
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

**Glucoamilases mutantes termoestáveis do fungo *Aspergillus awamori*
expressas em levedura *Saccharomyces cerevisiae*: Sequenciamento do gene,
produção e purificação das enzimas obtidas por fermentação submersa**

FABIANA CARINA PAVEZZI

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio
Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de doutor
em Ciências Biológicas área de
Microbiologia Aplicada

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

**Glucoamilases mutantes termoestáveis do fungo *Aspergillus awamori*
expressas em levedura *Saccharomyces cerevisiae*: Sequenciamento do gene,
produção e purificação das enzimas obtidas por fermentação submersa**

Discente: Fabiana Carina Pavezzi

Orientador: Roberto da Silva

Co-orientador: Heloiza Ferreira Alves-Prado

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas área de Microbiologia Aplicada

Fevereiro- 2011

Mãe.... Pai.... obrigado por tudo !

Querido irmão você sabe o quanto é especial...

Obrigado por serem à base de tudo....

*O mais importante na vida não é o tempo que a gente leva para fazer alguma coisa, mas o
tanto de amor que a gente coloca ao praticá-la.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelos momentos em que me envolve com sua presença e espírito, e por que não, pelos problemas e aflições que me concedeu para edificar o meu caráter.

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto da Silva, pela confiança depositada, pela sua valiosa orientação e pela sua paciência em me receber e ajudar todos esses anos.

Aos Professores: Dr^a. Eleni Gomes e Dr. Henrique Ferreira pelo esclarecimento de dúvidas e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Prof^a. Dr^a. Heloiza Ferreira Alves-Prado, pelos seus ensinamentos, e pela contribuição em todos os momentos, e principalmente pela sua paciência e disposição em ajudar-me.

A todos os amigos do laboratório, pelos agradáveis momentos, incentivos, conversas e pelas muitas dúvidas também!

A amiga Paula M. M. Martins pela ajuda molecular.

A todos os funcionários da Seção de Pós-Graduação do instituto, pela atenção e eficiência.

A CAPES, FAPESP e CNPq pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

“A coragem é a primeira das qualidades humanas porque garante todas as outras”.

Aristóteles

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Amido.....	17
2.2 Enzimas envolvidas na degradação do amido.....	21
2.3 Família da Glucoamilase.....	22
2.4 Estrutura da glucoamilase.....	23
2.4.1 Domínio catalítico.....	24
2.4.2 Domínio de ligação ao amido.....	26
2.4.3 Linker	26
2.5 Outras características da enzima.....	26
2.6 Termoestabilidade da glucoamilase.....	28
2.7 Alterações moleculares.....	29
2.8 Purificação da glucoamilase.....	34
2.9 Aplicação da glucoamilase.....	35
3. OBJETIVO.....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 Micro-organismo.....	38
4.2 Produção da glucoamilase.....	38
4.2.1 Meio de cultura.....	38
4.2.2 Pré inóculo.....	38
4.2.3 Efeito da fonte de amido.....	38
4.3 Determinação da atividade enzimática.....	39
4.4 Quantificação da biomassa microbiana.....	39
4.5 Determinação da concentração de proteína.....	39
4.6 Purificação das glucoamilases.....	40
4.6.1 Procedimentos para montagem da coluna de afinidade.....	40
4.7 Processo cromatográfico.....	41
4.8 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE).....	41
4.9 Caracterização das glucoamilases mutantes e selvagem.....	41
4.10 Cinética de termoinativação irreversível das enzimas.....	42

4.11	Análise dos parâmetros termodinâmicos de desnaturação enzimática...	42
4.12	Estudo dos parâmetros cinéticos da enzima.....	43
4.13	Estudo dos efeitos de íons sobre a atividade da enzima.....	43
4.14	Determinação da natureza glicoprotéica.....	43
4.15	Análises moleculares.....	44
4.15.1	Extração do DNA plasmidial.....	44
4.15.2	Gel de agarose.....	44
4.15.3	Transformação por eletroporação.....	44
4.15.4	Extração de DNA das colônias transformadas.....	45
4.15.5	Amplificação do gene.....	45
4.15.6	Restrição do vetor.....	45
4.15.7	Sequenciamento do gene.....	46
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1	Produção da glucoamilase.....	47
5.2	Purificação da glucoamilase.....	53
5.2.1	Montagem da coluna de afinidade.....	53
5.3	Procedimentos de purificação.....	55
5.4	Caracterização enzimática das glucoamilases de <i>A. awamori</i> expressas em <i>S. cerevisiae</i>	58
5.5	Termoinativação irreversível das enzimas.....	63
5.6	Estudo dos parâmetros cinéticos da enzima.....	68
5.7	Estudo dos efeitos de íons sobre a atividade da enzima.....	69
5.8	Determinação da natureza glicoprotéica.....	70
5.9	Sequenciamento dos genes das glucoamilases.....	71
6.	CONCLUSÃO GERAL.....	77
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
APÊNDICE- Production and characterization of glucoamylase from fungus <i>Aspergillus awamori</i> expressed in yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
APÊNDICE - The influence of different substrates on the production of a mutant thermostable glucoamylase in submerged fermentation.....		

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estrutura da amilose.....	19
Figura 2. Estrutura da amilopectina.....	19
Figura 3. Ação das enzimas que hidrolisam o amido.....	21
Figura 4. Classificação da glucoamilase de <i>Aspergillus awamori</i> mostrando a inclusão nas famílias.....	23
Figura 5. Imagem da estrutura estendida da glucoamilase de <i>Aspergillus awamori</i> ..	24
Figura 6. Esquema da glucoamilase de <i>Aspergillus awamori</i> var. X100.....	25
Figura 7. Vetor de expressão YEpPM18 da glucoamilase de <i>Aspergillus awamori</i> ..	31
Figura 8. Estrutura da acarbose.....	40
Figura 9. Produção da glucoamilase pela linhagem selvagem (WT) em diferentes fontes de amido.....	48
Figura 10. Produção da glucoamilase pela linhagem M1 em diferentes fontes de amido.....	49
Figura 11. Produção da glucoamilase pela linhagem M2 em diferentes fontes de amido.....	50
Figura 12. Seção do sítio ativo da glucoamilase mostrando as cadeias de aminoácidos e a acarbose.....	55
Figura 13. Perfil de eluição da glucoamilase M1.....	56
Figura 14. Perfil eletroforético em SDS-PAGE das glucoamilases de <i>Aspergillus awamori</i> expressa em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
Figura 15. Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade da glucoamilase M1 pura..	59
Figura 16. Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade da glucoamilase M2 pura.	60
Figura 17. Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade da glucoamilase selvagem pura.....	60
Figura 18. Temperatura ótima e de estabilidade da glucoamilase M1.....	62
Figura 19. Temperatura ótima e de estabilidade da glucoamilase M2.....	62
Figura 20. Temperatura ótima e de estabilidade da glucoamilase selvagem.....	63
Figura 21. Atividade residual das glucoamilases em função do tempo de incubação a 70°C.....	64
Figura 22. Ln da atividade a 70 °C.....	65
Figura 23. Efeito da temperatura na termoinativação irreversível das glucoamilases.....	66
Figura 24: Extração de DNA das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em gel de agarose 1%.....	71

Figura 25. Restrição do produto da extração dos clones de <i>Escherichia coli</i>	72
Figura 26. Aminoácidos iniciais que compõem as glucoamilases.....	73
Figura 27. Sequenciamento do gene da glucoamilase de <i>Aspergillus awamori</i>	73
Figura 27. Sequenciamento do gene da glucoamilase de <i>Aspergillus awamori</i>	74

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Classificação dos tipos de xaropes.....	36
Tabela 2. Componentes da reação para amplificação do gene da glucoamilase.....	45
Tabela 3. Primers.....	46
Tabela 4. Determinação da concentração de acarbose na montagem da matriz de afinidade contendo resina Sepharose 6B Epoxi Ativada.....	54
Tabela 5. Purificação da glucoamilase M1.....	56
Tabela 6. Purificação da glucoamilase M2.....	56
Tabela 7. Purificação da glucoamilase selvagem.....	57
Tabela 8. Tempo de meia vida das glucoamilases em diferentes temperaturas.....	63
Tabela 9. Coeficiente de velocidade de termoinativação das glucoamilases.....	65
Tabela 10. Parâmetros termodinâmicos da termoinativação das glucoamilases.....	67
Tabela 11. Constantes cinéticas das glucoamilases.....	68
Tabela 12. Efeito de íons metálicos, detergentes e outros agentes químicos na atividade da glucoamilase.....	69
Tabela 13. Relação dos aminoácidos encontrados nas glucoamilases.....	76

Lista de abreviaturas

E_{ad} = energia de ativação para a desnaturação

EDTA = ácido etilenodiaminotetracético

GA = glucoamilase

Kb = kilo base

Kd = coeficiente de velocidade de termoinativação

kDa = kilo Dalton

K_m = constante de Michaelis-Menten

$\ln a_t$ = logaritmo neperiano da atividade enzimática

PCR = reação de polimerização em cadeia

SDS = duodecil sulfato de sódio

$t_{1/2}$ = tempo de meia vida

TE = tampão Tris-EDTA

TBE = tampão Tris-borato-EDTA

V_{max} = velocidade máxima

ΔG = energia livre

ΔH = entalpia

ΔS = entropia

RESUMO

A glucoamilase é uma enzima hidrolítica que catalisa a liberação sucessiva de β -D-glicose a partir do amido e oligossacarídeos relacionados. Neste trabalho foram estudadas as glucoamilases de *Aspergillus awamori* expressas em levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Foram utilizadas duas linhagens alteradas denominadas M1 e M2, e uma linhagem selvagem (WT), utilizada como parâmetros na comparação dos resultados. As enzimas foram produzidas em fermentação submersa, e amidos de diferentes origens vegetais foram utilizados como uma fonte extra de carbono na produção das enzimas. O melhor substrato para a produção da glucoamilase selvagem e da mutante M2 foi o amido de batata com 8,2 e 6,6 U/mL, respectivamente. Para a linhagem M1 foi o amido de mandioca com atividade enzimática de 5,9 U/mL. O amido de milho mostrou ser um substrato menos indicado para a produção destas enzimas. Para a purificação foi preparada uma coluna de afinidade com resina sepharoseTM 6B epóxi ativada ligada a acarbose, onde diferentes concentrações do ligante foram avaliadas. A coluna apresentou boa eficiência no processo de purificação conforme análise por eletroforese SDS-PAGE, com massas moleculares estimada em 100 kDa. A temperatura ótima de atividade das enzimas M1 e M2 foi 65 °C, enquanto que a selvagem teve sua atividade máxima em 60 °C. O pH ótimo de atuação das enzimas foi 4,5. As glucoamilases mutantes apresentaram maior termoestabilidade que a glucoamilase selvagem durante o processo de termoinativação, destacando principalmente a glucoamilase M2. A meia vida a 70 °C foi de 8,1 minutos para a enzima mutante M2, 4,1 minutos para a M1 e 3,0 minutos para a enzima selvagem. A energia de ativação para a desnaturação (E_{ad}) foi de 252,9 e 262,8 KJ mol⁻¹ para as enzimas M1 e M2 respectivamente, e de 234,3 KJ mol⁻¹ para a selvagem. A maior energia dos mutantes indica maior resistência da estrutura da proteína, pois mais energia será necessária para que a molécula entre num estado de transição e desdobramento. O parâmetro termodinâmico ΔG foi maior para as enzimas M1 e M2 em todas as temperaturas analisadas, confirmando assim a melhor termoestabilidade. Os valores de K_m para o substrato amido solúvel foi de 0,13, 0,21 e 0,18 mg/ml para as enzimas M1, M2 e Selvagem, respectivamente. A atividade glucoamilásica foi ativada para a maioria dos íons na concentração de 1 mM, exceto para FeSO₄ que inibiu mais de 50% da atividade. Na concentração de 10 mM os compostos que inibiram total ou quase totalmente a atividade da glucoamilase foram FeSO₄ e o β -mercaptoetanol; os demais compostos inibiram de forma menos significativa. O sequenciamento revelou 3 alterações de aminoácidos na glucoamilase M2: Ser30→Pro, Thr290→Ala e His390→Tyr, todas localizadas no domínio catalítico, sendo que estas alterações contribuíram significativamente para a melhora da termoestabilidade.

Para a linhagem M1, apesar de ter passado pelo mesmo processo de mutação aleatória da linhagem M2, não foram observadas alterações de aminoácidos em relação à enzima selvagem.

Palavras-chave: Glucoamilase. Mutação. Termoestabilidade. Termoinativação. Fermentação. Amido.

ABSTRACT

Glucoamylase is a hydrolytic enzyme that catalyzes the consecutive liberation of β -D-glucose from starch and related oligosaccharides. In this work glucoamylases from *Aspergillus awamori* expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* were studied. Two mutant strains, denominated M1 and M2, were used and one wild strain (WS) was used as parameter to compare the results. The enzymes were produced in submerged fermentation and starches from different botanical origins were used as extra carbon source for enzyme production. The best substrate for the production of wild glucoamylase and of mutant M2 was potato starch with 8.2 and 6.6 U/mL, respectively. For strain M1 the best substrate was cassava starch with enzymatic activity of 5.9 U/mL. Corn starch revealed to be a less indicated starch for the production of these enzymes. For purification, an affinity column was prepared with activated SepharoseTM 6B epoxy linked to acarbose, and different concentrations of ligand were evaluated. The column exhibited good efficiency during the purification process according to SDS-PAGE analysis, with molecular masses estimated in 100 kDa. Optimum temperature for activities of M1 and M2 enzymes was 65°C, while the wild one exhibited maximum activity at 60°C. Optimum pH for enzyme action was 4.5. Mutant glucoamylases presented higher thermostability than wild glucoamylase during the thermoinactivation process, with M2 standing out. Half life at 70°C was of 8.1 minutes for mutant enzyme M2, 4.1 minutes for M1 and 3.0 minutes for wild enzyme. Activation energy for denaturation (E_{ad}) was 252.9 and 262.8 KJ mol⁻¹ for enzymes M1 and M2 respectively, and 234.3 KJ mol⁻¹ for the wild one. The higher energy of the mutants indicates higher resistance of the protein structure, since more energy is required for the molecule to enter a transition and unfolding state. Thermodynamic parameter ΔG was higher for enzymes M1 and M2 in all temperatures tested thus confirming the better thermostability. Values of K_m for soluble starch were 0.13, 0.21 and 0.18 mg/mL for enzymes M1, M2 and wild, respectively. Glucoamylase activity was activated by most ions at 1 mM, except for FeSO₄ which inhibited more than 50% of the activity. At 10 mM, the compounds that completely or almost completely inhibited glucoamylase activity were FeSO₄ and β -mercaptoethanol; and the other compounds caused a less significant inhibition. Sequencing revealed 3 alterations of amino acids in glucoamylase M2: Ser30→Pro, Thr290→Ala and His390→Tyr, all located in the catalytic domain, having significantly contributed to the improvement of thermostability. In spite of strain M1 having gone through the same random mutation process as strain M2, its enzyme did not exhibit amino acid alterations when compared to the wild enzyme.

Keywords: Glucoamylase. Mutant. Thermostable. Thermo-inactivation. Fermentation. Starch.

1. INTRODUÇÃO

A aplicação de enzimas como catalisador industrial é hoje um processo muito bem estabelecido. Contudo, uma das principais limitações em determinadas aplicações desses biocatalisadores é relativamente, a sua fácil desnaturação quando submetidos a altas temperaturas.

A glucoamilase (1,4- α -D-glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.3.) é uma importante enzima aplicada em processos fermentativos e na indústria alimentícia na sacarificação do amido. Esta enzima se distingue de α -amilase e β -amilase pela sucessiva hidrólise de ligações glicosídicas do tipo α -1,4 da extremidade final não redutora da molécula do amido, resultando na produção de glicose. Em menor grau, a enzima também hidrolisa ligações glicosídicas do tipo α -1,6 da amilopectina, liberando β -D- glicose como produto final (MERTENS e SKORY, 2007; THORSEN et al. 2006).

As glucoamilases podem ser derivadas de grande variedade de plantas, animais e micro-organismos. No entanto, a maioria ocorre em fungos (VIHINEM e MÄNTSÄLA, 1989; BHATTI et al. 2007; PANDEY, 1995; RIAZ et al 2007). A enzima é capaz de hidrolisar completamente o amido se incubada por longos períodos, produzindo até 100% de glicose.

A principal aplicação da glucoamilase é na produção de xarope de glicose, o qual é amplamente utilizado como adoçante. O xarope de glicose pode servir de substrato para fermentação e ser convertido em etanol ou ácidos orgânicos, ou ainda ser obtida como glicose cristalina (ROY e GUPTA, 2004; RIAZ et al 2007).

A glucoamilase catalisa a reação de sacarificação do amido dentro de um limite estreito de temperatura, isto porque, a sua estrutura ativa muda com o aumento da temperatura. Esta termoestabilidade limitada afeta seu uso em processos industriais onde a incubação prolongada em altas temperaturas é necessária (LEMOS et al., 2003).

O desenvolvimento de uma enzima mais termoestável poderia contribuir para a melhora do processo, reduzindo o tempo de hidrólise, viscosidade do meio, e o risco de contaminações.

Com o intuito de melhorar a termoestabilidade da enzima, e, conseqüentemente, agilizar e aprimorar os processos industriais, várias pesquisas têm sido realizadas nos últimos anos. Já que hoje, as propriedades naturais de uma enzima podem ser facilmente alteradas com o auxílio da tecnologia do DNA recombinante e engenharia de proteínas, as quais proporcionam uma importante ferramenta para melhorar as características das enzimas ou mesmo criar novas propriedades.

Em trabalho anterior foi realizada mutagênese aleatória no gene selvagem da glucoamilase de *Aspergillus awamori*, através da técnica do PCR mutagênico (erro-prone PCR), sendo as enzimas expressas em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. As colônias positivas que incorporaram o gene da glucoamilase passaram por testes de termoestabilidade por incubação a 75 °C por 15 minutos (LEMOS, 2003). Em seguida foram selecionados alguns mutantes que apresentaram a termoestabilidade elevada em relação à enzima selvagem para a caracterização (PAVEZZI, 2006). Duas linhagens denominadas M1 e M2 apresentaram termoestabilidade elevada, em relação à glucoamilase selvagem que foi utilizada como padrão para comparação dos resultados.

No presente trabalho, são apresentados os resultados de produção das glucoamilases termoestáveis em fermentação submersa, utilizando amidos de diferentes fontes vegetais. Essas enzimas foram purificadas por cromatografia de afinidade e caracterizadas bioquímica e físicoquimicamente. Posteriormente, foi realizado o seqüenciamento do gene que expressa a glucoamilase, para identificar as alterações na estrutura da enzima que permitiram uma melhora na termoestabilidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Amido

O carbono é o elemento químico mais abundante do planeta, sendo mais da metade deste elemento encontrado em apenas dois tipos de moléculas: o amido e a celulose. Ambos constituídos por monômeros de glicose. Estes polímeros se diferenciam pela forma de organização da glicose em cada polímero (CAMPBELL e FARRELL, 2007).

Encontrado principalmente em sementes de cereais como milho, arroz e trigo e em raízes e tubérculos como mandioca e batata, o amido é um polímero de α -D-glicose de alta massa molecular. É o mais importante polissacarídeo de reserva do reino vegetal, constituindo uma fonte de carbono e energia essencial para muitos organismos (VAN DER VEEN et al., 2000). Por ser um carboidrato de fácil digestão e assimilação pelos animais superiores, tornou-se um dos componentes mais importantes na alimentação humana e animal. Além da sua larga utilização na indústria de alimentos, têxtil, de papel e celulose, também apresenta enorme

potencial para a indústria química, gerando boas perspectivas como fonte renovável de energia (MORAES, 2004).

O grânulo de amido é constituído de dois tipos distintos de polímeros de glicose: a amilose e a amilopectina, cujos resíduos de glicose estão ligados através de ligações glicosídicas. No fim da cadeia está presente um grupo aldeído latente. Este grupo define a extremidade redutora. A proporção de amilose e amilopectina no grânulo é controlada geneticamente, de acordo como a fonte vegetal, idade do amido, e também pode ser influenciada pelo processo de extração empregado (CIACCO e CRUZ, 1981; MALDONDO e LÓPEZ, 1995; ROBYT, 1998; BULÉON et al., 1998; VAN DER VEEN et al., 2000; VAN DER MAAREL et al., 2002; TESTER et al., 2004; LIU et al., 2009; WEBER et al., 2009).

Em amidos de cereais geralmente o teor de amilose encontra-se entre intervalo de 20-30%. No milho varia entre 25 - 28%, enquanto o amido de mandioca possui apenas 17% de amilose. Algumas variedades de milho, cevada e arroz, mencionam o termo “high-amilose” para aqueles amidos que possuem teores acima de 50%, enquanto outros amidos são denominados cerosos ou “waxy” por serem constituídos totalmente por amilopectina (LINEBACK, 1984; WEBER et al., 2009).

A amilose é um polímero linear constituído por unidades de D-glicoses unidas entre si, exclusivamente por ligações glicosídicas do tipo α -1,4 (Fig. 1a). Este polímero pode conter de poucas até milhares de unidades de glicose. A conformação mais comum da amilose é uma estrutura helicoidal, com seis resíduos de glicose por volta (Fig. 1b). No interior desta estrutura encontram-se átomos de hidrogênio, enquanto no exterior há grupos hidroxilas. A presença destes hidrogênios no interior da estrutura a torna hidrofóbica, permitindo desta forma, a formação de complexos entre esta estrutura e outros compostos, tais como: ácidos graxos livres, glicerídeos de ácidos graxos, alguns alcoóis e o iodo (ZAVAREZE e DIAS, 2010). O complexo formado com o iodo resulta numa estrutura de coloração azul intenso (CAMPBELL e FARRELL, 2007). A estrutura linear da amilose faz com que seu comportamento se assemelhe a polímeros sintéticos (LIU et al., 2009). Dependendo da fonte de origem e das condições de processamento empregadas durante a extração, sua massa molecular pode ser cerca de 1×10^6 g/mol (ZAVAREZE e DIAS, 2010), que é 10 vezes maior do que os polímeros sintéticos convencionais (LIU et al., 2009).

Amilopectina, por outro lado, é um polímero ramificado e sua massa molecular é muito maior do que da amilose, em torno de 1000 vezes variando de 1×10^7 a 5×10^8 g/mol (ZAVAREZE e DIAS, 2010), sendo, portanto, uma das maiores moléculas encontradas na natureza (GOESAERT et al., 2009). É formada por várias cadeias curtas laterais de D-glicose

unidas por ligações do tipo α -1,4 e essas cadeias estão ligadas à cadeia central por ligações glicosídicas do tipo α -1,6 que ocorre a cada 24 a 30 resíduos de glicose na cadeia central (Fig. 2). Devido ao alto peso molecular destas ramificações, a mobilidade da estrutura da amilopectina é reduzida, podendo interferir de algum modo com a orientação e aproximação destas cadeias na formação de pontes de hidrogênio (LIU et al., 2009).

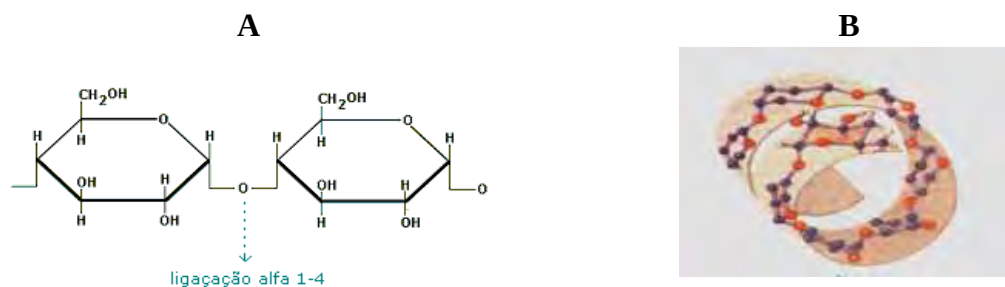


Figura 1. Estrutura da amilose. **(A)** cadeia linear composta por D-glicose ligadas por ligações (α 1 $\rightarrow$ 4). **(B)** Estrutura helicoidal estreitamente compacta (CAMPBELL e FARRELL, 2007).

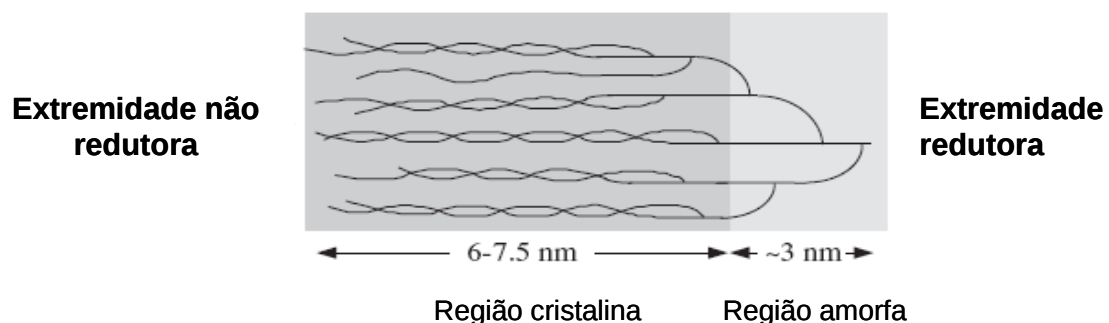


Figura 2. Estrutura da amilopectina proposta por JEON et al. 2010, mostrando as regiões amorfas e cristalinas.

A maioria dos amidos nativos são semi-cristalinos, sendo que, esta cristalinidade varia em torno de 20-45% (WHISTLER et al., 1984). A amilose e os pontos de ramificação da amilopectina são consideradas regiões amorfas. A amilopectina é a principal responsável pela cristalinidade do grânulo de amido. Essas regiões cristalinas estão presentes em forma de dupla hélice com aproximadamente 5 nm de comprimento, sendo todos estes segmentos

paralelos ao eixo da hélice principal da amilopectina (LIU et al., 2009), Assim, as extremidades não redutoras da molécula ficam orientadas para a superfície do grânulo, formando as regiões cristalinas (dupla hélice) e amorfas (ponto de ramificação) alternadamente (ZAVAREZE e DIAS, 2010).

Os grânulos de amido podem variar em forma, tamanho, estrutura e composição química, dependendo da origem do amido (SMITH, 2001; ZAVAREZE e DIAS, 2010). Lipídeos e proteínas em pequenas quantidades também estão presente nos grânulos (LIU et al., 2009). O formato dos grânulos de amido é diferenciado. Em tubérculos e raízes os grânulos são em sua maioria ovais, entretanto esféricos, poligonais irregulares também podem ocorrer (LIDEBOOM et al., 2004).

A susceptibilidade do amido à hidrólise enzimática é influenciada por diversos fatores, tais como teor de amilose e amilopectina (RING et al., 1988), tamanho das partículas, estrutura cristalina e presença de inibidores de enzimas. Entre esses fatores, a estrutura granular, acredita-se que seja o fator mais importante (ZHANG e OATES, 1999, SHARIFFA et al., 2009). Grânulos danificados também são mais suscetíveis ao ataque enzimático do que os inteiros (DELCOUR e HOSENEY, 2009). O amido é degradado por um sistema enzimático, e embora capaz de hidrolisar o amido no seu estado natural, a suscetibilidade do grânulo à ação enzimática é consideravelmente aumentada quando este está na forma gelatinizada (CIACCO e CRUZ, 1981).

A aplicação do amido depende, em grande parte, de suas propriedades coloidais. Quando uma suspensão de amido é aquecida, os grânulos absorvem água e incham formando um gel. Esta propriedade é que determina seu processamento na indústria, onde pode ser utilizado para melhorar as propriedades funcionais de alguns produtos alimentícios, sendo usado como espessante, estabilizante e geleificante (CIACCO e CRUZ, 1981), como agente adesivo, ligante, retentor de umidade e retardador da retrogradação de alguns alimentos (FREITAS et al., 2003). O amido também é muito utilizado na produção de xarope de glicose ou frutose. O xarope de glicose pode ainda, ser convertido em etanol por meio de processos fermentativos (CRABB e MITCHINSON, 1997). Com o crescente interesse no desenvolvimento de produtos biodegradáveis e não agressivos ao meio ambiente, o amido tem surgido como uma excelente alternativa no desenvolvimento de novos produtos como, plásticos e outros polímeros a base de amido, substituindo assim os derivados de petróleo (ZAVAREZE e DIAS, 2010).

Exoamilases: atuam nos resíduos externos da amilose e amilopectina liberando apenas produtos de baixa massa molecular como, glicose e maltose. Representantes deste grupo são: β -amilase (E.C. 3.2.1.2) que hidrolisa somente ligações glicosídicas α -1,4, liberando maltose; glucoamilase (E.C. 3.2.1.3) que hidrolisa tanto ligações α -1,4 quanto α -1,6 produzindo β -glicose; α -glicosidase também pode hidrolisar ligações α -1,4 e α -1,6, produzindo α -glicose. As glucoamilase e α -glicosidase diferem pelo substrato de preferência, a glucoamilase atua melhor em substratos de alto peso molecular, enquanto a α -glicosidase atua melhor em substratos menores.

Enzimas desramificantes: são enzimas que quebram exclusivamente ligações do tipo α -1,6. Exemplos deste grupo encontram a isoamilase (E.C. 3.2.1.68) e pululanase tipo I (E.C. 3.2.1.41) liberando oligossacarídeos lineares de cadeia longa. A diferença entre estas duas enzimas consiste no fato da pululanase atuar tanto em ligações α -1,6 da amilopectina quanto em pululana. A pululanase tipo II (α -amilase-pululanase) hidrolisa, além de ligações α -1,6, as ligações α -1,4.

Transferases: este grupo de enzimas modificadoras do amido envolve a quebra de ligações α -1,4 da molécula doadora, para um aceptor com a formação de uma nova ligação glicosídica. As enzimas amilomaltase (E.C. 2.4.1.25) e ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, E.C. 2.4.1.19) são representantes deste grupo. O principal produto da ação da CGTase sobre o amido são as ciclodextrinas e dextrinas ramificadas. As amilomaltases são similares as ciclodextrinas glicosiltransferases em relação ao tipo de reação enzimática. A maior diferença é que a ação da amilomaltase produz um produto linear enquanto a ciclodextrina glicosiltransferase produz um produto cíclico. Amilomaltases foram encontradas em diferentes micro-organismos sendo responsáveis pela utilização da maltose como fonte de carbono, ou mesmo, na degradação de glicogênio dos mesmos.

2.3 Família da Glucoamilase

As enzimas degradadoras de amido ou derivados são classificadas em glicosil hidrolases. De acordo com a similaridade das sequências de aminoácidos, estas estão classificadas em aproximadamente 100 diferentes famílias, cujos membros de cada família apresentam em comum a estrutura tridimensional (3D) e o mecanismo estéreo químico (HENRISSAT, 1991).

A glucoamilase é uma enzima integrante da família 15 glicosil hidrolase (HENRISSAT, 1991; HENRISSAT, 1993; SAUER et al. 2000), e pelo menos 23 estruturas primárias são conhecidas em fungos, bactérias e Archaea (COUTINHO, REILLY, 1997). As enzimas deste grupo apresentam as seguintes características: a inversão da configuração anomérica do

produto formado (SAUER, 2000); a presença de um domínio catalítico na forma de barril α/α localizado na extremidade N-terminal da proteína (ALESHIN et al., 1992).

As glucoamilases frequentemente se encontram em duas formas moleculares; a primeira contendo apenas o domínio catalítico (CD) compactado em forma de barril α/α , e a segunda apresentando dois domínios: o CD e o domínio de ligação ao amido cru (DLA) localizado na região C-terminal. O DLA possui características que ainda permite sua classificação na família 20 “carbohydrate-binding module” (CBM 20, Fig. 4) (NIELSEN et al., 2002). Os CBM compreendem todos os domínios de proteínas que são capazes de fazer ligação com moléculas de polissacarídeos. São conhecidos cerca de 53 membros nesta família, oito representantes são caracterizados por possuir esta estrutura na forma de DLA. Este grupo ainda inclui muitas outras enzimas que degradam polissacarídeos (LIN et al., 2009).

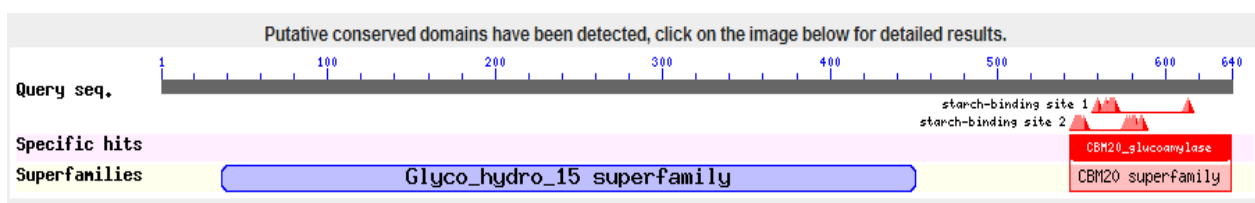


Figura 4. Classificação da glucoamilase de *Aspergillus awamori* mostrando a inclusão nas duas famílias. O domínio catalítico (CD) classificado na família 15 glicosil hidrolase (GH15), e o domínio de ligação ao amido (DLA), incluído na família 20 “carbohydrate-binding module” (CBM20). A figura foi desenhada após obter a sequência dos aminoácidos que compõe a proteína utilizando a ferramenta BLAST do NCBI.

2.4. Estrutura da glucoamilase

Em *Aspergillus awamori* a glucoamilase se apresenta como uma glicoproteína contendo 616 resíduos de aminoácidos. A enzima apresenta dois domínios ligados a um filamento ligante (linker) (Fig. 5). Na região N-terminal está localizado o domínio catalítico que corresponde aos resíduos de aminoácidos 1 a 440, com estrutura em forma de barril α/α . Na extremidade C-terminal está localizado o domínio de ligação ao amido formado por 108 resíduos de aminoácidos, necessário para a hidrólise do amido cru, ligando estas estruturas um linker contendo 68 resíduos de aminoácidos altamente *O*-glicosilado (McDANIEL et al., 2008).

A glucoamilase ocorre naturalmente em duas isoformas, glucoamilase 1 e glucoamilase 2. A glucoamilase 1 consiste de três áreas funcionais: o domínio catalítico, o filamento ligante e

o domínio de ligação ao amido no estado natural. A glucoamilase 2, na qual falta o domínio de ligação ao substrato (amido), tem uma atividade catalítica normal semelhante a glucoamilase 1 para hidrolisar amido gelatinizado, porém sem habilidade para se ligar ao amido no estado natural (cru). Além disso, a glucoamilase 2, tem termoestabilidade similar a glucoamilase 1 (SVENSSON et al., 1986).

Na estrutura da glucoamilase são conhecidas quatro pontes de sulfeto, das quais três estão no domínio catalítico e uma no domínio de ligação ao amido. No domínio catalítico as pontes estão entre os resíduos 210 e 213 (conectando o N-terminal com o meio da hélice 7), 262 e 270 (conectando um filamento β antiparalelo) e 222 e 449 (associando o trigésimo resíduo O-glicosilado do linker com o domínio catalítico) (ALESHIN et al., 1992). A outra ligação de sulfeto ocorre entre os resíduos 509 e 604 (COUTINHO e REILLY, 1994). Estes resíduos ajudam a melhorar o dobramento da proteína e, conseqüentemente, a sua estabilidade (LI et al., 1998).

Embora a compactação da estrutura da glucoamilase em forma de barril α/α , e a proteção dos carboidratos tornem a glucoamilase produzida por *Aspergillus* mais estável do que algumas outras proteínas, uma termoestabilidade maior ainda é necessária para os processos industriais (LEMOES et al., 2003).

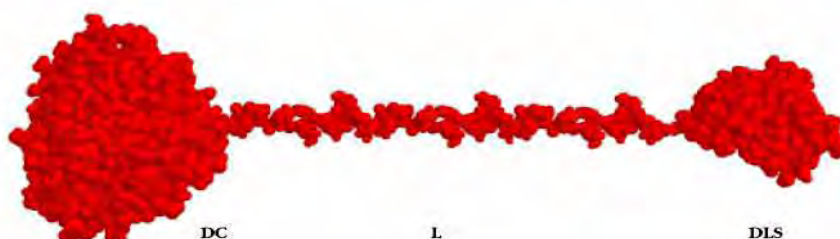


Figura 5. Imagem da estrutura estendida da glucoamilase de *Aspergillus awamori*. No lado esquerdo o domínio catalítico (DC), ao centro o filamento ligante ou “linker” (L), e a direita o domínio de ligação ao substrato (amido) (DLS). <http://nte-server.univ-lyon1.fr/nte/heyde/www.public.iastate.edu/~pedro/glase/glase.html>

2.4.1. Domínio catalítico

O domínio catalítico de *A. awamori* var. X100 é formado por 13 α -hélices, sendo que 12 dessas α -hélices formam uma estrutura denominada de barril α/α (Fig. 6), consistindo de 6 α -hélices externas e 6 α -hélices internas que envolvem o sítio catalítico em forma de funil, constituído por 6 segmentos α/α altamente conservados que conectam a extremidade N-

terminal à α -hélice interna com a região C-terminal da α -hélice externa (ALESHIN et al., 1992; HARRIS et al., 1993; ALESHIN et al., 1994).

O sítio catalítico da glucoamilase possui uma barreira de resíduos hidrofóbicos no centro, separando o núcleo em duas regiões de volume morto (void), contendo apenas água. Uma dessas regiões funciona como sítio ativo e contém ainda os resíduos de aminoácidos Glu 179 e Glu 400 como os dois resíduos catalíticos, que estão localizados no fundo desse sítio (HARRIS et al., 1993; SIERKS et al., 1990; FRANDSEN et al., 1994; SVENSSON et al., 1990). Os resíduos Trp 52 e Asp 55 também estão localizados no sítio ativo, e estão envolvidos na atividade enzimática. O Trp 52 está localizado próximo ao sítio ativo e uma ponte de hidrogênio é formada entre este resíduo e o Glu 179, acreditando que a função do resíduo Trp 52 seja manter a orientação correta do Glu 179 durante o processo catalítico. Os resíduos Tyr 48, Arg 54, Trp 120, Glu 180, Arg 305 e Trp 317 também localizados no sítio ativo são cruciais no estado de transição e estabilização do substrato (FRANDSEN et al., 1995; FIEROBE et al., 1997).

Os aminoácidos do domínio catalítico correspondem a mais de 51% de todos os aminoácidos encontrados na proteína (LEMOS et al., 2003).

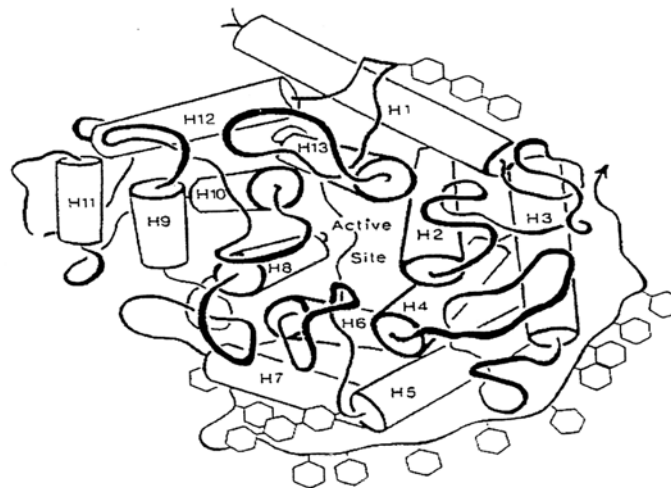


Figura 6. Esquema da glucoamilase de *Aspergillus awamori* var. X100 (ALESHIN et al. 1992). Alfa-hélice (H1 a H13) é simbolizada por cilindros, sítios de O-glicosilação são representados por hexágonos simples, e sítios de N-glicosilações são simbolizados por cadeias de três hexágonos.

2.4.2. Domínio de ligação ao amido

O domínio de ligação ao amido está localizado na região C-terminal e se apresenta como uma estrutura de folha- β consistindo de um par paralelo e 6 pares antiparalelos que formam um barril β aberto na lateral (SAUER et al., 2000). Este domínio liga-se à parede celular, isto porque tem afinidade por α -1,4 e α -1,6 glucanos que pertencem à parede celular. (NEUSTROEV et al., 1993; NOROUZIAN et al., 2006). O mecanismo de ligação ao amido parece envolver a formação de um complexo de inclusão entre os resíduos hidrofóbicos deste domínio e os grânulos de amido (GOTO et al., 1994).

Experimentos mostraram que a adição de domínio de ligação ao substrato em uma solução contendo amido cru e glucoamilase 2 aumentou a taxa de hidrólise do amido, sugerindo que, essa estrutura rompe as interações entre cadeias complexas de α -glucanos, aumentando o acesso da enzima ao grânulo de amido (SOUTHALL et al., 1999; SAUER et al., 2001).

2.4.3. Linker

O linker é um segmento altamente glicosilado que liga o domínio catalítico ao domínio de ligação ao amido, e se apresenta numa conformação de cinto estendido em torno do barril α/α catalítico (LE MOS et al., 2003).

A primeira parte dessa região O-glicosilada (aminoácidos 441 a 471) possui cerca de 10 resíduos de manoses expostos e, juntos com 2 resíduos N-glicosilados do Asn 171 e Asn 395, formam um cinto de glicosilações ao redor do domínio catalítico. A segunda parte do linker é ainda mais glicosilada (aminoácidos 472 a 512) e envolve o domínio catalítico como uma continuação do resíduo 471. Esta organização faz com que o domínio de ligação ao amido fique próximo ao sítio ativo (SAUER et al., 2000). O segmento C-terminal do linker contém cerca de 30 resíduos de aminoácidos, principalmente serina e treonina, sendo, portanto, muito O-glicosilado. A esta parte do linker tem sido atribuídas as funções de estabilidade, secreção e digestão do amido cru (SAUER et al., 2001). Tem sido relatado que as glucoamilases com baixo grau de glicosilação são mais propensas à ação de protease. Assim, O-glicosilação em glucoamilase também protege a enzima contra a proteólise (COUTINHO e REILLY, 1997; GAL-GÖEFER et al., 1995; NOROUZIAN et al., 2006).

2. 5. Outras características da enzima

A glucoamilase é uma proteína altamente glicosilada que quebra ligações α -1,4 da extremidade não redutora do grânulo de amido e oligossacarídeos relacionados liberando β -D-

glicose. A enzima também atua nas ligações α -1,6, porém mais lentamente, com velocidade de hidrólise do substrato de apenas 0,2% em relação à ação na ligação α -1,4 (HIROMI et al., 1966; SIERKS e SVENSSON, 1994; FRANDSEN et al., 1995; FIEROBE et al., 1996; MERTENS e SKORY, 2007; THORSEN et al. 2006). Sugere-se, portanto, que a ação da enzima ocorra através de um mecanismo multisseriado, degradando aleatoriamente toda a molécula do substrato (JAMES e LEE, 1997).

A enzima é produzida por uma variedade de micro-organismos, sendo obtida principalmente de fungos *Aspergillus* sp e *Rhizopus* sp, considerados os mais importantes. Tal importância se deve a sua baixa atividade de transglicosilação e habilidade para obter valor próximo a 100% de glicose a partir do amido (MERTENS e SKORY, 2007).

Várias formas de glucoamilases fúngicas são encontradas, as quais são denominadas de isoenzimas ou isoformas, resultantes da variação de aminoácidos e carboidratos presentes em sua estrutura. A glucoamilase de *Aspergillus* é codificada por um único gene, mas tem duas ou três formas variantes que são obtidas após a tradução por proteólise limitada. Outra possível causa das diferenças estruturais pode ser a influência da composição do meio onde o micro-organismo cresce (JAMES e LEE, 1997; VIHINEM e MANTSALA, 1989; MANJUNATH et al., 1983). Entretanto, as várias isoformas possuem características físico-químicas similares (SAHA e ZEIKUS, 1989).

Outra característica encontrada na estrutura da glucoamilase é a glicosilação, onde destacam-se os seguintes carboidratos: glicose, glicosamina, manose e galactose. Glucoamilases de *Aspergillus* geralmente contêm manose, glicose, galactose e em alguns casos xilose e glucosamina, enquanto nas de *Rhizopus* encontram-se manose e glucosamina. Tais carboidratos são necessários para a manutenção da conformação tridimensional das glucoamilases (VIHINEM e MANTSALA, 1989; JAMES e LEE, 1987). A glicosilação influencia diretamente a atividade enzimática e a solubilidade (DEMAIN e VAISHNAV, 2009). Aos carboidratos também tem sido atribuída a estabilidade a altas temperaturas, pois quando removidos da estrutura, a enzima tem sua estabilidade e atividade reduzidas (SAHA e ZEIKUS, 1989; DEMAIN e VAISHNAV, 2009). Além disso, os carboidratos também previnem que as enzimas parcialmente desdobradas se agreguem, além de desempenhar a função de proteção contra a ação de proteases (COUTINHO e REILLY, 1997; GAL-GÖEFER et al., 1995; NOROUZIAN et al., 2006).

As proteínas extracelulares secretadas por *Saccharomyces cerevisiae* frequentemente são hiperglicosiladas. Essas proteínas são N-glicosiladas no retículo endoplasmático pela adição de até 13-14 resíduos de monossacarídeos. Posteriormente, as cadeias de açúcares são

prolongadas ainda mais no complexo de Golgi com a adição de longas caudas de manoses (CONDE et al., 2004; LATORRE-GARCÍA, 2008). A glucoamilase expressa por *S. cerevisiae* representa um caso extremo de hiperglicosilação, com conteúdo de carboidratos ao redor de 80% da massa total da enzima (ADAM et al., 2004; LATORRE-GARCÍA, 2008). O nível de glicosilação de uma proteína também pode ser influenciado pelo meio no qual as células são cultivadas (DEMAIN e VAISHNAV, 2009).

2.6. Termoestabilidade da glucoamilase

A estabilidade da estrutura de uma proteína é o resultado de um delicado equilíbrio entre diversos fatores, como o número de pontes de hidrogênio e de sulfeto, interações hidrofóbicas, grau de enovelamento da molécula, nível de glicosilação, e também, o número e os tipos de aminoácidos envolvidos em sua estrutura primária, que influencia as estruturas secundárias, terciárias e quaternárias (BRUINS et al., 2001; NELSON e COX, 2002). Esses fatores intimamente relacionados é que proporcionam a estabilidade protéica. No entanto, as enzimas termoestáveis tendem a apresentar núcleos altamente hidrofóbicos, maior número de interações iônicas e pontes de hidrogênio que dificultam o desdobramento da proteína (MADIGAN et al., 2003; BRUINS et al., 2001).

Poucas glucoamilases fúngicas termoestáveis tem sido descritas. Dentre elas estão: *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Mucor rouxians*, *Mucor javanicus*, *Neurospora crassa*, *Rhizopus delmar* e *Rhizopus oryzae* (PANDEY et al., 2000; NOROUZIAN et al., 2006). A temperatura ótima de atividade das glucoamilases varia entre 58-65 °C, sendo facilmente desnaturadas em temperaturas superiores (SAUER et al., 2000; CRABB e MITCHINSON, 1997; SUTTHIRAK et al., 2005).

Em glucoamilases mais termoestáveis algumas características têm sido observadas, tais como: redução do número de possíveis conformações na estrutura da enzima, pela substituição de resíduos de Gly por outro aminoácido mais rígido como a Pro; introdução de outros resíduos que permitem a formação de ligações covalentes como pontes de sulfeto; melhoria das interações fracas não covalentes na estrutura das proteínas, tais como pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações polar (LI et al., 1998).

Frequentemente o aumento do número de resíduos de Pro está relacionado com o aumento da termoestabilidade (LI et al., 1997; McDANIEL et al., 2008; WANG et al., 2006). Muitos trabalhos relacionam o aumento da termoestabilidade pelo aumento do número deste resíduo,

e também pelo aumento do número de pontes de sulfeto, que reduziria em parte a flexibilidade da enzima (McDANIEL et al., 2008; LI et al., 1998; LIU e WANG, 2003).

O processo de termoinativação da glucoamilase é ocasionado pela conformação incorreta da proteína (MUNCH e TRITSCH, 1990). Usualmente, as proteínas começam a se desdobrar devido ao aumento da deslocação intramolecular causado pelo aumento da temperatura (LIU et al., 2000). Portanto, a inativação é ocasionada primeiramente pelo rompimento das ligações não covalente, seguido pelo seu desdobramento.

A atuação da glucoamilase na indústria, no processamento de amido ocorre dentro de uma faixa relativamente estreita de temperatura, isto porque sua conformação ativa muda com o aumento da temperatura. Esta termoestabilidade limitada afeta seu uso em processos industriais onde a incubação prolongada em altas temperaturas é necessária (LEMOS et al., 2003). Desta forma, a termoestabilidade da glucoamilase determina a velocidade do processo de sacarificação, pois altas temperaturas aumentam as taxas de reações, e reduzem o tempo do processo e os riscos de contaminações microbiológicas. O desenvolvimento de uma glucoamilase termoestável contribui para maior eficiência de todo o processo na indústria.

Devido ao número restrito de enzimas termoestáveis, e às dificuldades enfrentadas no isolamento de organismos termofílicos, e na produção dessas enzimas pela sua baixa instabilidade, várias estratégias vêm sendo propostas.

Muitos trabalhos têm focado o aumento da termoestabilidade enzimática, com o uso de aditivos químicos gerando modificações ou a imobilização da enzima, porém essas técnicas têm falhado no uso industrial, devido à estabilização ineficiente, perda da atividade e baixo rendimento. Com isso, a principal técnica empregada tem sido a engenharia de proteínas, através das técnicas de biologia molecular, que proporcionam uma importante ferramenta para melhorar as características das enzimas.

2.7. Alterações moleculares

Hoje as propriedades naturais de uma enzima podem ser facilmente alteradas com o auxílio da tecnologia do DNA recombinante e engenharia de proteínas. As enzimas podem ser manipuladas sob medida para atender às necessidades do processo, enzimas de qualidade superior podem ser obtidas por estas técnicas. Uma única alteração na sequências de um aminoácidos permiti observar mudanças de pH ótimo, termoestabilidade, inibição da fonte de carbono, especificidade de substrato, V_{max} e K_m (DEMAIN e VAISHNAV, 2009).

Entre as estratégias de mutações mais utilizadas destacam-se: mutações sítio dirigidas e mutações aleatórias através da técnica de PCR mutagênico (erro-prone PCR). A técnica de PCR mutagênico tem sido realizada com sucesso para gerar mutações na estrutura da glucoamilase visando melhoria na estabilidade e atividade (FORD, 1999). A vantagem desta técnica é que não é necessário nenhum conhecimento prévio da estrutura para introduzir mutações no DNA alvo (LUHE et al., 2010).

Uma reação de PCR é normalmente realizada de modo a amplificar qualquer DNA, permitindo a multiplicação dessas moléculas em bilhões de vezes. Para esse procedimento é usada uma DNA polimerase termoestável (*Taq* polimerase de *Thermus aquaticus*). Ocasionalmente, nucleotídeos errados são incorporados durante a amplificação, pois esta não apresenta atividade de correção, levando a mutação com uma frequência de 0,1 a 2×10^{-4} por nucleotídeo para a DNA polimerase. Esta baixa taxa de erro pode ser aumentada para 7×10^{-3} por nucleotídeo através do aumento da concentração de dCTP e dTTP, do aumento na quantidade *Taq* polimerase ou aumento de Mg^{2+} . Estas condições devem ser usadas a fim de se obter uma taxa média de 1 a 2 nucleotídeos alterados por gene, levando a uma mudança média de 1 aminoácido por enzima mutante (REETZ e JAEGER, 1999; LEMOS et al., 2003).

Grandes bibliotecas de mais de 10^{10} genes mutantes podem facilmente ser criadas usando essa técnica. Por isso, o desenvolvimento de um sistema apropriado de triagem e seleção é muito importante no processo. Seleções efetivas, nas quais apenas aqueles clones que adquiriram a característica desejada sobrevivam ou cresçam mais rápido são extremamente importantes para o sucesso do processo (LEMOS et al., 2003).

No caso do emprego de vetores, o “screening” é feito para selecionar os clones que incorporaram o vetor contendo o fragmento de interesse. Os vetores carregam uma marca de seleção, que é geralmente um gene para a resistência a algum antibiótico, por isso utiliza-se o plaqueamento das linhagens submetidas ao processo de mutagênese em um meio contendo antibiótico. As colônias que incorporaram o vetor contendo o novo fragmento crescem normalmente. Em outros casos, a marca de seleção pode ser a degradação de algum composto presente no meio de cultura, com a formação de halos, significando que também estas colônias incorporaram o vetor, e que o gene inserido produz enzimas para degradação do determinado composto.

O plasmídio YEpPM18, construído por Cole et al., (1981), é um vetor de expressão que codifica para a proteína glucoamilase de *Aspergillus awamori*, e foi utilizado neste trabalho para expressão heteróloga desta enzima em *Saccharomyces cerevisiae*. Ele é formado por várias regiões funcionais, como o fragmento promotor e terminador, provenientes do gene de

enolase, e que são utilizados para possibilitar a expressão proteica de modo eficiente. A sequência *Leu2* confere habilidade de crescimento para mutantes em meio mínimo sem leucina, servindo como marca de seleção e manutenção do vetor nas linhagens de levedura transformadas. Este papel é realizado pelo gene de beta-lactamase nas células bacterianas, o qual confere resistência à ampicilina às células que o carregam. A região 2 μ confere habilidade da replicação autônoma do plasmídio em leveduras, da mesma maneira que a porção pBR322 (originada do plasmídio bacteriano pBR322) confere habilidade para a replicação do plasmídio em *E. coli*. Existem sítios únicos de restrição *Bam*HI e *Pst*I flanqueando o gene glucoamilase (Fig. 7).

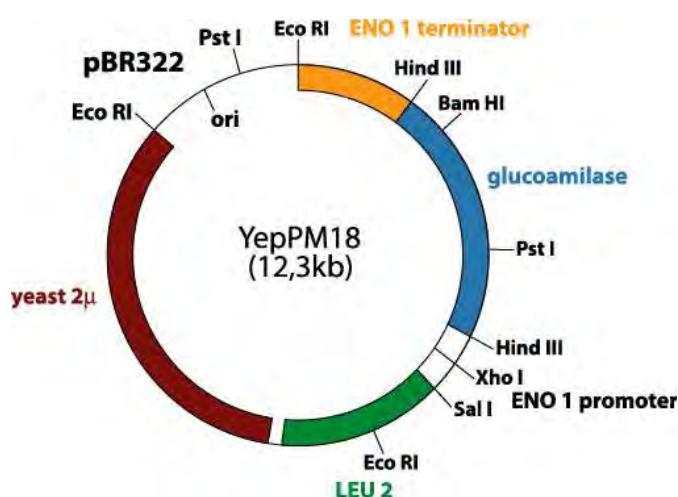


Figura 7. Vetor de expressão YEpPM18 da glucoamilase de *Aspergillus awamori*

A clonagem de genes termofílicos ou mutantes em hospedeiros mesofílicos facilmente manipuláveis promove algumas vantagens como aumento da termoestabilidade, e elevada produtividade (IYER e ANANTHANARAYAN, 2008). Desse modo, a glucoamilase de *Aspergillus awamori* tem sido clonada e expressa em *Saccharomyces cerevisiae* ou em *Pichia pastoris*.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um hospedeiro atrativo para a expressão de proteínas heterólogas, já que apresenta a combinação de diversas características importantes, tais como: fácil manipulação, habilidade de crescimento em diferentes fontes de carbono, não potogenicidade, ausência de produção de substâncias alergênicas (SCHAFER e WOLF, 2005; GUERA et al., 2006), além de alto rendimento e linhagens de crescimento estável. Elas também possuem um sistema de secreção bem definido com modificações pós-traducionais tais como a glicosilação, tornando este sistema apropriado para expressão de proteínas de

eucariotos (LEE et al., 2000; KILONZO et al., 2009; DEMAINE e VAISHNAV, 2009). As leveduras também produzem chaperoninas que ajudam o dobramento das proteínas que são sintetizadas, principalmente no caso de proteínas que apresentam grandes quantidades de pontes de sulfeto (DEMAINE e VAISHNAV, 2009).

Alguns vetores tradicionais para transformação de leveduras são chamados de vetores bifuncionais, porque são capazes de se propagarem tanto em *Saccharomyces cerevisiae* quanto em *Escherichia coli* e, incluem diversos tipos quanto à estabilidade e marcadores de seleção (GUERRA et al., 2006).

Mutações aleatórias e sítio dirigidas associadas a um bom método de seleção têm sido usadas com sucesso para gerar proteínas alteradas.

Mutações aleatórias foram eficientemente introduzidas no peptídeo sinal da glucoamilase de *Saccharomycopsis fibuligera*. A linhagem *Saccharomyces cerevisiae* recombinante que expressou a glucoamilase apresentou mutações benéficas sendo capaz de secretar 30% a mais de glucoamilase do que com o peptídeo nativo (LUHE et al., 2010).

A melhora na termoestabilidade da glucoamilase de *Aspergillus niger* expressas em *S. cerevisiae*, foi observada na linhagem denominada THS8 (WANG et al., 2006). Neste trabalho foram realizadas mutações sucessivas no gene da enzima, alcançando substancial aumento da termoestabilidade. A energia livre de termoinativação (ΔG) do mutante a 80 °C foi 5.1 KJ.mol⁻¹ maior que a energia da enzima selvagem. Dando continuidade nestes estudos e, realizando novos ciclos de mutações, este mesmo grupo produziu a mais termoestável glucoamilase descrita até o momento, a CR2-1 que apresentou a 80 °C um ΔG de 106 KJ.mol⁻¹ enquanto que, a enzima selvagem utilizada como padrão apresentou um ΔG de 96 KJ.mol⁻¹ (McDANIEL et al., 2008).

Rajoka e colaboradores (2004) produziram glucoamilase mutante de *Aspergillus niger* com elevação de 5 °C na temperatura ótima em relação à enzima selvagem utilizada como controle.

A mutação nos resíduos Ser 436 e Ser 30 substituídos por Pro estabilizaram a glucoamilase, reduzindo a entropia conformacional de desdobramento (ALLEN et al., 1998; LI et al., 1997). A substituição de resíduo Ser 30 por Pro possibilitou um ganho na termoestabilidade da glucoamilase de *A. awamori* (LI et al., 1998).

Estratégias utilizadas por Liu e Wang (2003) apresentaram bons resultados na termoestabilidade da glucoamilase de *A. awamori* expressas em *S. cerevisiae*, com a introdução de resíduos com alta hidrofobicidade na região da α -hélice 12 e α -hélice 13.

Nielsen e colaboradores (2002) usaram a técnica de PCR mutagênico para modificar uma glucoamilase termoestável de *Talaromyces emersonii* expressa em *A. niger*, melhorando a habilidade da enzima para hidrolisar amilopectina a 65 °C. Também observaram aumento da meia vida da enzima em 30% a 65 °C, quando comparada com a glucoamilase de *A. niger*.

Liu e colaboradores (2000) através da mutação sítio dirigida, com a substituição e deleção de resíduos de aminoácidos no domínio catalítico e linker da glucoamilase de *Aspergillus awamori* criaram 6 mutantes com aumento da termoestabilidade.

Fierobe e colaboradores (1997) constataram que as glucoamilases recombinantes de *A. awamori* expressas em *Pichia pastoris* e *S. cerevisiae* apresentaram propriedades similares, porém, a enzima secretada por *P. pastoris* foi mais termoestável do que a glucoamilase secretada por *S. cerevisiae*, com temperaturas ótimas de 72,5 °C e 69 °C, respectivamente.

A mutação aleatória na glucoamilase de *A. awamori*, que substituiu um único resíduo de aminoácido (Gly 396 → Ser) desestabilizou a enzima com a diminuição da energia livre (ΔG) (FLORY et al., 1994).

A região do linker de *A. niger* foi estudada por Sauer e colaboradores (2001), onde várias regiões do filamento foram substituídas por outros aminoácidos de várias glucoamilases de seqüências homólogas, e também, por linkers artificiais usando PCR mutagênico, sendo as enzimas expressas por *S. cerevisiae*. Quando os aminoácidos 466-483 foram deletados houve uma redução na termoestabilidade. A redução da termoestabilidade também foi constatada quando os resíduos 485-512 foram retirados.

Mutações de alguns aminoácidos flexíveis por aminoácidos mais rígidos, como, Gly 396 por Ser, Gly 407 por Asp, implicaram em mudanças na conformação, e conduzindo a uma baixa estabilidade. Foi observado que a secreção da glucoamilase pode ser afetada por mutações que resultaram em diferentes conformações estruturais da enzima (FLORY et al., 1994).

Mutações não apenas podem afetar a termoestabilidade da enzima como também podem reduzir a atividade específica. Na mutação Ala 39 → Val, ocorreu uma redução de 40% na atividade, quando se comparou com a enzima selvagem. Isto pode ser explicado pela localização do resíduo Ala 39, que está localizado no sítio ativo, muito próximo do Glu 400: a substituição de um resíduo relativamente pequeno (Ala 92 Å³), por um grande (Val 142 Å³) aparentemente diminuiu o espaço disponível para o substrato (FLORY et al., 1994).

2.8. Purificação da glucoamilase

A purificação enzimática é um processo complexo que separa constituintes do meio de cultivo como, moléculas orgânicas e inorgânicas, metabólitos produzidos durante o processo de fermentação, peptídeos e proteínas em geral da enzima de interesse, permitindo assim, que suas propriedades sejam facilmente estudadas (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

Não existe um protocolo definido para a purificação de proteínas, devido às diferenças entre os métodos de fermentação, tipo de meio de cultivo, micro-organismo utilizado, além das características peculiares de cada proteína. Porém, estas podem ser purificadas através de métodos que se baseiam em certas características como a solubilidade, massa molecular, carga elétrica, polaridade e afinidade por determinados compostos (VOET, et al., 2002).

A purificação de enzimas por cromatografia de afinidade bioespecífica é baseada na formação de um complexo seletivo e reversível entre a proteína a ser recuperada e outra molécula ligada denominada ligante. A afinidade, entre a molécula de interesse e o ligante, somente existe quando há reconhecimento molecular entre as duas espécies. Os ligantes bioespecíficos apresentam vantagens, pois fornecem um grau de especificidade muito elevado e, conseqüentemente o produto apresenta um alto fator de pureza; uma separação rápida e, geralmente, em uma única etapa com um rendimento elevado, uma vez que a enzima é protegida da desnaturação por estabilização da estrutura terciária (ALVES-PRADO, 2005). As proteínas retidas na coluna são eluídas gradualmente e, o que é mais importante, seletivamente, através da passagem de um gradiente de concentração de uma substância que compete pela ligação da proteína com os grupamentos químicos da resina.

A literatura traz relatos de sucesso na purificação de glucoamilases por cromatografia de afinidade (OUYANG, et al. 2007; WANG, et al. 2006; LIU e WANG, 2003; LIU et al, 2000; LI et al. 1998; FLORY et al. 1994; MONDAL, et al. 2003). Outros autores adotaram outras técnicas como cromatografia de filtração em gel e cromatografia de troca iônica, porém nestes casos várias etapas cromatográficas foram necessárias para a purificação da enzima (NEGI e BANERJEE, 2009; MICHELIN et al. 2008; FERREIRA-NOZAWA et al. 2008; RIAZ, et al. 2007; THORSEN, et al. 2006; NIELSEN et al. 2002).

A massa molecular das glucoamilases fúngicas encontra-se entre 26 – 112 kDa (VIHINEM e MÄNTSÄLÄ, 1989; MICHELIN, 2008). O pH ótimo está na faixa de 3,5 – 5,0, e a temperatura ótima está entre 58 °C e 65 °C, sendo inativadas a temperaturas superiores.

2.9. Aplicação da glucoamilase

Embora muitas espécies de fungos sejam capazes de produzir glucoamilase em diferentes condições de fermentação, a produção industrial em grande escala está focada nas espécies; *Aspergillus niger* que é idêntica a enzima de *Aspergillus awamori* e também por *Rhizopus oryzae*. As glucoamilases produzidas por essas espécies apresentam alta atividade e, uma melhor termoestabilidade (NEGI e BANERJEE, 2009), além da baixa atividade de transglicosilação citada por Mertens e Skory (2007).

A glucoamilase pode ser utilizada em vários segmentos da indústria alimentícia. Nos processos de panificação, elas aumentam os níveis de açúcares fermentáveis na massa. A ação da glucoamilase sobre o amido libera glicose, enquanto que, o uso de β -amilase produz maltose. Como a glicose apresenta doçura superior à maltose, as glucoamilases são mais eficientes que as β -amilases neste processo, e, portanto, são utilizadas com o objetivo de reduzir a quantidade de açúcar a ser adicionado à massa (KNIGHT e MAZZIEIRO, 2000).

Na indústria japonesa, a enzima é utilizada na preparação de produtos manufaturados tradicionais da cultura japonesa, como na fermentação do shoyu, saquê e misso (HATA et al., 1997). A glucoamilase também pode ser empregada junto com α -amilase no processamento do amido para a produção de bioetanol (NIGAM e SINGH, 1995). Além disso, na medicina é utilizada em ensaio com a α -D-glucosidade no diagnóstico de doenças pancreáticas (KILONZO et al., 2008; KILONZO et al., 2009).

O foco principal da produção da enzima é no processamento do amido para a produção de xarope com alto teor de glicose (MICHELIN et al., 2008). Também é utilizada na produção de xarope de frutose, obtida pela isomerização da glicose, os quais têm grande aplicação na indústria panificadora, na produção de doces e na fermentação de cervejas (JAMES e LEE, 1997; SWIFT et al., 2000; RIAZ et al., 2007).

A maior parte do amido processado mundialmente é direcionada para a produção de xarope. A hidrólise do amido para a produção de xarope de glicose consiste em três etapas: a gelatinização, a liquefação e a sacarificação (CRABB e MITCHINSON, 1997).

A gelatinização do amido ocorre a uma temperatura na faixa de 105-107 °C de 5-15 minutos, para que as complexas interações da amilose se rompam, facilitando as etapas subsequentes e aumentando o rendimento. Em amidos de cereais, geralmente, as cadeias de amilose encontram-se associadas a moléculas de lipídeos. Esse complexo amilose-lipídeo diminui a suscetibilidade da amilose ao ataque das enzimas (CUI e OATES, 1999).

A segunda etapa é a liquefação, onde a temperatura do processo é de 90-95 °C por um período de 60-180 minutos em pH mais neutro, próximo de 6,0-6,5. Nesta etapa, são

utilizadas α -amilases termoestáveis produzidas por *Bacillus licheniformis* e por *B. stearothermophilus*. A ação dessas enzimas, que são aplicadas alternadamente, resulta em um amido liquefeito claro, com teor de 10 a 18 D.E. (dextrose equivalente) e reação negativa com o iodo. Após completa liquefação, a solução é resfriada a 55-60 °C e, o pH é corrigido a uma faixa mais ácida, de 4,0 a 4,5 para que a próxima etapa ocorra. A faixa de pH recomendada para a hidrólise do amido com glucoamilases fúngicas comercialmente disponível situa-se entre 4,0 e 4,5 (BOYCE, 1986).

A sacarificação consiste na completa transformação enzimática do amido liquefeito em dextrose, catalisada por uma glucoamilase. Normalmente são utilizadas enzimas produzidas por espécies do gênero *Aspergillus* (*A. niger* e *A. awamori*). A sacarificação ocorre num período de 42 a 72 horas dependendo do D.E. desejado. Outras enzimas amilolíticas desramificantes podem ser usadas durante a sacarificação, como por exemplo, a pululanase, e a isoamilase promovendo uma maior velocidade de hidrólise das ramificações, e eficiência do processo.

Em altas concentrações de glicose, a glucoamilase pode repolimerizar essas moléculas, por meio da reação de “reversão”, formando di, tri e tetrassacarídeos (THORSEN, et al., 2006; FERREIRA-NOZAWA et al., 2008).

Os xaropes convencionalmente referem-se a produtos que apresentam uma taxa de quebra do amido em dextrose equivalente, representada por D.E. Abaixo de 20 D.E. o produto é conhecido como maltodextrinas e acima de 80 D.E. como hidrolisados (KEARSLEY e DZIEDZIC, 1995). Os valores de D.E. dependem da intensidade da hidrólise ou “conversão”, e dependendo do produto obtido pode-se caracterizar quatro diferentes tipos de xaropes, como descritos na Tabela 1.

Considerando que na hidrólise, além da glicose, formam-se vários outros açúcares, o valor D.E. expressa o teor de açúcares redutores totais em proporções variáveis, dependendo do tipo de xarope.

Tabela 1. Classificação dos tipos de xaropes

TIPO	D.E.
I – conversão baixa	20 – 38
II – conversão média	39 – 58
III – conversão alta	59 – 73
IV – conversão extra alta	74 – 99

Fonte: BOBBIO e BOBBIO, 2001

3. OBJETIVOS

Estudar as glucoamilases mutantes de *Aspergillus awamori* expressas em *Saccharomyces cerevisiae*;

Avaliar a produção das enzimas em fermentação submersa, utilizando diferentes fontes vegetais de amido;

Purificar as enzimas através da técnica de cromatografia de afinidade, e analisar as alterações causadas pelas mutações em relação às características físico-químicas e termodinâmicas;

Isolar e seqüenciar o gene que expressa as glucoamilases mutantes, para avaliar o efeito da mutação na estrutura e na estabilidade da enzima.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Micro-organismo

A levedura: *Saccharomyces cerevisiae* linhagem C468 (α *leu2-3 leu2-112 his3-11 his3-15mal*) carregando o vetor YEpPM18 para expressar o gene da glucoamilase. Os genes mutantes da glucoamilase foram previamente obtidos através da técnica de PCR mutagênico por Lemos (2003). As colônias positivas que incorporaram o gene da glucoamilase passaram por teste de termoestabilidade por incubação a 75 °C por 15 minutos. As linhagens *S. cerevisiae* que receberam os genes alterados foram denominadas de M1 e M2. Também foi utilizada uma linhagem de *S. cerevisiae* carregando o gene selvagem (WT), como controle dos resultados. A manutenção das culturas ocorreu em solução 10% de glicerol a -80°C.

4.2. Produção da glucoamilase

4.2.1. Meio de cultura

Para o crescimento das leveduras alteradas foi utilizado o meio SD + His composto de 10g/L de amido solúvel; 1,7g/L de “yeast nitrogen base” sem aminoácidos; 5g/L de sulfato de amônio; 20g/L de glicose; 100mg/L de L-histidina, com 25g/L de agar. As colônias foram semeadas por esgotamento em estria em placas de Petri contendo 20 mL de meio, e incubadas a 30 °C por 5 dias.

4.2.2. Pré inóculo

O pré inóculo foi preparado pela transferência de uma colônia de cada linhagem, para frascos Erlenmeyers de 100 mL, contendo 20 mL de meio SD + His suplementado com + 1% de amido solúvel, sem adição de agar. Os Erlenmeyers foram mantidos em shaker por aproximadamente 24 horas, com agitação de 180 rpm a 30 °C. O crescimento celular foi monitorado através da densidade óptica (D.O) com comprimento de onda de 600 nm e absorbância na faixa de 0,8 a 1,0.

4.2.3. Efeito da fonte de amido

A produção de glucoamilase foi realizada através da fermentação submersa substituindo o amido solúvel por outras fontes de amido, como: amido de batata, amido de mandioca e amido de milho. A fermentação ocorreu em frascos Erlenmeyers de 100 mL, contendo 20 mL de meio SD + His com as diferentes fontes de amido. Cada Erlenmeyer foi inoculado com 1 mL do pré inóculo. Os frascos foram incubados em shaker sob agitação de 180 rpm a 30 °C por 168 horas. Para cada fonte de amido estudada, foi retirado o volume

total de cada Erlenmeyer, em intervalos de 24 horas. O material fermentado foi centrifugado a 10.000g por 10 minutos sob refrigeração de 5 °C. O precipitado foi utilizado para quantificação da biomassa produzida e o sobrenadante livre de células foi utilizado para determinação da atividade enzimática. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.3. Determinação da atividade enzimática

A glicose liberada pela ação da glucoamilase foi avaliada pelo método enzimático peroxidase/glicose-oxidase descrito por Bergmeyer e Bernt (1974) com modificações, utilizando o Kit comercial (Glicose-Enz Color/ Biodiagnóstica).

A reação constituiu-se de 0,4 mL de solução de amido solúvel 0,5% (Merck) em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 4,5 e 0,1 mL de solução enzimática devidamente diluída. Após a incubação da reação a 65 °C por 10 minutos, as amostras foram submetidas ao resfriamento em banho de gelo. Desse hidrolisado, uma alíquota de 0,1 mL foi retirada e misturada a 0,4 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 7,0. Posteriormente, acrescentou-se 1 mL do reagente glicose oxidase e a mistura foi incubada a 37 °C por 1 hora. O controle da reação foi preparado conforme o processo descrito, porém substituindo a enzima por volume equivalente de água (controle do substrato). Outro controle também foi realizado substituindo a solução de amido por tampão acetato de sódio (controle da enzima). O branco para calibrar o aparelho foi preparado com 0,5 mL de água destilada e 1 mL do reagente. A absorbância foi determinada a 500 nm.

Uma unidade de atividade de glucoamilase (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de glicose por minuto, nas condições do ensaio.

4.4. Quantificação da biomassa microbiana

O precipitado celular foi ressuspendido e homogeneizado com 20 mL de água destilada, em seguida foi submetido à centrifugação a 10.000g, o sobrenadante foi descartado, este procedimento ocorreu por três ciclos sucessivos. As células livres de resíduos do meio foram secas em estufa com circulação de ar a 60 °C até peso constante, e a biomassa expressa em mg/mL.

4.5. Determinação da proteína

A concentração de proteínas foi quantificada pelo método de Hartree-Lowry (HARTREE, 1972), utilizando soro albumina bovina como padrão.

4.6. Purificação da glucoamilase

4.6.1. Procedimentos para montagem da coluna de afinidade

A coluna para cromatografia de afinidade foi preparada utilizando como matriz a resina Epoxi ativada SepharoseTM 6B (Amersham Pharmacia Biotech, Sweeden) e a acarbose (Sigma) como ligante.

Hidratação do gel: 1g da resina foi hidratada com 200 mL de H₂O MilliQ por 1 hora e filtrada em membrana de 0,22 µm para recuperação do gel.

Procedimento para fazer a ligação do ligante com a matriz: a acarbose foi diluída em 7 mL de NaOH 0,1N, esta mesma solução foi utilizada para equilibrar o gel. A mistura foi mantida a 45 °C por 20 horas sob leve agitação em shaker para que ocorresse a ligação entre a acarbose e a resina. A matriz Epóxi ativada Sepharose 6B é um meio versátil para a ligação direta de grupos hidroxilas de açúcares e de carboidratos, e também de outros ligantes que apresentam hidroxilas ou aminoácidos, por apresentar longos braços hidrofílicos no gel, o que é particularmente útil para o acoplamento de pequenos ligantes como açúcares. A acarbose por sua vez é um tetrassacarídeo que possui vários grupos hidroxilas, apresenta fórmula molecular C₂₅H₄₈NO₁₈ que agem como inibidor competitivo e reversível da glucoamilase (Fig. 8).

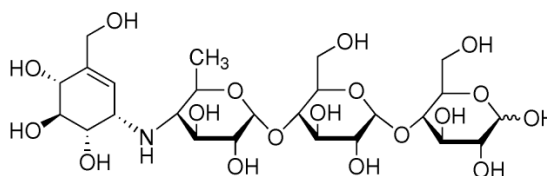


Figura 8. Estrutura da acarbose

Procedimento para bloquear grupos ativos remanescentes: terminado o período em que a acarbose ficou em contato com a matriz para que a ligação dos grupos hidroxilas ocorressem com a resina, o complexo foi lavado com H₂O MilliQ para remover o excesso de ligante, e posteriormente, o gel foi tratado com uma solução de etanolamina 1M pH 8,0, por 4 horas a 45 °C para inativar grupos ativos da matriz que não se ligaram a acarbose. Após esse período, o gel foi lavado consecutivamente pelos sistemas tamponantes: tampão NaOAc 0,1 M pH 4,5 com 0,5 M de NaCl, e, tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 com 0,5 M de NaCl por 3 ciclos.

Empacotamento da coluna: a matriz de afinidade para glucoamilase foi empacotada em coluna BioRad (10 x 0,5 cm) com volume final de 2 mL.

4.7. Processo cromatográfico

Os extratos enzimáticos obtidos em meio contendo amido solúvel com 120 h de fermentação foram concentrados por ultrafiltração no sistema Quixstand Benchtop (Amershan Biosciences, Sweeden) com membrana de corte de 10 kDa. Após concentrada, as amostras foram dialisadas em tampão NaOAc 0,1 M pH 4,5 com 0,5 M de NaCl por 24 horas. A amostra foi aplicada na coluna cromatográfica de afinidade Sepharose 6B-Acarbose equilibrada com tampão NaOAc 0,1 M pH 4,5 com 0,5 M de NaCl. A proteína foi eluída com tampão Tris-HCl 1,7 M pH 7,6 a um fluxo de 0,2 mL/min. As amostras coletadas foram dialisadas em água destilada por 48 horas.

4.8. Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)

As amostras coletadas após a cromatografia de afinidade foram analisadas por meio de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970). As proteínas foram desnaturadas por fervura a 100 °C por 5 minutos em tampão de amostra composto por Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8, 2% de SDS, 10% de glicerol, DTT a 0,1M e azul de bromofenol a 0,001 M. O gel fracionador foi preparado na concentração de 10% e o gel concentrador na concentração de 4% como indicado em Sambrook e Russel (2001). Para a revelação do gel foi utilizado o método de coloração com reagente de prata de acordo com Blum et al. (1987).

4.9. Caracterização das glucoamilases mutantes e selvagem

Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da enzima

Para a determinação do pH ótimo de atividade das enzimas foi utilizado tampões com pH entre 3,0 a 10,0 (tampão McIlvaine: Na_2HPO_4 0,2M e Ácido cítrico 0,1M com valores de pH entre 3,0 e 8,0, e, tampão glicina-NaOH pH 8,5 a 10,0, 0,2M), a atividade enzimática foi realizada de acordo com o procedimento descrito no item 3.3.

Para a avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade das glucoamilases, a mistura da reação foi incubada em temperaturas entre 45 a 80 °C, no pH determinado como ótimo para a atividade das enzimas.

Estabilidade das enzimas frente às variações de pH e temperatura, quando em ausência de substrato

Foram utilizados os tampões descritos acima com pH 3,0 a 10,0, 0,2M. Uma alíquota de 0,2 mL de solução enzimática pura foi misturada a 0,2 mL de tampão em cada valor de pH,

e a mistura mantida a 25 °C por 24 horas. Após esse período, a atividade residual foi determinada no pH e temperatura ótimos de cada enzima.

O efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas, em ausência de substrato, foi avaliado em temperaturas de 40 a 80 °C por uma hora, sendo o controle, a atividade da enzima no início do ensaio. As atividades residuais foram determinadas na temperatura e pH ótimos de cada enzima.

4.10. Cinética de termoinativação irreversível das enzimas

A cinética foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Rashid e Siddiqui, (1998) com modificações. Os extratos enzimáticos foram incubados em seus respectivos pH ótimos em temperaturas variando de 65 a 80 °C , com intervalos de 2,5 °C. Sete amostras foram retiradas periodicamente de cada temperatura e resfriadas a temperatura ambiente. A atividade residual foi medida 20 horas após a incubação.

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) das glucoamilases foi definido como, o tempo no qual após a incubação a atividade residual da enzima foi 50% da atividade original. O $t_{1/2}$ também foi determinado de acordo com a equação (1). O coeficiente de velocidade de termoinativação (K_d), foi determinado graficamente através da regressão linear do logaritmo natural da atividade ($\ln a_t$) versus o tempo de preincubação nas temperaturas indicadas, nos quais as enzimas foram irreversivelmente inativadas. O K_d é o valor absoluto da inclinação da linha de regressão.

4.11. Análise dos parâmetros termodinâmicos de desnaturação enzimática

Os parâmetros termodinâmicos de desnaturação, energia livre, entalpia e entropia foram calculadas segundo as equações abaixo:

$$T_{(1/2)} = 0,693 / K_d \quad (1)$$

$$\Delta G = -R T \ln K_d \quad (2)$$

$$\Delta H = E_a - R T \quad (3)$$

$$\Delta S = \Delta H - \Delta G / T \quad (4)$$

$$E_a = - R (\text{slope}) \quad (5)$$

Sendo ΔG a energia livre (KJ mol^{-1}), R a constante dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T a temperatura absoluta (K), K_d a constante de termoinativação (min^{-1}), h a constante de Plank ($11,04 \times 10^{-36} \text{ Jmol}^{-1} \text{ J}$), K_B a constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), ΔH a entalpia (KJ mol^{-1}), ΔS a entropia (J mol^{-1}), E_a a energia de ativação para desnaturação (KJ mol^{-1}). A E_a foi determinada graficamente por regressão linear do logaritmo natural de K_d ($\ln K_d$ eixo y) versus o recíproco das temperaturas absolutas ($1/T$, K eixo x) nas quais as enzimas foram irreversivelmente inativadas com cinética de velocidade de primeira ordem, de acordo com a equação 5.

4.12. Estudo dos parâmetros cinéticos da enzima

Para a determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} , as amostras foram incubadas na presença de amido e maltose na concentração de 0,025 a 10 mg em tampão 0,1 M no pH e temperatura ótimos para atividade das enzimas. As constantes cinética foram determinadas por regressão não linear usando como modelo a equação descrita por Michaelis-Menten no programa GraFit 5.0.

4.13. Estudo dos efeitos de íons sobre a atividade da enzima

As enzimas foram misturadas com soluções de ZnSO_4 , FeSO_4 , MnSO_4 , MgCl_2 , CuSO_4 , CoCl_2 , NaCl , CaCl_2 , KCl , SDS, EDTA, β -mercaptoetanol, Hg_2Cl_2 , AgNO_3 , AlCl_3 , Ag_2SO_4 de modo a se obter concentrações de 1 e 10 mM na mistura de reação. Os compostos foram incubados na presença da enzima pura por 10 minutos e, depois a atividade enzimática foi realizada na temperatura e pH ótimo de acordo com o procedimento descrito no item 3.3.

4.14. Determinação da natureza glicoprotéica

A quantificação do conteúdo de carboidratos das glucoamilases purificadas produzidas pela levedura *S. cerevisiae* foi quantificada através do método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Um volume de 0,5 mL da enzima pura foi adicionado a 0,5 mL de uma solução de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, a mistura foi mantida em gelo por 10 minutos em repouso. Após este período, esta mistura foi colocada em banho maria a temperatura ambiente por 20 minutos. As leituras da absorbância feitas em 490 nm. O método foi padronizado por uma curva padrão de glicose.

4.15. Análises Moleculares

4.15.1 Extração do DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Hoffman e Winston (1987), onde a cultura de células cresceu por 24 h, o material fermentado foi transferido para tubos estéril e centrifugados a 7000g por 10 min a 4 °C. O precipitado foi ressuspenso em 200 µL de tampão de quebra (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA), e transferidos para tubos ependorf contendo pequenas perolas de vidro estéreis, 200 µL da solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico na proporção (25:24:1) foi adicionada e a mistura agitada em “vortex” por 2 min e depois centrifugados por 5 min a 12000g. Após a separação das fases, o sobrenadante foi recuperado e transferido para tubos estéreis e precipitado pela adição de 2 volumes de etanol absoluto gelado, e 1/10 do volume total de tampão acetato de sódio 3 M, pH 5,2. O tubo foi invertido 4 vezes e mantido a -80 °C por 1 h, depois centrifugado por 30 min a 12000g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 900 µL de etanol 70% por 2 vezes. Os tubos foram secos em estufa com circulação de ar a 37 °C e o DNA ressuspenso em 40 µL de TE.

4.15.2. Gel de agarose

O DNA foi visualizado em gel de agarose 1%. O tampão utilizado foi o TBE 1X, preparado de acordo com Sambrook e Russell (2001). A amostra foi diluída em tampão de amostra “loading buffer”, composto de 0,25% azul de bromofenol; 0,25% de xileno cianol FF e 30% de glicerol em água.

4.15.3. Transformação por eletroporação

Células eletrocompetentes de *Escherichia coli* DH5α foram transformadas com 5 µL de DNA plasmidial, o material foi colocado em contato com as células e mantido em banho de gelo por 10 min, e em seguida transferidas para cubetas de eletroporação (0,1 cm) geladas. As células foram eletroporadas e imediatamente regeneradas com 1 mL do meio SOC. O material foi colocado em ependorf e mantido a 37 °C por 1 h com agitação de 200 rpm. Depois, o material foi centrifugado a 4000g por 2 minutos o sobrenadante descartado e as células ressuspenso em um volume reduzido do próprio meio e transferidas para placas de Petri contendo meio LB + ampicilina na concentração de 100 µg/mL, e incubadas “overnight” a 37 °C.

4.15.4. Extração de DNA das colônias transformadas

Algumas colônias transformadas foram inoculadas em meio LB + ampicilina (100 µg/mL) e incubadas “overnight” a 37 °C com agitação de 200 rpm. As células foram recuperadas por centrifugação e o plasmídeo foi extraído e purificado utilizando o kit Gene JetTM Plasmid Miniprep kit (Fermentas).

4.15.5. Amplificação do gene

O programa para a amplificação foi de 94 °C por 5 minutos para desnaturação inicial, e 30 ciclos de desnaturação do DNA molde a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 48 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 2,5 minutos e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os primers utilizados foram GA 528 “upstream”, e GA 529 “downstream” (Tabela 3). O tamanho de fragmento amplificado esperado foi de aproximadamente 2 kb. A reação foi realizada de acordo com a Tabela abaixo (Tabela 2).

Tabela 2. Componentes da reação para amplificação do gene da glucoamilase

Componentes	Reação concentração final
H ₂ O	9,64 µL
Tampão	2 µL (1X)
dNTP	2 µL (0,2 mM)
MgCl ₂	1,26 µL (3,15 mM)
Primer F	2 µL (10 µM)
Primer R	2 µL (10 µM)
Taq DNA Polimerase	0,1 µL
DNA molde	1 µL
Volume final	20 µL

4.15.6. Restrição do vetor

O plasmídeo foi digerido com 2 enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I para liberar o fragmento de interesse, a fim de visualizar em gel o correspondente gene. A mistura da reação foi 14 µL de H₂O, 6 µL de tampão Tango 1x (33 mM Tris-acetato pH 7,9, 10 mM acetato de magnésio, 66 mM acetato de potássio, 0,1 mg/mL de soro albumina bovina), 8 µL de DNA, 1 µL da enzima *Xho*I e 1 µL da enzima *Bam*HI, sendo a reação mantida a 37 °C por 4 h.

4.15.7 Sequenciamento do gene

O sequenciamento do gene da glucoamilase foi realizado pela Macrogen (Korea) utilizando os seguintes primers: GA 528 (forward), GA 529 (reverse), NF1, NF2, NF3, NF4, NF5, NF6, NF7.

Tabela 3. Primers

Primer	Sequência
GA528	5' ACCGCCAGATATTCATTACTTG 3'
GA 529	5' TACTCAAACGACTCACCAGCC 3'
NF1	5' CCCTGAGCGGCCTCGTCTGCA 3'
NF2	5' CTCCGCCCAGGCAATTGTCCA 3'
NF3	5' CGATTGCTGTGCAACACCGCG 3'
NF4	5' TCAGTGACAGCGAGGCTGTTG 3'
NF5	5' CGCAAGCAACGGCTCCATGTC 3'
NF6	5' ACCAGCAAGACCACCGCGACT 3'
NF7	5' ACACCGTTCCTCAGGCGTGCG 3'

As análises das sequências obtidas foram alinhadas e analisadas pelos programas Bioedit, Gene ruller, além de busca por homologias de outras sequências através do programa Blast do *National Center for Biotechnology Information* ([HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção da glucoamilase

O processo de fermentação submersa foi empregado para a produção das glucoamilases, sendo utilizados como fonte de carbono a glicose e amido de diferentes fontes vegetais, ambos a 2%.

As linhagens em estudo apresentaram bom crescimento microbiano e produção das glucoamilases em todos os meios analisados, mas em proporções diferentes. O tempo de cultivo também influenciou na produção das glucoamilases, para as diferentes culturas. Os melhores meios para a produção da enzima selvagem foram: amido de batata com 14,2 U/mg de proteína (8,2 U/mL, Fig. 9c) e amido solúvel com 13,8 U/mg de proteína (6,8 U/mL, Fig. 9a), para o substrato amido de mandioca a produção foi de 14,5 U/mg (4,9 U/mL, Fig. 9b). O amido de milho propiciou uma menor produção da enzima com 7,8 U/mg de proteína, e atividade enzimática de 2,7 U/mL (Fig. 9d).

Para a linhagem mutante M1 os melhores substratos para a produção da enzima foram o amido solúvel com 8,9 U/mg de proteína (5,8 U/mL, Fig. 10a), e o amido de mandioca com atividade específica de 8,2 U/mg de proteínas e atividade enzimática de 5,9 U/mL (Fig. 10b), após 96 horas de fermentação. Os substratos amido de batata e amido de milho mostraram uma menor produção da enzima com atividade específica de 6,0 U/mg (3,6 U/mL, Fig. 10c) e 3,9 U/mg (2,0 U/mL, Fig. 10d), respectivamente.

Nos estudos com a linhagem mutante M2, os substratos amido solúvel, amido de mandioca e amido de batata foram bons meios para a produção, a atividade enzimática foi de 6,3, 5,9 e 6,5 U/mL respectivamente (Fig. 11a, 11b e 11c). Estes substratos se apresentaram como um excelente meio para produção da enzima com alta atividade específica de 22,5 U/mg de proteína no substrato amido solúvel, 12,3 U/mg de proteína para o amido de mandioca, e 20,9 U/mg de proteína no amido de batata. O substrato amido de milho, como observado para as outras linhagens, também apresentou menor produção entre os amidos analisados (Fig. 11d).

Na busca por meios alternativos para a produção desta glucoamilase foram realizados ensaios utilizando como substrato para a fermentação o farelo de trigo, farelo de mandioca e farelo de arroz, em substituição ao amido, uma vez que não existem relatos na literatura da utilização de resíduos agroindustriais para a produção de glucoamilases a partir desses tipos de mutantes. Nestas condições, foi verificado que o farelo de mandioca foi um excelente substrato para a produção, apresentando atividade enzimática de 8,6 U/mL e atividade específica de 43 U/mg em 96 horas de cultivo (Fig. 11g). Os farelos de trigo e farelo de arroz

apresentaram uma produção inferior ao farelo de mandioca, com atividade específica de 18,0 U/mg de proteína (3,2 U/mL, Fig. 11e) e 10 U/mg de proteína (2,6 U/mL, Fig. 11f), respectivamente.

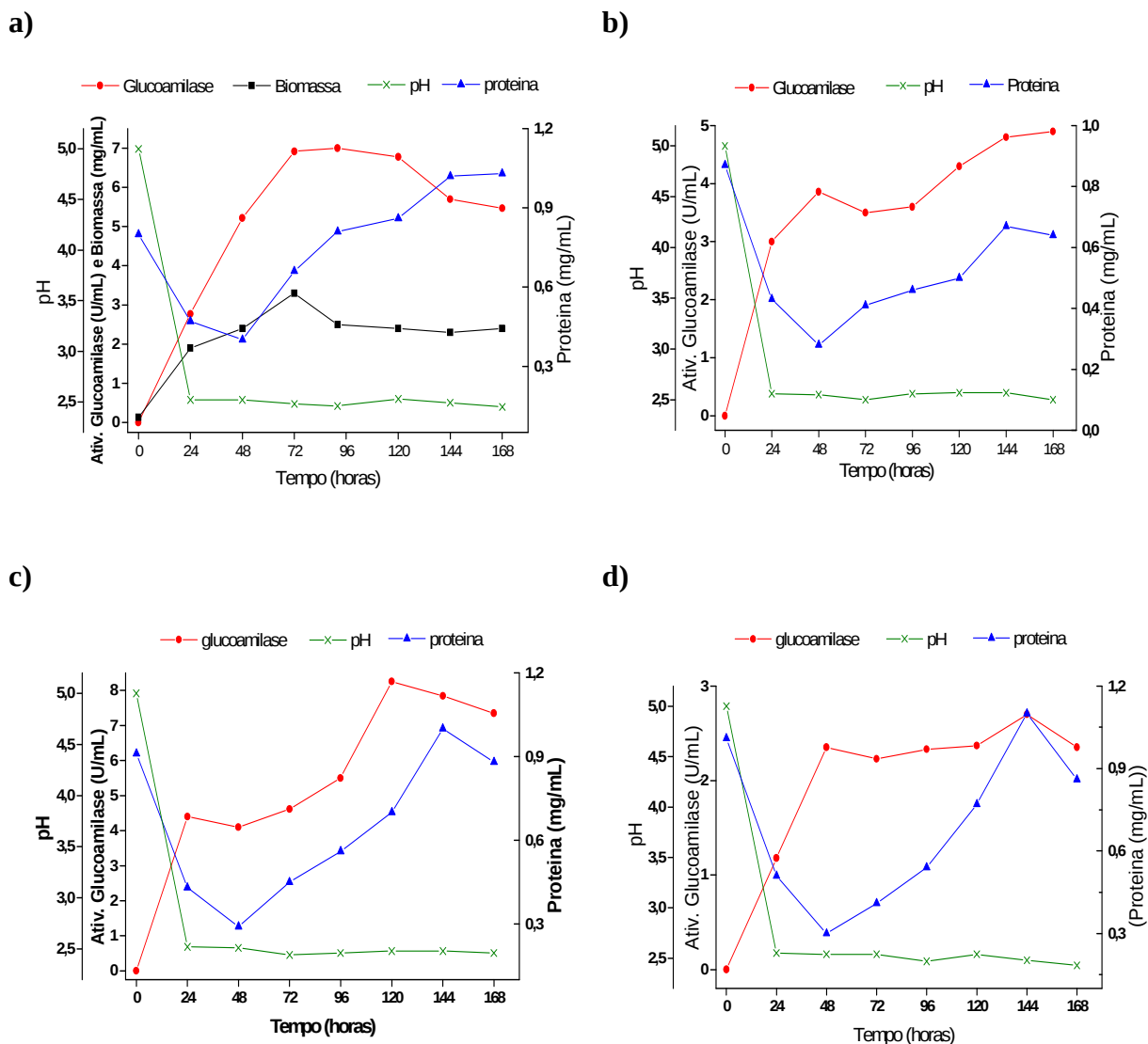
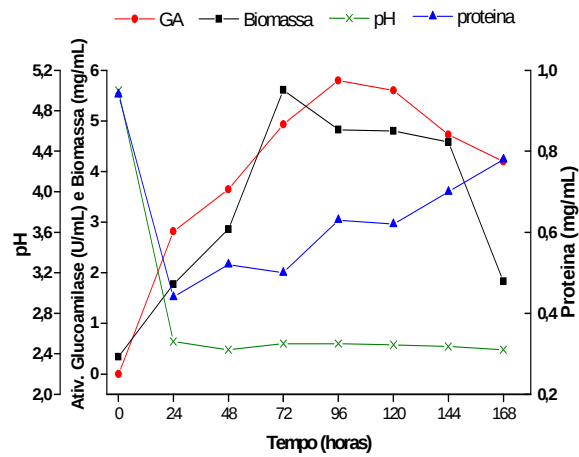
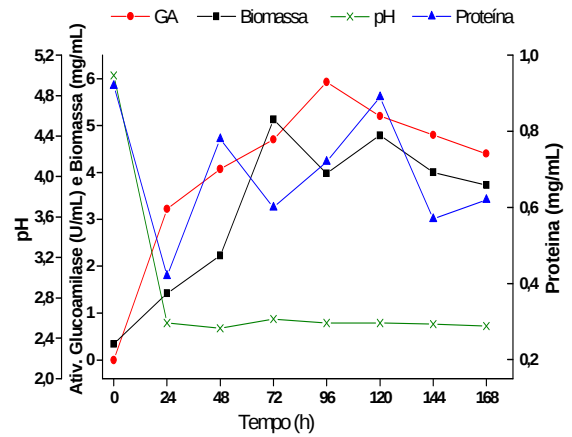


Figura 9. Produção da glucoamilase pela linhagem selvagem (WT) em diferentes fontes de amido. a) amido solúvel; b) amido de mandioca; c) amido de batata e d) amido de milho.

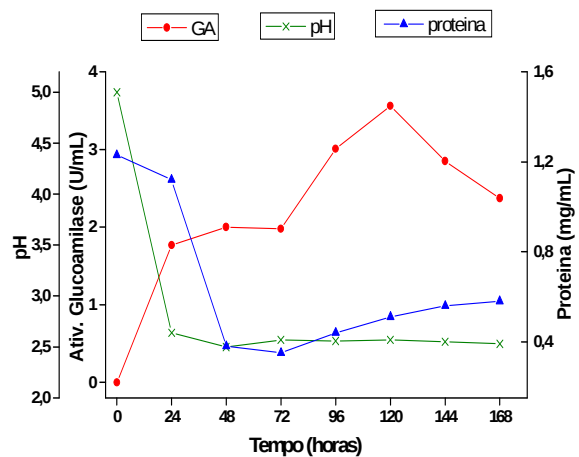
a)



b)



c)



d)

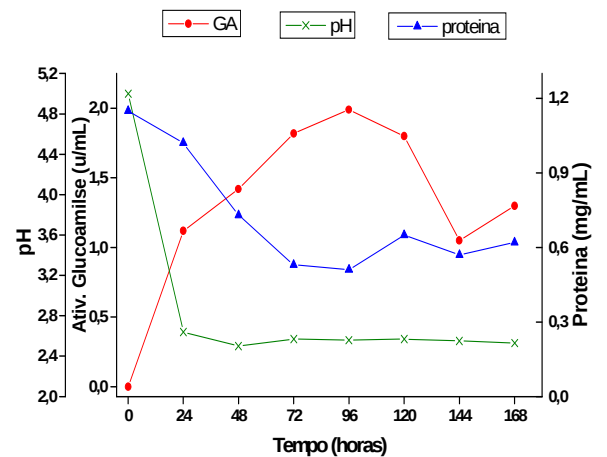
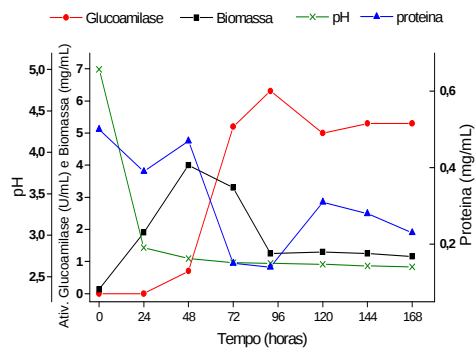
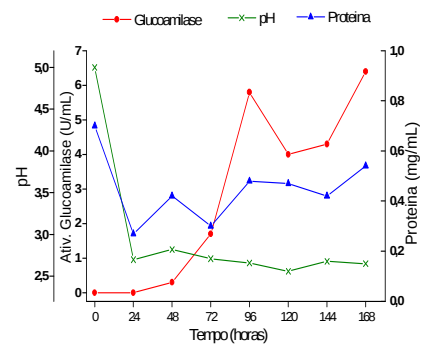


Figura 10. Produção da glucoamilase mutante M1 em diferentes fontes de amido. a) amido solúvel; b) amido de mandioca; c) amido de batata e d) amido de milho.

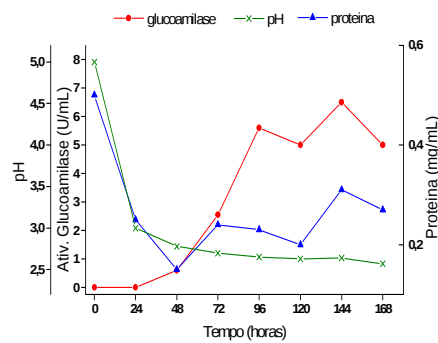
a)



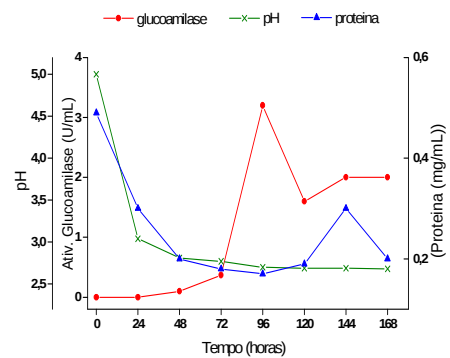
b)



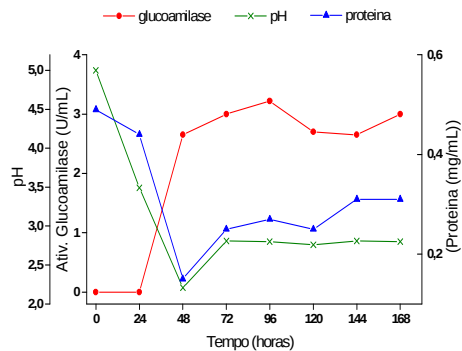
c)



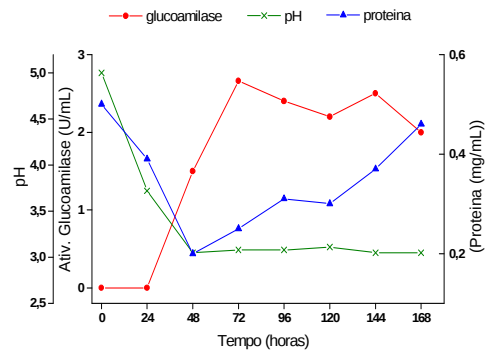
d)



e)



f)



g)

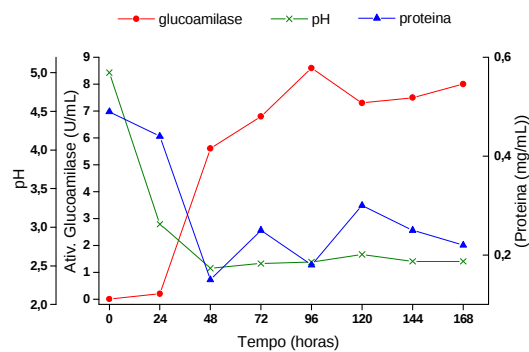


Figura 11. Produção da glucoamilase mutante M2. a) amido solúvel; b) amido de mandioca; c) amido de batata; d) amido de milho; e) farelo de trigo; f) farelo de arroz e g) farelo de mandioca.

Com os resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que não houve diferenças na quantidade de proteína secretada pelas linhagens mutantes em relação à linhagem selvagem, indicando que a mutação não afetou a produção de proteínas, bem como da atividade enzimática. Wallis e colaboradores (2001), estudando a glucoamilase produzida por mutantes de *A. niger* observaram que em relação à linhagem selvagem houve uma redução de 50% na secreção da proteína no meio extracelular, durante o processo fermentativo.

A literatura relata trabalhos correlacionando a baixa atividade da glucoamilase com o efeito mutação. Carrea e Colombo (2000) constataram que alteração no intuito de melhorar a termoestabilidade está vinculada com o decréscimo na atividade. Segundo Flory e colaboradores (1994) mutações não apenas afetam a termoestabilidade da enzima, mas também podem reduzir a atividade específica.

Mutações sítio dirigidas realizadas na região da α -hélice 11 de glucoamilase de *A. awamori*, sintetizada e excretada por levedura tornaram a enzima inativa (Da SILVA, 1999). Mutações realizadas nos resíduos Asp 176 $\rightarrow$ Glu e Glu 180 $\rightarrow$ Asp na enzima de *A. awamori* expressa em levedura afetaram tanto o K_m (coeficiente de velocidade de ligação ao substrato), quanto o K_{cat} (coeficiente de velocidade de quebra do substrato), demonstrando que esses resíduos estão envolvidos na ligação com o substrato ou na integridade estrutural da proteína (BAKIR et al., 1993).

Comparando os resultados apresentados nesse trabalho com dados da literatura observa-se que esses são bastante expressivos em relação à produção desta enzima. A linhagem híbrida CL-9 de *Saccharomyces diastaticus* produziu glucoamilase extracelular com atividade de 1,06 U/mL em meio contendo amido solúvel e glicose (PERES et al., 2006). A enzima produzida por *A. awamori* também expressa em *S. cerevisiae* apresentou atividade de 0,09 U/mL para a linhagem selvagem, e 0,26 U/mL para o mutante Pro128 $\rightarrow$ Ser (FLORY et al., 1994). A glucoamilase de *Saccharomycopsis fibuligera* DSM-70554 apresentou atividade de 0,65 U/mL após 48 horas de fermentação em meio contendo amido (GONZÁLEZ et al. 2008). Knox e colaboradores (2004) estudando a glucoamilase produzida pela linhagem recombinante *S. cerevisiae* Stell7 apresentou atividade de 1,5 U/mL. Uma linhagem industrial de *S. cerevisiae* alterada para expressão da glucoamilase de *Debaryomyces occidentalis* apresentou 0,9 U/mL de atividade enzimática (CHANG et al. 2007).

A glucoamilase selvagem de *A. awamori* expressa em *S. cerevisiae* estudada por Chen e colaboradores (1994) exibiu atividade de 0,31 U/mL. A super expressão da enzima, codificando o gene *STA1* de *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* em linhagens

industriais de *Saccharomyces* produziram bons resultados. A linhagem diplóide Y468 produziu glucoamilase com atividade de 6,2 U/mL, e a linhagem haplóide Y457 3,0 U/mL (LATORRE-GARCÍA et al., 2008).

Em relação à produção de biomassa foi observado que nos cultivos com amido solúvel e glicose a 2,0%, a linhagem mutante M1 apresentou o maior crescimento com um pico de 5,6 mg/mL de células em 72 horas de cultivo (Fig. 10a). A linhagem mutante M2 apresentou maior biomassa em 48 horas de fermentação com 4,0 mg/mL (Fig. 11a) e a linhagem selvagem teve o pico de produção de biomassa em 72 horas com 3,3 mg/mL (Fig.9a).

A linhagem CL-9 de *Saccharomyces diastaticus* apresentou biomassa de 9,3 mg/mL em meio contendo glicose como fonte de carbono e de 2,5 mg/mL em meio contendo amido (PERES et al., 2006). A linhagem *Saccharomycopsis fibuligera* DSM-70554 cultivada em amido de mandioca por 48 horas teve sua biomassa estimada em 2,36 mg/mL (GONZÁLEZ et al., 2008). A linhagem recombinante *S. cerevisiae* Stell7 apresentou biomassa de 28 mg/mL quando cultivada em condições aeróbicas, porém em condições anaeróbicas apresentou 4,2 mg/mL (KNOX et al., 2004). A linhagem recombinante *Saccharomyces cerevisiae* YPB-G que secreta glucoamilase de *A. awamori* teve seu crescimento máximo avaliado em 6,24 mg/mL de biomassa (ALTINTAS et al., 2003).

A concentração de proteínas nos meios de fermentação, na fase inicial foi alta devido ao enriquecimento do meio com o aminoácido histidina (Fig. 9, 10 e 11). Porém, esses valores foram reduzidos nas primeiras 48 horas de fermentação, e logo em seguida voltaram a aumentar com o crescimento do micro-organismo, acompanhando a secreção de proteínas extracelulares.

Foi uma constante nos processos fermentativos a acidificação do meio em função do tempo de cultivo. O pH 5,0 inicial do meio de cultura foi reduzido para a faixa de 2,4 a 2,5 no final da fermentação. Essa intensa redução de pH pode ser devido à liberação de metabólitos derivados do consumo de nutrientes do meio. Segundo Rimbault (1998), os valores de pH durante o processo fermentativo podem ser alterados em função do metabolismo produzido pelo micro-organismo com a liberação de ácidos para o meio. Para as leveduras essa redução vai depender do tipo de metabolismo desenvolvido pelo microrganismo, já que a levedura pode respirar ou fermentar, em função da oferta de oxigênio e de açúcar disponível. Frequentemente, um sistema alternativo de respiração aparece, quando um caminho normal é bloqueado, ou limitado de alguma forma. Assim, a *Saccharomyces cerevisiae* em determinadas condições pode realizar a fermentação aeróbica e, produzir etanol e ácidos mesmo na presença de oxigênio. Além disso, o baixo pH pode reduzir a solubilidade do CO₂,

o qual é importante para atividade da enzima anaplerótica piruvato carboxilase, que tem como função a carboxilação enzimática do piruvato pelo CO_2 com produção de oxaloacetato para a manutenção de ciclo do ácido cítrico (GUPTA e MAHESHWARI, 1985).

As leveduras, especialmente a *Saccharomyces cerevisiae* toleram uma ampla variação de pH (2,5 a 8,5), mas tem como ótimo para seu crescimento pH 4,5. Entretanto, o pH intracelular mostra-se independente do pH extracelular, de modo que, sob uma faixa de pH externo, entre 3 e 8, o pH intracelular pode encontra-se entre 6 e 7, com um gradiente interno do centro para a periferia da célula, sendo mais ácido, próximo a membrana (SLAVIK e KOTYK, 1984). A acidificação interna nas leveduras é controlada pela capacidade de expulsar íons hidrogênio para o meio externo, mediada pela H^+ -ATPase da membrana plasmática, que gera um potencial eletroquímico, permitindo a absorção de K^+ e alcalinizando o meio intracelular. Desta forma, o pH interno é mantido pela atuação das ATPases da membrana, porém valores extremos de pH podem causar um estresse celular, e isso influencia no metabolismo da levedura, forçando o sistema ATPase, e diminuindo parte da energia disponível para o crescimento e outras funções essenciais do metabolismo (BRUL e COOTE, 1999; HALM, et al. 2004).

5.2. Purificação da glucoamilase

5.2.1. Montagem da coluna de afinidade

Para a purificação das glucoamilases foi adotada a cromatografia por afinidade utilizando uma matriz Sepharose 6B-Acarbose. Os parâmetros ideais para a purificação e preparação da coluna foram determinados. Assim, várias concentrações do ligante foram avaliadas para a preparação da coluna (Tabela 4). Para tal ensaio, a proteína foi dialisada em tampão NaOAc 0,1 M pH 4,5 com 0,5 M de NaCl por 24 horas, e aplicada nas matrizes com concentrações variadas do ligante, e, posteriormente lavada com o mesmo tampão da diálise. Observou-se uma saturação da matriz com a glucoamilase, uma vez que o excesso da proteína não adsorvida foi removido no processo de lavagem com o tampão acetato de sódio. Após a lavagem da coluna a proteína foi eluída em tampão Tris-HCl 1,7 M pH 7,6. As amostras foram dialisadas em água destilada por 48 horas e a atividade determinada (Tabela 4).

Um controle foi feito utilizando uma matriz sem acarbose, composta apenas da SepharoseTM 6B Epoxi ativada, a qual foi submetida aos mesmos protocolos da matriz contendo o ligante. No controle, como era esperado, não foi constatada atividade após a eluição, já que não tinha sítios para ligação da glucoamilase.

Dessa forma, foi comprovada a ligação da acarbose com a resina SepharoseTM 6B epóxi ativada. A melhor eficiência deste complexo ocorreu na concentração de 600 $\mu\text{M/mL}$ do ligante acarbose, como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4. Determinação da concentração de acarbose na montagem da matriz de afinidade contendo resina Sepharose 6B Epoxi Ativada

Concentração do Ligante (acarbose)	Atividade da glucoamilase (U/mL) após lavagem da coluna	
	Tampão NaOAc 0,1M pH 4,5	Tampão Tris-HCl 1,7M pH 7,6
Controle	4,60	0,0
200 μM	0,53	3,60
600 μM	0,17	4,70
0,01 M	2,00	1,70
0,3 M	2,97	0,95

Observou-se que o aumento da concentração do ligante diminuiu a eficiência da coluna. A concentração elevada do ligante acoplado, provavelmente, pode aumentar a força da ligação, causando impedimento estérico e ligação não específica da proteína com o complexo e, reduzindo assim, a eficiência da ligação, especialmente quando elevadas concentrações e grandes proteínas forem acopladas.

A acarbose funciona como um inibidor competitivo e reversível da glucoamilase, já que interage com alguns resíduos importantes do sítio catalítico (Fig. 12). A acarbose estabelece ligações hidrofóbicas com cadeias laterais de triptofano, e impede a troca de hidrogênio do resíduo Trp 52, que faz parte do sítio ativo da glucoamilase (ALESHIN et al., 1996; CHRISTENSEN et al., 2002). O resíduo Trp 52 forma uma ponte de hidrogênio com o resíduo Glu 179, que é o resíduo catalítico, e como a função do Trp 52 acredita ser a manutenção e a orientação correta do Glu 179 durante o processo catalítico, quando este está ligado, a acarbose inibe a ação catalítica da enzima.

Os resíduos Tyr 48, Arg 54, Trp 120, Glu 180, Arg 305 e Trp 317 também localizados no sítio ativo são cruciais no estado de transição e estabilização da ligação com o substrato (FRANDSEN et al., 1995; FIEROBE et al., 1997).

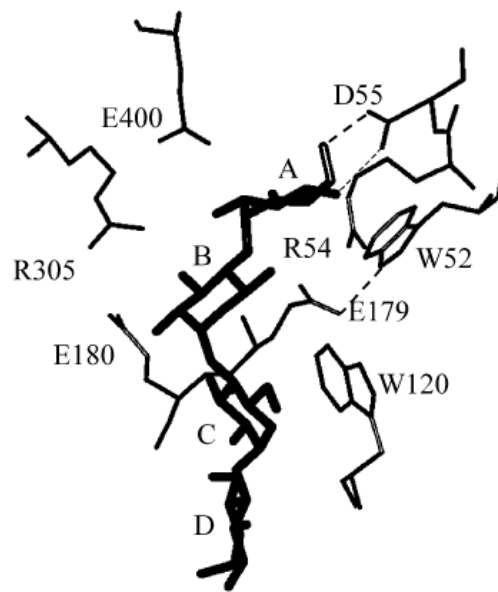


Figura 12. Seção do sítio ativo da glucoamilase; as cadeias de aminoácidos são representadas por traços finos, e a acarbose por traços largos. Os anéis da acarbose são representados pelas letras A, B, C e D, mostrando a interação deste no sítio ativo. (CHRISTENSEN et al., 2002).

5.3. Procedimentos de purificação

Após determinação das condições ideais para obtenção da matriz de afinidade, os extratos brutos obtidos do cultivo dos micro-organismos em meio de amido solúvel com 120 h de fermentação foram concentrados por ultrafiltração usando o sistema Quix StandTM, equipado com uma membrana de 10 kDa.

A amostra foi dialisada em tampão NaOAc 0,1 M pH 4,5 com 0,5 M de NaCl. Este mesmo tampão foi utilizado para equilibrar a coluna. Depois de aplicar a amostra, a coluna foi novamente lavada com o tampão NaOAc 0,1 M pH 4,5 com 0,5 M de NaCl. O estágio de lavagem é importante para que os compostos adsorvidos por interações não específicas como interações hidrofóbicas e troca-iônica sejam removidos. A glucoamilase ligada a matriz foi posteriormente eluída em tampão Tris-HCl 1,7 M pH 7,6. As frações foram dialisadas em água destilada por 48 horas e em seguida, a atividade enzimática foi determinada. O gráfico a seguir mostra a eluição da enzima M1.

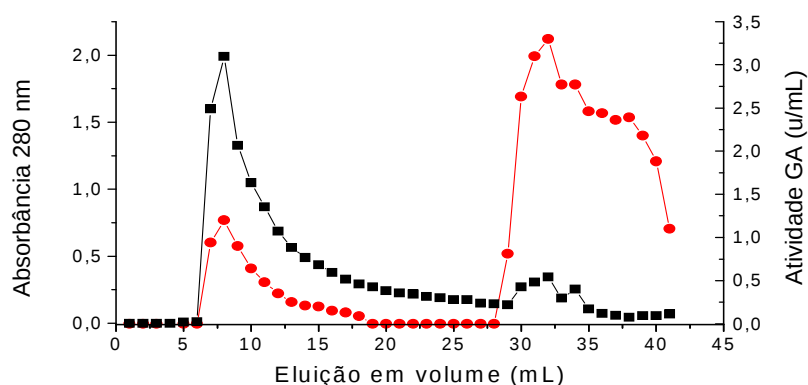


Figura 13. Perfil de eluição da glucoamilase M1: ■- absorbância das frações determinada a 280 nm; ●- atividade glucoamilase. As frações de 0 a 28 corresponde a lavagem da coluna com tampão NaOAc pH 4,5 0,1 M; tubos 29 a 42 eluição da glucoamilase com tampão Tris-HCl pH 7,6 1,7 M.

O protocolo estabelecido para a purificação da glucoamilase mutante M1 apresentou um fator de purificação alto de 185,9 vezes, e alta atividade específica 1766 U/mg de proteína (Tabela 5).

Tabela 5. Purificação da glucoamilase M1 de *A. awamori* expressa em *S. cerevisiae*.

Etapas Purificação	Volume total (mL)	Atividade Glucoamilase (U/mL)		Proteína (mg/mL)		Atividade específica U/MG	Rendimento (%)	Fator de purificação
		U total	mg/total	mg/mL	mg/total			
Enzima bruta	750	5,9	4425	0,62	465	9,5	100	1
Enzima concentrada	75	60,0	4500	1,29	96,7	46,5	101,7	4,9
Cromatografia afinidade	8,5	5,3	45,0	0,003	0,0255	1766	1,02	185,9

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos da purificação da glucoamilase produzida pela linhagem mutante M2. O extrato bruto foi concentrado 20 vezes e apresentou uma atividade específica de 107,9 U/mg, o rendimento obtido após a homogeneidade foi de 2,5% com fator de purificação de 150,6 vezes.

Tabela 6. Purificação da glucoamilase M2 de *A. awamori* expressa em *S. cerevisiae*

Etapas Purificação	Volume total (mL)	Atividade GA (U/mL)		Proteína (mg/mL)		Atividade específica U/MG	Rendimento (%)	Fator de purificação
		U total	mg/total	mg/mL	mg/total			
Enzima bruta	400	2,5	1000	0,30	120	8,33	100	1
Enzima concentrada	16	52,9	846,4	0,49	7,8	107,9	84,6	12,9
Cromatografia afinidade	5,0	5,0	25,0	0,004	0,02	1250	2,5	150,6

Como observado para as enzimas mutantes, a purificação da glucoamilase selvagem também apresentou alta atividade específica com 1000 U/mg de proteína, e um fator de purificação 38,8 vezes. Neste caso, o rendimento foi mais significativo com 17,7% (Tabela 7).

Tabela 7: Purificação da glucoamilase produzida pela linhagem selvagem de *A. awamori* expressa em *S. cerevisiae*.

Etapas Purificação	Volume total (mL)	Atividade GA		Proteína		Atividade específica U/MG	Rendimento (%)	Fator de purificação
		(U/mL)	U total	mg/mL	mg/total			
Enzima bruta	15	7,5	112,5	0,29	4,35	25,8	100	1
Enzima concentrada	2	47,0	94	0,45	0,9	104,4	84	4,0
Cromatografia afinidade	4	5,0	20,0	0,005	0,02	1000,0	17,7	38,8

A etapa única da cromatografia de afinidade, utilizando a matriz Sepharose 6B-Acarbose, foi eficiente para a purificação. No perfil eletroforético em SDS-PAGE, foi observada uma banda única para cada enzima purificada, com massas moleculares estimadas em 100 kDa (Fig. 14). A massa molecular foi determinada por meio de análise da regressão linear, representando graficamente os valores do logaritmo da massa molecular dos padrões utilizados versus os valores da migração relativa de cada padrão em centímetro, para obtenção da reta padrão. A partir da reta padrão foi obtido o valor estimado de cada glucoamilase purificada, aplicando-se o valor da migração relativa da enzima pura.

A massa molecular estimada está dentro da extensão encontrada para a maioria das glucoamilases fungicas que varia entre 26 – 112 kDa (VIHINEM e MÄNTSÄLÄ, 1989; MICHELIN et.al., 2008). Flory e colaboradores (1994) e Lemos (2003) também relataram glucoamilases mutantes com massas moleculares semelhantes. A glucoamilase de *Aspergillus niger* purificada por cromatografia de afinidade apresentou massa molecular de 100 kDa (OUYANG et al., 2007). A glucoamilase de *A. awamori* selvagem e o mutante Asn →Ala expressas em *S. cerevisiae* apresentaram massas molares de 95 kDa (CHEN, et al., 1994). Já a enzima do fungo *Paecilomyces variotii* teve sua massa estimada em 86,5 kDa (MICHELIN et al., 2008). A glucoamilase intracelular do fungo *Scytalidium thermophilum* teve sua massa estimada em 98,7 kDa (FERREIRA-NOZAWA et al., 2008). A glucoamilase de *Humicola* sp apresentou massa de 72,8 kDa (RIAZ et al., 2007).

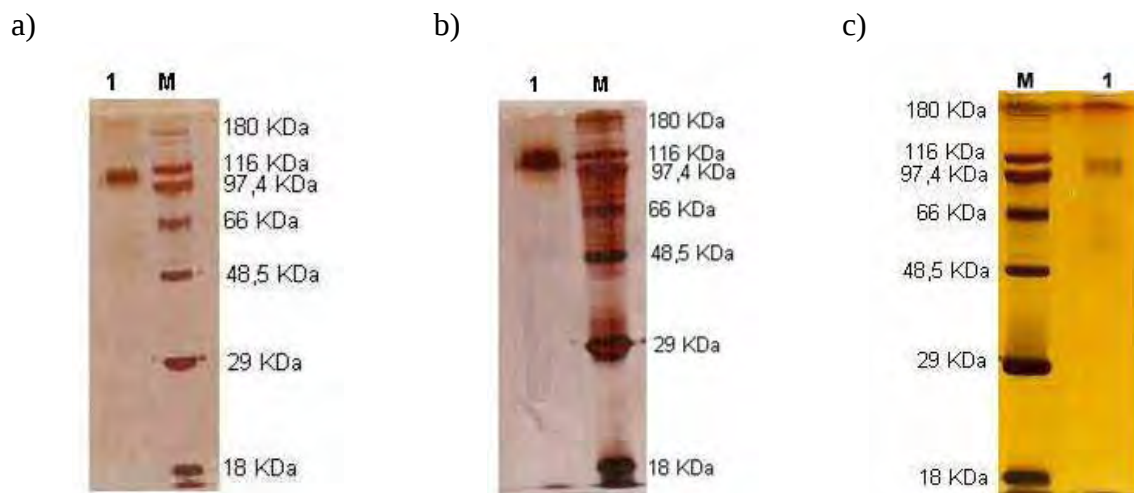


Figura 14. Perfil eletroforético em SDS-PAGE das glucoamilases de *Aspergillus awamori* expressa em *Saccharomyces cerevisiae*. (a) glucoamilase selvagem; (b) glucoamilase M1 e (c) glucoamilase mutante M2. Coluna 1: Glucoamilase purificada; Coluna M: marcadores de massa molecular. Marcadores: α_2 -Macroglobulin 180 kDa; β galactosidase, 116 kDa; Phosphorylase b 97,4 kDa; BSA, 66,0 kDa; Fumarase 48,0 kDa; Carbonic Anhydrase 29,0 kDa; β -lactoglobulina, 18,4 kDa.

5.4. Caracterização das glucoamilases de *A. awamori* expressas em *S. cerevisiae*

Inicialmente foram avaliados pH e temperatura ótimo de atividade, assim como, a estabilidade das enzimas frente às variações de pH e temperatura. As glucoamilases M1 e M2 e selvagem apresentaram atividade ótima em pH 4,0 - 4,5 (Fig. 15, 16 e 17, respectivamente). Este valor está na faixa relatada em outros estudos da literatura, e também se enquadra no valor ótimo de pH, em que a glucoamilase é empregada na hidrólise do amido.

Usualmente as glucoamilases fúngicas são mais ativas em valores ácidos de pH (NOROUZIAN et al., 2006). Pode-se destacar a glucoamilase do fungo *Talaromyces emersonii* que apresentou atividade ótima entre os valores de pH 4,0 – 4,5 (NIELSEN et al., 2002). *Streptosporangium* sp, estudado por Stamford e colaboradores (2002) produziu glucoamilase com pH ótimo de atividade em 4,5. A glucoamilase produzida por *Aspergillus oryzae*, estudada por Hata e colaboradores (1997), também apresentou um pH ótimo de 4,5.

O pH ótimo da glucoamilase deglicosilada de *Aspergillus niger* foi de 4,8 (JAFARI-AGHDAM et al., 2005). O gene da glucoamilase de *Aspergillus awamori* foi introduzido em arroz por *Agrobacterium*, uma bactéria utilizada como vetor de transformação em plantas. O pH ótimo da glucoamilase expressa pelas sementes de arroz transgênico foi 5,0 - 5,5 (XU et al., 2008).

Em relação à estabilidade das enzimas frente à variação do pH foi observado para a enzima M1 100% de atividade no pH 5,5, sendo esta estável em uma ampla faixa, mantendo

acima de 80% de estabilidade em todos os valores pH analisado. A enzima mutante M2 apresentou 100% de estabilidade no pH 7,0, mantendo-se estável (80%) entre 5,5 e 9,0. A linhagem selvagem apresentou 100% de estabilidade no pH 6,5, e 80% de estabilidade entre os pHs 4,0 e 9,0.

Esses dados corroboram com dados divulgados na literatura para glucoamilases. As glucoamilases fúngicas geralmente são estáveis em uma faixa de pH entre 3,0 e 8,0. Como a glucoamilase de *Streptosporangiuns* sp estudada por Stamford e colaboradores (2002), e a glucoamilase do fungo *Aspergillus awamori*: nakazawa MTCC6652 (NEGI e BANERJEE 2009) foram estáveis entre o pH 3,0 e 9,0. A glucoamilase produzida pelo fungo *Paecilomyces variotii* foi estável entre o pH 3,0 e 7,5 (MICHELIN et al., 2008). A linhagem de *Aspergillus terreus* NA 170 mutante produziu glucoamilase com estabilidade na faixa de pH de 3,0 a 7,0 (GHOSH et al., 1991), e a glucoamilase produzida pela linhagem mutante *exo-1* de *Neurospora crassa* foi estável na faixa de 2,0 a 8,0 por 40 minutos (SPINELLI et al., 1996).

Jafari-Aghdam e colaboradores (2005) estudaram a glucoamilase nativa e sua forma deglicosilada de *Aspergillus niger*, eles encontraram que a forma nativa foi estável entre valores de pH de 2,0 a 7,0, e para a glucoamilase deglicosilada a faixa de estabilidade foi de 2,0 a 9,0.

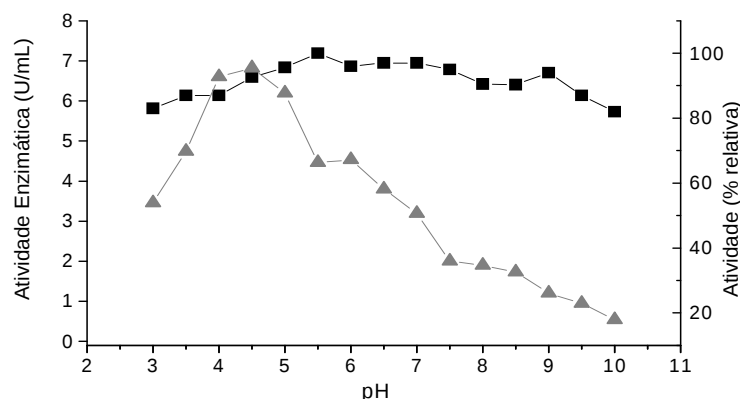


Figura 15. Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade da glucoamilase M1 pura. (▲- pH ótimo; ■- pH de estabilidade ; tampão McIlvaine pH 3,0 a 8,0 e tampão glicina-NaOH pH 8,5 a 10,0).

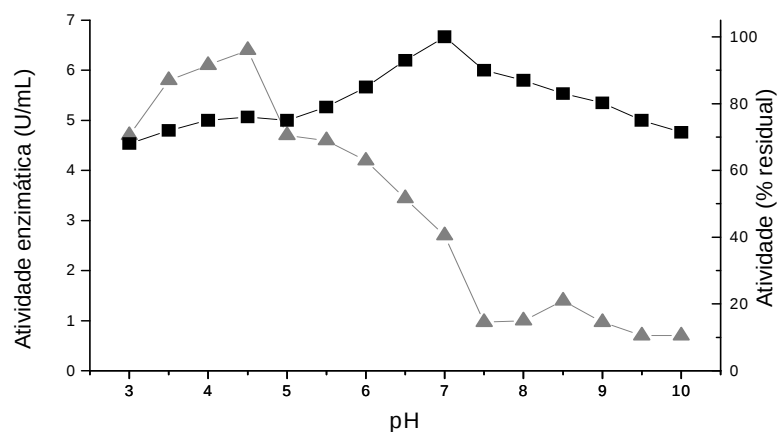


Figura 16. Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade da glucoamilase M2 pura. (▲ - pH ótimo; ■ - pH de estabilidade ; tampão McIlvaine pH 3,0 a 8,0 e tampão glicina-NaOH pH 8,5 a 10,0).

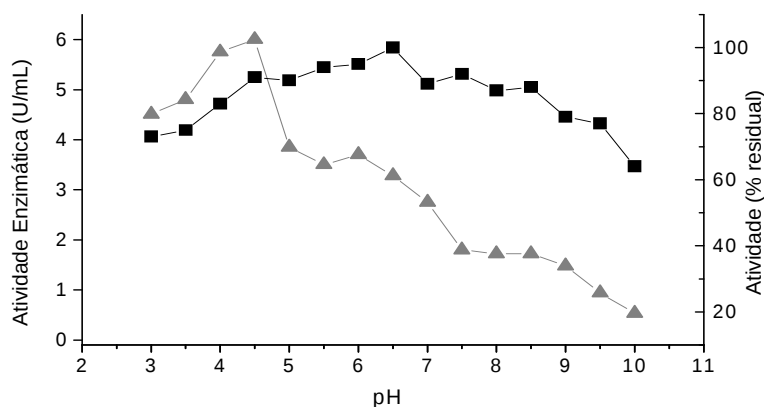


Figura 17. Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade da glucoamilase selvagem pura. (▲ - pH ótimo; ■ - pH de estabilidade ; tampão McIlvaine pH 3,0 a 8,0 e tampão glicina-NaOH pH 8,5 a 10,0).

O efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas é mostrado nas Figuras 18, 19 e 20. Observa-se que as glucoamilases M1 e M2 apresentaram atividade máxima em elevados valores de temperatura, apresentando temperatura ótima ambas a 65 °C (Fig. 18 e 19). Acima dessa temperatura foi observada uma queda brusca da atividade para ambas glucoamilases. A enzima selvagem apresentou atividade ótima a 60 °C (Fig. 20). Acima dessa temperatura a atividade diminui, sendo que a 65 °C retém apenas cerca de 50% da atividade. A 75 °C a enzima é totalmente inativada devido à desnaturação proteica.

A temperatura ótima das glucoamilases fúngicas geralmente está na faixa de 58 a 65 °C. Anto e colaboradores (2006) descreveram uma glucoamilase de *Aspergillus* sp HA-2 que

apresentou temperatura ótima de atividade a 55 °C, igual a glucoamilase produzida por *Paecilomyces variotii* estudada por Michelin e colaboradores (2008). A glucoamilase de *Aspergillus oryzae* cultivada em fermentação submersa apresentou temperatura ótima de 65 °C (HATA et al., 1997). A glucoamilase do mutante Exo-1 de *Neurospora crassa*, estudada por Spinelli e colaboradores (1996), apresentou temperatura ótima de 60 °C. Rajoka e colaboradores (2004) produziram glucoamilase de *Aspergillus niger* nativa com temperatura ótima de 55 °C, e uma glucoamilase de *A. niger* mutante com temperatura ótima de 60 °C. O gene da glucoamilase de *Aspergillus awamori* foi introduzido em planta através do vetor *Agrobacterium*, que é um vetor utilizado para expressão de genes em plantas, a caracterização da enzima extraída da semente do arroz revelou atividade ótima em torno de 60 °C (XU et al., 2008).

De forma geral, as enzimas estudadas apresentaram tolerância a temperaturas inferiores aos seus valores de temperaturas ótimos. A enzima M1 mostrou-se estável em temperatura de até 50 °C, preservando 100% de sua atividade (Fig. 18). Quando incubada a 55 °C por 1 hora a enzima ainda manteve 95% da atividade, porém a 60 °C perdeu 50% da atividade. A glucoamilase mutante M2, (Fig. 19) exibiu uma faixa maior de termoestabilidade com 100% de sua atividade quando incubada por 1 hora em ausência de substrato em temperatura de até 55 °C, mantendo 91% da atividade a 60 °C, e a 65 °C apresentou 73%. A selvagem apresentou-se menos estável, como mostra a Figura 20, sendo estável até 50 °C. Quando incubada a 60 °C a enzima reteve 40% da atividade inicial, sendo totalmente inativada a 75 °C.

Dados da literatura mostram que a glucoamilase de *Acremonium* sp foi estável a temperatura de 60 °C (MARLIDA et al., 2000). A linhagem de *A. terreus* NA 170 mutante estudada por Ghosh e colaboradores (1991) produziu uma enzima estável a temperaturas na faixa de 30 a 75 °C. Nguyen e colaboradores (2002) estudaram a glucoamilase produzida pelo fungo *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626, a qual foi estável a 50 °C, e perdeu 50% de sua atividade a 70 °C em 30 minutos. Stanford e colaboradores (2002) produziram glucoamilase de *Streptosporangium* sp com propriedades termoestáveis, com 100% de atividade a 70 °C por 30 minutos. A glucoamilase do fungo *Paecilomyces variotii* a 60 °C apresentou 95% de estabilidade por 5 minutos (MICHELIN et al., 2008).

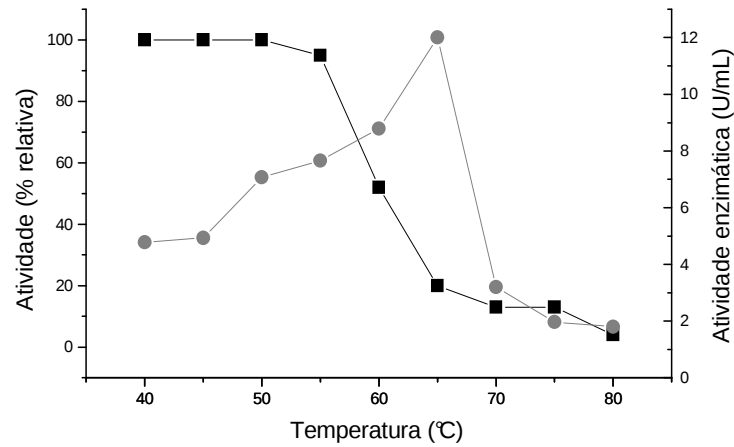


Figura 18. Temperatura ótima (●) e de estabilidade (■) da glucoamilase M1. A temperatura ótima foi determinada realizando a atividade enzimática em diferentes temperaturas. A estabilidade foi determinada pela incubação da enzima em ausência de substrato por 1h, após, a atividade foi determinada utilizando como substrato amido solúvel 0,5%.

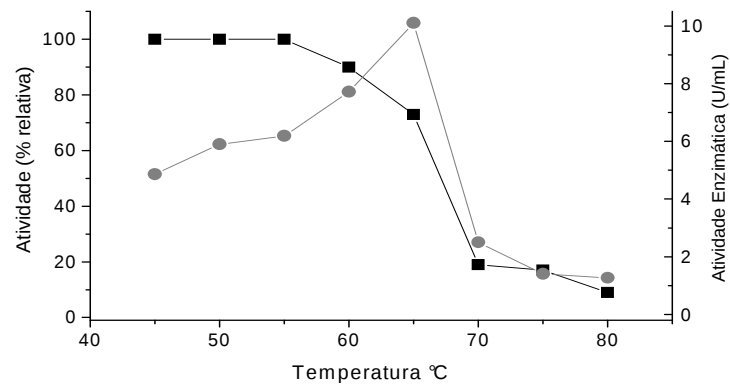


Figura 19. Temperatura ótima (●) e de estabilidade (■) da glucoamilase M2. A temperatura ótima foi determinada realizando a atividade enzimática em diferentes temperaturas. A estabilidade foi determinada pela incubação da enzima em ausência de substrato por 1h, após, a atividade foi determinada utilizando como substrato amido solúvel 0,5%.

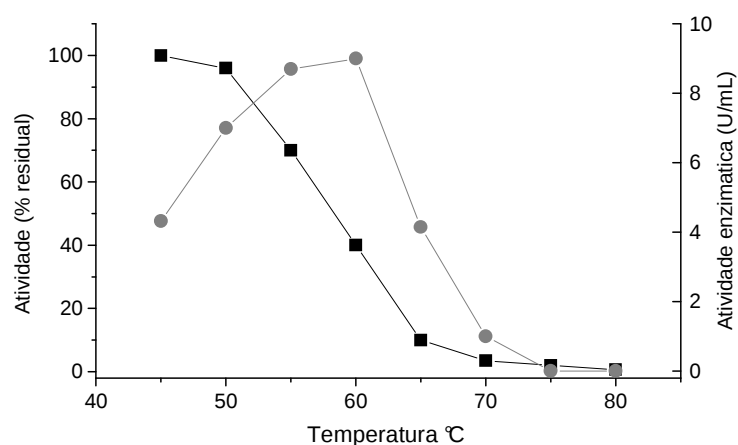


Figura 20. Temperatura ótima (●) e de estabilidade (■) da glucoamilase selvagem WT. A temperatura ótima foi determinada realizando a atividade enzimática em diferentes temperaturas. A estabilidade foi determinada pela incubação da enzima em ausência de substrato por 1h, após, a atividade foi determinada utilizando como substrato amido solúvel 0,5%.

5.5. Termoinativação irreversível das enzimas

A termoinativação irreversível das glucoamilases realizou-se em temperaturas de 65 a 80 °C, com intervalos de 2,5 °C entre estas temperaturas, no pH ótimo das enzimas. O tempo de meia vida ($t_{(1/2)}$) a 70 °C está representado na Figura 21, o tratamento resultou em uma inativação progressiva das enzimas. A glucoamilase mutante M2 apresentou maior termoestabilidade em relação às demais enzimas, a 70 °C o $t_{(1/2)}$ foi 8,1 minutos; a glucoamilase mutante M1 apresentou 4,1 minutos, enquanto a enzima selvagem após 3,0 minutos já havia perdido 50% de sua atividade original. A Tabela 8 representa o $t_{(1/2)}$ determinado pela equação 1 (materiais e métodos), e estes confirmam os resultados obtidos graficamente.

Tabela 8. Tempo de meia vida ($t_{(1/2)}$) das glucoamilases em diferentes temperaturas

Linhagem	Tempo de meia vida ($t_{(1/2)}$; min)						
	65°C	67,5°C	70°C	72,5°C	75°C	77,5°C	80°C
Mutante M2	76,1 min	23,2 min	8,1 min	3,6 min	2,1 min	1,5 min	0,8 min
Mutante M1	40,8 min	8,3 min	4,1 min	2 min	0,9 min	0,7 min	0,6 min
Selvagem WT	30,2 min	8 min	3,0 min	1,6 min	0,6 min	0,6 min	-

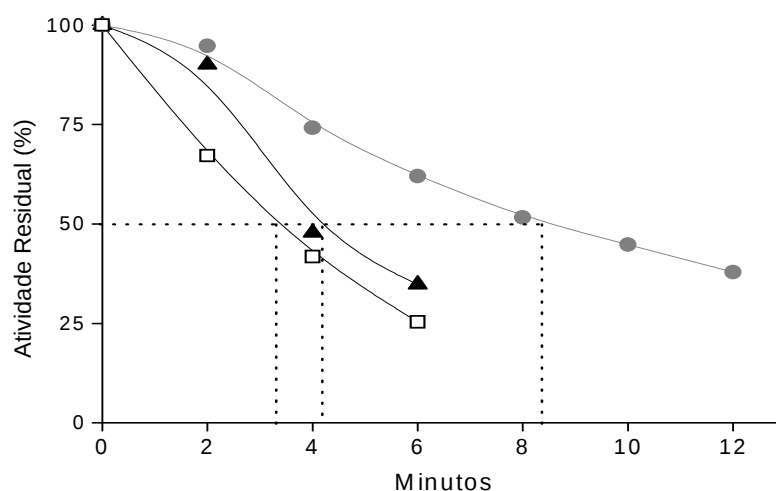


Figura 21. Atividade residual das glucoamilases em função do tempo de incubação a 70 °C. □ – linhagem selvagem; ▲ – mutante M1 e ● – mutante M2.

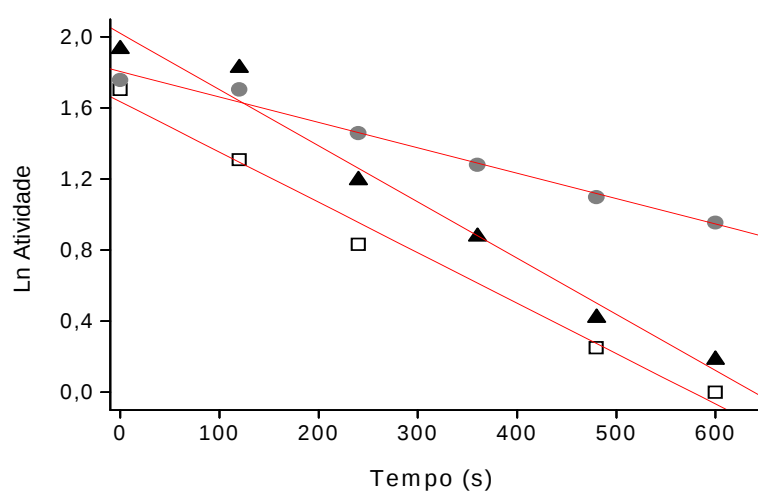
Os valores do K_d apresentaram um coeficiente de correlação maior que 0,98. A termoinativação das glucoamilases obedeceu a uma cinética de primeira ordem, de acordo com a linearidade obtida. Conduzindo à idéia de que, a inativação térmica foi ocasionada por processo monomolecular, e que a inativação por agregação protéica não foi suficiente para causar a perda da linearidade (COBOS e ESTRADA, 2003). Liu e colaboradores (2000), Liu e Wang (2003) e, Wang e colaboradores (2006) também reportaram cinética de primeira ordem para a termoinativação das glucoamilases de *A. awamori*.

O K_d foi calculado para todas as temperaturas (Tabela 9), entretanto, somente o de 70 °C está graficamente representado na Figura 22. As glucoamilases mutantes apresentaram os menores valores de K_d , indicando que essas enzimas desnaturam mais lentamente do que a enzima selvagem. Na termoinativação realizado por Liu e Wang (2003); Rajoka e colaboradores (2004) e, Wang e colaboradores (2006) os valores de K_d encontrados, também foram maiores para as enzimas nativas e menores para os mutantes.

Tabela 9. Coeficiente de velocidade de termoinativação (K_d) das glucoamilases

Temperatura	Kd		
	Selvagem	M1	M2
65°C	0,0003816	0,0002826	0,0001459
67,5°C	0,0014	0,00138	0,0004975
70°C	0,00382	0,00298	0,00142
72,5°C	0,007	0,00577	0,00339
75°C	0,0167	0,0125	0,00545
77,5°C	0,0165	0,01808	0,00743
80°C	ND	0,01488	0,01572

ND - não detectado

**Figura 22.** Ln da atividade a 70 °C. □ – linhagem selvagem WT; ▲ – mutante M1 e ● – mutante M2.

A representação gráfica do Ln do K_d versus a temperatura absoluta (Fig. 23) confirma a maior termoestabilidade da enzima mutante M2, tanto em temperaturas mais baixas (65 °C) quanto em temperaturas mais elevadas (80 °C). Os parâmetros termodinâmicos da desnaturação mostrados na Tabela 10 demonstram esses resultados, evidenciando que a energia livre (ΔG) diminui com o aumento da temperatura. Isto mostra que, as enzimas tornaram-se mais sensíveis à medida que ocorre o aumento da temperatura. A ΔG da glucoamilase M2 foi maior que as demais linhagens em todas as temperaturas. A 65 °C a enzima apresentou 106,1 KJ mol⁻¹, enquanto que a energia da selvagem foi de 102,5 KJ mol⁻¹. A 70 °C a ΔG da glucoamilase M2 foi 2,8 KJ mol⁻¹ maior que a enzima selvagem, sendo que, a 80 °C a diferença ainda foi significativa (1,9 KJ mol⁻¹). Altos valores de ΔG indicam maior termoresistência da molécula, enquanto que, um valor menor mostra uma proteína

termosensível. Li e colaboradores (1998) encontraram valores semelhantes durante a termoinativação de glucoamilases mutantes e selvagem, sendo a ΔG do mutante denominado N20C/A27C/S436 foi $2,2 \text{ KJ mol}^{-1}$ maior que a enzima selvagem estudada. Rajoka e colaboradores (2004) também encontraram bons resultados durante o estudo termodinâmico de glucoamilase mutante e nativa de *Aspergillus niger*, sendo que a ΔG do mutante foi 2 KJ mol^{-1} maior que a da enzima nativa. A glucoamilase alterada denominada THS8, que apresentou oito mutações teve um aumento na termoestabilidade de 5 KJ mol^{-1} em relação a enzima selvagem a 80°C (WANG et al., 2006). Depois de muitos ciclos de mutações a glucoamilase mutante múltipla CR2-1, tornou-se a glucoamilase mais termoestável desenvolvida até o momento, apresenta uma energia de termoinativação de 10 KJ mol^{-1} maior que a enzima selvagem (McDANIEL et al., 2008).

Observa-se na Tabela 10 que a entalpia (ΔH) não mostra dependência direta da temperatura, pois não sofre variações consideráveis nos extremos 65 e 80°C . A entropia (ΔS) sofre pequenas variações e, em temperaturas mais elevadas se torna constante, indicando talvez que, essa seja a temperatura crítica para a estrutura da molécula. O aumento da entropia pela desnaturação se deve a exposição de cadeias hidrofóbicas durante o desdobramento da proteína (COBOS e ESTRADA, 2003).

Os resultados obtidos graficamente (Fig. 23 $\text{Ln } K_d$ versus $1/T$) e matematicamente expressos em Tabela 10 (calculados pela equação 2: materiais e métodos) apresentam similaridade, mostrando uma melhor termoestabilidade da enzima mutante M2. A representação gráfica da Figura 23 sugere que possivelmente as enzimas apresentaram o mesmo mecanismo de inativação sendo, entretanto, mais resistente o mutante M2.

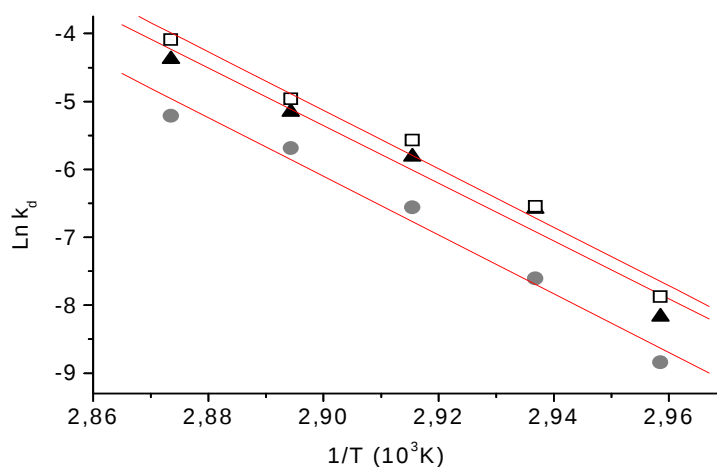


Figura 23. Efeito da temperatura na termoinativação irreversível das glucoamilases. $\square$ – linhagem selvagem WT; $\blacktriangle$ – mutante M1 e $\bullet$ – mutante M2.

Tabela 10. Parâmetros termodinâmicos da termoinativação das glucoamilases

PARÂMETROS	ENZIMAS		
	Selvagem	Mutante M1	Mutante M2
ΔG (KJ mol ⁻¹) 65°C	102,5	103,4	106,1
ΔG (KJ mol ⁻¹) 67,5°C	101,6	102,3	104,6
ΔG (KJ mol ⁻¹) 70°C	100,7	101,1	103,5
ΔG (KJ mol ⁻¹) 72,5°C	99,7	100,0	102,3
ΔG (KJ mol ⁻¹) 75°C	98,8	98,9	100,9
ΔG (KJ mol ⁻¹) 77,5°C	97,8	97,8	100
ΔG (KJ mol ⁻¹) 80°C	96,8	96,7	98,6
ΔH (KJ mol ⁻¹) 65°C	231,48	250,15	260,0
ΔH (KJ mol ⁻¹) 67,5°C	231,45	250,13	259,97
ΔH (KJ mol ⁻¹) 70°C	231,43	258,11	259,95
ΔH (KJ mol ⁻¹) 72,5°C	231,41	250,09	259,93
ΔH (KJ mol ⁻¹) 75°C	231,39	250,07	259,91
ΔH (KJ mol ⁻¹) 77,5°C	231,37	250,05	259,89
ΔH (KJ mol ⁻¹) 80°C	231,35	250,03	259,87
ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹) 65°C	381,53	434,28	456,18
ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹) 67,5°C	381,32	434,27	456,12
ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹) 70°C	381,13	434,28	456,06
ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹) 72,5°C	380,95	434,26	456,0
ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹) 75°C	380,94	434,22	456,75
ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹) 77,5°C	380,94	434,54	456,69
ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹) 80°C	380,94	434,27	456,69

ΔG calculado de acordo com Eq. (2), ΔH com Eq. (3) e ΔS com Eq. (4).

A energia de ativação para a desnaturação (E_{ad}), que é a energia necessária para mudar a conformação da enzima, foi de 252,9 e 262,8 KJ mol⁻¹ para as linhagens M1 e M2 respectivamente, e de 234,3 KJ mol⁻¹ para a enzima selvagem. A maior energia de ativação indica maior resistência da estrutura da proteína, pois mais energia será necessária para que a molécula entre num estado de transição. Já para a enzima selvagem não existiu uma alta barreira energética, sendo esta mais facilmente desnaturada.

A glucoamilase sofre termoinativação irreversível em pH moderadamente ácido e temperaturas na faixa de 70 °C. O processo de termoinativação é ocasionado pela conformação incorreta da proteína (MUNCH e TRITSCH, 1990). Usualmente, as proteínas começam a se desdobrar devido ao aumento da deslocação intramolecular causado pelo aumento da temperatura (LIU et al., 2000). Portanto, a inativação térmica é ocasionada pelo rompimento das ligações não covalentes, seguido pelo concomitante desdobramento.

Sabe-se, portanto, que a estabilidade da estrutura de uma enzima é o resultado de um delicado equilíbrio entre diversos fatores, como o número de pontes de hidrogênio e dissulfeto, interações hidrofóbicas e o grau de enovelamento da molécula, bem como o número e o tipo de aminoácidos envolvidos em sua estrutura (BRUINS et al., 2001). Esses fatores intimamente relacionados é que proporcionam a estabilidade protéica. Qualquer mudança que afeta a integridade do estado ordenado (dobrado) da proteína poderá mudar o equilíbrio, tornando-a mais susceptível ao desdobramento e a termoinativação. Portanto, proteínas são frágeis e facilmente desorganizadas pelo calor e outros tratamentos mesmo que brandos, por isso, pequenas alterações moleculares podem gerar mudanças significativas em sua estabilidade.

5.6. Estudo dos parâmetros cinéticos da enzima

A Tabela 11 mostra o efeito da concentração dos substratos: amido solúvel e maltose na velocidade da reação enzimática, os valores foram obtidos graficamente através da curva de Michaelis-Menten, pelo uso do programa GraFit.

Tabela 11. Constantes cinéticas das glucoamilases

Enzima	Substrato			
	Amido solúvel		Maltose	
	$K_m(\text{mg/ml}^{-1})$	$V_{\max}(\text{U mg prot}^{-1})$	$K_m(\text{mg/ml}^{-1})$	$V_{\max}(\text{U mg prot}^{-1})$
M1	0,13	8,4	1,34	1,59
M2	0,21	4,7	1,07	0,72
WT	0,18	8,9	0,38	1,73

Os valores de K_m sugerem que as enzimas apresentaram maior afinidade pelo substrato amido solúvel. O valor de K_m na literatura é muito variável, alguns trabalhos apresentam valores muito superiores para reações sobre o amido. No trabalho de Michelin e colaboradores (2008) o K_m da glucoamilase de *Paecilomyces variotti* foi de $4,1 \text{ mg/ml}^{-1}$, no trabalho de Negi e Banerjee (2009) o K_m da glucoamilase de *Aspergillus awamori* foi de $9,8 \text{ mg/ml}^{-1}$. Outros trabalhos apresentam valores inferiores e próximos ao encontrado neste estudo, como o K_m da glucoamilase do fungo *Scytalidium thermophilum* que foi de $0,094 \text{ mg/ml}^{-1}$ (FERREIRA-NOZAWA et al., 2008), e o K_m da enzima do mutante de *Neurospora crassa* $0,17 \text{ mg/ml}^{-1}$ (SPINELLI et al., 1996). Para o substrato maltose os valores de K_m foram maiores, como observado na Tabela 11. O K_m da enzima do fungo *Scytalidium thermophilum* em maltose foi de $0,029 \text{ mg/ml}^{-1}$ (FERREIRA-NOZAWA et al., 2008). Pode-

se concluir com esses resultados que as glucoamilases demonstraram maior afinidade pelo substrato com maior grau de polimerização, como é relatado para maioria das glucoamilases, onde a eficiência aumenta com o aumento do peso molecular do substrato.

5.7 Estudo dos efeitos de íons sobre a atividade da enzima

O efeito de alguns íons, detergentes e outros agentes químicos nas concentrações finais de 1 e 10 mM foram investigados para a atividade das glucoamilases.

Como ilustrado na Tabela 12, a atividade glucoamilásica foi ativada para a maioria dos compostos na concentração de 1 mM, exceto para o íon FeSO_4 que inibiu mais de 50% da atividade. Na concentração de 10 mM os compostos que inibiram total ou quase totalmente a atividade da glucoamilase foram FeSO_4 e o β -mercaptoetanol, os demais compostos inibiram de forma menos significativa a atividade enzimática.

As enzimas M1 e selvagem apresentaram comportamento semelhante na presença dos íons, já que foram inibidas e ativadas praticamente pelos mesmos compostos na mesma proporção (Tabela 12), já o mutante M2 apresentou maior atividade na concentração de 1 mM, e na concentração de 10 mM apresentou-se mais resistente a inativação.

Tabela 12. Efeito de íons metálicos, detergentes e outros agentes químicos na atividade da glucoamilase. A atividade residual representa a porcentagem de atividade remanescente observada em relação ao valor de atividade obtido sem a adição dos agentes (controle)

<i>Agentes</i>	Atividade Residual (%)					
	M1		M2		WT	
	<i>1 mM</i>	<i>10 mM</i>	<i>1 mM</i>	<i>1 0mM</i>	<i>1 mM</i>	<i>10 mM</i>
ZnSO_4	91,2	85,5	109,1	92,6	90,0	79,9
FeSO_4	35,0	0	39,4	36,8	47,0	0
MnSO_4	93,9	96,5	114,1	97,0	94,9	79,0
MgCl_2	94,6	84,0	107,9	90,6	94,7	79,0
CuSO_4	89,9	74,9	114,7	86,7	98,0	74,6
CoCl_2	106,5	84,4	117,6	92,6	100,9	78,6
NaCl	106,8	87,3	107,0	93,8	101,2	81,3
CaCl_2	109,6	88,5	117,6	93,2	101,5	86,0
KCl	102,6	82,3	124,1	107,9	101,6	84,6
SDS	118,8	89,6	119,4	89,4	104,5	92,8
EDTA	120,7	91,7	112,0	96,2	107,2	87,9
β -mercaptoetanol	101,0	10,1	98,0	0	99,2	7,0
Hg_2Cl_2	110,6	71,3	129,0	83,8	109,5	76,5
AgNO_3	117,4	66,0	124,7	53,8	103,8	60,0
AlCl_3	88,2	55,9	102,6	67,9	82,0	61,0
Ag_2SO_4	94,1	63,0	125,0	68,2	107,9	71,2

O β -mercaptoetanol é um agente redutor quebra pontes dissulfeto. Em baixa concentração (1mM) ele não interferiu na atividade enzimática, mas na concentração de 10 mM ele inibiu fortemente a atividade, o que pode indicar que este composto rompeu pontes dissulfeto importantes para a manutenção da estrutura da proteína durante a catálise.

Em baixa concentração (1 mM) os íons Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} e Hg^{2+} aumentaram a atividade da glucoamilase de *Aspergillus awamori*: nakazawa MTCC6652 (NEGI e BANERJEE, 2009). Para a enzima do fungo *Paecilomyces variotti* a atividade foi melhorada na presença dos íons CoCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 , BaCl_2 na concentração de 1mM, os íons FeCl_3 , KCl e AlCl_3 inibiram a atividade enzimática (MICHELIN et al., 2008).

5.8. Determinação da natureza glicoprotéica

Através do método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) foi verificada a natureza glicoprotéica das glucoamilases purificadas. O conteúdo de carboidrato foi estimado em 75,2% para a M1, 51% para glucoamilase M2 e 57% para a selvagem.

Glucoamilases fungicas são caracterizadas como glicoproteínas com conteúdo de carboidratos bastante variável entre as diferentes espécies. A enzima do fungo *Paecilomyces variotii* apresentou 27,5% (MICHELIN et al., 2008), o conteúdo de carboidrato da glucoamilase intracelular do fungo *Scytalidium thermophilum* linhagem 15.8 foi 51% (FERREIRA-NOZAWA et al., 2008). A enzima do fungo *Thermomyces lanuginosus* teve média de 11,4% de carboidratos (LI et al., 1998). A glucoamilase recombinante de *Aspergillus awamori* expressa pelos organismos *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger* apresentou diferenças no conteúdo de carboidratos, sendo a glucoamilase expressa em *S. cerevisiae* a forma mais glicosilada (FIEROBE et al., 1997). As enzimas produzidas por levedura *S. cerevisiae* apresentam casos extremos de glicosilação com valores próximos a 80% da massa total da enzima (ADAM et al., 2004, LATORRE-GARCIA et al., 2008). Na estrutura da glucoamilase encontram-se diferentes resíduos de açúcares, sendo estes encontrados na forma de glicose, glicosamina, manose e galactose. Estas enzimas têm regiões ricas em treonina e serina que são ideais para O-glicosilações (SAHA e ZEIKUS, 1989; JAMES e LEE, 1997). O alto grau de glicosilação favorece a estabilização da enzima, e ainda protege contra proteólise.

4.9. Sequenciamento dos genes das glucoamilases

O DNA foi extraído das leveduras pela metodologia proposta por Hoffman e Winston (1987) de um meio crescido por 24 h (Fig. 24) Uma alíquota de 5 μ L deste material foi utilizada para transformação de 40 μ L de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* DH5 α conforme descrito em Material e Método. 5

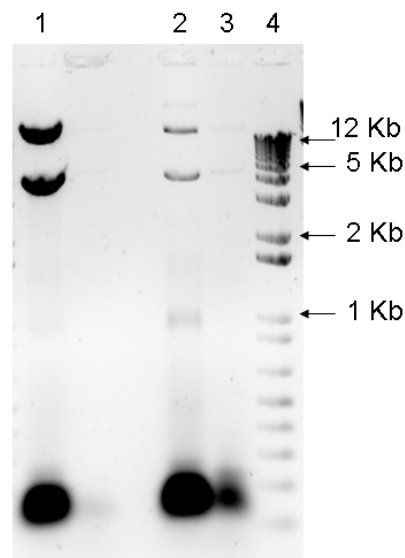


Figura 24: Extração de DNA das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* em gel de agarose 1% (1: linhagem M1; 2 linhagem M2; 3: linhagem M2 crescido por 48 h 4: marcador molecular 1Kb Plus DNA Gibco BRL[®]).

Alguns clones foram selecionados de cada placa, inoculados em meio líquido LB + ampicilina, e mantidos overnight a 37 °C com agitação de 200 rpm. A extração dos plasmídios de *E. coli* foi realizada de acordo com o protocolo do kit Gene JetTM Plasmid Miniprep (Fermentas).

Para confirmar a presença do gene de glucoamilase no plasmídio, foi realizado um ensaio de restrição com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I, para liberação do mesmo. Outra restrição também foi realizada somente com a *Bam*HI, linearizando o vetor. Na figura 25 é visualizado o resultado, confirmando a presença do fragmento correspondente ao gene da glucoamilase.

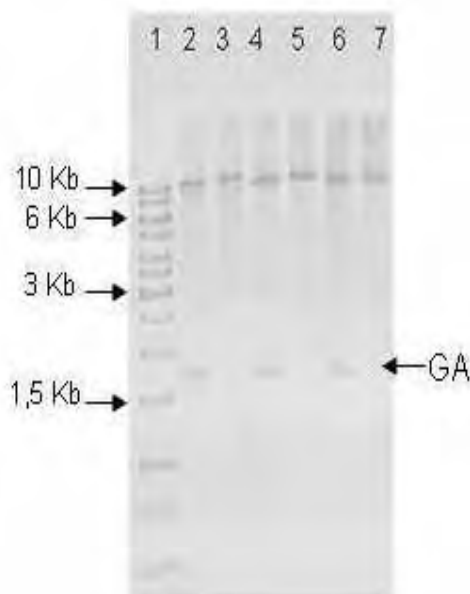


Figura 25. Restrição do produto da extração dos clones de *Escherichia coli* com a liberação do inserto (1: Marcador fermentas 1 Kb; 2: amostra WT ensaio de restrição com *Bam*HI e *Xho*I; 3: linhagem WT ensaio de restrição com *Bam*HI; 4: linhagem M1 ensaio de restrição com *Bam*HI e *Xho*I; 5: linhagem M1 ensaio de restrição com *Bam*HI; 6: linhagem M2 ensaio de restrição com *Bam*HI e *Xho*I; 7: linhagem M2 ensaio de restrição com *Bam*HI).

O sequenciamento foi realizado pela Macrogen (Coréia) utilizando os seguintes primers: GA 528, GA 529, NF1, NF2, NF3, NF4, NF5, NF6, NF7 (Tabela 3). As sequências foram analisadas no programa Bioedit, onde os fragmentos obtidos de cada primer sequenciado foram unidos, dando origem a sequência completa do gene para a glucoamilase.

As sequências completas após tradução teórica apresentaram 640 resíduos de aminoácidos incluindo a metionina inicial (ATG - códon iniciador), entretanto, para glucoamilase os primeiros 24 resíduos de aminoácidos (Fig.26) que compreendem o início da tradução, segundo a literatura não fazem parte da proteína madura, esta região é chamada de pré-proteína. Se considerarmos somente a proteína madura a sequência apresenta 616 resíduos de aminoácidos (Fig.27). As sequências foram comparadas com outras sequências de glucoamilases usando o banco de dados do *National Center of Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), para localização de domínios conservados.

WT → MSFRSLLALSGLVCTGLANVISKR
M1 → MSFRSLLALSGLVCTGLANVISKR
M2 → MSFRSLLALSGLVCTGLANVISKR

Figura 26. Resíduos iniciais de aminoácidos (24) que compõem as glucoamilases (pré-proteína).

WT → ATLD SWLSNEATVARTAILNNIGADGAWVSSADSGIVVASPSTDNPDYFYTWTRDSGLVLF
M1 → ATLD SWLSNEATVARTAILNNIGADGAWVSSADSGIVVASPSTDNPDYFYTWTRDSGLVLF
M2 → ATLD SWLSNEATVARTAILNNIGADGAWVSSADSGIVVASPSTDNPDYFYTWTRDSGLVLF

WT → KTLVDLFRNGDTSLLSTIENYISAQAIVQGISNPSGDLSSGAGLGEPKFNVD E TAYTGSWG
M1 → KTLVDLFRNGDTSLLSTIENYISAQAIVQGISNPSGDLSSGAGLGEPKFNVD E TAYTGSWG
M2 → KTLVDLFRNGDTSLLSTIENYISAQAIVQGISNPSGDLSSGAGLGEPKFNVD E TAYTGSWG

WT → GRPQRDGPALRATAMIGFGQWLLDNGYTSTATDIVWPLVRNDLSYVAQYWNQ TGYDLWEEVN
M1 → GRPQRDGPALRATAMIGFGQWLLDNGYTSTATDIVWPLVRNDLSYVAQYWNQ TGYDLWEEVN
M2 → GRPQRDGPALRATAMIGFGQWLLDNGYTSTATDIVWPLVRNDLSYVAQYWNQ TGYDLWEEVN

WT → VNGSSFFTTIAVQHRALVEGSAFATAVGSSCSWCSQAPEIICYLQSFWTG SFILANFDSSR
M1 → VNGSSFFTTIAVQHRALVEGSAFATAVGSSCSWCSQAPEIICYLQSFWTG SFILANFDSSR
M2 → VNGSSFFTTIAVQHRALVEGSAFATAVGSSCSWCSQAPEIICYLQSFWTG SFILANFDSSR

WT → RSGKDANTLLGSIHTFDPEAACDDSTFQECSPRALANHK EVVDSFRSIYTLNDGLSDSEAV
M1 → RSGKDANTLLGSIHTFDPEAACDDSTFQECSPRALANHK EVVDSFRSIYTLNDGLSDSEAV
M2 → RSGKDANTLLGSIHTFDPEAACDDSTFQECSPRALANHK EVVDSFRSIYTLNDGLSDSEAV

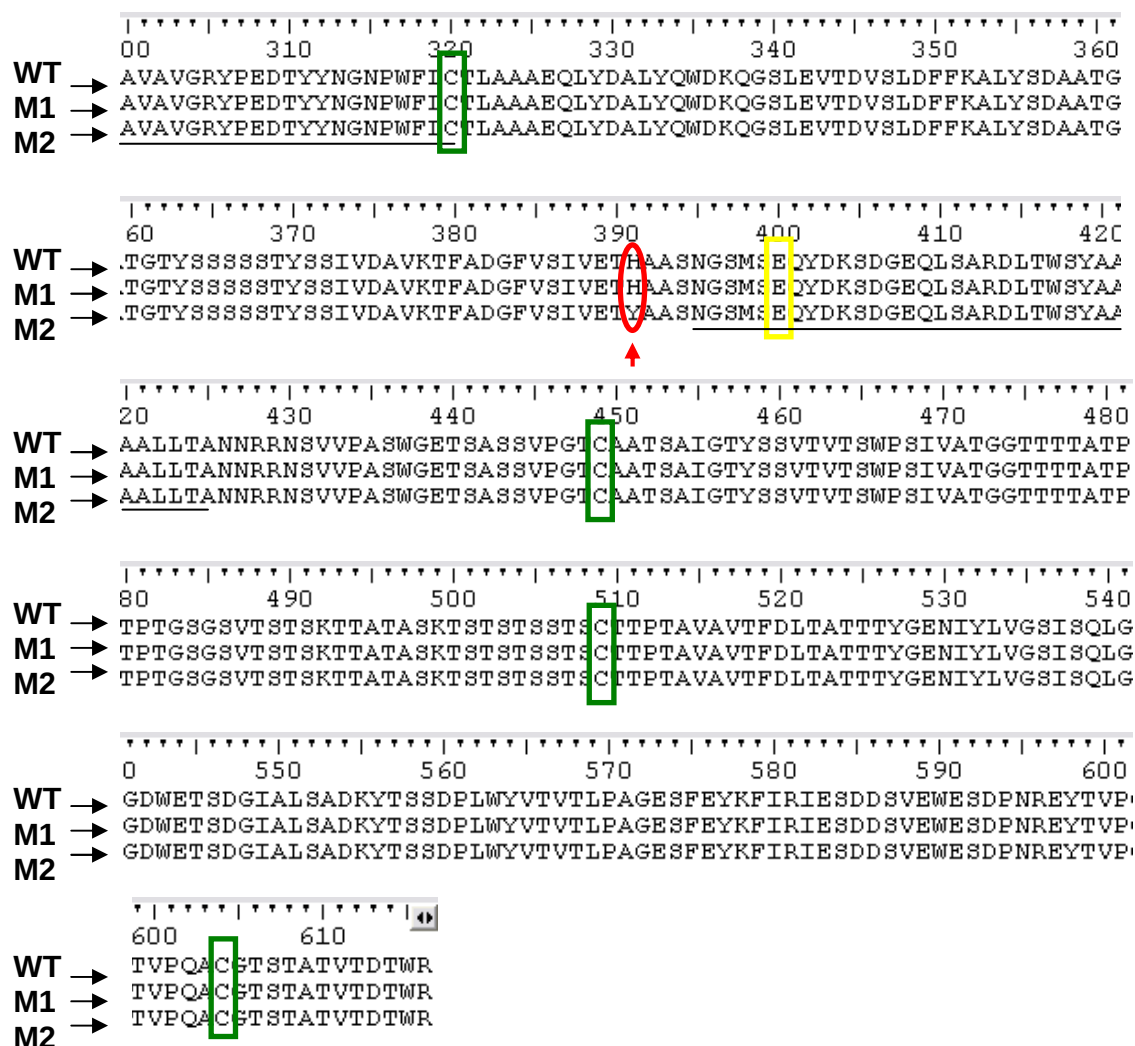


Figura 27. Sequenciamento do gene da glucoamilase de *Aspergillus awamori*. As regiões alteradas estão circuladas em vermelho; os resíduos catalíticos em amarelo; os resíduos de cisteínas envolvidos nas pontes de sulfeto estão em verdes. As regiões conservadas estão sublinhadas. O domínio catalítico corresponde aos resíduos de 1 a 440, o linker aos resíduos de 441 a 508 e o domínio de ligação ao substrato aos resíduos de 509 a 616.

A sequência de aminoácidos da glucoamilase selvagem foi utilizada como padrão para a comparação das alterações em relação às duas outras glucoamilases estudadas. A linhagem M1 apesar de ter passado pelo processo de mutação aleatória não apresentou alterações em relação à enzima selvagem. Para a linhagem M2 foram observadas 4 alterações de nucleotídeos, sendo que uma alteração resultou em mutação silenciosa, onde apenas uma das bases do códon foi alterada, sem alteração do aminoácido resultante ($\text{GGC} \rightarrow \text{GGT}$), e três mutações levaram a substituição de aminoácidos (Fig. 27). Todas as alterações foram identificadas no domínio catalítico da enzima, sendo que as mutações que resultaram em troca de aminoácidos ocorreram nas seguintes posições: Ser30→Pro, Thr290→Ala e His391→Tyr. Alguns trabalhos envolvendo mutações de glucoamilase relatam resíduos Thr→Ala e His→Tyr substituídos em posição diferente no gene, e o conjunto destas mutações contribuiu para o aumento da termoestabilidade (WANG et al. 2006; McDANIEL et al. 2008). A substituição de resíduo His391→Tyr, é relatada na glucoamilase mutante múltipla CR-21 que passou por vários ciclos sucessivos de mutação para melhorar a termoestabilidade (McDANIEL et al., 2008). A substituição Ser 30 por Pro é relatada no trabalho de Li e colaboradores (1998), essa alteração também melhorou significativamente a termoestabilidade da glucoamilase de *A. awamori*.

Frequentemente o aumento do número de resíduo de Pro está relacionado com o aumento da termoestabilidade (McDANIEL et al. 2008; WANG et al. 2006; SUZUKI et al. 1991; LIU et al. 2000; LI et al. 1997 e ALLEN et al. 1998). O aumento do número de resíduos de Pro ajuda na estabilidade da enzima devido à estrutura deste aminoácido que tem poucas possíveis configurações, reduzindo a entropia do desdobramento e desta forma estabilizando a proteína (GOMES et al., 2007).

Várias estratégias têm sido usadas para melhorar a termoestabilidade da glucoamilase através de mutações sítio dirigidas, ou aleatórias, tais como a introdução de pontes de sulfeto (LI et al. 1998; LIU e WANG, 2003; McDANIEL et al. 2008) e redução da flexibilidade da estrutura da proteína pela introdução de resíduos de Pro (McDANIEL et al. 2008; WANG et al. 2006; LI et al. 1997).

O efeito individual de cada resíduo substituído na estabilidade da glucoamilase é difícil de ser determinado sem o conhecimento profundo das estruturas de dobramento da proteína, entretanto é comprovado que a inclusão de pelo menos um resíduo de Pro na estrutura melhora a termoestabilidade.

As massas moleculares das enzimas e a relação dos aminoácidos encontrados nas glucoamilases estão representadas na Tabela 12.

Tabela 12. Relação dos aminoácidos encontrados nas glucoamilases

Proteína WT				Proteína: M1				Proteína M2			
Tamanho = 640 aminoácidos				Tamanho = 640 aminoácidos				Tamanho = 640 aminoácidos			
PM = 68304,72 Daltons				PM = 68304,72 Daltons				PM = 68310,76 Daltons			
Aminoácido		Número	Mol%	Aminoácido		Número	Mol%	Aminoácido		Número	Mol%
Ala	A	65	10,16	Ala	A	65	10,16	Ala	A	66	10,31
Cys	C	10	1,56	Cys	C	10	1,56	Cys	C	10	1,56
Asp	D	44	6,88	Asp	D	44	6,88	Asp	D	44	6,88
Glu	E	26	4,06	Glu	E	26	4,06	Glu	E	26	4,06
Phe	F	22	3,44	Phe	F	22	3,44	Phe	F	22	3,44
Gly	G	47	7,34	Gly	G	47	7,34	Gly	G	47	7,34
His	H	4	0,63	His	H	4	0,63	His	H	3	0,47
Ile	I	24	3,75	Ile	I	24	3,75	Ile	I	24	3,75
Lys	K	13	2,03	Lys	K	13	2,03	Lys	K	13	2,03
Leu	L	48	7,50	Leu	L	48	7,50	Leu	L	48	7,50
Met	M	3	0,47	Met	M	3	0,47	Met	M	3	0,47
Asn	N	25	3,91	Asn	N	25	3,91	Asn	N	25	3,91
Pro	P	22	3,44	Pro	P	22	3,44	Pro	P	23	3,59
Gln	Q	17	2,66	Gln	Q	17	2,66	Gln	Q	17	2,66
Arg	R	20	3,13	Arg	R	20	3,13	Arg	R	20	3,13
Ser	S	88	13,75	Ser	S	88	13,75	Ser	S	87	13,59
Thr	T	74	11,56	Thr	T	74	11,56	Thr	T	73	11,41
Val	V	42	6,56	Val	V	42	6,56	Val	V	42	6,56
Trp	W	19	2,97	Trp	W	19	2,97	Trp	W	19	2,97
Tyr	Y	27	4,22	Tyr	Y	27	4,22	Tyr	Y	28	4,37

A análise das sequências de aminoácidos pelo National Center of Biotechnology Information (ncbi) utilizando a ferramenta blast, mostrou uma alta homologia com outras sequências. A enzima selvagem apresentou 100% de identidade para as glucoamilases de *Aspergillus awamori* BAD06004.1, *Aspergillus niger* AAT67041.1, *Aspergillus niger* AAP04499.1, *Aspergillus ficuum* AAT58037.1, e o precursor da glucoamilase de *A. awamori* CAA25304.1, a enzima mutante M2 apresentou 96% de identidade para as mesmas proteínas.

6. CONCLUSÃO GERAL

Em relação à produção das enzimas podemos concluir que as mutações não interferiram na secreção e na atividade enzimática da glucoamilase, uma vez que os mutantes mantiveram perfis de produção semelhante ao da enzima selvagem.

As enzimas foram sintetizadas em todos os meios analisados, entretanto, a produção foi estimulada diferentemente de acordo com a fonte de amido. Entre os amidos a produção foi mais significativa no final da fermentação, destacando o amido solúvel, de mandioca e batata como boas fontes para a produção das enzimas, já o amido de milho mostrou ser um substrato menos propício. Nos processos fermentativos usando os farelos, o farelo de mandioca se destacou com a maior produção, sendo um substrato promissor por ser um subproduto agrícola de baixo custo e, portanto, uma alternativa para a produção da enzima, podendo substituir fontes de carbono comerciais e meios complexos.

Para a purificação das glucoamilases foi adotado o procedimento de cromatografia de afinidade, o qual foi eficiente na purificação das enzimas. As condições ideais para a obtenção da coluna de afinidade foi 600 $\mu\text{M/mL}$ de acarbose em resina SepharoseTM 6B epóxi ativada com volume final de 2,0 mL. Altas concentrações do ligante resultaram em condição insatisfatória, nas quais possivelmente, a interação da glucoamilase com o ligante foi impedida, ou ocorreu de forma inespecífica. As glucoamilases foram purificadas em uma única etapa cromatográfica. A massa molecular foi estimada em 100 kDa para todas as glucoamilases estudadas.

Os efeitos de alguns íons metálicos, detergentes e outros agentes químicos na atividade das glucoamilases foram avaliados, sendo as enzimas totalmente inibidas por FeSO_4 e β -mercaptoetanol. Em relação à afinidade pelos substratos, os valores de K_m indicaram a preferência das enzimas pelo substrato amido solúvel que é um substrato de maior peso molecular em relação à maltose.

A alta termoestabilidade da glucoamilase é de fundamental importância na indústria de hidrólise do amido, para agilizar o processo e reduzir custos operacionais. Os dados de caracterização enzimática mostraram melhor termoestabilidade das enzimas M1 e M2, com elevação na temperatura ótima de atividade de 5 °C. Esse resultado foi confirmado com a cinética de termoinativação irreversível, sendo a glucoamilase mutante M2 a mais termoestável. Esta apresentou um ΔG maior que a enzima selvagem utilizada como controle, altos valores de ΔG indicam maior termoresistência da molécula. O sequenciamento mostrou três alterações de aminoácidos no domínio catalítico da glucoamilase M2: Ser30→Pro, Thr290→Ala e His390→Tyr, estas substituições melhoraram significativamente a

termoestabilidade. Como observado na literatura, a introdução de resíduos de Pro melhora a estabilidade da enzima. Todos os trabalhos em que a Pro foi introduzida relatam um aumento da termoestabilidade, devido a uma maior rigidez na estrutura. A contribuição das outras regiões alteradas também pode ter sido importante para alcançar esta característica desejada.

Em relação à enzima M1, como não foram identificadas alterações em sua sequência de aminoácidos, embora esta tenha passado pelo processo de mutação, a termoestabilidade desta, pode ser explicada pelo alto grau de glicosilação da enzima, que foi praticamente o dobro da outras enzimas estudadas.

Portanto, a mutação aleatória realizada no gene da glucoamilase de *A. awamori* apresentou bons resultados, já que em um único ciclo de mutação, uma das proteínas apresentou três alterações de aminoácido, com aumento expressivo da termoestabilidade, o que pode viabilizar a aplicação da enzima na indústria, possibilitando que o processo de sacarificação ocorra em temperaturas mais elevadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, A.C.; LATORRE-GARCÍA, L.; POLAINA, J. Structural analysis of glucoamylase encoded by the *STA1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* (var. *diastaticus*). **Yeast**, v. 21, p. 379-388, 2004.

ALESHIN, A.; GOLUBEV, A.; FIRSOV, L. M.; HONZATKO, R. B. Crystal structure of glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. X100 to 2,2-Å resolution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 19291-19298, 1992.

ALESHIN, A.; FIRSOV, L. M.; HONZATKO, R. B. Refined crystal structures of glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. X100. **Journal of Molecular Biology**, v. 238, p. 575-591, 1994.

ALLEN, M. J.; COUTINHO, P. M.; FORD, C. F. Stabilization of *Aspergillus awamori* glucoamylase by praline substitution and combining stabilizing mutations. **Protein Engineering**, v. 11, p. 783-788, 1998.

ALTINTAS, M.M.; ÜLGEN, K. Ö.; KIRDAR, B.; ÖNSAN, I.; OLIVER, S.G. Optimal substrate feeding policy for fed-batch cultures of *S. cerevisiae* expressing bifunctional fusion protein displaying amylolytic activities. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 262-269, 2003.

ALVES-PRADO, H. F. **Purificação e caracterização de Ciclodextrinas Glicosiltransferase (CGTase) produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 e *Bacillus clausii* E16: caracterização das ciclodextrinas, clonagem e sequenciamento do gene da CGTase de *Bacillus clausii* E16.** Tese de doutorado - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 149 f, 2005.

ANTO, H.; TRIVEDI, U. B.; PATEL, K. C. Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. **Bioresource Technology**, v.97, p. 1161-1166, 2006.

BAKIR, U.; COUTINHO, P. M.; SULLIVAN, P. A.; FORD, C.; REILLY, P. J. Cassete mutagenesis of *Aspergillus awamori* glucoamylase near general acid residue to probe its catalytic and pH properties. **Protein Engineering**, v. 6, p. 939-946, 1993.

BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. Methods of enzymatic analysis. In: BERGMEYER, H. U. (Ed) **Methods of enzymatic analysis**. New York: Verlag – Chimie-Academic Press, v. 3, p. 1205-1215, 1974.

BERTOLDO, C.; ANTRANIKIAN, G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p. 151-160, 2002.

BHATTI, H. N.; RASHID, M. H.; ASGHAR, M.; NAWAZ, R.; KHALID, A. M.; PERVEEN, R. Chemical modification results in hyperactivation and thermostabilization of *Fusarium solani* glucoamylases. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 177-185, 2007.

BLUM, H.; BIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**, 3 ed. São Paulo: Varela, 2001.

BOYCE, C. O. L. **Novo's handbook of practical biotechnology**. Novo Industry AS, Denmark: Bagsvaerd, 1986.

BRUINS, M. E.; JANSSEN, A. E. M.; BOOM, R. M. Thermozyms and their applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 90, p. 155-181, 2001.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in food: mode of action and microbial resistance mechanism. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 1999.

BRUMM, P. J. Enzymatic production of dextrose. **Cereal Food World**, v. 40, p. 804-807, 1998.

BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: Structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, p. 85-112, 1998.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**, vol. 1, São Paulo: Thomson Learning, 2007.

CARREA, G.; COLOMBO, G. Coupling high enzyme activity and stability: a Challenging target. **Trends in Biotechnology**, v. 18, p. 401-402, 2000.

CHANG, D.M.; YU, L.; LIM, M.H.; KO, H.M.; IM, S.Y.; LEE, H.B.; BAI, S. Efficient one-step starch utilization by industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the glucoamylase and α -amylase genes from *Debaryomyces occidentalis*. **Biotechnol Lett**, v. 29, p. 1203-1208, 2007.

CHEN, H.M.; BAKIR, U.; REILLY, P.J.; FORD, C. Increased thermostability of Asn 182→Ala mutant *Aspergillus awamori* glucoamylase. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 43, p. 101-105, 1994.

CHRISTENSEN, T.; FRANDSEN, T. P.; KAARSHOLM, N. C.; SVENSSON, B.; SIGURSKJOLD, B. W. Physicochemical characterization of the two active site mutants Trp52 →Phe and Asp→Val of glucoamylase from *Aspergillus niger*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1601, p. 163-171, 2002.

CIACCO, C. F.; CRUZ, R. **Fabricação de amido e sua utilização**, São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, v. 7, 1981.

COBOS, A.; ESTRADA, P. Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase from *Trichoderma reesei* QM 9414. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 810-818, 2003.

COLE, G. E., P. C. MCCABE, D. INLOW, D. H. GELFAND, A. BEM-BASSAT, & M. A. INNIS. Stable expression of *Aspergillus awamori* glucoamilase in distiller's yeast. **Bio/Technology**, v. 6, p. 417-421, 1988.

CONDE, R.; CUEVA, R.; PABLO, G.; POLAINA, J.; LARRIBA, G. A search for hiperglicosylation signals in yeast proteins. **Journal Biol. Chem.**, v. 279, p.43789-43798, 2004.

COUTINHO, P. M.; REILLY, P. J. Glucoamylase structural, functional and evolutionary relationships. **Protein Engineering**, v. 29, p. 334-347, 1997.

CRABB, W. D.; MITCHINSON, C. Enzyme involved in the processing of starch to sugars **Trends in Biotechnology**, v. 2, p. 252-256, 1997.

CUI, R.; OATES, C. G. The effect of amylose - lipid complex formation on enzyme susceptibility of sago starch. **Food Chemistry**, v. 65, p. 417-425, 1999.

Da SILVA, R. **Mutagenesis of *Aspergillus awamori* glucoamylase to improve thermostability: Deletion of helix 11**. Tese de pós doutoramento – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 1999.

DELCOUR, J. A., HOSENEY, R. C. **Principles of Cereal Science and Technology**, third ed. Association of Cereal Chemists, Inc, St. Paul, MN, USA, 2009.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 297–306, 2009.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substance. **Analytic Chemic**, v. 28, p. 350-356, 1956.

FERREIRA-NOZAWA, M.S.; REZENDE, J.L.; GUIMARÃES, L.H.S.; TERENCEI, H.F.; JORGE, J.A.; POLIZELI, M.L.T.M. Mycelial glucoamylases produced by the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* strains 15.1 and 15.8: purification and biochemical characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 344-352, 2008.

FIEROBE, H. P.; STOFFER, B. B.; FRANDSEN, T. P.; SVENSSON, B. Mutational modulation of substrate bond-type specificity and thermostability of glucoamylase from *Aspergillus awamori* by replacement with short homologue active site sequences and thiol/disulfide engineering. **Biochemistry**, v. 35, p. 8696-8704, 1996.

FIEROBE, H. P.; MIRGORODSKAYA, E.; FRANDSEN, T. P.; ROESPSTORFF, P.; SVENSSON, B. Overexpression and characterization of *Aspergillus awamori* wild-type and mutant glucoamylase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: Comparison with wild-type recombinant glucoamylase produced using *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger* as hosts. **Protein Expression and Purification**, v. 9, p. 159-170, 1997.

FLORY, N.; GORMAN, M.; COUTINHO, P. M.; FORD, C.; REILLY, P. J. Thermosensitive mutants of *Aspergillus awamori* glucoamylase by random mutagenesis: inactivation kinetics and structural interpretation. **Protein Engineering**, v. 7, p. 1005-1012, 1994.

FORD, C. Improving operating performance of glucoamylase by mutagenesis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 353-357, 1999.

FRANDSEN, T. P.; DUPONT, C.; LEHMBERK, J.; STOFFER, B.; SIERKS, M. R.; HONZATKO, R. B.; SVENSSON, B. Site-directed mutagenesis of the catalytic base glutamic acid 400 in glucoamylase from *Aspergillus niger* and of tyrosine 48 and glutamine 401, both hydrogen-bonded to the γ -carboxylate group of glutamic acid 400. **Biochemistry**, v. 33, p. 13808-13816, 1994.

FRANDSEN, T. P.; CHRISTENSEN, T.; STOFFER, B.; LEHMBECK, C. DUPONT, C.; HONZATKO, R. B.; SVENSSON, B. Mutational analysis of the roles in catalysis and substrate recognition of arginines 54 and 305, aspartic acid 309, and tryptophan 317 located at

subsites 1 and 2 glucoamylase from *Aspergillus niger*. **Biochemistry**, v. 34, p. 10162-10169, 1995.

FREITAS, R. A.; GORIN, P. A. J.; NEVES, J.; SIERAKOWSKI, M. R. A rheological description of mixtures of a galactoxiloglucan with high amylose and waxy corn starches. **Carbohydrate Polymers**, v.51, p.25-32, 2003.

GAL-GÖEFER, L.; JACK, M. F.; SORIMACHI, A. J.; WILLIAMSON, K.; WILLIAMSON, G.; ARCHER, D. B. Expression *Aspergillus niger* of the starch binding domain of glucoamylase comparison with the proteolitically produced starch binding domain. **European Journal of Biochemistry**, v.233, p.561-567, 1995.

GHOSH, A.; CHATTERJEE, B. DAS, A. Purification and characterization of glucoamylase of *Aspergillus terreus* NA-170 mutant. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, p. 162-169, 1991.

GOESAERT, H.; SLADE, L.; LEVINE, H.; DELCOUR, J.A. Amylases and bread firming – an integrated view. **Journal of Cereal Science**, v. 50, p. 345-352, 2009.

GOMES, E. GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; da SILVA, R. . Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, (1), p. 136-145, 2007.

GONZÁLEZ, C.F.; FARIÑA, J.I.; FIGUEROA, L.I.C. Optimized amylolytic enzymes production in *Saccharomycopsis fibuligera* DSM-70554. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42 (3), p. 272-277, 2008.

GOTO, M.; SEMINARU, T.; FURUKAWA, K.; HAYASHIDA, S. Analysis of the raw starch-binding domain by mutation of a glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3926-3930, 1994.

GUERRA, O. G.; RUBIO, I. G.S.; FILHO, C. G. S.; BERTONI, R. A.; GOVEA, R. C. S.; VICENTE, E. J. A novel system of genetic transformation allows multiple integrations of a desired gene in *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 437–445, 2006.

GUPTA, S. D.; MAHESHWARI, R. Is organic-acid required for nutrition of thermophilic?. **Archives of Microbiology**, v. 141, p. 164-169, 1985.

HALM, M.; HORNBAEK, T.; ARNEBORG, N.; SEFA-DEDEH, S.; JESPERSEN, L. Lactic acid tolerance determined by measurement of intracellular pH of single cells of *Candida krusei* and *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fermented maize dough. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 97-103, 2004.

HATA, Y.; ISHIDA, H.; KOJIMA, Y.; ICHIKAWA, E.; KAWATO, A.; SUGINAMI, K.; IMAYASU, S. Comparison of two Glucoamylases produced by *Aspergillus oryzae* in solid-state culture (Koji) and submerged culture. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, p. 532-537, 1997.

HARRIS, E. M. S.; ALESHIN, A. E.; FIRSOV, L. M.; HONSATKO, R. B. Refined structure for the complex of 1-deoxynojirimycin with glucoamylase from *Aspergillus awamori* var x100 to 2.4 Å resolution. **Biochemistry**, v. 32, p. 1618-1626, 1993.

HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HENRISSAT, B. a classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemistry Journal**. v. 280, p. 309-316, 1991.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Journal Biochemical**, v. 293, p. 781-788, 1993.

HIROMI, K.; HAMAUZU, Z. I.; TAKAHASKI, S.; ONO, S. Kinetic studies on gluc-amylase II. Competition between two types of substrate having α -1,4 and α -1,6 glucosidic linkage. **Journal of Biochemistry**, v. 59, p. 411-418, 1966.

HOFFMAM, C. S.; WINSTON, F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. **Gene**, v. 57, p. 267–272, 1987.

IYER, P.A.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization – Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1019-1032, 2008.

KEARSLEY, M. N.; DZIEDZIC, S. Z. **Starch Hydrolysis Products and their Derivates**, 1 ed. London: Blackie Academic & Professional, 1995.

KILONZO, P. M.; MARGARITIS, A.; BERGOUGNOU, M. A. Effects of medium composition on glucoamylase production during batch fermentation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114 (2), p. 83–95, 2008.

KILONZO, P.; MARGARITIS, A.; BERGOUGNOU, M. Airlift-driven fibrous-bed bioreactor for continuous production of glucoamylase using immobilized recombinant yeast cells. **Journal of Biotechnology**, v. 143, p. 60-68, 2009.

KNIGHT, I. M.; MAZZIEIRO, G. Aplicação das enzimas amilolítica em panificação. **Higiene Alimentar.**, v. 14, p. 35-46, 2000.

KNOX, A. M.; DU PREEZ, J. C.; KILIAN, S. G. Starch fermentation characteristic of *Saccharomyces cerevisiae* strains transformed with amylase genes from *Lipomyces kononenkoae* and *Saccharomycopsis fibuligera*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 453-460, 2004.

JAFARI-AGHDAM, J.; KHAJEK, K.; RANJBAR, B.; NEMAT-GORGANI, M. Deglycosylation of glucoamylase from *Aspergillus niger*: Effects on structure, activity and stability. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1750, p. 61-68, 2005.

JAMES, J. A.; LEE, B. H. Glucoamylases: microbial sources, industrial applications and molecular biology – A review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 21, p. 1-52, 1997.

JEON, J-S.; RYOO, N.; HAHN, T-R.; WALIA, H.; NAKAMURA, Y. Starch biosynthesis in cereal endosperm. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 383-392, 2010.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T₄. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LATORRE-GARCÍA, L.; ADAM, A.C.; POLAINA, J. Overexpression of the glucoamylase-encoding *STA1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* in laboratory and industrial strains of *Saccharomyces*. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v.24, 2957-2963, 2008.

LEE, J-W.; KANG, D-O.; KIM, B-Y.; OH, W-K.; MHEEN, T-I.; PYUN, Y-R.; AHN, J-S. Mutagenesis of the glucoamylase signal peptide of *Saccharomyces diastaticus* and functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, 193:7-11, 2000.

LEMOES, C. M. Estudo da aplicação de PCR mutagênico e mutação sítio dirigida para melhorar a termoestabilidade da glucoamilase de *Aspergillus awamori* expressada em

Saccharomyces cerevisiae. Dissertação de mestrado - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 74 f, 2003.

LEMOS, C. M.; FUCHS, E.; GOMES, E.; SILVA, R. Glucoamilase: Estrutura e Termoestabilização. **Revista de Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 31, p. 86-94, 2003.

LI, Y.; COUTINHO, P. M.; FORD, C. Effect of introducing proline residues on the stability of *Aspergillus awamori* glucoamylase. **Protein Engineering**, v. 10, p. 1199-1204, 1997.

LI, Y.; COUTINHO, P. M.; FORD, C. Effect on thermostability and catalytic activity of introducing disulfide bonds into *Aspergillus awamori* glucoamylase. **Protein Engineering**, v. 11, p. 661-667, 1998.

LIDEBOOM, N.; CHANG, R.; TYLER, R. Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis of small granule starches: A review. **Starch/Starke**, v.56, p. 89-99, 2004.

LIN, S-C.; LIN, I-P.; CHOU, W-I.; HSIEH, C-A.; LIU, S-H.; HUANG, R-Y.; SHEU, C-C.; CHANG, M. D-T. CBM21 starch-binding domain: A new purification tag for recombinant protein engineering. **Protein Expression and Purification**, v. 65, p. 261-286, 2009.

LINEBACK, D. R. The starch granule: organization and properties. **Bakers Digest**, v. 58, n. 2, p. 16-21, 1984.

LIU, H-L.; DOLEYRES, Y.; COUTINHO, P. M.; FORD, C.; REILLY, P. J. Replacement and deletion mutations in the catalytic domain and belt region of *Aspergillus awamori* glucoamylase to enhance thermostability. **Protein Engineering**, v. 13, p. 655-659, 2000.

LIU, H-L.; WANG, W-C. Protein engineering to improve the thermostability of glucoamylase from *Aspergillus awamori* based on molecular dynamics simulations. **Protein Engineering**, v. 16, p. 19-25, 2003.

LIU, H.; XIE, F.; YU, L.; CHEN, L.; LI, L. Thermal processing of starch-based polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 34, p. 1348-1368, 2009.

LUHE, A. L.; TING, E. N. Y.; TAN, L.; WU, J.; ZHAO, H. Engineering of small sized DNAs by error-prone multiply-primed rolling circle amplification for introduction of random point mutations. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2010 doi:10.1016/j.molcatb.2010.07.011.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. 10 ed., New York: Prentice Hall, 2003.

MALDONADO, H. G.; LÓPEZ, O. P. Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 35, p.373-403, 1995.

MANJUNATH, P.; SHENOY, B. C.; RACHAVENDRA-RAO, M. R. Fungal glucoamylase Review. **Journal Application Biochemistry**, v. 5, p. 235-260, 1983.

MARLIDA, Y. SAARI, N.; HASSAN, Z.; RADU, S.; BAKAR, J. Purification and characterization of sago starch-degrading glucoamylase from *Acremonium* sp endophytic fungus, **Food Chemistry**, v. 71, p. 221-227, 2000.

McDANIEL, A., FUCHS, E., LIU, Y., FORD, C. Directed evolution of *Aspergillus niger* glucoamylase to increase thermostability. **Microbial Technology**, 1 (6), 523-531, 2008.

MERTENS, J.A.; SKORY, C.D. Isolation and characterization of a second glucoamylase gene without a starch binding domain from *Rhizopus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40 p. 874-880, 2006.

MICHELIN, M.; RULLER, R.; WARD, R. J.; MORAES, L.A.B.; JORGE, J.A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M.L.T.M. Purification and biochemical characterization of a thermostable extracellular glucoamylase produced by the thermo tolerant fungus *Paecilomyces variotii*. **Journal Industrial Microbiol Biotechnology**, v.35, p.17-25, 2008.

MONDAL, K.; SHARMA, A.; GUPTA, M.N. Macroaffinity ligand-facilitated three-phase partitioning for purification of glucoamylase and pullulanase using alginate. **Protein Expression and Purification**, v. 28, p. 190-195, 2003.

MORAIS, L. M. P. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Suma, 2004. Cap. 3, p. 223-242.

MUNCH, O.; TRITSCH, D. Irreversible thermoinactivation of GA from *Aspergillus niger* and thermostabilization by chemical modification of carboxyl groups. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1041, p. 111-116, 1990.

NEGI, S.; BANERJEE, R. Characterization of glucoamylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. **Food Research International**, v. 42, p. 443-448, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NEUSTROEV, K. N.; VALTER, S. N.; TIMCHENKO, N.V.; FIRSOV, L. M.; GOLUBEV, A. M.; KHOKHLOV, S. E. Adsorption of glucoamylase from *Aspergillus awamori* x100/D27 on cell walls. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 30, p. 115-120, 1993.

NIELSEN, B. R.; LEHMBECK, J.; FRANDSEN, T. Cloning, heterologous expression, and enzymatic characterization of a thermostable glucoamylase from *Talaromyces emersonii*. **Protein Expression & Purification**, v. 26, p. 1-8, 2002.

NIGAM, P.; SINGH, D. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 770-778, 1995.

NGUYEN, Q. D.; REZESSY-SZABÓ, J. M.; CLAEYSSENS, M.; STALS, I.; HOSCHKE, Á. Purification and characterization of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 345-352, 2002.

NOROUZIAN, D.; AKBARZADEH, A.; SCHARER, J. M.; YOUNG, M. M. Fungal glucoamylases. **Research Review Paper**, v. 24, p. 80-85, 2006.

OUYANG, A.; BENNEU, P.; ZHANG, A.; YANG, S.T. Affinity chromatographic separation of secreted alkaline phosphatase and glucoamylase using reactive dyes. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 561-569, 2007.

PANDEY, A. Glucoamylase Research: an overview. **Starch/Stärke**, v. 47, p. 439-445. 1995.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAN, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGUE, L. P. S.; MOAHN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 81-87, 2000.

PAVEZZI, F.C. **Produção e caracterização de glucoamilases termoestáveis de *Aspergillus awamori* obtidas por PCR mutagênico e expressas por *Saccharomyces cerevisiae***, Dissertação de mestrado - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 72 f, 2006.

PERES, M.F.S.; SOUZA, C.S.; THOMAZ, D.; DE SOUZA, A.R.; LALUCE, C. Partitioning of the glucoamylase activity at the cell surfaces in culture of *Saccharomyces*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 77- 83, 2006.

PESSOA, A. JR., KLIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos** Editora Manole, p. 456, 2005.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 175-188, 1998.

RAJOKA, M. I.; YASMIN, A.; LATIF, F. Kinetic of enhanced ethanol productivity using raw starch hydrolyzing glucoamylase from *Aspergillus niger* mutant produced in solid state fermentation. **Letters Applied Microbiology**, 39:13-18, 2004.

RASHID, M. H.; SIDDIQUI, K. S. Kinetic and thermodynamic parameters for native and chemically modified β -glucosidase produced by *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 109-115, 1998.

REETZ, M. T.; JAEGER, K-E. Superior Biocatalyst by Direct Evolution. **Topics in Current Chemistry**, v. 200, p. 31-57, 1999.

RIAZ, M.; PERVEEN, R.; JAVED, M.R.; NADEEM, H.; RASHID, M.H. Kinetic and thermodynamic properties of novel glucoamylase from *Humicola* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 558-564, 2007.

RING, S. G.; GEE, M. J.; WHITTAM, M.; ORFORD, P.; JOHNSON, I. T. Resistant starch: Its chemical form in foodstuffs and effect on digestibility in vitro. **Food Chemistry**, v. 28, p. 97–109, 1988.

ROBYT, J.F..Cyclodextrins. **In-Essentials of carbohydrate chemistry**. New York, Springer, Cap. 8, pp. 245-250, 1998.

ROY, I.; GUPTA, M. N. Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase entrapped individually in calcium alginate beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 26-32, 2004.

SAHA, B. C.; ZEIKUS, J. G. Microbial glucoamylase: biochemical and biotechnological features. **Starch/ Stärke**, v. 41, p. 57-64, 1989.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning – Laboratory manuals**. 3.ed. vol.3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAUER, J.; SIGURSKJOLD, B. W.; CHRISTENSEN, U.; FRANDSEN, T.; MIRGORODSKAYA, E.; HARRISON, M.; ROEPSTORFF, P.; SVENSSON, B. Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, p. 275-293, 2000.

SAUER, J.; CHRISTENSEN, T.; FRANDSEN, T.; MIRGORODSKAYA, E.; MCGUIRE, K. A.; DRIGUEZ, H.; ROEPSTORFF, P.; SIGURSKJOLD, W.; SVENSSON, B. Stability and Function of interdomain linker variants of glucoamylase 1 from *Aspergillus niger*. **Biochemistry**, v. 40, p. 9336-9346, 2001.

SCHAFER, A., WOLF, D.H. Endoplasmic reticulum-associated protein quality control and degradation: genome-wide screen for ERAD components. **Methods Mol. Biol.** v. 301, p. 289–292, 2005.

SHARIFFA, Y. N.; KARIM, A. A.; FAZILAH, A.; ZAIDUL, I. S. M. Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 434– 440, 2009.

SIERKS, M. R.; FORD, C.; REILLY, P. J.; SVENSSON, B. Catalytic mechanism of fungal glucoamylase as defined by mutagenesis of Asp 176, Glu 179 and Glu 180 in the enzyme from *Aspergillus awamori*. **Protein Engineering**, v. 3, p. 193-198, 1990.

SIERKS, M. R.; SVENSSON, B. Protein engineering of the relative specificity of glucoamylase from *Aspergillus awamori* based on sequence similarities between starch-degrading enzymes. **Protein Engineering**, v. 7, p. 1479-1484, 1994.

SLAVIK, J.; KOTYK, A. Intracellular pH distribution and transmembrane pH profile of yeast-cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 766 (3), p. 679-684, 1984.

SMITH, A.M. The biosynthesis of the starch granule. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 335–341, 2001.

SOUTHALL, S. M.; SIMPSON, P. J.; GILBERT, H. J.; WILLIAMSON, M. P. The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch. **FEBS Letters**, v. 447, p. 58-60, 1999.

SPINELLI, L. B. B.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENZI, H. F.; JORGE, J. A. Biochemical characterization of glucoamylase from the hyper producer exo-1 mutant Strain of *Neuspora crassa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 138, p. 173-177, 1996.

STAMFORD, T. L. M.; ATAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp endophyte of maize leaves. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 105-109, 2002.

SUTTHIRAK, P.; DHARMSTHITI, S.; LERTSIRI, S. Effect of glycation on stability and parameters of thermostable glucoamylase from *Aspergillus niger*. **Biochemistry**, v. 40, p. 2821-2826, 2005.

SVENSSON, B.; LARSEM, K. E.; GUNNARSON, A. A characterization glucoamylase G2 from *Aspergillus niger*. **European Journal of Biochemistry**, v. 154, p. 479-502, 1986.

SVENSSON, B.; CLARKE, A. J.; SVENDSEN, I.; MOLLER, H. Identification of carboxylic acid residues in glucoamylase that participate in catalysis and substrate binding. **European Journal of Biochemistry**, v. 188, p. 29-38, 1990.

SWIFT, R. J.; KARANDIKAR, A.; GRIFFEN, A. M.; PUNT, P. J.; HONDEL, C. A. M. J. J.; ROBSON, G. D.; TRINCI, A. P. J.; WIEBE, M. G. The effect of nitrogen sources on recombinant glucoamylase production by *Aspergillus niger* in chemostat culture. **Fungal Genetics and Biology**, v. 32, p. 125-133, 2000.

TESTER, R. F.; KARKALLAS, J.; QI, X. Starch-composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, p. 151-165, 2004.

THORSEN, T.S.; JOHNSEN, A.H.; JOSEFSEN, K.; BENSEN, B. Identification and characterization of glucoamylase from the fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Biochemistry Biophysical Acta**, v. 1764, p. 671-676, 2006.

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**, 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**, v. 1543, p. 336-360, 2000.

VIHINEN, M.; MÄNTSÄLÄ, P. Microbial amylolytic enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 24, p. 329-418, 1989.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica**. 1.ed. Porto Alegre: artmed, 2002.

XU, X.; HUANG, J.; FANG, J.; LIN, C.; CHENG, J.; SHEN, Z. Expression of a fungal glucoamylase in transgenic rice seeds. **Protein Expression and Purification**, v. 61, p. 113-116, 2008.

ZAVAREZE, E. d. R.; DIAS, A. R. G. Impact of heat-moisture treatment and annealing in starches: A review. **Carbohydrate Polymers**, 2010. doi:10.1016/j.carbpol.2010.08.064.

ZHANG, T.; OATES, C. G. Relationship between α -amylase degradation and physico-chemical properties of sweet potato starches. **Food Chemistry**, v. 65, p.157–163, 1999.

WALLIS, G. L. F.; SWIFT, R. J.; ATTERBURY, R.; TRAPPE, S.; RINAS, U.; HEMMING, F. W.; WIEBE, M. G.; TRINCI, A. P. J.; PEBERDY, J. F. The effect of pH on glucoamylase production, glycosylation and chemostat evolution of *Aspergillus niger*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1527, p. 112-122, 2001.

WANG, Y.; FUCHS, E.; da SILVA, R.; McDANIEL, A.; SEIBEL, J.; FORD, C. Improvement of *Aspergillus niger* glucoamylase thermostability by direct evolution. **Starch/Stärke**, v. 58, p. 501-508, 2006.

WEBER, F. H.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; CHANGI, Y. K. Physicochemical, rheological, morphological, and thermal characterization of normal, waxy, and high amylose corn starches. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, vol.29, n 4, 2009 doi: 10.1590/S0101-20612009000400008.

WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHALL, B. F. **Starch: chemistry and technology**. New York: Academic Press; 1984.