



Acta Scientiarum. Health Sciences

ISSN: 1679-9291

eduem@uem.br

Universidade Estadual de Maringá
Brasil

Moriwaki, Cristiane; Mazzer, Cassiana; Pazzetto, Rúbia; Matioli, Graciete
Avaliação de métodos para manutenção e preservação de bactéria esporulada produtora da enzima
CGTase

Acta Scientiarum. Health Sciences, vol. 31, núm. 2, 2009, pp. 113-118

Universidade Estadual de Maringá
Maringá, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=307226625005>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Avaliação de métodos para manutenção e preservação de bactéria esporulada produtora da enzima CGTase

Cristiane Moriwaki¹, Cassiana Mazzer¹, Rúbia Pazzetto¹ e Graciette Matioli^{2*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

²Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: gmatioli@uem.br

RESUMO. A conservação de células sem mudanças morfológicas, fisiológicas ou genéticas é uma necessidade da biotecnologia. *Bacillus firmus* cepa 37 é uma bactéria esporulada produtora da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), que transforma o amido em ciclodextrinas (CDs). O objetivo deste estudo foi avaliar a manutenção e preservação de *B. firmus* cepa 37 estocada em meio de cultivo sólido, solo estéril e em glicerol a baixa temperatura (-70°C). Para avaliação do melhor método de manutenção da bactéria foram utilizados procedimentos de imobilização das células em matrizes inorgânicas. As células imobilizadas foram submetidas ao teste do efeito da biomassa inicial e à microscopia eletrônica de varredura (MEV). O repique não foi um método adequado, pois a cepa diminuiu a produção de CGTase. A estocagem em solo estéril mostrou-se eficaz e a produção da enzima mantida constante. A conservação a baixas temperaturas também foi satisfatória, com contagem de células praticamente a mesma após 360 dias. A imobilização, avaliada por MEV, não mostrou diferença na adsorção das células conservadas pelos diferentes métodos. O mesmo ocorreu para o teste do efeito da biomassa inicial, que apresentou maior produção de beta-CD quando do uso de 1,5 g de células.

Palavras-chave: preservação biológica, ciclodextrinas, células imobilizadas.

ABSTRACT. *Evaluation of methods for maintenance and preservation of sporulating bacteria producer of CGTase enzyme.* The conservation of cells without morphologic, physiologic or genetic changes is a biotechnology necessity. *Bacillus firmus* strain 37 is a sporulating bacteria that produces the cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) enzyme, which transforms starch into cyclodextrins (CDs). This study aimed to evaluate the maintenance and preservation of *B. firmus* strain 37 stored in a solid medium, sterile soil and in glycerol at low temperature (-70°C). In order to evaluate the best bacteria maintenance method, cell immobilization procedures were used on inorganic matrices. The immobilized cells were submitted to the initial biomass effect test and scanning electron microscopy (SEM). Periodic transfer was not an appropriate method, because the strain reduced the production of CGTase. The storage in sterile soil proved effective and the enzyme production remained constant. The conservation in low temperatures was also satisfactory, with cell counts practically the same after 360 days. The immobilization evaluated by SEM did not show any difference in the adsorption of the cells preserved by the different methods. The same happened for the initial biomass effect test, which presented higher beta-CD production when 1.5 g of cells was used.

Key word: biological preservation, cyclodextrins, immobilized cells.

Introdução

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos com seis (alfa-CD), sete (beta-CD), oito (gama-CD) ou mais unidades de glicopiranosas unidas por ligações alfa-(1,4) (VAN DER VEEN et al., 2000; DEL VALLE, 2004). A molécula de CD é descrita como um cone truncado, cujo interior é hidrofóbico e a superfície hidrofílica. Por esta estrutura, as CDs podem formar complexos de inclusão com várias moléculas orgânicas e inorgânicas, e as

propriedades físicas, químicas e/ou biológicas da molécula-hóspede podem ser alteradas. As CDs são amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos, cosméticos, na farmacêutica e na agricultura, atuando como agentes estabilizantes de substâncias voláteis e/ou instáveis, emulsificantes, antioxidantes, na solubilização de compostos insolúveis em água, em sistemas de liberação controlada de drogas, na imobilização de compostos tóxicos para proteção ambiental (CONNORS, 1997; CAO et al., 2005).

As CDs são produzidas por reação de transglicosilação intramolecular a partir da degradação do amido pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) (DEL VALLE, 2004; COSTA et al., 2007). Esta enzima, geralmente extracelular, é produzida por vários tipos de microrganismos, como *Thermoanaerobacterium*, *Klebsiella oxytoca* e algumas espécies de *Bacillus*, como *Bacillus macerans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus firmus* e *Bacillus lentus* (CAO et al., 2005).

A aplicação de células bacterianas imobilizadas como fonte de enzima elimina a necessidade de purificação das mesmas e, em alguns casos, as enzimas são mais estáveis no interior das células, o qual é seu ambiente natural (TONKOVA, 1998; UZUNOVA et al., 2002). Sistemas de células imobilizadas têm sido aplicados em muitos processos bioquímicos e oferecem várias vantagens, como uso repetido e prolongado dessas células, facilidade na separação das mesmas do meio de fermentação, risco reduzido de contaminação, aumento da produtividade do reator e fermentação contínua em reatores menos sofisticados (JAMUNA; RAMAKRISHNA, 1992; MAMO; GESSESSE, 1997; ABDEL-NABY et al., 2000).

Vários métodos têm sido utilizados para imobilização e para obtenção de células com alta atividade e estabilidade, incluindo a adsorção, a ligação covalente e o aprisionamento em gel (CHEN et al., 2004). O método mais fácil e antigo é a adsorção de biocatalisadores em carreadores macroscópicos insolúveis em água, no qual numerosos materiais inorgânicos e orgânicos têm sido utilizados, como, por exemplo, o carvão ativado, o óxido de alumínio, a terra de diatomácea, a celulose, o vidro poroso e as resinas sintéticas (PORTO et al., 2002). O método de imobilização e o tipo de matriz são importantes fatores que afetam a estabilidade dos biocatalisadores (UZUNOVA et al., 2002).

Diferentes metodologias podem ser aplicadas para a manutenção e preservação de culturas por períodos prolongados, como, por exemplo, a transferência periódica, a conservação em óleo mineral, ou em solo estéril, a secagem, o congelamento, a liofilização entre outras (MARTIN, 1964). A escolha de um protocolo específico está baseada nas características do isolado, na facilidade do método e no seu custo (MOTA et al., 2003). A seleção de métodos apropriados para estocagem de microrganismos baseia-se nas características fenotípicas de cada microrganismo, bem como no comportamento de cada espécie frente aos métodos de preservação. Diversas técnicas de estocagem têm

sido relatadas na literatura, porém, nenhuma tem se mostrado plenamente eficaz, requerendo-se a conjugação de dois ou mais métodos, para se garantir melhor recuperação da cepa (GIRÃO et al., 2004).

A finalidade da preservação é manter as culturas em estado viável, sem mudanças morfológicas, fisiológicas ou genéticas, assim como manter sua completa viabilidade e estabilidade. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar a manutenção e preservação de *Bacillus firmus* cepa 37 estocada em meio de cultivo sólido, solo estéril e em glicerol a baixa temperatura (-70°C), por procedimentos de imobilização de células em matrizes inorgânicas e de verificação por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Material e métodos

Microrganismo, condições de cultivo e métodos de preservação

O microrganismo utilizado foi o *B. firmus* cepa 37 isolado de solo de plantação de mandioca por Matioli et al. (1998). Inicialmente a cepa foi preservada pelo método de transferência periódica (repique), em meio de cultivo sólido contendo (% p/V): amido solúvel 1,0; polipeptona 0,5; extrato de levedura 0,5; K₂HPO₄ 0,1; MgSO₄.7H₂O 0,02; Na₂CO₃ 1,0 e agar 1,5. Posteriormente, foi adotado o método de armazenamento em solo estéril, que consistiu em adicionar suspensão de células em solo submetido à autoclavação. Para a conservação em baixas temperaturas, o microrganismo foi novamente cultivado em meio sólido e as placas incubadas a 37°C por 48h. As colônias foram transferidas para o meio de cultivo líquido de mesma composição, com exceção do agar. O cultivo foi realizado a 37°C por 48h com agitação de 120 rpm. As células foram removidas do meio por centrifugação (3.700 rpm, 10 min. e 4°C), estocadas a -70°C, utilizando-se como agente protetor o glicerol a 10% (p/V) e com contagem inicial de células de 10⁷ UFC mL⁻¹.

Procedimentos de reativação

Os esporos armazenados em solo estéril foram suspensos em água destilada estéril e reativados em meio sólido a 37°C por 48h. As colônias foram transferidas para o meio líquido e cultivadas a 37°C por 48h. Posteriormente, as células foram centrifugadas (3.700 rpm, 10 min. e 4°C), lavadas com solução tampão e utilizadas para os procedimentos de imobilização. Elas continham 8,0 g de células secas 100 g⁻¹ de células úmidas.

As células armazenadas em baixa temperatura continham 7,2 g de células secas 100 g⁻¹ de células úmidas. Elas foram reativadas em meio líquido, sendo incubadas a 37°C por 24h e então removidas por centrifugação (3.700 rpm, 10 min. e 4°C), lavadas com solução tampão e utilizadas para os procedimentos de imobilização.

Imobilização de células de *Bacillus firmus* cepa 37 em matrizes inorgânicas

A imobilização das células de *B. firmus* cepa 37 foi realizada em 50 mL de água destilada estéril, 1,0 g de cada matriz inorgânica, ou seja, sílica-titânio (SiO₂/TiO₂) e sílica-mangânês (SiO₂/MnO₂) e quantidades específicas de células íntegras de *B. firmus* cepa 37 (0,5 g, 1,0 g e 1,5 g). A suspensão foi agitada a 120 rpm e mantida a 37°C por 12h. Terminado este período, as células imobilizadas foram centrifugadas (2.300 rpm, 3 min. e 4°C), lavadas e submetidas ao ciclo de produção de CDs.

Os ciclos de produção de CDs foram realizados em reator batelada contendo 50,0 mL de maltodextrina 10% (p/V) em tampão Tris-HCl 50,0 mM e CaCl₂ 5,0 mM, pH 8,0, com temperatura de 50°C, agitação de 120 rpm durante 120h. Alíquotas de 1,0 mL foram retiradas em 0, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120h, diluídas em 1,0 mL de água destilada e submetidas à fervura para posterior dosagem de beta-CD produzida.

Métodos analíticos

Determinação de beta-CD

A concentração de beta-CD foi medida pela descoloração de uma solução de fenoltaleína (TARDIOLI et al., 2006). O ensaio foi conduzido, misturando-se 0,5 mL de amostra com beta-CD com 2,5 mL de solução trabalho de fenoltaleína 0,06 mM, com tampão bicarbonato-carbonato 0,12 M, pH 10,5 e a absorbância foi lida a 550 nm. Para o branco, a amostra foi substituída por água destilada. A solução trabalho de fenoltaleína foi preparada no momento da dosagem a partir de uma solução estoque de fenoltaleína 3,0 mM em 95% de etanol (2,0 mL da solução estoque de fenoltaleína, 20,0 mL do tampão bicarbonato-carbonato 0,6 M, pH 10,5, e o volume completado para 100,0 mL com água destilada). A concentração de beta-CD foi calculada pela Equação (1), que foi obtida pela determinação da constante de equilíbrio ($K_{\beta-CD}$) para a formação do complexo de inclusão beta-CD com fenoltaleína. Esta constante foi determinada por ajuste não-linear da Equação (2) para uma série de dados de absorbância em função de concentrações

padrão de beta-CD ($0 - 1 \times 10^{-3}$ M) preparadas em água destilada.

$$C_{\beta-CD} = 0,3 \left(1 - \frac{A_{550}}{A_{0/550}} \right) \left(1 + 1,0813 \frac{A_{0/550}}{A_{550}} \right) \quad (1)$$

em que: $C_{\beta-CD}$ é a concentração de beta-CD (mM), A_{550} e $A_{0/550}$ são as absorbâncias das amostras e do branco, respectivamente.

$$C_{\beta-CD} = a \left(1 - \frac{A_{550}}{A_{0/550}} \right) \left(1 + \frac{A_{0/550}}{K_{\beta-CD} a A_{550}} \right) \quad (2)$$

em que: a é a concentração total de fenoltaleína na cubeta do ensaio (5×10^{-5} M).

Inicialmente, as concentrações de beta-CD padrão foram corrigidas, levando-se em consideração a diluição realizada na cubeta (1:6) e a constante de equilíbrio ($K_{\beta-CD}$) foi calculada, usando-se o método de Quasi-Newton, resultando em $21627,10 \pm 85,61 \text{ M}^{-1}$, para o intervalo de confiança de 95%. A Equação (1) foi obtida pela substituição de $K_{\beta-CD}$ e o valor a na Equação (2) e pela multiplicação dessa equação por um fator igual a 6.000, que está relacionado com a diluição do ensaio e com a conversão de molar na cubeta para milimolar de beta-CD na amostra.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As células imobilizadas foram colocadas na presença de tampão Tris-HCl 50,0 mM e CaCl₂ 5,0 mM, pH 8,0, com 2,5% de glutaraldeído, por 24h. Após esse período, a solução sobrenadante foi descartada e as células imobilizadas lavadas com soluções etanólicas de 30, 50, 70, 90 e 100%. O material permaneceu em etanol absoluto para posterior desidratação em sistema de extração de fluídos supercríticos, utilizando CO₂ à alta pressão. O mesmo procedimento foi realizado com as células livres. Para obtenção das fotomicrografias, utilizou-se microscópio eletrônico de varredura (Shimadzu modelo SS 550) com voltagem de aceleração de 10 kV. As amostras de células livres e imobilizadas foram colocadas sobre a superfície de uma fita dupla-face, metalizadas com ouro e fotomicrografadas.

Resultados e discussão

Manutenção e preservação da cepa

Na comparação dos métodos de preservação, o repique não se mostrou adequado, pois a cepa diminuiu a capacidade de produção da enzima

CGTase, provavelmente em função de o meio conter amido e as CDs serem uma forma de armazenamento do substrato glicose para a bactéria. Ao contrário deste, o método de estocagem em solo estéril mostrou-se eficaz, considerando-se que o *B. firmus* cepa 37 é uma bactéria esporulada. O método de preservação a baixas temperaturas (-70°C) também se apresentou satisfatório, uma vez que a contagem inicial de células foi de 10^7 UFC mL^{-1} e manteve-se a mesma após 360 dias de estocagem.

A seleção de métodos apropriados para estocagem de microrganismos baseia-se nas características fenotípicas do microrganismo, bem como no comportamento de cada espécie frente aos métodos de preservação (GIRÃO et al., 2004). No estudo realizado por Bezerra et al. (2006), cinco das 20 cepas de *Coccidioides immitis* preservadas em óleo mineral mantiveram-se viáveis, todas as cinco subculturas preservadas em água permaneceram viáveis e nenhuma das 13 subculturas mantidas em solo foi viável. Para fungos queratinolíticos e dermatófitos relacionados, os métodos de manutenção em ágar, água destilada estéril, óleo mineral, secagem em sílica gel, estocagem em solo estéril e por liofilização apresentaram bom crescimento após sete a 12 anos de estocagem (DESHMUKH, 2003). Na escolha do método de preservação para determinados microrganismos, como o fungo *Chytridiomycota*, devem ser considerados fatores ambientais, tais como, a falta de umidade, as altas temperaturas, o alto potencial osmótico e a disponibilidade de oxigênio. Assim, a criopreservação é potencialmente o melhor entre os métodos de preservação por longo tempo (GLEASON et al., 2007).

Efeito da biomassa inicial de células de *Bacillus firmus* cepa 37 imobilizadas em matrizes inorgânicas

Células de *B. firmus* cepa 37 obtidas pelos diferentes métodos de preservação (solo estéril e baixa temperatura) foram utilizadas para os procedimentos de imobilização com diferentes concentrações (0,5 g, 1,0 g e 1,5 g). Para as células armazenadas em solo estéril, a imobilização em $\text{SiO}_2/\text{MnO}_2$ apresentou maior produção de beta-CD quando comparada a $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ (Figura 1), sendo, em média, 44,25% maior. Já para as células armazenadas em baixas temperaturas, a imobilização em $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ e $\text{SiO}_2/\text{MnO}_2$, utilizando-se 1,0 e 1,5 g de células levaram à, praticamente, mesma produção de beta-CD (Figura 2). Em ambos os casos, o aumento da biomassa também elevou a produção de beta-CD, o que pode sugerir que a carga utilizada ainda pode ser aumentada sem que

haja comprometimento nas camadas de biofilme formadas na superfície externa da matriz. Os métodos de preservação utilizados não interferiram na viabilidade das células, pois estas foram capazes de serem imobilizadas e de produzir CGTase, que, por sua vez, transformou a maltodextrina do meio reacional em beta-CD. As imagens obtidas por (MEV) com as células imobilizadas confirmaram a imobilização e a viabilidade celular (Figura 3).

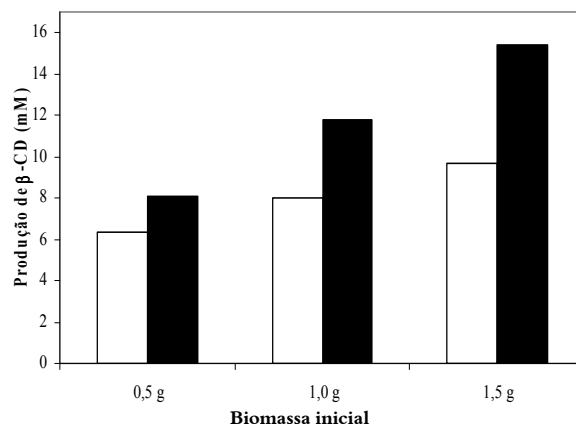


Figura 1. Produção de beta-CD por células de *B. firmus* cepa 37, armazenadas em solo estéril, imobilizadas em matrizes inorgânicas. □ $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$, ■ $\text{SiO}_2/\text{MnO}_2$. Condições do ensaio: maltodextrina 10% (p/V) em tampão Tris-HCl 50,0 mM, CaCl_2 5,0 mM, pH 8,0, 120 rpm e 120h.

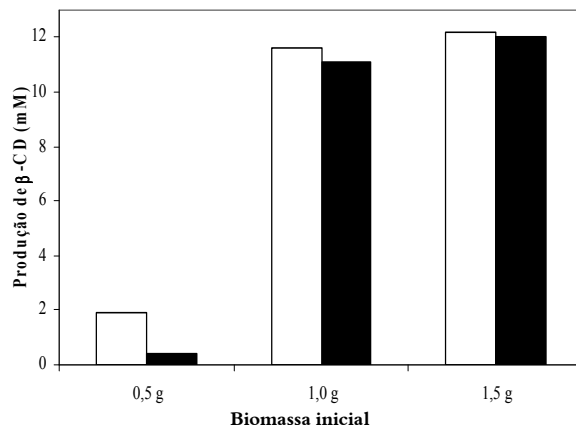


Figura 2. Produção de beta-CD por células de *B. firmus* cepa 37, armazenadas em baixa temperatura (-70°C), imobilizadas em matrizes inorgânicas. □ $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$, ■ $\text{SiO}_2/\text{MnO}_2$. Condições do ensaio: maltodextrina 10% (p/V) em tampão Tris-HCl 50,0 mM, CaCl_2 5,0 mM, pH 8,0, 120 rpm e 120h.

Segundo Moriwaki et al. (2007), para *B. firmus* cepa 37 imobilizados em $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ e $\text{SiO}_2/\text{MnO}_2$, quando utilizados 1,2; 1,8; 2,4; e 3,0 g de células como biomassa inicial, a produção de beta-CD não aumentou proporcionalmente. Neste caso foi sugerido que a produção da CGTase e, portanto, sua atividade, estão limitadas aos microrganismos situados na camada mais externa do biofilme

formado, ou seja, aos microrganismos que estão mais facilmente em contato com o substrato. Da mesma forma, quando Mazzer et al. (2008) utilizaram 0,5 g, 1,0 g, e 1,5 g de células de *B. firmus* cepa 37 e imobilizaram em $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ e $\text{SiO}_2/\text{MnO}_2$, a produção de beta-CD aumentou, mas quando do uso de 2,0 g de células, a produção diminuiu.

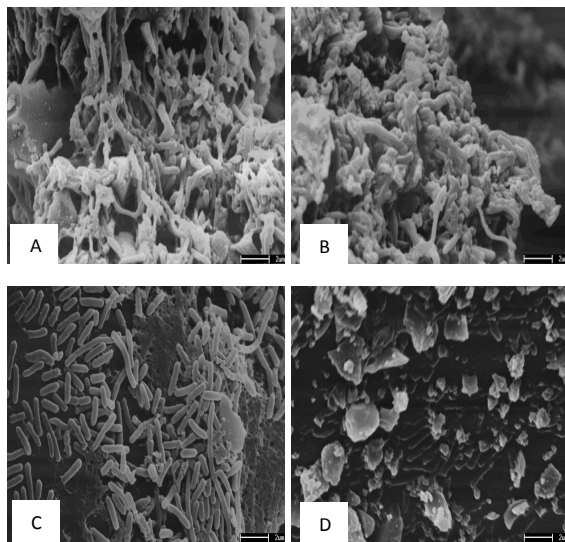


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura. *B. firmus* cepa 37 imobilizado em: A) $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ e (B) $\text{SiO}_2/\text{MnO}_2$, obtidos com células armazenadas em solo estéril. C) $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ e (D) $\text{SiO}_2/\text{MnO}_2$, obtidos com células armazenadas em baixa temperatura (-70°C)

Bacillus circulans ATCC 21783, imobilizados por ligação covalente em partículas magnéticas silanizadas com cargas iniciais de células de 70 a 560 mg, apresentaram atividade máxima para CGTase, utilizando 140 mg e mínima, com 560 mg de células (SAFARIKOVA et al., 2007). O mesmo microrganismo imobilizado por aprisionamento em ágar aumentou significativamente a atividade da CGTase com 48h de cultivo, utilizando 0,7 a 2,0% de carga inicial de células (VASSILEVA et al., 2003).

Abdel-Naby et al. (2000) imobilizaram *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus macerans* e *Bacillus megaterium* em alginato de cálcio, ágar e poliacrilamida e demonstraram que o *B. amyloliquefaciens*, imobilizado em alginato de cálcio, apresentou a maior atividade da CGTase ($70,8 \text{ U mL}^{-1}$). Quando estes autores aperfeiçoaram as condições de imobilização, um estudo do efeito da biomassa inicial, utilizando 0,77 a 1,40 g de células úmidas foi realizado, demonstrando aumento da atividade enzimática com aumento da carga de células em até 1,08 g de células úmidas, que, depois, manteve-se constante.

Conclusão

O comportamento dos isolados microbianos, quando mantidos por períodos prolongados em condições laboratoriais, é importante fator na seleção do método de preservação mais eficiente, conforme exposto por Mota et al. (2003) e também verificado neste estudo. A manutenção e preservação de *B. firmus* cepa 37 apresentaram-se adequadas quando do uso de solo estéril e em baixa temperatura (-70°C), indicando que ambas as metodologias são passíveis de serem utilizadas para longos períodos de conservação das células.

O teste do efeito da biomassa inicial, que apresentou maior produção de beta-CD quando do uso de 1,5 g de células, demonstrou que os métodos de preservação utilizados não interferiram na viabilidade das células. O mesmo ocorreu para imobilização avaliada por MEV, que não mostrou diferença na adsorção das células conservadas pelos diferentes métodos.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com texto de Girão et al. (2004), os quais mencionam que diversos métodos vêm sendo empregados para preservação de microrganismos, porém, em virtude da biodiversidade destes, não existe uma técnica padrão que seja capaz de preservá-los de forma adequada e generalizada. Portanto, para a escolha de um método de preservação, devem ser levadas em consideração a capacidade e a manutenção das características fenotípicas, genotípicas e patogênicas das cepas estocadas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes, pelo suporte financeiro.

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**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2000.
- BEZERRA, C. C. F.; LIMA, R. F.; LAZERA, M. S.; WANKE, B.; BORBA, C. M. Viability and molecular authentication of *Coccidioides immitis* strains from Culture Collection of the Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 241-244, 2006.
- CAO, X.; JIN, Z.; WANG, X.; CHEN, F. A novel cyclodextrin glycosyltransferase from an alkalophilic *Bacillus* species: purification and characterization. **Food Research International**, v. 38, n. 3, p. 309-314, 2005.

- CHEN, J.; XU, Y.; XIN, J.; LI, S.; XIA, C.; CUI, J. Efficient immobilization of whole cells of *Methylobacter* sp. strain GYJ3 by sol-gel entrapment. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 30, n. 3-4, p. 167-172, 2004.
- COSTA, G. L.; PAZZETTO, R.; BROL, F.; MATIOLI, G. Metodologia de seleção de cepas para produção da ciclodextrina glicosiltransferase e para purificação da enzima. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 29, n. 1, p. 45-50, 2007.
- CONNORS, K. A. The stability of cyclodextrin complexes in solution. **Chemical Reviews**, v. 97, n. 5, p. 1325-1357, 1997.
- DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1033-1046, 2004.
- DESHMUKH, S. K. The maintenance and preservation of keratinophilic fungi and related dermatophytes. **Mycoses**, v. 46, n. 5-6, p. 203-207, 2003.
- GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 3, p. 229-233, 2004.
- GLEASON, F. H.; MOZLEY-STANDRIDGE, S. E.; PORTER, D.; BOYLE, D. G.; HYATT, A. D. Preservation of *Chytridiomycota* in culture collections. **Mycological Research**, v. 111, n. 2, p. 129-136, 2007.
- JAMUNA, R.; RAMAKRISHNA, S. V. Continuous synthesis of thermostable α -amylase by *Bacillus* cells immobilized in calcium alginate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 1, p. 36-41, 1992.
- MAMO, G.; GESSESSE, A. Thermostable amylase production by immobilized thermophilic *Bacillus* sp. **Biotechnology Techniques**, v. 11, n. 6, p. 447-450, 1997.
- MARTIN, S. M. Conservation of microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, v. 18, p. 1-16, 1964.
- MATIOLI, G.; ZANIN, G. M.; GUIMARÃES, M. F.; MORAES, F. F. Production and purification of CGTase of alkalophilic *Bacillus* isolated from Brazilian soil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, n. 1, p. 267-275, 1998.
- MAZZER, C.; FERREIRA, L. R.; RODELLA, J. R. T.; MORIWAKI, C.; MATIOLI, G. Cyclodextrin production by *Bacillus firmus* strain 37 immobilized on inorganic matrices and alginate gel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, n. 1, p. 79-86, 2008.
- MORIWAKI, C.; PELISSARI, F. M.; GONÇALVES, R. A. C.; GONÇALVES, J. E.; MATIOLI, G. Immobilization of *Bacillus firmus* strain 37 in inorganic matrix for cyclodextrin production. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 49, n. 1-4, p. 1-7, 2007.
- MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V. Sporulation, radial growth and biomass production of *A. robusta* and *M. thaumasium* submitted to different methods of preservation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 157-160, 2003.
- PORTO, A. L. M.; CASSIOLA, F.; DIAS, S. L. P.; JOEKES, I.; GUSHIKEM, Y.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S.; MANFIO, G. P.; MARSAIOLI, A. J. *Aspergillus terreus* CCT 3320 immobilized on chrysotile or cellulose/TiO₂ for sulfide oxidation. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 19-20, p. 327-334, 2002.
- SAFARIKOVA, M.; ATANASOVA, N.; IVANOVA, V.; WEYDA, F.; TONKOVA, A. Cyclodextrin glucanotransferase synthesis by semicontinuous cultivation of magnetic biocatalysts from cells of *Bacillus circulans* ATCC 21783. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 10, p. 1454-1459, 2007.
- TARDIOLI, P. W.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Characterization of *Thermoanaerobacter* cyclomaltodextrin glucanotransferase immobilized on glyoxil-agarose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 6, p. 1270-1278, 2006.
- TONKOVA, A. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 8, p. 678-686, 1998.
- UZUNOVA, K.; VASSILEVA, A.; IVANOVA, V.; SPASOVA, D.; TONKOVA, A. Thermostable exo-inulinase production by semicontinuous cultivation of membrane-immobilized *Bacillus* sp. 11 cells. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 8, p. 863-868, 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**, v. 1543, n. 2, p. 336-360, 2000.
- 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 *Bacillus circulans* ATCC 21783. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1585-1591, 2003.

Received on April 22, 2009.

Accepted on May 28, 2009.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.