mosi R, Kalk KH, van der Veen BA, Dijkhuizen L, Withers SG, Dijkstra BW (1999) X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α -amylase family. *Nature Struct Biol* 6:432-436.
2. Tonkova A (1998) Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme Microb. Technol.* 22:678-686.
3. Lejune A, Sakaguchi K, Imanaka T (1989) A spectrophotometric assay for the cyclization activity of cyclomaltohexaose (α -cyclodextrin) glucanotransferase. *Anal Biochem.* 181:6-11.
4. Biwer A, Antranikian, G, Heinzle, E (2002) Enzymatic production of cyclodextrins. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59:609-617.
5. van der Veen BA, Uitdehaag JCM, Dijkstra BW, Dijkhuizen L (2000) Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochim Biophys Acta* 1543:336-360.
6. van der Maarel MJEC, van der Veen BA, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J Biotechnol* 94:137-155.
7. Vassileva A, Burhan N, Beschkov V, Spasova D, Radoevska S, Ivanova V, Tonkova A (2003) Cyclodextrin glucanotransferase production by free and agar gel immobilized cells of *B. circulans* ATCC 21783. *Process Biochem* 38:1585-1591.
8. Priest FG (1977) Extracellular enzyme synthesis in the Genus *B.* *Bacteriol Rev* 41:711-753.
9. Horikoshi K (1999) Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:735-750.
10. Oh S, Rheem S, Sim J, Kim S, Baek Y (1995) Optimising the conditions of *LactoB. casei* YIT 9018 in tyrtone-yeast extract-glucose medium by using response surface methodology. *Appl Environ Microbiol* 61:3809–3814.

11. Box GEP, Hunter WG, Hunter SJ (1978) *Statistics for Experimenters*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
12. Chen W and Liu C (1996) Production of P-fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. *Enzyme Microb. Technol* 18:153-160.
13. Shiraia K, Guerreroa I, Huertaa S, Saucedoa G, Castillob A, Gonzalezb RO, Hallc GM (2001) Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme Microb. Technol* 28:446-52.
14. Rao KJ, Kim C, Rhee S (2000) Statistical optimization of medium for the production of recombinant hirudin from *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. *Process Biochem* 35:639-647.
15. Viniegra-González G, Favela-Torres E (2006) Why solid-state fermentation seems to be resistant to catabolite repression? *Food Technol. and Biotechnol* 44(3):397-406.
16. Wang F, Du G, Li Y, Chen J (2006) Regulation of CCR in the γ -CGTase from *B. macorous* by the specific cell growth rate control *Enzyme Microb. Technol* 39:1279-1285.
17. Heck JX, Hertz PF, Ayub MAZ (2002) Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. *Braz. J. Microbiol.* 33:213-218.
18. Nakamura N, Horikoshi K (1976) Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *B. sp.* *Agric Biol Chem* 40:935-941.
19. Nakamura N, Horikoshi K (1977) Production of Schardinger β -dextrin by soluble and immobilized cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *B. sp.* *Biotech Bioeng* 19:87-99.
20. Kaneko T, Kato T, Nakamura N, Horikoshi K (1987) Spectrophotometric determination of cyclization activity of β -cyclodextrin-forming cyclodextrin glucanotransferase. *J Jpn Soc Starch Sci* 34:45-48.

21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin–phenol reagent. *J Biol Chem* 193:256–275.
22. Mäkelä MJ, Paavilainen SK, Korpela TK (1990) Growth dynamics of cyclomaltodextrin glucanotransferase producing *B. circulans* var. *alkalophilus*. *Can J Microbiol* 36(3):176-182.
23. Goel A, Nene SN (1995) Modification in the phenolphthalein method for spectrophotometric estimation of beta cyclodextrin. *Starch* 10:399-400.
24. Gawande BN, Goel A, Patkar AY, Nene SN (1999) Purification and properties of a novel raw starch degrading cyclomaltodextrin glucanotransferase from *B. firmus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:504-509.
25. Gawande BN; Patkar AY (2001) Purification and properties of a novel raw starch degrading-cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS-22. *Enzyme Microb. Technol* 28:735-743.
26. Gawande BN, Sonawane AM, Jogdand VV, Patkar AY (2003) Optimization of cyclodextrin glycosyltransferase production from *Klebsiella pneumoniae* AS-22 in batch, fed-batch, and continuous cultures. *Biotechnol Prog* 19:1697-1702.
27. Zain WSWMd, Illias RMd.; Salleh MMd, Hassan O, Rahman RA, Hamid AA (2007) Production of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. TS1-1: Optimization of carbon and nitrogen concentration in the feed medium using central composite design. *Biochemical Engineering Journal* 33:26-33.
28. Ramakrishna SV, Saswathi N, Sheela R, Jamuna R (1994) Evaluation of solid, slurry, and submerged fermentation for the production of cyclodextrin glycosyltransferase by *Bacillus cereus*. *Enzyme Microb. Technol* 16:441-444.

Table 1: Experimental design and results according to the 2^2 full factorial central composite design

Treatment	Coded setting levels		Actual levels		CGTase activity (U.mL ⁻¹)	
	$(x_1=T; x_2=pH)$		$(X_1=T; X_2=pH)$		Observed	Predicted
	x_1	x_2	X_1	X_2		
1	-1	-1	34	8.6	449	452
2	1	-1	40	8.6	238	206
3	-1	1	34	11.4	0	114
4	1	1	40	11.4	0	80
5	0	0	37	10	612	624
6	0	0	37	10	637	624
7	0	0	37	10	623	624
8	-1.41	0	32	10	553	487
9	0	-1.41	37	8	168	206
10	1.41	0	42	10	308	290
11	0	1.41	37	12	0	0

Table 2: Analysis of variance (ANOVA) for the model regression for CGTase

Source	Sum of Squares	d.f.	Mean Square	<i>F</i> -value	<i>F</i> -value in statistic table
Model	643784.33	5	128756.87	15.49	5.05
Residual	41569.75	5	8313.95		
Lack of fit	41249.27	3	13749.76		
Pure error	320.48	2	160.24		
Total	685354.08	10			

$R^2 = 0.9393$; Standard error of estimate = 0.005, d.f., degrees of freedom; Significance level = 95 %

Figure 1: Contour plot for the effects of temperature and pH on CGTase activity of *B. circulans* ATCC 21783.

Figure 2: Production of CGTase on SC under optimized conditions: (a) 600 rpm and air flow rate 2 vvm; (b) 400 rpm and air flow rate 1 vvm: (□) pH; (●) % pO₂; (+) CGTase activity; (▲) biomass. Results are the mean of two experiments.

Figure 3: Production of CGTase on SSC under optimized conditions: (+) CGTase activity. Results are the mean of two experiments.

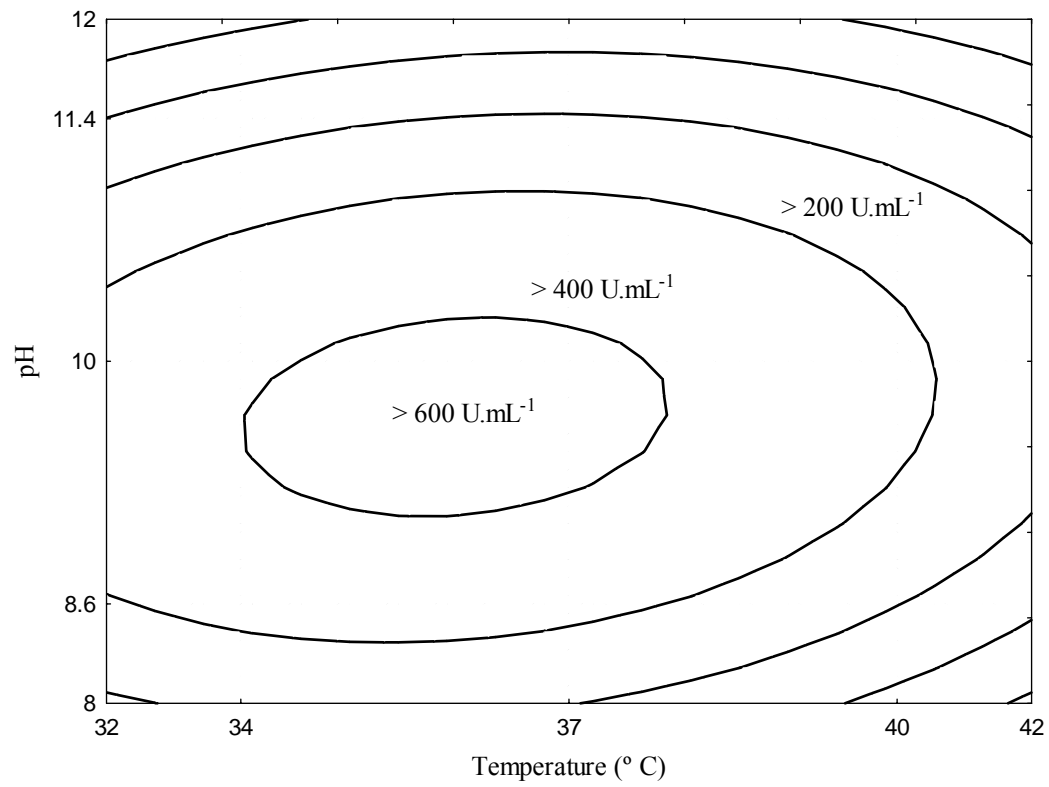


Figure 1: Contour plot for the effects of temperature and pH on CGTase activity of *B. circulans* ATCC 21783

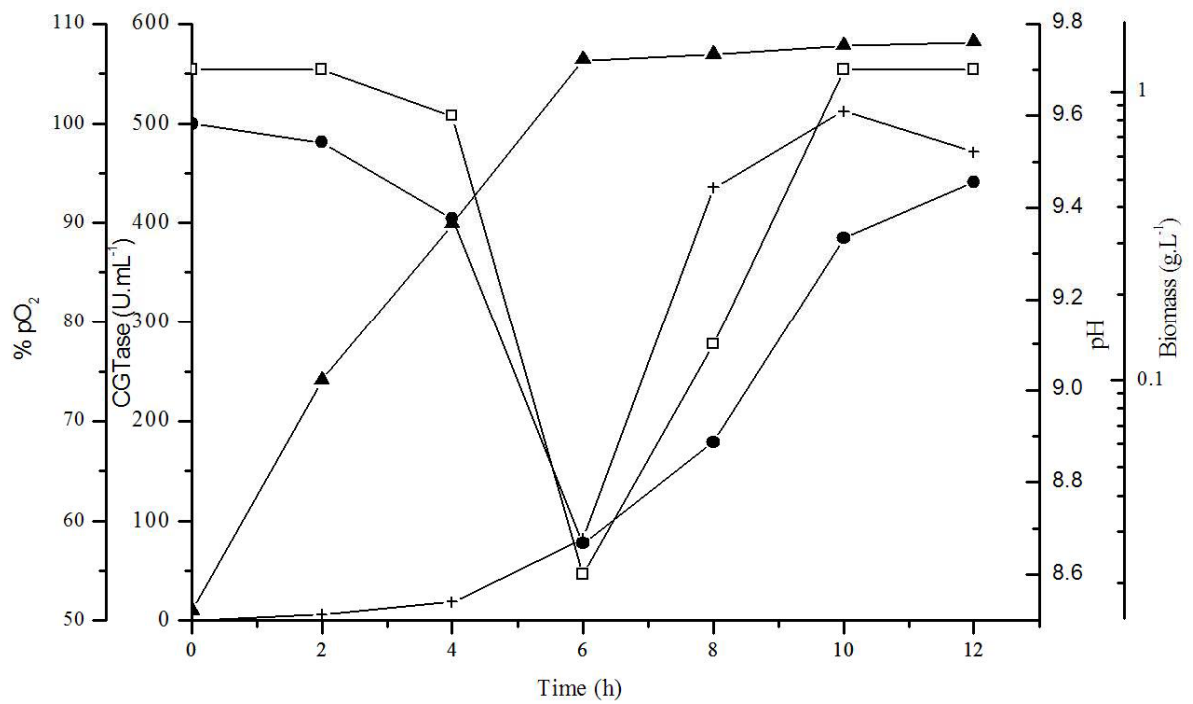


Figure 2a: Production of CGTase on SC under optimized conditions: 600 rpm and air flow rate 2 vvm: (□) pH; (●) %pO₂; (+) CGTase activity; (▲) biomass. Results are the mean of two experiments

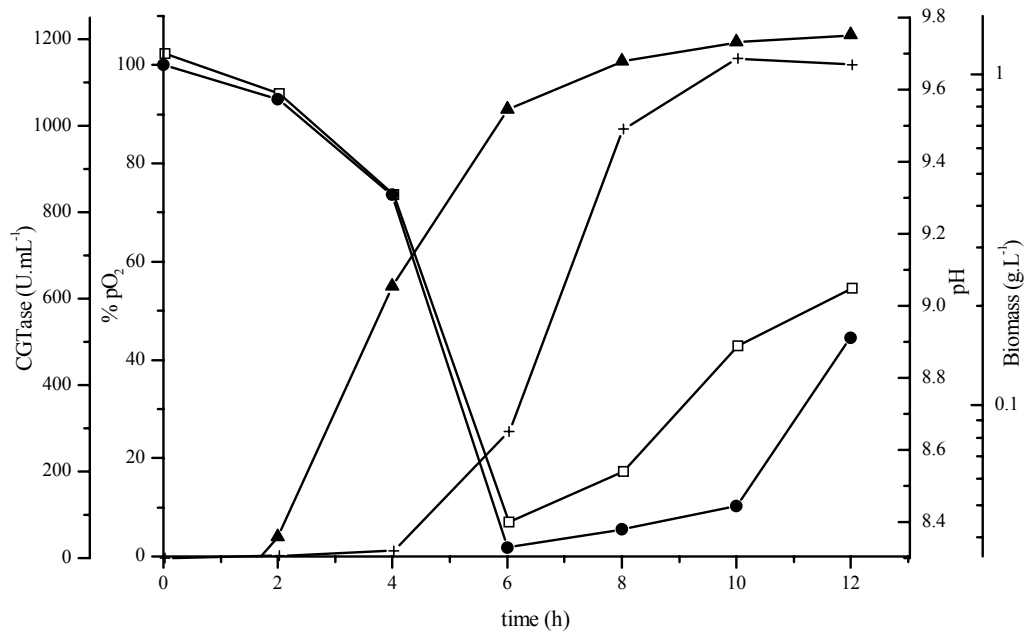


Figure 2b: Production of CGTase on SC under optimized conditions: 400 rpm and air flow rate 1 vvm: (□) pH; (●) %pO₂; (+) CGTase activity; (▲) biomass.

Results are the mean of two experiments

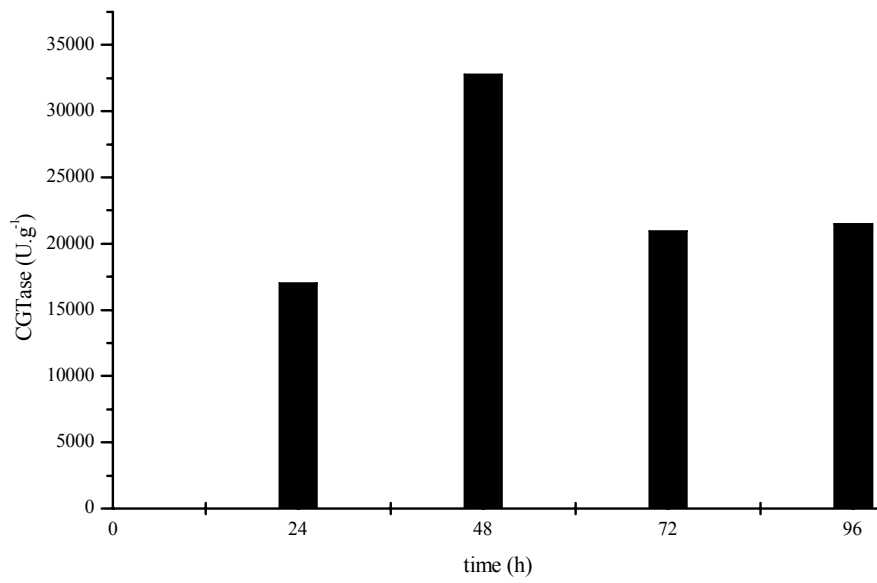


Figure 3: Production of CGTase on SSC under optimized conditions. Results are the mean of two experiments

2.2 Batch and fed-batch production of cyclodextrin glycosyltransferase by alkaliphilic *Bacillus circulans*

**Batch and fed-batch production of cyclodextrin glycosyltransferase by alkaliphilic
*Bacillus circulans***

Flávia Santos Twardowski Pinto, Simone Hickmann Flôres, Marco Antônio Záchia Ayub,
Plinho Francisco Hertz*

Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Av. Bento Gonçalves, 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Summary

Experimental design and response surface methodology were applied to optimize production of Cyclodextrin glycosyltransferase by alkalophilic *Bacillus circulans* ATCC 21783. In batch cultivations, the effects of speed agitation (200 – 600 rpm) and air flow rate (0 – 2 vvm) were evaluated to identify the significant effects and its interactions in the CGTase synthesis at 36° C and initial pH of 9.7. The best values for maximal productivity of CGTase were 400 rpm for speed agitation and 1.7 vvm for air flow rate with a CGTase productivity of 155 U.mL⁻¹h⁻¹. CGTase synthesis was also studied on fed-batch cultures with the optimized process parameters. The maximum CGTase productivity obtained on fed-batch cultivations was 137 U.mL⁻¹h⁻¹ with feeding rate at 0.17 g.L⁻¹h⁻¹.

Key words: *Bacillus circulans*; batch and fed-batch cultivation; cyclodextrin glycosyltransferase

* Corresponding author. E-mail: plinho@ufrgs.br

Introduction

Cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins, CDs) are cyclic oligosaccharides comprised of α -1, 4-linked glucose monomers consisting of mainly six, seven or eight glucose residues, which are commonly referred to as α -CD, β -CD, and γ -CD, respectively [1, 4]. The applicability of CDs arises from their cyclic molecular structure, with a hydrolytic external coating and a hydrophobic internal cavity. Due to these unique structure, the CD can form inclusion complexes with organic compounds improving their physical and chemical properties such as solubility in water, stability against oxidation, discoloration and vaporization [1]. CDs have been used in food mainly as carriers for molecular encapsulation of flavors, and other sensitive ingredients like unsaturated fatty acids and colorants [2]. These encapsulated compounds have also been also widely applied for complexation of many of relevant pharmaceutical molecules increasing drug bioavailability, solubilization of the pharmaceutically active compound and absorption of the pharmacologically active substance [3].

CDs are obtained from the enzymatic conversion of starch or correlated substrates by cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase; EC 2.4.1.19), an enzyme of the α -amylase family produced by bacteria, especially of the genus *Bacillus* [4]. CGTase mainly catalyses transglycosylation reactions, in which a linear oligosaccharide chain is cleaved and the new reducing end sugar is transferred to the non-reducing end sugar of the same chain (cyclization). CGTase also catalyzes other reactions like coupling and disproportionation. The enzyme has a weak hydrolytic activity [4].

The optimization of process parameters like agitation and aeration are important in order to supply oxygen for the microorganism growth and enzyme production during cultivation process [5]. A few numbers of studies state the importance of agitation and aeration on CGTase production [5, 12]. Optimization of process parameters to reach high CGTase levels and productivity can be used to reduce the cost of enzyme production.

Statistical approaches offer ideal ways for process optimization studies in biotechnology. The most commonly used method for optimization in bioprocess is the classical approach, which involves studying one variable at a time, while keeping others constant [6]. Factorial design makes possible the study of many factors simultaneously, while quantifying the effect of each of them and their possible interactions [7]. This technique is being applied in fermentation processes development in order to improve product yields, reduced process variability, time

and overall costs [8, 9, 10]. Response surface methodology (RSM) is now being routinely used for optimization studies in several biotechnological and industrial processes [6].

Bacterial CGTases are conventionally produced on submerged batch cultivations. In these conditions, CGTase production can be reduced by Carbon Catabolite Repression (CCR). It is known that glucose, maltose, maltotriose, and maltotetraose accumulated during cultivation produce repressive effects on the β -CGTase production by *Bacillus circulans* ATCC 21783 [5]. One way to avoid this undesirable effect is the use of fed-batch cultivation in which substrate feeding can successfully reduce CCR in the production of γ -CGTase, which has been described in a few works [11, 12, 18].

This work aimed developing a mathematical correlation model, using the experimental factorial design and the response surface methodology, in order to verify the combined effects of agitation and aeration on CGTase production in bioreactors. The optimized process parameters were applied to verify the effects of fed-batch cultivation on CGTase production by *B. circulans*.

Material and methods

Microorganism

Bacillus circulans ATCC 21783 was obtained from ATCC collection. Stock cultures of *B. circulans* ATCC 21783 were kept frozen at -20°C in 25 % glycerol.

Medium and inoculum

The medium composition used throughout this work (standard medium) was comprised of, in $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$: soluble starch (Synth, Brazil), 2; peptone (Oxoid, England), 5; yeast extract (Oxoid, England), 5; MgSO_4 , (Nuclear, Brazil) 0.2; K_2HPO_4 (Nuclear, Brazil), 1. Sterile sodium carbonate (Synth, Brazil) was used to adjust the medium pH after autoclaving. Cultures were grown in 500 mL Erlenmeyer flasks filled with 100 mL of standard medium (initial pH 9.7) at 36°C in a rotatory shaker, 150 rpm, for 18 h. A volume corresponding to 5 %, (v/v), $\text{OD}_{600\text{nm}}$, 1.0, was used as inoculum for submerged cultivation.

Experimental Design

The effects of speed agitation and air flow rate of cultivation, which varied according to the experimental design were studied in a 2 L lab scale stirred tank (Biostat B, B. Braun Biotech International, Germany), filled with 1.5 L of sterile standard medium, for 24 h. Experimental designs analysis were carried out using Statistic 5.0 software (Statsoft, USA). A 2^2 full factorial central composite design was used to show the statistical significance of speed agitation and air flow rate on the production of CGTase. A total of 11 sets of experiments

including three central points were employed to determine the significance factors affecting the CGTase production. The minimum and maximum ranges of variables investigated and the full experimental plan with respect to their actual and coded forms are listed in Table 1. In the statistical model, Y is the measured response and denotes units of CGTase productivity in $U.(mLh)^{-1}$. The range and the level of the variables investigated in this study were given in Table 1. The quadratic model for predicting the optimal points was expressed according to equation (1):

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \varepsilon \quad (1)$$

where Y represents the response variable, β_0 is the interception coefficient, β_1 and β_2 are the linear terms, β_{11} and β_{22} are the quadratic terms, and x_1 and x_2 represent the studied variables. The statistical analysis of the model was performed in the form of analysis of variance (ANOVA). The significance of the regression coefficients and the associated probabilities, p (t), were determined by Student's t -test; the second order model equation was determined by Fischer's test. The variance explained by the model is given by the multiple coefficient of determination, R^2 .

Cultures were incubated at 36° C and initial pH at 9.7. The O₂ concentration was controlled using a polarographic electrode (Ingold, Germany). The Antifoam 204 (organic non-silicone Emulsiort, Sigma, USA) was used for foaming control.

CGTase production in Fed-batch cultivations

Fed-batch experiments were performed in a 2 L stirred tank (Biostat B, B. Braun Biotech International, Germany), filled with 1.5 L of sterile standard medium. The cells were initially grown in batch mode, and feeding was initiated when starch was depleted. The feeding solution comprised of, in g.L⁻¹: soluble starch, 18.5; peptone, 5; yeast extract, 5; MgSO₄, 0.2; K₂HPO₄, 1. This medium was fed at constant rates of either 0.5 h⁻¹ and 0.17 h⁻¹ using a pre-calibrated peristaltic pump.

Analytical methods

Samples of submerged cultivations (10 mL) were centrifuged at 3,500 g for 15 min at 4 °C. The cell-free supernatant was used for the estimation of enzyme activity, total sugar and for pH determinations. Samples were collected at every two hours.

CGTase activity assay

CGTase cyclization activity was determined using the phenolphthalein method assay [14] with modifications as follows. Reaction mixture, containing 26 mg of soluble starch in 0.65 mL of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.0), and 0.35 mL of crude enzyme were incubated at 60°C for 15 min. The reaction was stopped by addition of 4 mL of 0.04 mM phenolphthalein dissolved in 125 mM Na₂CO₃ solution. The absorbance was then measured at 550 nm. A standard curve was prepared with β-CD. One unit of CGTase activity (U) was defined as the amount of enzyme that formed 1 μg of β-CD min⁻¹ under standard conditions. Enzyme was expressed as volumetric activity (U.mL⁻¹ medium).

Biomass

Biomass was quantified gravimetrically as dry weight of cells. Samples were centrifuged, washed twice with cold distilled water, and dried in pre-weighted plastic tubes at 80°C to a constant weight in vacuum-ovens.

Determination of total sugar

Total sugars were measured by a phenol sulphuric acid method [15].

Determination of the oxygen volumetric mass transfer rate

The oxygen volumetric mass transfer rate (k_{La} , [h⁻¹]) of cultures was measured using the dynamic method described in Doran [19].

Results and Discussion

Experimental Design

Based on preliminary studies in our laboratory, speed agitation and air flow rate were identified as important factors affecting CGTase production by *B. circulans*. In the present work, these variables were statistically optimized with RSM. The experimental designs and the results are shown in table 1. In order to allow for comparisons with other bioreactor systems, k_{La} of each experiment was also measured and the values are shown in table 1. The ANOVA showed an *R*-squared of 0.65, which is suitable for describing the tendency and the influence over the CGTase production, and a good *F*-test. The computed *F*-value for CGTase productivity (4.31) was 1.4-fold higher than the *F*-value in statistic tables [9], indicating that the model was significant at high confidence level (90 %). The significance of each coefficient was determined by Student's *t*-test and *p*-values. At 5 % probability level, speed agitation is significant only at second-order model ($P_{\text{agi-agi}} < 0.009$) and air flow rate is significant at primary and second-order model ($P_{\text{aer}} < 0.004$ and $P_{\text{aer-aer}} < 0.023$), which indicates that they can act as limiting factors and even small variations in their values will alter CGTase productivity to a considerable extent. However, the interaction between

variables and the linear response for agitation had a non significant effect on CGTase productivity. The model can now be simplified by the elimination of statistically non significant terms. The quadratic model was reduced to:

$$Y = 1154.76 + 287.27x_1 - 143.57x_1^2 - 232.09x_2^2 \quad (2)$$

The response surface described by the model equation to estimate CGTase productivity over independent variables (x_1 and x_2) is shown in Figure 1. Contour plot indicates that aeration below 1 vvm and speed agitation over 450 rpm and below 350 rpm cause reduction in CGTase productivity.

In most of cultivations, it was observed that intensive enzyme production began from 8 h of cultivation, at the end of exponential phase. Vassileva et al. [5], working with different conditions of temperature, found similar kinetics of growth for this bacterium. The highest CGTase productivity ($155 \text{ U} \cdot (\text{mLh})^{-1}$) was observed at run number 10, where the process parameters speed agitation and air flow rate were used at their intermediary (400 rpm) and higher (2 vvm) levels, respectively ($k_{\text{la}} = 48 \text{ h}^{-1}$) (Figure 2). This productivity was 31-fold higher than observed at run number 8 (anaerobic condition), where the related factors were used at the same speed agitation and lowest air flow rate. Moreover, in the central points it was also observed high productivities (112 , 113 and $122 \text{ U} \cdot (\text{mLh})^{-1}$) differently of that occurred in run number 11, where CGTase productivity was $70 \text{ U} \cdot (\text{mLh})^{-1}$ with speed agitation at 600 rpm and air flow rate at 1 vvm ($k_{\text{la}} = 51 \text{ h}^{-1}$). These results suggest that *B. circulans* has a higher CGTase productivity with 48 h^{-1} of k_{la} , which, in our system, was achieved with speed agitation (400 rpm) and air flow rate over 1 vvm, being oxygen transfer an important factor for CGTase synthesis.

The change of pH values of the medium during growth decreased reaching about 8.4 at 8 h of run, due to the assimilation of starch by microorganisms, increasing afterwards reaching 9.5, strongly suggesting re-equilibration of the redox state [16] (Figure 2). Paavilainen et al [16] reported that a drop of pH probably occurs due to the reduction potential generated from a singular oxidation mechanism where the sugars are not metabolized through tricarboxylic acid cycle. The exception has occurred in run number 8, where the aeration was zero (Figure 3). In this experiment, the cellular growth was very slow reaching $0.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ in 10 hours and pH decreased until 7.35 in the end of cultivation. This fact could be explained by the ability of the

strain to grow also under anaerobic conditions [13], but little synthesis of CGTase was observed under these conditions.

The optimized values of selected variables were obtained by solving the regression equation 3. The optimized values of the test variables in coded units are: $x_1 = 1$, $x_2 = 0$. The real values obtained by substituting the respective optimized values in equation 1 are: air flow rate of 1.7 vvm and speed agitation of 400 rpm. The model predicts that the maximum CGTase productivity that can be obtained using the above values of variables would be $130 \text{ U} \cdot (\text{mLh})^{-1}$. The maximum enzyme activity obtained experimentally was $127 \text{ U} \cdot (\text{mLh})^{-1}$, which is in close agreement with the model prediction.

These parameters of aeration and speed agitation can be attributed to the fact that dissolved oxygen concentration play an important role in the process of CGTase synthesis as it is shown by the response surface plot (Figure 1).

CGTase production in Fed-Batch cultivation

Fed-batch cultivations were carried out in order to study the optimization of speed agitation and air flow rate on CGTase productivity by *B. circulans*. The best values of speed agitation and air flow rate that were used in fed-batch cultivations were 400 rpm and 1.7 vvm, respectively. It was observed that at 0.5 h^{-1} of feed rate the CGTase productivity decreased immediately after beginning the starch feeding (data not shown). It was also observed that the biomass has grown a little and the total sugars were accumulated in medium not being immediately consumed. This may be explained by the fact that high concentrations of starch led to an accumulation of simple sugars and consequently causes a repressive effect on CGTase synthesis [17]. When feed rate was lower, 0.17 h^{-1} , the biomass has grown up to $1.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Figure 4) being 1.2-fold higher than it was observed in run number 10 of batch cultivation. According to Wang et al. [18] fed-batch can effectively reduce CR and boost the production and productivity of γ -CGTase by *B. macorouus* WSH02-06. Therefore, it was expected an increase of CGTase synthesis during fed-batch cultivations, fact that did not occur. The CGTase productivity in fed-batch cultures reached $137 \text{ U} \cdot (\text{mLh})^{-1}$ being 0.88-fold lower than run number 10 in batch cultivations. Perhaps one possibility for these low CGTase activity and cell growth resides in the fact that we used a linear feeding regime that did not match a controlled growth rate for this microorganism. This may led to accumulation of starch, which, in turn, led to an accumulation of simple sugars with the same consequences as described previously [17].

Conclusions

The rates of oxygen transfer play an important role in overall microbial metabolism. It was observed that in the experiment with high air flow rate a higher enzyme productivity could be observed ($155 \text{ U} \cdot (\text{mLh})^{-1}$), differently that in other experiment without air when the enzyme productivity was the lowest ($5 \text{ U} \cdot (\text{mLh})^{-1}$). This fact showed that both speed agitation and air flow rate affected the oxygen availability for cellular growth and CGTase synthesis by *B. circulans*. The optimized process values that increase CGTase productivity are 400 rpm for speed agitation and 1.7 vvm for air flow rate.

Compared with batch cultures, fed-batch cultures produced enhanced cell growth and diminished CGTase productivity. More work is needed to test different feeding rates conditions on CGTase synthesis to become feasible as an industrial process.

Acknowledgments

The authors wish to thank CAPES for their financial support.

5. References

1. A. Biwer, G. Antranikian, E. Heinzle, Enzymatic production of cyclodextrins, *Appl Microbiol Biotechnol.* 59 (2002) 609-617.
2. L. Szente, J. Szejtli, Cyclodextrins as food ingredients, *Trends Food Sci. Technol.* 15 (2004) 137–142.
3. C.M. Buchanan, S.R. Alderson, C.D. Cleven, D.W. Dixon, R. Ivanyi, J.L. Lambert, D.W. Lowman, R.J. Offerman, J. Szejtli, L. Szente, Synthesis and characterization of water-soluble hydroxybutenyl cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins), *Carbohydr. Res.* 337 (2002) 493–507.
4. B.A. van der Veen, J.C.M. Uitdehaag, D. Penninga, G-J.W.M. Alebeek, L.M. Smith, B.W. Dijkstra, L. Dijkhuizen, Rational design of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 to increase α -cyclodextrin production. *J. Mol. Biol.* 296 (2000) 1027-1038.
5. A. Vassileva, V. Beschkov, V. Ivanova, A. Tonkova, Continuous Cyclodextrin Glucanotransferase Production by Free and Immobilized Cells of *B. circulans* ATCC 21783 in Bioreactors, *Process Biochem.* 40 (2005) 3290-3295.
6. S. Oh, S. Rheem, J. Sim, S. Kim, Y. Baek, Optimizing conditions for the growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in tryptone-yeast extract-glucose medium by using response surface methodology, *Appl. Environ. Microbiol.* 61(1995) 3809–3814.

7. G.E.P. Box, W.G. Hunter, S.J. Hunter: *Statistics for Experimenters*, John Wiley & Sons, New York, USA (1978) 672pp.
8. W. Chen, C. Liu, Production of P-fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*, *Enzyme Microb. Technol.* 18 (1996) 153-160.
9. K. Shiraia, I. Guerreroa, S. Huertaa, G. Saucedoa, A. Castillob, R.O. Gonzalezb, G.M. Halle, Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation, *Enzyme Microb. Technol.* 28 (2001) 446-52.
10. K.J. Rao, C. Kim, S. Rhee, Statistical optimization of medium for the production of recombinant hirudin from *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology, *Process Biochem.* 35 (2000) 639-647.
11. S-G. Kim, D-H. Kweon, D-H. Lee, Y-C. Park, J-H. Seo, Coexpresssion of folding accessory proteins for production of active cyclodextrin glycosyltransferase of *Bacillus macerans* in recombinant *Escherichia coli*, *Protein expression and purification*, 41 (2005) 426-432.
12. B.N. Gawande, A.M. Sonawane, V.V. Jogdand, A.Y. Patkar, Optimization of cyclodextrin glycosyltransferase production from *Klebsiella pneumoniae* AS-22 in batch, fed-batch, and continuous cultures, *Biotechnol Prog.* 19 (2003) 1697-1702.
13. K. Horikoshi, F. Ikeda, Y. Ikeda, Y. Tanaka, Novel amylase and process for preparing the same. *US Patent* 3826715 (1974).
14. T. Kaneko, T. Kato, N. Nakamura, K. Horikoshi, Spectrophotometric determination of cyclization activity of β -cyclodextrin-forming cyclodextrin glucanotransferase, *J Jpn Soc Starch Sci.* 34 (1987) 45-48.
15. M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350-356.
16. S. Paavilainen, M. Mäkelä, T. Korpela, Proton and carbon inventory during growth of an alkaliphilic *Bacillus* indicates that protons are independent from acid aniona, *J. Ferment. Bioeng.* 80 (1995) 429-433.
17. B.N. Gawande; A.Y. Patkar, Purification and properties of a novel raw starch degrading-cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS-22, *Enzyme Microb. Technol.* 28 (2001) 735-743.
18. F. Wang, G. Du, Y. Li, J. Chen, Regulation of CCR in the γ -CGTase from *B. macorous* by the specific cell growth rate control, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 1279-1285.
19. P.M. Doran, *Bioprocess Engineering Principles*, Academic Press, San Diego (1995) pp.190-217.

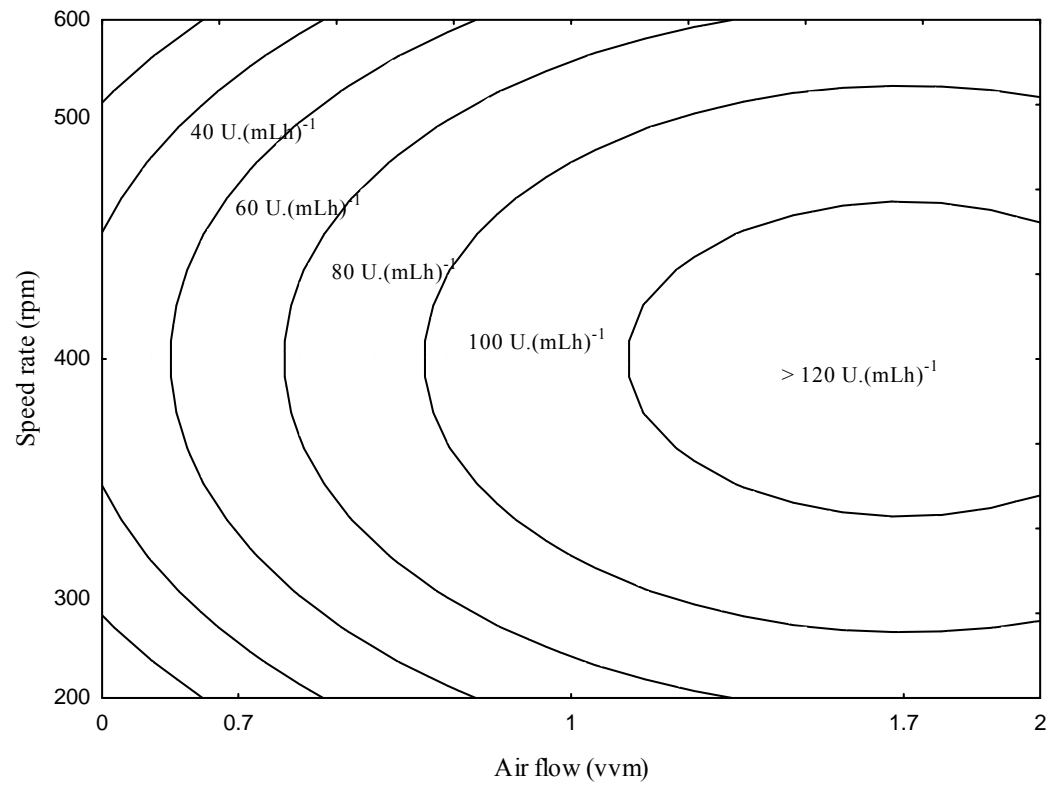


Figure 1: Contour plot for the effects speed agitation and air flow rate on CGTase productivity of *B. circulans* ATCC 21783.

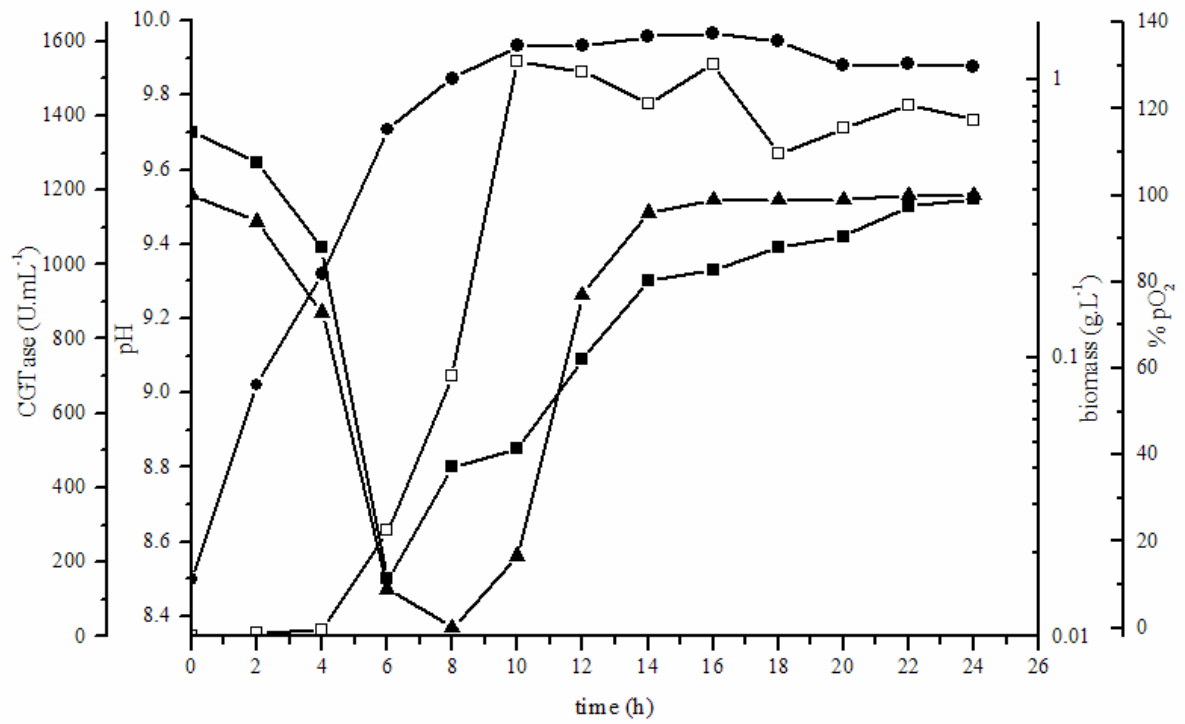


Figure 2: Production of CGTase in run number 10 (400 rpm and 2 vvm): (□) CGTase activity; (●) cell dry weight; (■) pH; (▲) %pO₂.

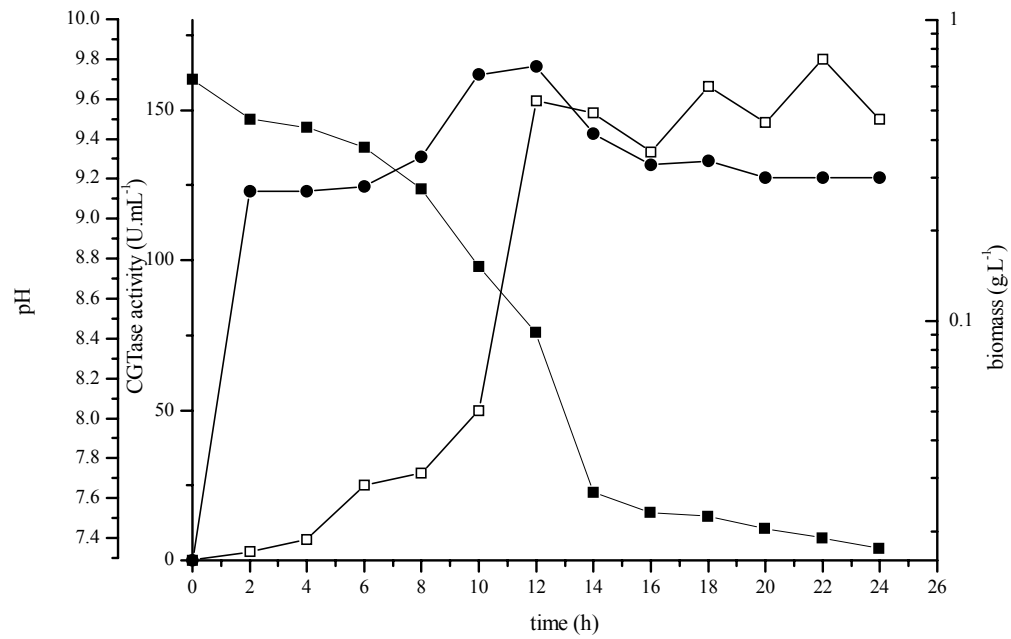


Figure 3: Production of CGTase in run number 8 (400 rpm): (□) CGTase activity; (●) cell dry weight; (■) pH.

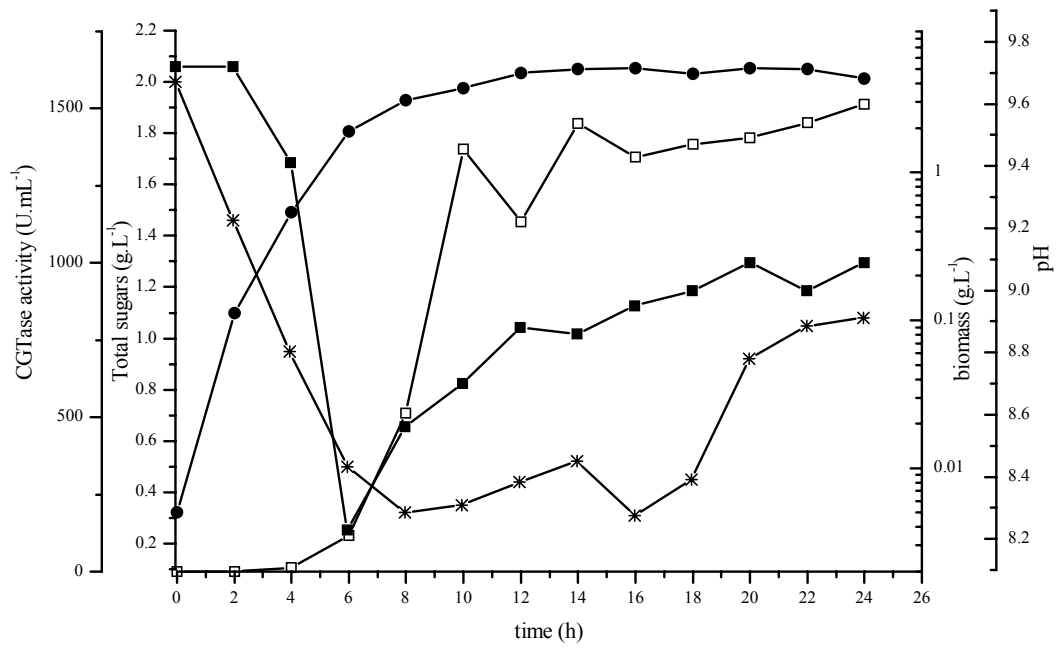


Figure 4: Production of CGTase on fed-batch (400 rpm and 1.7 vvm): (□) CGTase activity; (●) cell dry weight; (■) pH; (*) starch.

Table 1: Real values and coded levels, results for CGTase activity and k_{1a}

Treatment	Coded setting levels		Actual levels		CGTase activity U.(mLh) ⁻¹	k_{1a}
	$(x_1=af; x_2=sr)$		$(X_1=af; X_2=sr)$			
	x_1	x_2	X_1	X_2		
1	-1	-1	0.7	300	78	25
2	1	-1	1.7	300	82	27
3	-1	1	0.7	500	83	32
4	1	1	1.7	500	97	32
5	0	0	1	400	112	35
6	0	0	1	400	113	34
7	0	0	1	400	122	33
8	-1.41	0	0	400	5	0
9	0	-1.41	1	200	55	13
10	1.41	0	2	400	155	48
11	0	1.41	1	600	70	51

3 DISCUSSÃO GERAL

O método utilizado neste trabalho para a quantificação de CGTase (KANEKO et al., 1987) foi modificado, conforme descrito no artigo *Production of cyclodextrin glycosyltransferase by alkaliphilic bacillus circulans on submerged and solid-state cultivation* (artigo 1). As modificações foram realizadas para minimizar os efeitos de instabilidade da fenolftaleína na presença de oxigênio, conduzindo a uma maior precisão na detecção de β -CD. Mäkela et al. (1990) e Goel e Nenê (1995) já haviam realizado modificações no método e obtiveram curvas com linearidade de β -CD até 68 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Com as modificações propostas no presente trabalho observou-se um aumento da linearidade na curva padrão com concentrações de até 400 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2=0,995$). Estes resultados foram validados em Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (dados não mostrados) confirmando a confiabilidade do método e possibilitando melhoria nas análises.

O crescimento da bactéria *Bacillus circulans* ATCC 21783, foi testado primeiramente com duas fontes de carbono, amido e glicose, na concentração de 2 g.L^{-1} em incubadora agitadora orbital de acordo com o planejamento experimental fatorial descrito no artigo 1. Nos cultivos em presença de glicose ou amido, onde o pH foi igual ou superior a 11,4, não houve crescimento do microrganismo. No entanto, nos demais pHs analisados, foi possível verificar que houve crescimento do microrganismo em ambas as fontes de carbono testadas, porém, quando na presença de glicose, a produção enzimática atingiu um máximo de 11 U.mL^{-1} (APÊNDICE A), na condição de 37° C e pH 10,0 em 12 horas de cultivo, enquanto que nas mesmas condições em presença de amido a produção enzimática foi 33,5 vezes maior. Se por um lado, é bem conhecido que microrganismos produtores de α -amilase têm sua produção enzimática induzida na presença de amido (NISHIDA et al., 1997), fato também relatado por Gawande et al. (2003), para a produção de CGTase, em uma linhagem de *Klebsiella pneumoniae* AS-22, por outro lado a possibilidade de repressão catabólica (VASSILEVA et al., 2003) em presença de glicose não deve ser desconsiderada, como será discutido a seguir.

A máxima produção de CGTase obtida em incubadora agitadora orbital, conforme mostrado no artigo 1, foi de 637 U.mL^{-1} , utilizando 36° C e pH 9,7. Este valor foi 21 vezes

maior que o valor obtido por Mäkela et al. (1990), após 80 horas de cultivo, utilizando o mesmo microrganismo nas mesmas condições de cultivo, porém com quantidade inicial de amido de 20 g.L^{-1} . Estes resultados mostraram que uma menor concentração de substrato no meio de cultura pode estar relacionada a uma possível diminuição da repressão catabólica. Observações semelhantes foram feitas por Vassileva et al. (2003), que relatam que altas concentrações de amido conduzem ao acúmulo de mono e dissacarídeos no meio de cultura, principalmente glicose e maltose causando como consequência a repressão da síntese enzimática. Além disso, altas concentrações de amido aumentam a viscosidade do meio, necessitando desta forma maior demanda de energia. Também, segundo Gawande et al (2003), altas concentrações de amido resultam em alta taxa de crescimento celular, acidificando muito o meio de cultura, provocando a queda de síntese enzimática.

Com os parâmetros pH e temperatura otimizados, realizou-se, em uma segunda etapa, testes em biorreatores de bancada de 2 L, buscando verificar o comportamento do microrganismo frente ao aumento de escala. Observou-se que a transferência de oxigênio afeta a produção de CGTase e o crescimento celular, conforme demonstrado no artigo 1. No experimento onde a agitação foi de 600 rpm e a aeração de 2 vvm, a biomassa atingiu $1,49 \text{ g.L}^{-1}$ em 12 horas de cultivo com máxima produção de CGTase 512 U.mL^{-1} em 10 horas. Este valor foi 1,24 vezes menor que o obtido nos experimentos em incubadora agitadora orbital. Já no experimento com 400 rpm de agitação e 1 vvm de aeração, observou-se um aumento de 1,79 vezes na atividade enzimática (1155 U.mL^{-1}) quando também comparada aos experimentos em incubadora agitadora orbital. Uma vez que a agitação e aeração mostraram-se fatores decisivos na síntese enzimática, realizou-se um planejamento experimental utilizando estes dois parâmetros como variáveis, conforme pode ser observado no artigo *Batch and fed-batch production of cyclodextrin glycosyltransferase by alkaliphilic Bacillus circulans* (artigo 2).

No planejamento experimental em biorreator, onde a agitação variou de 200 a 600 rpm e aeração de 0 a 2 vvm, observou-se que a máxima produtividade enzimática ocorreu em 10 horas de cultivo, $155 \text{ U.mL}^{-1}\text{h}^{-1}$, nas condições de 400 rpm e 2 vvm. Neste experimento, a atividade enzimática foi de 1546 U.mL^{-1} , sendo 1,35 vezes maior que o valor obtido nos experimentos com 400 rpm e 1 vvm.

No experimento número 8, 400 rpm e sem aeração, observou-se que o microrganismo cresceu muito lentamente devido à escassez de oxigênio, prejudicando a síntese enzimática que atingiu seu valor máximo em 22 horas de cultivo, 167 U.mL^{-1} . Já no experimento número 9, 200 rpm e 1 vvm, onde a transferência de oxigênio foi pequena, a produção de CGTase

máxima ocorreu em 12 h de cultivo, 615 U.mL⁻¹, diferentemente do ocorrido quando a agitação foi máxima, 600 rpm, e aeração intermediária, 1 vvm em que a atividade máxima foi atingida em 22 horas de cultivo, 1241 U.mL⁻¹. Comparando estes experimentos com o de 400 rpm de agitação e 1 ou 2 vvm de aeração, onde a produção de CGTase foi significativamente maior podemos concluir que a escassez ou o excesso de oxigênio são prejudiciais para a síntese enzimática, sendo portanto essencial sua otimização para um posterior processo de escalonamento industrial.

Os valores otimizados em biorreator foram aeração de 1,7 vvm e agitação de 400 rpm.

Com o intuito de verificar a produção de CGTase pelo *B. circulans* utilizando processo de batelada alimentada, foram testadas duas condições de alimentação. Na primeira condição testada, $0,5 \frac{\text{g}_{\text{amido}}}{\text{L.h}}$, o amido foi acumulado no meio de cultura imediatamente a sua adição, indicando que essa concentração de açúcar era superior a demanda necessária para o microrganismo multiplicar-se e sintetizar a enzima. Utilizando a equação 1,

$$d \frac{(VS)}{dt} = F.S_F - \frac{\mu XV}{Y_{X/S}} \quad (1)$$

onde V é o volume de cultura inicial, F é a vazão de alimentação, S_F é a concentração de substrato para a alimentação μ é a velocidade de crescimento da bactéria, X é a biomassa e $Y_{X/S}$ é a taxa de conversão de substrato em biomassa e considerando o termo dS/dt aproximadamente zero, calculou-se a taxa de alimentação para o segundo experimento que foi de $0,17 \frac{\text{g}_{\text{amido}}}{\text{L.h}}$. Nesta condição, o microrganismo cresceu 1,24 vezes mais que o observado no experimento de número 10 do cultivo de batelada, sendo a produtividade 0,88 vezes menor. Portanto, estudos posteriores com diferentes condições de alimentação são fundamentais para a obtenção de melhores resultados em batelada alimentada.

Por fim, realizaram-se experimentos preliminares utilizando 30 g.L⁻¹ de resíduo industrial de fibra de soja (RIFS) como fonte de carbono, proteínas e sais minerais para verificar a possibilidade de crescimento da bactéria alcalófila *B. circulans* e produção de CGTase. O cultivo foi realizado a 37 °C e pH 9,7 em incubadora agitadora orbital, em frascos de Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio de cultura e inóculo de 5%_(v/v) durante 48 horas (APÊNDICE B).

Após a verificação da viabilidade da utilização de RIFS como fonte de carbono e de energia para o crescimento e produção de CGTase, realizaram-se experimentos, com este

mesmo substrato, em biorreatores cilíndricos verticais estáticos de fluxo ascendente com capacidade de 500 mL em estado semi-sólido, conforme descrito no artigo 1.

Nos experimentos em cultivo semi-sólido (CSS) foi constatado que a bactéria cresceu e sintetizou a enzima de interesse atingindo a máxima atividade enzimática de $32.776 \text{ U.g}_{(\text{RIFS})}^{-1}$, sendo que a máxima atividade no cultivo submerso com RIFS foi de apenas $1.267 \text{ U.g}_{(\text{RIFS})}^{-1}$, aproximadamente 26 vezes menor, ambas em 48 horas de cultivo. Estes resultados observados paralelamente aos resultados obtidos em cultivo submerso em presença de glicose, onde a produção de atividade CGTase, ainda que existente, foi muito baixa, corroboram a hipótese de repressão catabólica nos cultivos submersos. Por outro lado, isso não foi observado no CSS onde a síntese enzimática foi maior. Uma possível explicação para isso é dada por Viniegra-González e Favela-Torres (2006) que sugerem a existência de gradientes microscópicos dentro dos agregados celulares, bem como a redução da permeabilidade da membrana celular à glicose tendo como consequência a não existência de repressão catabólica no CSS.

Por fim, este trabalho otimizou a produção de CGTase pela bactéria alcalófila *B. circulans* ATCC 21783, através de ferramentas estatísticas e de planejamento experimental, pela bactéria alcalófila *B. circulans* ATCC 21783 resultando na obtenção de um rendimento superior aos encontrados na literatura, até o presente momento, para este microrganismo.

O sistema de cultivo em batelada alimentada necessita de mais estudos, principalmente de ajustes nas taxas de alimentação, para verificar se é possível aumentar a produção de CGTase em cultivos submersos. Os resultados obtidos nas condições utilizadas não foram vantajosos quando comparados ao sistema de batelada tradicional.

Já os experimentos com RIFS demonstraram a possibilidade de utilização de resíduos da agroindústria na produção de CGTase. Além disso, os resultados apresentados reforçam a necessidade de mais estudos sobre a produção desta enzima em CSS, com o aproveitamento de substratos de menor custo que os atualmente utilizados.

REFERÊNCIAS

- 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*, Amsterdam, v. 5, p. 1-9, 1999.
- CEREDA, M.P. *Tecnologias, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas*. São Paulo: Fundação Cargill, v. 3, 2003. 711p.
- DEPINTO, J.A.; CAMPBELL, L.L. Purification and properties of the amylase of *Bacillus macerans*. *Biochemistry*, New York, 1967.
- FIEDLER, G.; PAJATSCH, M.; BÖCK, A. Genetics of a novel starch utilisation pathway present in *Klebsiella oxytoca*. *Journal of Molecular Biology*, London, v. 256, p. 279-291, 1996.
- GAWANDE, B.N. et al. Purification and properties of a novel raw starch degrading cyclomalto-dextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus*. *Applied Microbiology Biotechnology*, Oxford, v. 51, p. 504-509, 1999.
- GAWANDE, B.N.; AVINASH, M.; SONAWANE, V.; PATKAR, A.Y. Optimization of cyclodextrin glycosyltransferase production from *Klebsiella pneumoniae* AS-22 in batch, fed-batch and continuous cultures. *Biotechnology Progress*, New York, v. 19, p. 1697-1702, 2003.
- GAWANDE, B.N.; PATKAR, A.Y. Purification and properties of a novel raw starch degrading-cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS-22. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 28, p. 735-743, 2001.
- GAWANDE, B.N.; SINGH, A.K.; CHAUBAN, A.; PATKAR, A.Y. Optimization of cyclomalto-dextrin glucanotransferase production from *Bacillus firmus*. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 22, p. 288-291, 1998.
- GOEL, A.; NENE, S.N. Modifications in the phenolphthalein method for spectrophotometric estimation of beta cyclodextrin. *Starch*, Weinheim, v. 47, n. 10, p. 399-400, 1995.
- JAMUNA, R.; SASWATHI, N.; SHEELA, R.; RAMAKRISHNA, S.V. Synthesis of cyclodextrin glucosyl transferase by *Bacillus cereus* for the production of cyclodextrins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Clifton, v. 43, n. 3, p. 163-176, 1993.
- KANEKO, T.; KATO, T.; NAKAMURA, N.; HORIKOSHI, K. Spectrophotometric determination of cyclization activity of β -cyclodextrin-forming cyclodextrin glucanotransferase. *Journal of the Japanese Society of Starch Science*, Tokyo, v. 34, p. 45-48, 1987.

MÄKELÄ, M.J.; PAAVILAINEN, S.K.; KORPELA, T.K. Growth dynamics of cyclomaltoextrin glucanotransferase producing *B. circulans* var. *alkalophilus*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 36, n. 3, p. 176-182, 1990.

MONTEIRO, C. L. B. *Técnicas de avaliação sensorial*. 2.ed. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1984. 101p.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. Campinas, Editora da Unicamp, 2001. 401p.

NISHIDA, T.; NAKAMURA, A.; MASAKI, H.; UOZUMI, T. Regulation of cyclodextrin glucanotransferase synthesis in *Bacillus ohbensis*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiological Letters*, Amsterdam, v. 149, n. 2, p. 221-226, 1997.

OH S.; RHEEM, S.; SIM J., KIM, S.; BAEK, Y. Optimizing conditions for the growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in tyrtone-yeast extract-glucose medium by using response surface methodology. *Applied Environmental Microbiology*, Washington v. 61, p. 3809–3814, 1995.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 13, p. 81-84, 2003.

PARK, Y.C.; KIM C.S.; KIM C.I.; CHOI K.H.; SEO J.H. Fed-batch fermentations of recombinant *Escherichia coli* to produce *Bacillus macerans* CGTase. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Oxford, v. 7, p. 323-328, 1997.

PSZCZOLA D.E. Production and potential food applications of cyclodxtrins. *Food Technology*, Chicago, v. 42, n. 1, p. 96-100, 1988.

RAMAKRISHNA, S.V.; SASWATHI, N.; SHEELA, R.; JAMUNA, R. Evaluation of solid, slurry, and submerged fermentation for the production of cyclodextrin glycosyltransferase by *Bacillus cereus*. *Enzyme and Microbiol Technology*, New York, v. 16, p. 441-444, 1994.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia seqüencial de planejamentos*. São Paulo: Casa do Pão Editora, 2005. 326p.

SASWATHI, N.; SHEELA, R.; JAMUNA, R.; RAMAKRISHNA, S.V. Synthesis of Cyclodextrin Glycosyl Transferase by Immobilized Cells of *Bacillus circulans*. *Bioprocess Engineering*, New York, v. 12, n. 6, p. 283-286, 1995.

STROKOPYTOV, B.; KNEGTEL, R.M.A.; PENNINGA, D.; ROZEBOOM, H.J.; KALK, K.H.; DIJKHUIZEN, L.; DIJKSTRA, B.W. Structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with a maltonaose inhibitor at 2.6Å resolution: implications for product specificity. *Biochemistry*, New York, v. 35, p. 4241-4249, 1996.

SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. *Food science ε Technology*, London, v. 15, p. 137-142, 2004.

THIEMANN, V.; DÖNGES, C.; PROWE S.G.; STERNER, R.; ANTRANIKIAN, G. Characterization of a thermoalkali-stable cyclodextrin glycosyltransferase from the anaerobic thermoalkaliphilic bacterium *Anaerobranca gottschalkii*. *Archives of Microbiology*, Berlin, v. 182, p. 226-235, 2004.

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

UITDEHAAG, J.C.M.; VAN DER VEEN, B.A.; DIJKHUIZEN, L.; DIJKSTRA, B.W. Catalytic mechanism and product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase, a prototypical transglycosylase from the α -amylase family. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 30, p. 295-304, 2002.

UITDEHAAG, J.C.M.; KALK, K.H.; VAN DER VEEN B.A.; DIJKHUIZEN, L.; DIJKSTRA, B.W. The Cyclization Mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase as revealed by a γ -cyclodextrin-CGTase complex at 1.8 Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 274, p. 34868-34876, 1999.

VAN DER MAAREL, M.J.E.C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J.C.M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 94, p. 137-155, 2002.

VAN DER VEEN, B.A.; UITDEHAAG, J.C.M.; DIJKSTRA, B.W.; DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1543, p. 336-360, 2000a.

VAN DER VEEN, B.A.; UITDEHAAG, J.C.M.; PENNINGA, D.; ALEBEEK, G-J. W.M.; SMITH, L.M.; DIJKSTRA, B.W.; DIJKHUIZEN, L. Rational design of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 to increase α -cyclodextrin production. *Journal of Molecular. Biology*, London, v. 296, p. 1027-1038, 2000b.

VASSILEVA, A.; BESCHKOV, V.; IVANOVA, V.; TONKOVA, A. Continuous cyclodextrin glucanotransferase production by free and immobilized cells of *Bacillus circulans* ATCC 21783 in bioreactors. *Process Biochemistry*, London, v. 40, p. 3290-3295, 2005.

VASSILEVA, A.; BURHAN, N.; BESCHKOV, V.; SPASOVA, D.; RADOEVSKA, S.; IVANOVA, V.; TONKOVA, A. Cyclodextrin glucanotransferase production by free and agar gel immobilized cells of *B. circulans* ATCC 21783. *Process Biochemistry*, London, v. 38, p. 1585-1591, 2003.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E. Why solid-state fermentation seems to be resistant to catabolite repression? *Food Tecnology and Biotechnology*, Zagreb, v. 44, n. 3, p. 397-406, 2006.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C.N.; RÓMERO-GOMEZ, S.J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 13, n. 2-3, p. 157-167, 2003.

WEN, C. C.; JOE, M. L.; KUANG, J. L. Production of cyclodextrin glucanotransferase by fed batch fermentation with sugar supply. *Journal Chinese Agricultural Chemical Society*, Taipei, v. 32, n. 5, p. 565-573, 1994.

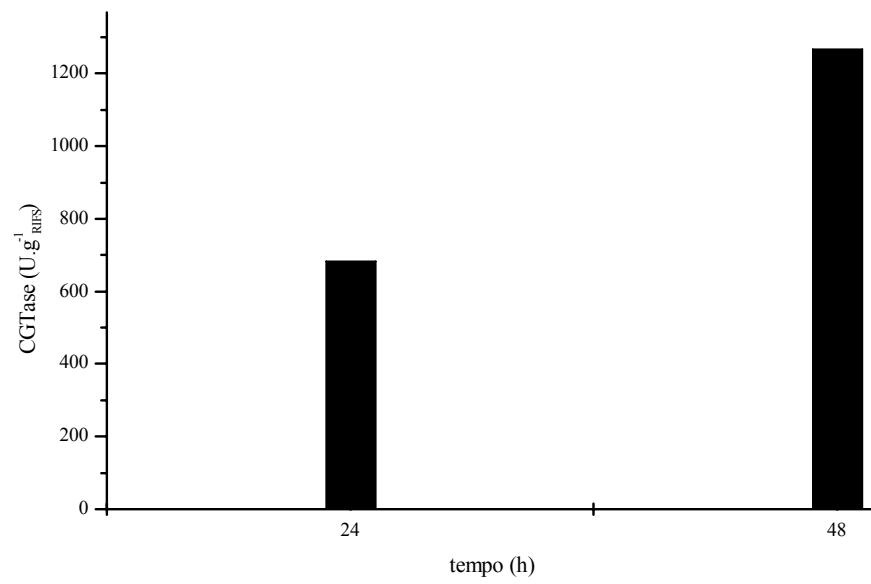
ZAIN, W.S.W.Md.; ILLIAS, R.Md.; SALLEH, M.Md.; HASSAN, O.; RAHMAN, R.A.; HAMID, A.A. Production of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. TS1-1: optimization of carbon and nitrogen concentration in the feed medium using central composite design. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 33, p. 26-33, 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Planejamento Experimental e resultados de produção de CGTase do *B. circulans* em glicose em incubadora agitadora orbital

Ensaio	Valores Codificados		Valores reais		CGTase (U.mL ⁻¹)
	$(X_1=T; X_2=pH)$		$(X_1=T; X_2=pH)$		
	X_1	X_2	X_1	X_2	
1	-1	-1	34	8,6	0
2	1	-1	40	8,6	7
3	-1	1	34	11,4	0
4	1	1	40	11,4	0
5	0	0	37	10	5
6	0	0	37	10	7,5
7	0	0	37	10	11
8	-1,41	0	32	10	0
9	0	-1,41	37	8	7,5
10	1,41	0	42	10	0
11	0	1,41	37	12	0

APÊNDICE B



Produção de CGTase por *Bacillus circulans* em cultivo submerso com 30 g.L⁻¹ de RIFS. Média de dois experimentos.