

**Produção e caracterização de glucoamilases
termoestáveis de *Aspergillus awamori* obtidas por PCR
mutagênico e expressas em *Saccharomyces cerevisiae***

FABIANA CARINA PAVEZZI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos (Área de Concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos).

São José do Rio Preto - SP

2006

**Produção e caracterização de glucoamilases
termoestáveis de *Aspergillus awamori* obtidas por PCR
mutagênico e expressas em *Saccharomyces cerevisiae***

FABIANA CARINA PAVEZZI

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos (Área de Concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos).

São José do Rio Preto - SP

2006

BANCA EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Prof. Dr. Roberto da Silva
(IBILCE/UNESP)

Profa. Dr^a. Inês Conceição Roberto
(----)

Prof. Dr. Haghuvir Arni
(IBILCE/UNESP)

MEMBROS SUPLENTES

Prof. Dr. ----
(USP/RIBEIRÃO)

Profa. Dr^a. Valquiria---

Dedico:

Aos meus pais Tereza e José, que trabalharam dobrado, sacrificando seus sonhos em favor dos meus, me apoiando e me amparando em todas as circunstâncias.

Ao meu querido irmão Zé Luiz por ser uma pessoa muito especial em minha vida, sempre me ajudando em todas as minhas dificuldades.

Ao meu namorado Cidinho, pelo seu amor, paciência e apoio; por compartilhar comigo minhas alegrias e tristezas, incentivando-me a prosseguir e não desanimar nos insucessos.

A toda minha família e aos amigos que me apoiaram em todos os momentos

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 e pela sua valiosa orientação em todas os momentos.

A Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes pelo esclarecimento de dúvidas e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

A grande e sempre amiga Heloisa Ferreira Alves-Prado, pelos seus ensinamentos, e pela contribuição em todas as etapas deste trabalho, e principalmente pela sua paciência e disposição em ajudar-me.

A Prof^a. Dr^a. Célia Maria Landi Franco coordenadora do programa de pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos pela doação dos amidos utilizados neste trabalho.

A todos os amigos do laboratório, pelos agradáveis momentos, incentivos e conversas: Andréia, Alexandre, Aline, Ana Paula, Ana Flávia, Carol, Daniela, Denis, Eduardo, Ellen, Érica, Gisele, Hamilton, Luis Gustavo, Maíra, Marcelo, Natália, Patrícia, Paula, Rodrigo, Rodolfo, Rosângela e Viviane.

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

Ao funcionário Claudinei por seu trabalho como técnico e sua amizade.

A CAPES, FAPESP e CNPq pelo suporte financeiro.

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT	XII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Amido.....	3
2.2 Glucoamilase.....	5
2.3 Estrutura da glucoamilase.....	7
2.3.1 Domínio catalítico	7
2.3.2 Domínio de ligação ao amido	8
2.3.3 Linker.....	8
2.4 Aplicação da enzima.....	9
2.5 Termoestabilidade através da técnica de PCR mutagênico	11
3 MATERIAL E MÉTODO	14
3.1 Microrganismo	14
3.2 Meio de cultura e condições de crescimento	14
3.3 Produção enzimática.....	15
3.3.1 Pré inóculo	15
3.3.2 Fermentação submersa.....	15
3.4 Determinação da atividade da glucoamilase.....	15

3.5	Quantificação da biomassa microbiana	16
3.6	Determinação quantitativa de proteínas	17
3.7	Dosagem de açúcares redutores	18
3.8	Caracterização físico-química do extrato enzimático bruto	18
3.8.1	Determinação do pH ótimo	18
3.8.2	Determinação da temperatura ótima.....	19
3.8.3	Determinação da estabilidade das enzimas em diferentes valores de pH.....	19
3.8.4	Determinação da estabilidade das enzimas em diferentes temperaturas	19
3.9	Cinética de termoinativação irreversível das enzimas.....	19
3.10	Análise dos parâmetros termodinâmicos de desnaturação enzimática.....	20
3.11	Avaliação da ação das glucoamilases sobre diferentes substratos amiláceos.....	20
3.12	Avaliação da hidrólise do amido solúvel pelas glucoamilases mutantes e a selvagem....	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1	Produção de glucoamilases mutantes em <i>S. cerevisiae</i>	22
4.2	Caracterização físico-química das glucoamilases de <i>A. awamori</i> expressas em <i>S. cerevisiae</i>	35
4.3	Comparação da estabilidade das glucoamilases mutantes em relação a glucoamilase selvagem frente as variações de pH e temperatura.	44
4.4	Termoinativação irreversível das enzimas.....	47
4.5	Avaliação da ação das glucoamilases sobre diferentes substratos	51
4.6	Hidrólise do amido pela ação das glucoamilases mutantes e a selvagem	55
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da amilose.....	4
Figura 2. Estrutura da amilopectina.....	4
Figura 3. Estrutura da glucoamilase de <i>Aspergillus awamori</i>	6
Figura 4. Produção de glucoamilase pela linhagem mutante MUT.....	24
Figura 5. Produção de glucoamilase pela linhagem mutante M1.....	26
Figura 6. Produção de glucoamilase pela linhagem mutante M2.....	28
Figura 7. Produção de glucoamilase pela linhagem selvagem.....	30
Figura 8. pH ótimo e de estabilidade da glucoamilase mutante MUT.....	38
Figura 9. pH ótimo e de estabilidade da glucoamilase mutante M1.....	38
Figura 10. pH ótimo e de estabilidade da glucoamilase mutante M2.....	39
Figura 11. pH ótimo e de estabilidade da glucoamilase selvagem.....	39
Figura 12. Temperatura ótima e de estabilidade da glucoamilase mutante MUT.....	42
Figura 13. Temperatura ótima e de estabilidade da glucoamilase mutante M1.....	42
Figura 14. Temperatura ótima e de estabilidade da glucoamilase mutante M2.....	43
Figura 15. Temperatura ótima e de estabilidade da glucoamilase selvagem.....	43
Figura 16 A. Comparação da estabilidade ao pH das glucoamilases mutantes em relação a selvagem.....	44
Figura 16 B. Comparação da termoestabilidade das glucoamilases mutantes em relação a selvagem.....	46
Figura 18. Ln da atividade a 70°C.....	49
Figura 19. Efeito da temperatura na termoinativação irreversível das glucoamilases..	49
Figura 20. Atividade enzimática sobre diferentes substratos da glucoamilase mutante MUT.....	52

Figura 21. Atividade enzimática sobre diferentes substratos da glucoamilase mutante M1.....	52
Figura 22. Atividade enzimática sobre diferentes substratos da glucoamilase mutante M2.....	53
Figura 23. Atividade enzimática sobre diferentes substratos da glucoamilase selvagem WT.....	53
Figura 24. Hidrólise do amido pela ação das glucoamilases a 60°C.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de xaropes.....	11
Tabela 2. Composição do meio de cultura SD+His.....	14
Tabela 3. Reagentes usados no método Hartree-Lowry.....	17
Tabela 4. Atividade específica (U/mg de biomassa) das glucoamilases.....	32
Tabela 5. Atividade específica (U/mg de proteína) das glucoamilases.....	32
Tabela 6. Resumo dos parâmetros da caracterização das glucoamilases mutantes e a selvagem.....	46
Tabela 7. Tempo de meia vida das glucoamilases em diferentes temperaturas.....	47
Tabela 8. Parâmetros termodinâmicos da termoinativação das glucoamilases.....	50

RESUMO

A glucoamilase é uma enzima importante na produção enzimática de xarope de glicose a partir do amido. Neste processo o amido é primeiramente dextrinizado pela ação da α -amilase a aproximadamente 100°C. Em seguida, a suspensão de dextrinas é resfriada a uma temperatura próxima de 55°C para a sacarificação, pela ação da glucoamilase. A característica de alta termoestabilidade para essa enzima é fundamental para agilizar o processo e reduzir custos operacionais. O presente estudo visou à obtenção, caracterização físico-química, bem como a cinética de termoinativação das glucoamilases mutantes de *Aspergillus awamori* expressa em *Saccharomyces cerevisiae*. O gene da glucoamilase sofreu alterações através da técnica de PCR mutagênico, e os clones expressando glucoamilases mais termoestáveis foram selecionados e avaliados. A glucoamilase selvagem apresentou temperatura ótima de atividade a 58°C, as enzimas mutantes apresentaram atividades ótimas a 68°C para a linhagem M1, e 65°C para a linhagem M2. As glucoamilases mutantes M1 e M2 também apresentaram maior termoestabilidade que a enzima selvagem. As temperaturas de desnaturação térmicas na ausência de substrato por 1 hora foram 45, 50 e 55°C para as enzimas, selvagem, M1 e M2, respectivamente. Todas as enzimas apresentaram atividade ótima no pH 3,5 - 4,0, sendo que os mutantes M1 e M2 também exibiram maior estabilidade à variação de pH, restando acima de 80% da atividade na faixa de pH 5,5 a 10,0. A meia vida ($t_{1/2}$) a 70°C foi de 8,1 minutos para a glucoamilase mutante M2, 3,8 minutos para o mutante M1 e 3 minutos para a glucoamilase selvagem. A termoinativação das enzimas seguiu uma cinética de primeira ordem. A energia de desnaturação foi de 262,8 e 252,9 KJ mol⁻¹ para os mutantes M2 e M1 respectivamente, e de 234,3 KJ mol⁻¹ para a enzima selvagem. O parâmetro termodinâmico de termoinativação, ΔG foi menor para a glucoamilase selvagem confirmando uma desestruturação maior dessa enzima. As enzimas mutantes e a selvagem apresentaram um perfil semelhante de atividade sobre diferentes substratos, sendo o amido de milho o melhor substrato para a hidrólise para todas as glucoamilases testadas.

ABSTRACT

Glucoamylase is an important enzyme for the production of glucose syrup made from starch. In this process, starch is initially dextrinized by the action of a α -amylase at approximately 100°C. Secondly, the dextrans suspension is cooled down to a temperature near 55°C for the saccharification, by the action of an glucoamylase. High thermostability is a fundamental characteristic for this enzyme to accelerate the process and to reduce operational costs. This work had the purpose of studying physicochemical characteristics as well as thermoinactivation kinetics of mutants glucoamylases of *Aspergillus awamori* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Glucoamylases gene was modified through mutagenic PCR technique and the clones which produced more thermostable glucoamylases were selected and evaluated. The wild glucoamilase exhibited optimum temperature at 58°C, the mutants from strain M1 and M2 acted optimally at 68°C and 65°C, respectively. The mutants M1 and M2 also exhibited higher thermostability when compared to the wild enzyme. Thermic denaturation temperatures in the absence of substrate for 1 hour were 45, 50 and 55°C for the wild, M1 and M2 enzymes, respectively. All enzymes showed optimum activity at pH 3.5 – 4.0, and the mutants M1 and M2 also exhibited higher stability towards pH variation, maintaining 80% of activity in pH from 5.5 to 10.0. Half life ($t_{1/2}$) at 70°C was 8.1 minutes for mutant M2, 3.8 minutes for mutant M1 and 3 minutes for wild glucoamylase. The enzymes thermoinactivation followed a first order kinetics. Denaturation energy was 262.8 and 252.9 KJ mol⁻¹ for mutants M2 and M1 respectively, and 234.3 KJ mol⁻¹ for the wild enzyme. Thermodynamic parameter of thermoinactivation, ΔG was lower for wild glucoamylase showing a higher denaturation for the enzyme. All enzymes revealed similar activity profile on different substrates, of which corn starch was the best substrate for hydrolysis for all glucoamylases tested.

1 INTRODUÇÃO

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; SVENSSON, 1994; FRANDSEN et al., 1995; FIEROBE et al., 1996).

Esta enzima é muito importante para a indústria alimentícia, sendo empregada em inúmeros setores em todo o mundo. Por essa razão, tem sido o foco de muitas pesquisas nos últimos anos, que visam aumentar a sua termoestabilidade e atividade a partir do conhecimento da sua estrutura.

Sua principal aplicação 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; GUPTA, 2004).

O xarope de glicose também é empregado na produção de xarope de frutose, através da isomerização da glicose pela ação da glicose isomerase. A frutose também tem grande aplicação na indústria panificadora e em cervejarias (JAMES; LEE, 1997; SWIFT et al., 2000).

As glucoamilases são utilizadas na panificação com o objetivo de reduzir a quantidade de açúcar a ser adicionada a massa, já que, a glicose liberada pela ação da enzima, apresenta doçura maior que a maltose, que é o açúcar liberado quando a β -amilase é utilizada no processo (KNIGHT; MAZZIEIRO, 2000). A glucoamilase é utilizada ainda na preparação de produtos tradicionais da cultura japonesa como na fermentação do shoyu, saquê e misso (HATA et al., 1997). A enzima também tem sido empregada junto com α -amilase no processamento do amido para a produção de bioetanol (NIGAM; SINGH, 1995).

As glucoamilases podem ser derivadas de grande variedades de plantas, animais e microrganismos. No entanto, a maioria das enzimas ocorre em fungos (VIHINEM; MÄNTSÄLA, 1989). A enzima é capaz de hidrolisar completamente o amido se incubada por longos períodos, produzindo 100% de glicose.

A enzima 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).

Com o intuito de melhorar a termoestabilidade da enzima, e, conseqüentemente, agilizar e melhorar os processos industriais, várias pesquisas têm sido realizadas nos últimos anos, através de técnicas de biologia molecular, as quais proporcionam uma importante ferramenta para melhorar as características das enzimas existentes ou criar novas propriedades.

Em trabalho anterior, Lemos (2003) foi realizada mutagênese aleatória no gene selvagem da glucoamilase de *A. awamori*, através da técnica do PCR mutagênico para melhorar a termoestabilidade da enzima. As colônias positivas que incorporaram o gene da glucoamilase passaram por testes de termoestabilidade por incubação a 75°C por 15 minutos. Os mutantes que apresentaram a termoestabilidade elevada em relação à enzima selvagem foram selecionados.

Neste trabalho, as linhagens selecionadas foram utilizadas para produção das glucoamilases, e também para o estudo dos parâmetros físico-químicos e termodinâmicos das enzimas mutantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Amido

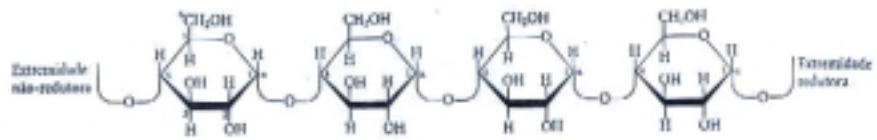
Depois da celulose, o amido é o principal carboidrato fotossintetizado pelas plantas. É um polímero de glicose de alta massa molar, acumulado na forma de substância de reserva, constituindo uma fonte de carbono e energia essencial para muitos organismos (VAN DER VEEN et al., 2000). Por ser um carboidrato que é facilmente digerido e assimilado pelos animais superiores, tornou-se um dos componentes mais importantes na alimentação humana e animal.

O grânulo de amido não é quimicamente homogêneo, sendo basicamente formado por dois polímeros distintos: amilose e amilopectina. A proporção destes polissacarídeos no grânulo é controlada geneticamente, existindo plantas com maior ou menor proporção destes componentes (CIACCO; CRUZ, 1981; GUZMAN-MALDONATO; PAREDES-LOPEZ, 1995).

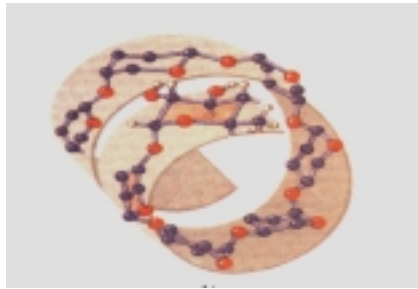
A amilose é um polímero linear constituído por unidades de D-glicose unidas entre si por ligações glicosídicas α -1,4. Este polímero pode conter de poucos até milhares de unidades de glicose (Fig. 1A). A amilose apresenta uma estrutura helicoidal, e pode complexar com outros compostos. Por exemplo, o complexo entre este polissacarídeo e o iodo resulta numa estrutura de coloração azul intenso (Fig. 1B) (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

A amilopectina constitui a fração altamente ramificada do amido. É formada por várias cadeias curtas de D-glicose unidas entre si por ligações α -1,4 e essas cadeias estão ligadas à cadeia central de glicose por ligações glicosídicas α -1,6 que ocorre a cada 24 ou 30 resíduos de glicose. Esta estrutura confere a amilopectina uma forma esférica (Fig. 2).

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 o amido pode ser utilizado para melhorar as propriedades funcionais de alguns produtos alimentícios, sendo usado como espessante, estabilizante e geleificante (CIACCO; CRUZ, 1981). Entretanto, sua principal aplicação é na produção de xarope de glicose, a qual pode ser convertida por fermentação em etanol, e, por isomerização, em frutose (CRABB; MITCHINSON, 1997).



A



B

Figura 1. Estrutura da amilose. (A) cadeia linear composta por D-glicose ligadas por ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$). (B) Estrutura helicoidal estreitamente compacta (LEHNINGER, 1995).

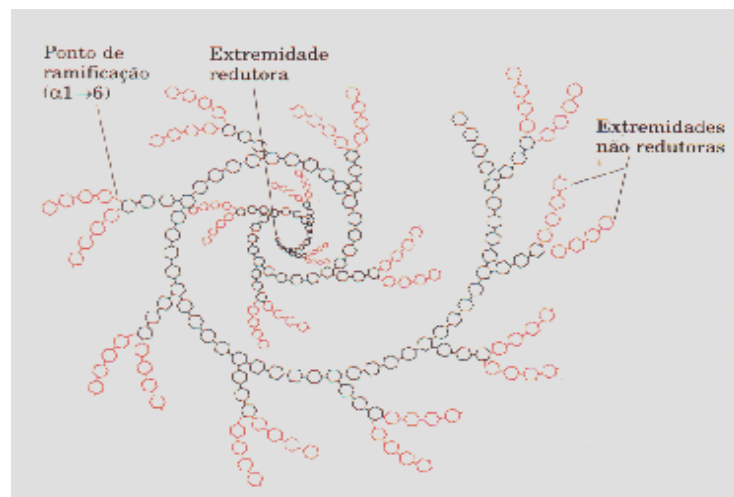


Figura 2

Figura 2. Estrutura da amilopectina. Cada um dos hexágonos representa um resíduo de glicose (LEHNINGER, 1995).

Cerca de um terço da produção total de amido é utilizado em outros tipos de indústrias, principalmente de papéis, tecidos e embalagens, onde atuam como aglutinante de fibras e como adesivos (MICHELIN, 2005).

Os amidos modificados também são adicionados em sopas, pudins instantâneos, maioneses, produtos solúveis a frio, balas moles de goma, produtos farmacêuticos, cosméticos e lavanderias (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

2.2 Glucoamilase

Glucoamilase (1,4- α -D-glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.3.) é uma enzima que catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 do amido. No primeiro caso, atuam na extremidade final das cadeias não redutoras do amido e polissacarídeos relacionados liberando β -D-glucose. No segundo caso, atuam nas ramificações mas com apenas 0,2% da velocidade de atuação no segmento linear do amido (HIROMI et al., 1966; SIERKS; SVENSSON, 1994; FRANDBEN et al., 1995; FIEROBE et al., 1996). Sugere-se, portanto, que a ação da enzima ocorra através de um mecanismo multisseriado degradando aleatoriamente toda a molécula do substrato (JAMES; LEE, 1997).

A glucoamilase é produzida por uma variedade de microrganismos, sendo os fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori* e *Rhizopus oryzae* considerados os mais importantes (COUTINHO; RELLY, 1997).

São encontradas várias formas de glucoamilases fúngicas, que são denominadas de isoenzimas ou isoformas, resultantes da variação de aminoácidos e/ou carboidratos presentes em sua estrutura. A glucoamilase de *Aspergillus* é codificada por um único gene, mas tem duas ou três formas variáveis 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 microrganismo cresce (JAMES; LEE, 1997; VIHINEM; MANTSALA, 1989; MANJUNATH et al., 1983). Entretanto, as várias formas das glucoamilases possuem características físico-químicas similares (SAHA; ZEIKUS, 1989).

Dos carboidratos que são encontrados na estrutura da glucoamilase cerca de 5 a 20% estão na forma de glicose, glicosamina, manose e galactose. Enzimas de *Aspergillus* geralmente contém manose, glicose, galactose e alguns casos xilose e glucosamina, enquanto que enzimas de *Rhizopus* apresentam manose e glucosamina, sendo esses carboidratos necessários para a

manutenção da conformação tridimensional das enzimas (VIHINEM; MANTSALA, 1989; JAMES; LEE, 1987). Os resíduos de carboidratos podem ser responsáveis pela estabilidade a altas temperaturas, removendo-os, estas estruturas tem sua estabilidade e atividade reduzida (SAHA; ZEIKUS, 1989). Além disso, os carboidratos também previnem que as proteínas parcialmente desdobradas se agreguem (COUTINHO; REILLY, 1997; GAL-GÖEFER et al., 1995; NOROUZIAN et al., 2006).

A glucoamilase na sua forma nativa apresenta-se na forma de alteres, no qual dois domínios volumosos, o domínio catalítico (DC) e o domínio de ligação ao amido/ substrato (DLS), estão ligados por um filamento fino (Linker) como mostra a Figura 3 (SAUER et al., 2000).

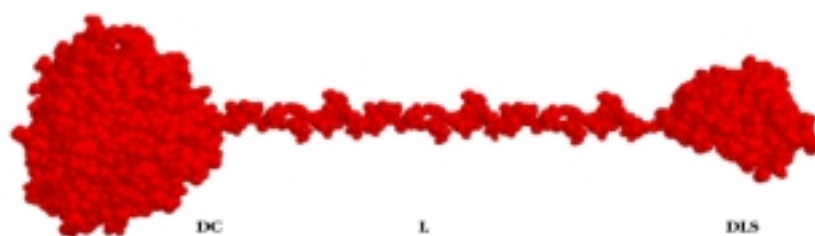


Figura 3. Imagem da estrutura estendida da glucoamilase de *Aspergillus awamori*. No lado esquerdo o domínio catalítico (DC), ao centro o filamento ligante ou “linker” (L), e a direita o domínio de ligação ao substrato (amido) (DLS). <http://nte-server.univ-lyon1.fr/nte/heyde/www.public.iastate.edu/~pedro/glase/glase.html>

Em *A. awamori* a glucoamilase se apresenta como uma glicoproteína, com 615 a 616 resíduos de aminoácidos ocorrendo naturalmente em duas isoformas, glucoamilase 1 e glucoamilase 2. A glucoamilase 1 consiste de três áreas funcionais: o domínio catalítico, que corresponde aos resíduos de aminoácidos 1 a 440, o filamento ligante, formado pelos resíduos 441 ao 512, que são altamente *O*-glicosilado, e o domínio de ligação ao amido no estado natural, contendo os resíduos 513 a 616. A glucoamilase 2 na qual falta o domínio de ligação ao substrato, que compreende os resíduos 513 a 616, 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, na

qual falta o domínio de ligação ao amido, tem termoestabilidade similar a glucoamilase 1 (SVENSSON et al., 1986).

A glucoamilase pertence à família 15 das hidrolases glicosídicas, a qual contém mais de 20 membros (HENRISSAT; BAIROCH, 1993), onde são conhecidas mais de 23 estruturas primárias exclusivamente de origem microbiana (COUTINHO; REILLY, 1997).

A estrutura da glucoamilase nativa é difícil de determinar em função do alto grau de glicosilação. Aleshin e colaboradores (1992) determinaram a estrutura cristalina de uma glucoamilase, próxima da forma nativa, denominada de *Aspergillus awamori* var. X100, que apresentou uma sequência de aminoácidos 94% idêntica a glucoamilase de *A. awamori* e *A. niger* (FIEROBE et al., 1997).

2.3 Estrutura da glucoamilase

2.3.1 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 α/α barril, 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 o N-terminal à α -hélice interna 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 região funciona como sítio ativo propriamente dito, e a outra não tem uma função conhecida (ALESHIN et al., 1994). O sítio catalítico contém ainda os resíduos de aminoácidos Glu 179 e Glu 400 como os dois resíduos catalíticos, que estão localizados no fundo deste sítio (HARRIS et al., 1993; SIERKS et al., 1990; FRANDBSEN et al., 1994; SVENSSON et al., 1990).

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

2.3.2 Domínio de ligação ao amido

O domínio de ligação ao substrato (amido) está localizado na região C-terminal e se apresenta como uma estrutura de β -fitas 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. Esta afinidade aumenta a concentração de glucoamilases próximas das membranas da célula (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 do domínio de ligação 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).

2.3.3 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 (LEMOS et al., 2003).

A primeira parte (aminoácidos 441 a 471) desta região *O*-glicosilada 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). *O*-glicosilação em glucoamilase também protege a enzima contra a proteólise. Tem sido relatado que as glucoamilases com baixo grau de glicosilação são mais propensas a ação de protease (COUTINHO; REILLY, 1997; GAL-GÖEFER et al., 1995; NOROUZIAN et al., 2006).

Embora a compactação da estrutura do barril α/α e a proteção dos carboidratos façam a glucoamilase de *Aspergillus* mais estável do que algumas outras proteínas, uma estabilidade maior ainda é necessária para os processos industriais (LEMOS et al., 2003).

Na estrutura da glucoamilase são conhecidas quatro pontes dissulfeto, 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 dissulfeto ocorre entre os resíduos 509 e 604 (COUTINHO; REILLY, 1994).

O peso molecular das glucoamilases fúngicas está na faixa de 48 a 90 KDa (NOROUZIAN et al., 2006), o pH ótimo geralmente é ácido variando entre 3,5 – 5,0.

2.4 Aplicação da enzima

Entre os vários fungos produtores de glucoamilases, as enzimas produzidas por *Aspergillus* e *Rhizopus* são mais termoestáveis. A temperatura ótima das glucoamilases esta entre 50 e 60°C (NOROUZIAN et al., 2006). Porém, podem ser inativadas a temperaturas superiores a 60°C (MANJUNATH et al., 1983; BRUMM, 1998).

A glucoamilase é aplicada na indústria alimentícia no processamento do amido para a produção de xarope com alto teor de glicose (96–98% de glicose). Também é utilizada na produção de xarope de frutose, obtida pela isomerização da glicose. Os quais têm grande aplicação na indústria panificadora e na fermentação de cervejas (JAMES; LEE, 1997; SWIFT et al., 2000).

No processo de panificação, as enzimas 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 a 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 adicionada à massa (KNIGHT; 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; SINGH, 1995).

A glucoamilase atua na sacarificação do amido 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).

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; 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 o processo seguinte 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; 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, geralmente o pH é corrigido a uma faixa mais ácida, de 4,0 a 4,5 para que a próxima etapa ocorra, pois 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 catalisado por uma glucoamilase. Normalmente são utilizadas enzimas produzidas por espécies do gênero *Aspergillus* (*A. niger* e *A. awamori*), as quais podem ser obtidas em grandes quantidades nos processos de fermentação (CRABB; MITCHISON, 1997). A sacarificação ocorre num período de 42 a 72 horas dependendo do D.E. esperado. Outra enzima amilolítica desramificante pode ser usada durante a sacarificação, como por exemplo, a pululanase, já que esta atua em condições semelhantes de temperatura e pH da glucoamilase, obtendo assim melhores resultados (GLAZER; NIKAIDO, 1995).

Em altas concentrações de glicose, a glucoamilase pode repolimerizar essas moléculas, na reação chamada de “reversão”, formando maltose que podem diminuir o rendimento. Porém, este fenômeno é raro, e, mais pronunciado apenas em altas concentrações de substrato e enzima (SLOMINSKA; MACZYNSKI, 1985; LABELLE et al., 1997).

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

Tabela 1. 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; BOBBIO, 2001.

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.

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 pode contribuir para uma melhor utilização da enzima nos processos industriais. Por isso, estratégias de recombinação e mutações de proteínas através da técnica de PCR mutagênico vêm ganhando espaço nas pesquisas, por ser um método que produz bons resultados.

2.5 Termoestabilidade através da técnica de PCR mutagênico

Várias tentativas têm sido realizadas para melhorar a termoestabilidade da glucoamilase, visto que esta característica é essencial para a utilização da enzima nos processos industriais que requerem altas temperaturas. Tais estratégias incluem a utilização de mutações aleatórias através da técnica de PCR mutagênico ou mutações sítio dirigidas.

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 glucoamilase de *A. awamori* tem sido clonada e expressada em *S. cerevisiae* ou em *Pichia pastoris* e, através da técnica de PCR mutagênico são realizadas mutações na estrutura da enzima visando melhoria na estabilidade e atividade (FORD, 1999).

Uma reação de PCR é normalmente realizada de modo a amplificar qualquer DNA com alta fidelidade. A atividade 3' → 5' da DNA polimerase assegura que a amplificação do DNA siga de maneira precisa. Ocasionalmente, nucleotídeos errados são incorporados durante a amplificação levando a mutações com uma frequência de 0,1 a 2×10^{-4} por nucleotídeo para a DNA polimerase termoestável (Taq polimerase). Esta baixa taxa de erro pode ser aumentada para 7×10^{-3} por nucleotídeo através do aumento da concentração de $MgCl_2$, adição de $MnCl_2$, aumento na concentração de dCTP e dTTP e do aumento na quantidade taq polimerase. Para o propósito da evolução dirigida da enzima, estas condições devem ser usadas (individualmente ou combinadas) a fim de se obter uma taxa média de 1 a 2 nucleotídeos mutados por gene, levando a uma mudança média de 1 aminoácido por enzima mutante (REETZ; JAEGER, 1999; LEMOS et al., 2003).

Grandes bibliotecas de mais de 10^{10} genes mutantes podem facilmente ser criadas usando essa técnicas. Porém, o desenvolvimento de um sistema apropriado de investigação é muito importante no processo de evolução dirigida de enzimas (REETZ; JAEGER, 1999). Seleções efetivas, nas quais apenas aqueles clones carregando a característica desejada sobrevivam ou cresçam mais rápido são extremamente importantes para o sucesso do processo (LEMOS et al., 2003).

As mutações geralmente consistem em alterar características desejáveis na estrutura da enzima como, por exemplo, a deleção ou substituição de aminoácidos, ou mesmo, a criação de pontes dissulfeto visando aumentar a termoestabilidade, ou também, aumentar a taxa de hidrólise em determinadas condições ou em determinado substrato. Mutações aleatórias associadas a um bom método de seleção tem sido empregada com sucesso para inúmeras características em diferentes enzimas.

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 aumentaram a meia vida da enzima em 30% a 65°C, quando comparada com a glucoamilase de *A. niger*.

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 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 → Ser, Gly 407 → Asp, implicaram em mudanças na conformação e estrutura da proteína conduzindo a uma baixa estabilidade. Diferentes conformações causadas por mutações também podem afetar a secreção da glucoamilase (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 do tipo 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 diminui o espaço disponível para o substrato (FLORY et al., 1994).

A técnica de PCR mutagênico tem sido empregada na manipulação de outras proteínas como a lipase que teve sua temperatura ótima aumentada em até 15% através da mutagênese aleatória (KOHNO et al., 2001).

Shaw e colaboradores (1999) utilizaram a técnica de mutações aleatórias através do PCR e obtiveram α -amilase de *Bacillus licheniformis* 23 vezes mais estável em pH 5,0 e 83°C.

Yang e colaboradores (2000) criaram um mutante para o gene da subtilisina através da técnica de PCR. Análises do sequenciamento revelaram apenas a substituição de um resíduo de aminoácido. E o tempo de vida médio da enzima mutante, quando incubada a 65°C, foi de aproximadamente 80 minutos, enquanto que a linhagem selvagem apresentou 15 minutos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

Foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem C468 (α leu 2-3 leu 2-212 his3-15 mal) contendo o plasmídio (pALTER-1) para expressão da glucoamilase. Os genes mutantes da glucoamilase foram previamente obtidos por Lemos (2003) por técnicas de PCR mutagênico. As colônias positivas que incorporaram o gene da glucoamilase passaram por teste de termoestabilidade por incubação a 75°C por 15 minutos. Os melhores resultados foram selecionados e estudados neste trabalho.

As linhagens *S. cerevisiae* que receberam os genes mutados foram denominadas de MUT, M1 e M2. Também foi utilizada uma linhagem *S. cerevisiae* expressando o gene selvagem da glucoamilase (sem mutação). A manutenção das culturas ocorreu em solução 10% de glicerol a -80°C.

3.2 Meio de cultura e condições de crescimento

Para o crescimento de leveduras mutantes e a selvagem, foi usado o meio SD (starch soluble) + His (Tabela 2). Após a esterilização do meio em autoclave 121°C por 20 minutos, 15 mL de meio foi transferido para placas de Petri autoclavadas. As placas foram inoculadas com aproximadamente 15 μ L da cultura de células, e com o auxílio de uma alça de platina foram feitas estrias nas placas por esgotamento, para se obter colônias de leveduras isoladas. A incubação ocorreu a 30°C por 5 dias.

Tabela 2. Composição do meio de cultura SD + His.

MEIO SD + HIS	CONCENTRAÇÃO
Amido solúvel	1%
“Yeast nitrogen base” without aa	0,17%
Sulfato de amônia	0,5%
Glucose	2%
Agar	3%
L-histidina	10 mg/100mL

3.3 Produção enzimática

3.3.1 Pré inóculo

O pré inóculo foi preparado com 20 mL de meio de produção SD + His suplementado com 1% de amido, sem adição de agar, no qual foi transferida da placa de Petri uma única colônia de cada linhagem para os vários Erlenmeyer contendo o meio. Os Erlenmeyers foram mantidos em shaker com agitação de 180 rpm a 30°C, durante 20 horas para o crescimento celular.

3.3.2 Fermentação Submersa

A produção das glucoamilases ocorreu através da fermentação submersa, onde 1 mL do pré inóculo de cada linhagem foi transferida para Erlenmeyers contendo 20 ml do meio SD + His + 1% de amido. Os Erlenmeyers foram incubados em shaker a 30° C, com agitação de 180 rpm. A cada 24 horas foram retirados dois frascos de cada linhagem com o material fermentado, e estes foram centrifugados a 13700 g por 10 minutos sob refrigeração (5°C). O sobrenadante livre de células foi utilizado como solução enzimática bruta, e o precipitado usado para quantificação da biomassa microbiana.

3.4 Determinação da atividade da glucoamilase

A atividade foi determinada pelo método enzimático peroxidase/glicose-oxidase descrito por Bergmeyer e Bernt (1974) modificado, utilizando o Kit comercial (Glicose-Enz Color/ Biodiagnóstica).

A mistura da reação constituiu de 0,4 mL de solução de amido solúvel 0,5% (Merck) e/ ou solução de maltose 1% (Sigma) em tampão acetato de sódio pH 4,5 a 0,2 M, e 0,1 mL de solução enzimática diluída. Após incubação da reação a 50°C por 10 minutos, as amostras foram submetidas ao resfriamento em banho de gelo. Desse hidrolisado, uma alíquota de 0,2 mL, foi retirada e misturada a 0,3 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 7,0. Adicionou-se 1mL do reagente glicose oxidase e incubou-se 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). Um outro controle foi realizado substituindo a solução de maltose ou

amido por tampão acetato de sódio (controle da enzima). O branco para zerar o aparelho foi feito com 0,5 mL de água destilada e 1 mL do reagente. Mediu-se a absorvância 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, e foi calculada pela equação abaixo.

$$U = \frac{[R - (CS+CE)]}{B} / t / V_e / \text{volume de hidrolisado} \times FD$$

Onde:

U = U/mL

R = absorvância da reação

C.S = absorvância do controle do substrato

C.E = absorvância do controle da enzima

B = valor da curva padrão de glicose

t = Tempo de reação (min)

V_e = volume da enzima (mL)

F.D = fator de diluição da enzima

3.5 Quantificação da biomassa microbiana

Após a fermentação o material foi centrifugado a 13700 g, a 5°C durante 10 minutos, separando as células do meio. O precipitado celular foi ressuspendido e homogeneizado com 20 mL de água destilada, seguido de centrifugação nas condições descrita, sendo o sobrenadante, descartado durante três ciclos. As células, livres de resíduos do meio foram novamente ressuspendidas em 20 mL de água destilada e, após homogeneização, realizou-se a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm. Parte dessa suspensão (1 mL) foi transferida para espendorfes de pesos conhecidos. Estes foram centrifugados por 15 minutos a 2300 g e o sobrenadante descartado. A massa celular foi seca em estufa com circulação de ar a 60°C por 24 horas.

3.6 Determinação quantitativa de proteínas

A concentração de proteínas no extrato enzimático bruto foi determinada pelo método Hartree-Lowry (HARTREE, 1972), usando soro albumina bovina como padrão. Na Tabela 3 são indicados os reagentes utilizados.

A mistura de reação foi preparada com 0,5 mL da enzima diluída adicionada a 0,45 mL do reagente **A**. A mistura da reação foi incubada a 50°C, por 10 minutos. Em seguida, resfriou-se a amostra à temperatura ambiente e adicionou-se 50 µL do reagente **B**. Após incubação por 10 minutos à temperatura de 25°C, foi acrescentado à reação 1,5 mL do reagente **C**, sendo esta mistura novamente incubada a 50°C por 10 minutos. O branco foi feito seguindo todos os procedimentos descritos, substituindo a amostra de proteína por água destilada. A absorvância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda a 650 nm.

Tabela 3. Reagentes usados no método Hartree-Lowry.

REAGENTE A	REAGENTE B	REAGENTE C
0,4g de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (7mM),	0,4g de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (7mM),	1 volume de Folin Ciocalteau (Sigma) para 15 volumes de água.
20g de Na_2CO_3 (0,81M), 100 mL de NaOH (0,5N), Completar p/ 200 mL c/ H_2O	0,2g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,04M), 2 mL NaOH (0,5N), acrescentar 18 mL de H_2O .	
Estocagem: 2 a 3 meses em temperatura refrigerada.	Estocagem: 2 a 3 meses em temperatura refrigerada.	Estocagem: preparar diariamente 16 mL ou múltiplos deste, não estocar.

A curva padrão usada para determinar a concentração protéica foi construída com soro albumina como padrão (mg/mL), na presença dos reagentes, em função da absorvância, da qual resultou a equação:

$$y = 0,0606 + 0,0017 x$$

Onde: y = absorvância da reação

X = Concentração protéica (mg/mL)

3.7 Dosagem de açúcares redutores

A dosagem de açúcares redutores do meio foi realizada pelo método DNS (3,5-ácido dinitrosalicílico) proposto por Miller (1959), com modificações. A mistura da reação foi constituída de 1mL de enzima diluída, e 1mL do reagente DNS. Após homogeneização e incubação durante 8 minutos em banho a 100°C, a mistura da reação foi resfriada em banho de gelo e diluída com 8 mL de água destilada. O branco foi preparado substituindo a enzima por água destilada. A absorvância foi determinada a 540 nm. A conversão dos valores de absorvância em μmol foi feita através da equação de regressão obtida pela curva padrão de glicose.

$$y = 0,118 + 0,242 x$$

Onde: y = absorvância da amostra

X = concentração de açúcar redutor ($\mu\text{mol/mL}$)

3.8 Caracterização físico-química do extrato enzimático bruto

3.8.1 Determinação do pH ótimo

A determinação do efeito do pH sobre a atividade enzimática foi realizada incubando-se 0,1 mL do extrato enzimático em 0,4 mL de solução de amido 0,5% em diferentes valores de pH, foi utilizado tampões 0,2 M com valores de pH de 2,5 a 10,5. Os tampões utilizados foram citrato-NaOH pH 2,5, acetato pH 3,0 – 5,5, citrato-fosfato 5,5 - 7,0, Tris-HCl 7,0 - 8,5 e glicina-NaOH 8,5 - 10,5. As demais condições foram conforme procedimento do item 3.4.

3.8.2 Determinação da temperatura ótima

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi avaliado incubando-se 0,1 mL do extrato enzimático e 0,4 mL de solução de amido 0,5% em temperaturas na faixa de 25 a 95°C no pH determinado como ótimo. A atividade foi realizada de acordo com o item 3.4.

3.8.3 Determinação da estabilidade das enzimas em diferentes valores de pH

A estabilidade da enzima referente à variação do pH foi analisada através da incubação dos extratos enzimáticos durante 24 horas a uma temperatura de 25°C na ausência de substrato em tampão, variando a escala de 3,0 a 10,5. Os tampões utilizados foram o McIlvaine 0,1 M pH de 3,0 – 8,0, e o Glicina – NaOH 0,1 M pH 8,5 – 10,5. A atividade remanescente foi determinada nas respectivas condições ótimas de pH e temperatura.

3.8.4 Determinação da estabilidade das enzimas em diferentes temperaturas

As soluções enzimáticas foram mantidas por 1 hora, em ausência de substrato, em temperaturas na faixa de 10 a 95°C, com intervalos de 5°C. Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de gelo, com o intuito de paralisar o efeito da desnaturação protéica. A atividade remanescente foi determinada nas respectivas condições ótimas de pH e temperatura.

3.9 Cinética de termoinativação irreversível das enzimas

A cinética foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Rashid e Siddiqui (1998), com modificações. As enzimas foram incubadas em tampão acetato 0,2 M nos seus respectivos pHs ótimos, nas temperaturas indicadas. Periodicamente, foram retiradas as amostras, resfriadas em banho de gelo, para posterior análise das atividades residuais. As temperaturas de preincubação e os tempos para a retirada das amostras foram: 65°C a cada 5 minutos até 30 minutos; 67,5°C a cada 3 minutos até 18 minutos; 70°C a cada 2 minutos até 12 minutos; 72,5°C a cada 1 minuto até 6 minutos; 75°C a cada 30 segundos até 3 minutos; 77,5°C a cada 20 segundos até 2 minutos e a 80°C a cada 20 segundos até 2 minutos. O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) das glucoamilases foi definido como o tempo no qual após incubação a 70°C (ou outra temperatura), 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 por regressão linear do plote do logaritmo natural da atividade ($\ln a_r$) 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.

3.10 Análise dos parâmetros termodinâmicos de desnaturação enzimática

Os parâmetros termodinâmicos de desnaturação das glucoamilases, energia livre, entalpia e entropia foram calculados segundo as equações:

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

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

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

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

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

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 ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), ΔS é a entropia (J mol^{-1}), ΔH a entalpia (KJ mol^{-1}), E_{ad} a energia de ativação para desnaturação (KJ mol^{-1}). A E_{ad} será determinada por regressão linear do plote do logaritmo natural de K_d ($\ln K_d$) versus o recíproco das temperaturas absolutas ($1/T$, K) nas quais as enzimas foram irreversivelmente inativadas com cinética de velocidade de primeira ordem, de acordo com a equação 5.

3.11 Avaliação da ação das glucoamilases sobre diferentes substratos amiláceos

A ação hidrolítica das glucoamilases foi avaliada em diferentes tipos de amidos crus e gelatinizados, como amido de milho, batata e mandioca, os quais foram adquiridos junto ao Departamento de Engenharia e Ciências de Alimentos – IBILCE/UNESP. E oligossacarídeos com duas a sete unidades de glicose, sendo: maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose e maltoheptaose, e substratos sintéticos p-nitrofenil α -D-

glucopiranosídeo, p-nitrofenil β -D-glucopiranosídeo (Sigma) e também a sacarose (Merck) na concentração de 0,5%. A atividade foi realizada como descrito no item 3.4 na temperatura e pH ótimo das enzimas.

3.12 Avaliação da hidrólise do amido solúvel pelas glucoamilases mutantes e a selvagem

As soluções enzimáticas de cada linhagem foram incubadas, na presença de amido solúvel na concentração 0,5% em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 4,0, a temperatura de 60°C por um período de 96 horas, a cada 12 horas foram retiradas alíquotas para dosar a atividade e a concentração de glicose liberada. Os tubos foram mantidos hermeticamente fechados, o volume total da hidrólise foi de 12 mL , sendo 11,7 mL de solução de amido e 0,3 mL de solução enzimática bruta.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção de glucoamilases mutantes em *S. cerevisiae*

As glucoamilases mutantes do fungo *A. awamori* foram estudadas e expressas em 4 linhagens de *S. cerevisiae*, sendo uma selvagem, a linhagem WT e 3 linhagens que excretam enzimas mutantes, as linhagens MUT, M1 e M2. Para esse estudo foi usado o processo da fermentação submersa, sendo utilizados como fonte de carbono, a glicose e o amido solúvel ambos a 2%, o processo ocorreu por um período de 7 dias, e a cada 24 horas foram retiradas duas amostras de cada linhagem para análise dos seguintes parâmetros: atividade enzimática, concentração de proteínas no extrato bruto, variação do peso da biomassa, dosagem de açúcares redutores e variação do pH do meio de cultura.

A atividade foi realizada utilizando-se como substrato, soluções de maltose a 1% e amido solúvel a 0,5%, para avaliar possíveis diferenças em relação à ação das enzimas sobre esses substratos, através da quantificação de glicose liberada.

As observações realizadas em todas as linhagens permitiram concluir que o tempo de cultivo influenciou nas quantidades de enzimas produzidas. Os dados da Figura 4 A

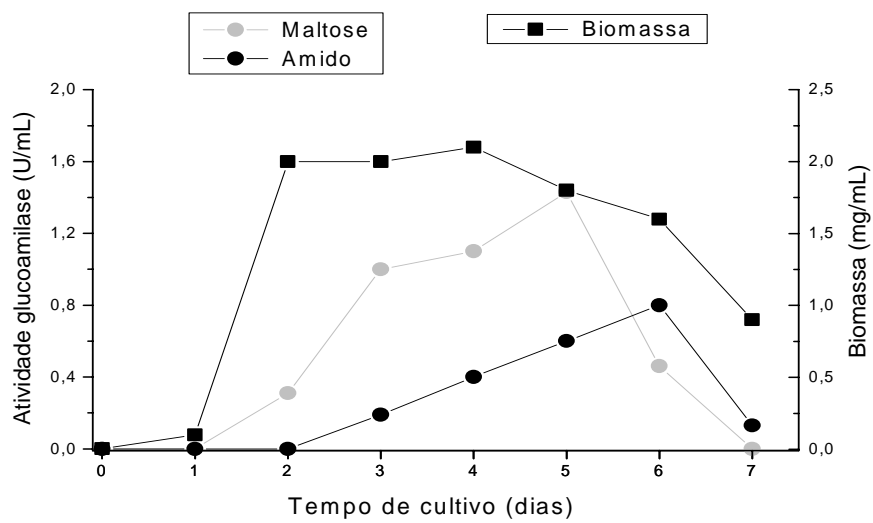
representam a média dos valores encontrados para a produção de glucoamilase da linhagem MUT. O pico de produção ocorreu no 5º dia de cultivo com 1,43 U/mL, quando o substrato utilizado para dosar a atividade foi maltose, contra outro pico de 0,8 U/mL no 6º dia de cultivo quando o substrato foi o amido solúvel. Foram observadas diferenças acentuadas na atuação da enzima sobre maltose e amido solúvel.

Na comparação entre a curva da biomassa (Fig. 4 A) e a curva da concentração protéica (Fig. 4 B) da linhagem mutante MUT, verifica-se que nas primeiras 24 horas não ocorre grande crescimento celular, pois essa fase corresponde à adaptação do microrganismo ao meio de cultura. Após esse período, o microrganismo apresenta um rápido crescimento celular, com uma biomassa de 2 mg/mL no 2º dia de fermentação, onde se inicia a fase estacionária de crescimento. A partir do 4º dia de cultivo inicia-se uma lenta redução da massa microbiana, sendo estas drasticamente reduzida a partir do 6º dia, possivelmente, devido à carência de nutrientes, e também ao acúmulo de metabólicos inibitórios no meio de cultivo.

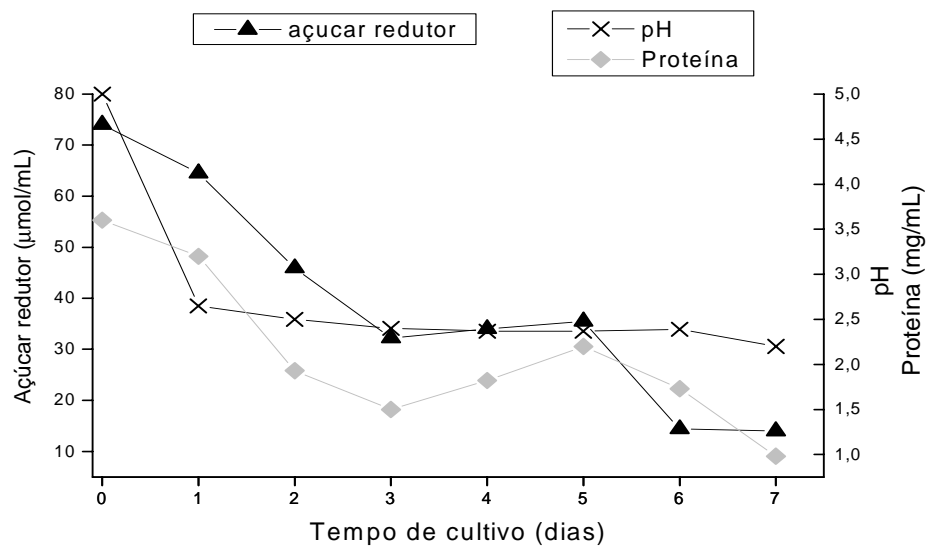
A concentração protéica foi bastante elevada no 1º dia de cultivo, devido ao enriquecimento do meio de cultura com o aminoácido histidina e também a outros componentes do meio, visto que não foi observado crescimento da biomassa nesse período.

Analisando ainda, as Figuras 4 A e B com relação às curvas de produção de glucoamilase e da concentração de proteína, nota-se que ambas apresentaram um pico em 5 dias de cultivo, podendo-se inferir que a proteína total quantificada nesse período corresponde, em sua maioria a glucoamilase excretada pelo microrganismo. Em relação à produção da enzima e à biomassa, observa-se que o maior pico de glucoamilase ocorre quando a massa celular começa a ser reduzida.

A Figura 4 B mostra a variação do pH do meio de cultura e a concentração do açúcar redutor durante o processo fermentativo. O valor inicial do pH do meio de cultura foi próximo a 5,0 unidades. Caindo rapidamente, após 24 horas de fermentação para 2,7, decrescendo durante todo o processo até um limite de 2,3. A comparação entre a variação do pH e a concentração de açúcar redutor mostra que à medida que o açúcar e nutrientes disponíveis no meio de cultura foram consumidos pela levedura, ocorreu uma acidificação do meio. Essa intensa redução do pH possivelmente se deve ao consumo de sais de amônio com a liberação de prótons para o meio de cultura, o que acidificou o meio, ou a liberação de ácidos orgânicos, etanol e CO₂ derivados do metabolismo da glicose.



(A)



(B)

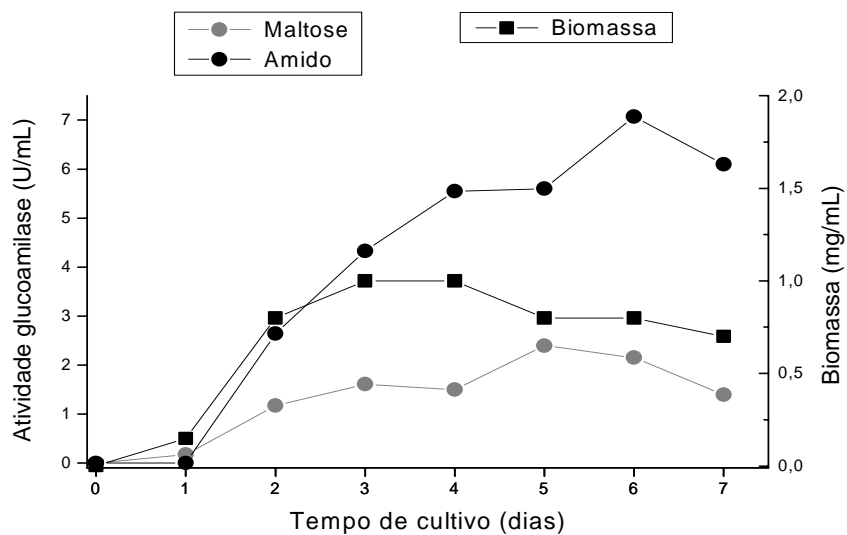
FIGURA 4. Produção de glucoamilase pela linhagem mutante MUT. (A) reação com amido e maltose como substrato e biomassa; (B) variação do pH do meio de cultivo, concentração de proteínas e de açúcar redutor.

A Figura 5 A refere-se a produção de glucoamilase pela linhagem M1, sendo observado uma diferença significativa na atividade enzimática em presença de amido solúvel e maltose. A maior produção enzimática ocorreu no 6º dia de cultivo com atividade de 7,07 U/mL na presença de amido solúvel, e na presença de maltose a maior atividade foi de 2,40 U/mL no 5º dia de fermentação.

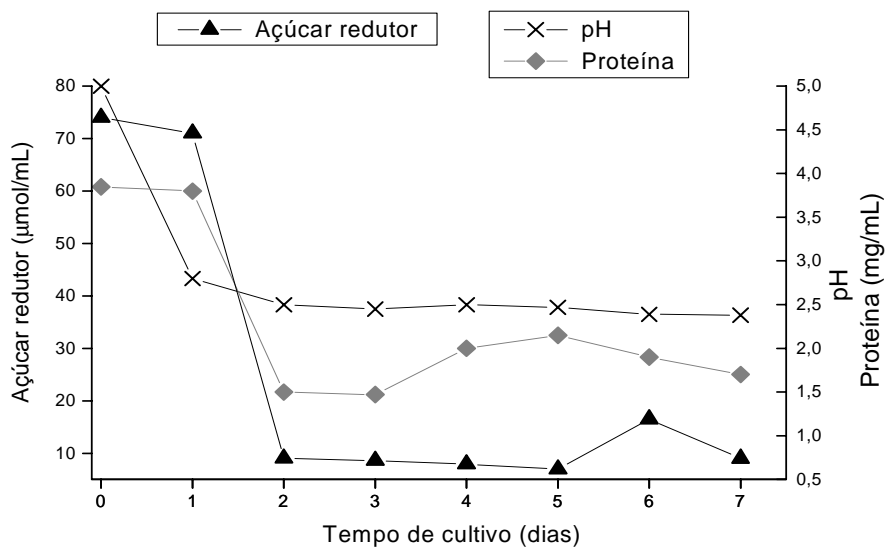
Analisando a atividade enzimática e a biomassa (Fig.5 A) observa-se que a produção mais acentuada da enzima, ocorreu no final da fermentação, após o 5º dia de fermentação.

A variação da biomassa (Fig. 5 A) da linhagem mutante M1 revela um leve crescimento celular na fase adaptativa do microrganismo, correspondendo ao 1º dia de cultivo. Conseqüentemente, não é observada atividade da enzima sobre o substrato amido solúvel e uma baixa atividade de 0,17 U/mL na presença do substrato maltose. Esses dados contrariam a alta concentração protéica de 3,8 mg/mL (Fig. 5 B), nas primeiras 24 horas de cultivo. Como mencionado esse fato está relacionado com a composição do meio de cultura, já que este foi enriquecido com aminoácido histidina, yeast nitrogen base e sulfato de amônia.

A concentração de açúcares redutores e o valor do pH do meio de cultivo (Fig. 5 B) são fortemente reduzidos entre o 1º e o 2º dia de fermentação, durante o crescimento máximo da levedura. Como se observa, a concentração de açúcar é alta nas primeiras 24 horas de cultivo (71,0 $\mu\text{mol/mL}$); como mencionado, não houve crescimento significativo do microrganismo, o que caracterizou a alta concentração de açúcar redutor neste período. No final da fermentação a concentração de açúcar no meio de cultura foi reduzido para 9 $\mu\text{mol/mL}$. Assim, como o valor do pH que também reduziu de 5,0 para 2,3 unidades. Essa intensa redução no valor pH, pode ser devido à produção de metabólitos produzidos pela levedura. Assim, a levedura consome a glicose e outros componentes do meio de cultivo, liberando compostos para o meio extracelular. Tal característica também foi observada para as outras linhagens.



(A)



(B)

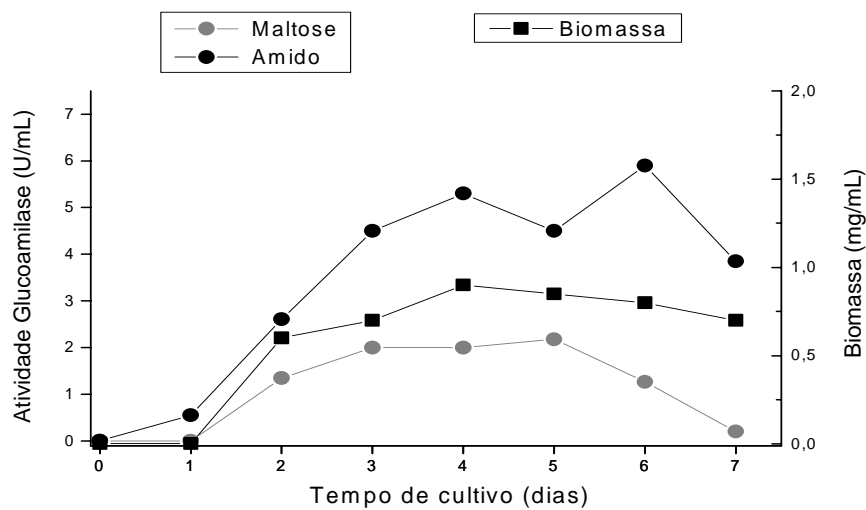
FIGURA 5. Produção de glucoamilase pela linhagem mutante M1. **(A)** reação com amido e maltose como substrato e biomassa; **(B)** variação do pH do meio de cultivo, concentração de proteínas e de açúcar redutor.

Para a linhagem mutante M2 nota-se, que o tempo de cultivo também influenciou na atividade enzimática (Fig. 6 A). Houve diferenças na atividade da glucoamilase sobre os substratos de reação, amido solúvel e maltose. O pico de produção foi observado no 6° dia de fermentação, com atividade máxima de 5,90 U/mL, quando a atividade foi dosada em presença do substrato amido solúvel. Em presença do substrato maltose a melhor atividade foi observada no 5° dia de produção com atividade de 2,18 U/mL. A atividade enzimática sobre a maltose apresentou-se linear durante todo o período de cultivo, decaindo a partir do 6° dia.

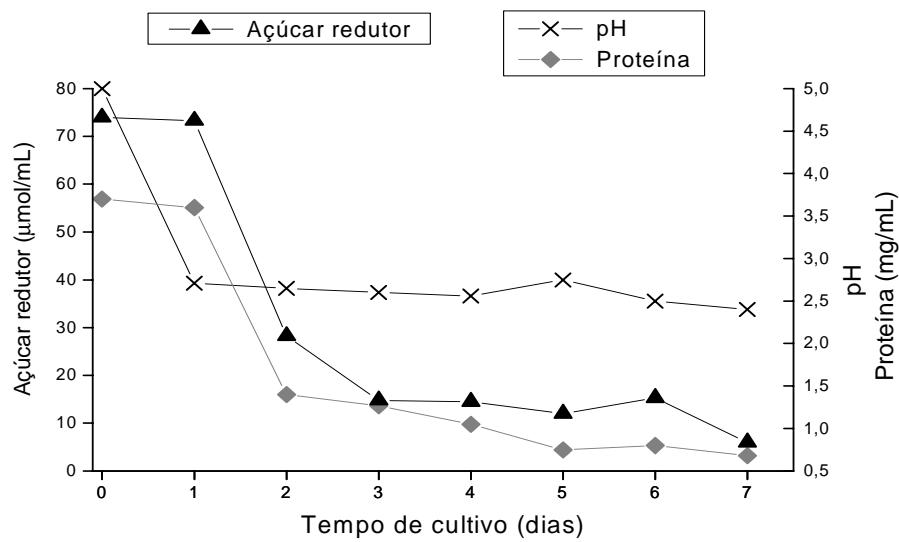
A curva de biomassa (Fig. 6 A) apresentou uma fase de crescimento mais longa, a maior concentração da biomassa foi de 0,9 mg/mL no 4° dia de fermentação, com um leve decréscimo a partir 6° dia de cultivo. Como ocorreu para as outras linhagens, o pico de atividade enzimática e a concentração protéica ocorreram no final da fermentação.

Os dados da Figura 6 B representam a concentração de proteína no extrato enzimático bruto. Como mencionado para as linhagens anteriores, a alta concentração de proteína no início da fermentação se deve aos constituintes do meio de cultivo, uma vez que o crescimento microbiano é bastante discreto. Porém, apesar da concentração de proteínas ser relativamente baixa nos últimos dias de cultivo quando comparada com as outras linhagens estudadas, a glucoamilase produzida pela linhagem mutante M2 apresentou boa atividade enzimática em ambos os substratos, indicando possivelmente, que a proteína total quantificada correspondeu em sua maioria a glucoamilase excretada pela levedura.

Como constatado na Figura 6 B, a alta concentração de açúcar redutor foi mantida nas primeiras 24 horas de fermentação (73,5 $\mu\text{mol/mL}$), sendo este consumido na fase de crescimento máximo da levedura entre o 1° e o 2° dia, ao término do período de fermentação esse nível foi para 6,0 $\mu\text{mol/mL}$. O valor do pH do meio, como nos outros casos também foi drasticamente reduzido durante a fermentação.



(A)



(B)

FIGURA 6. Produção de glucoamilase pela linhagem mutante M2. (A) reação com amido e maltose como substrato e biomassa; (B) variação do pH do meio de cultivo, concentração de proteínas e de açúcar redutor.

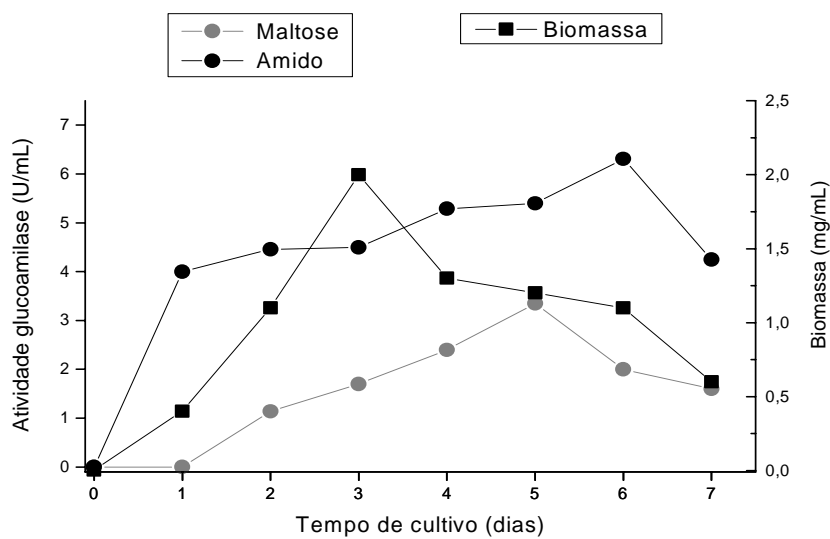
A linhagem selvagem WT também apresentou perfil de atividade sobre ambos os substratos diferenciados durante todo o processo fermentativo (Fig. 7A). A glucoamilase selvagem apresentou atividade enzimática mais acentuada sobre o amido solúvel. É evidenciado um pico de atividade de 6,31 U/mL no 6° dia de fermentação na presença de amido, e um outro pico menor com atividade de 3,35 U/mL sobre o substrato maltose no 5° dia de cultivo.

Comparando os gráficos referentes à concentração de proteínas no extrato bruto e a biomassa (Fig. 7 A e B). Observa-se que a real produção de proteínas ocorre no 4° e 5° dia de cultivo, durante a fase de redução da massa celular, sendo essa característica também observada para as linhagens mutantes. Em relação à curva da biomassa, nota-se um crescimento significativo nas primeiras 24 horas de cultivo, porém, a maior concentração da biomassa é evidenciada no 3° dia de fermentação com 2 mg/mL. Posteriormente, ocorre uma redução da massa microbiana que foi bastante acentuada a partir do 6° dia.

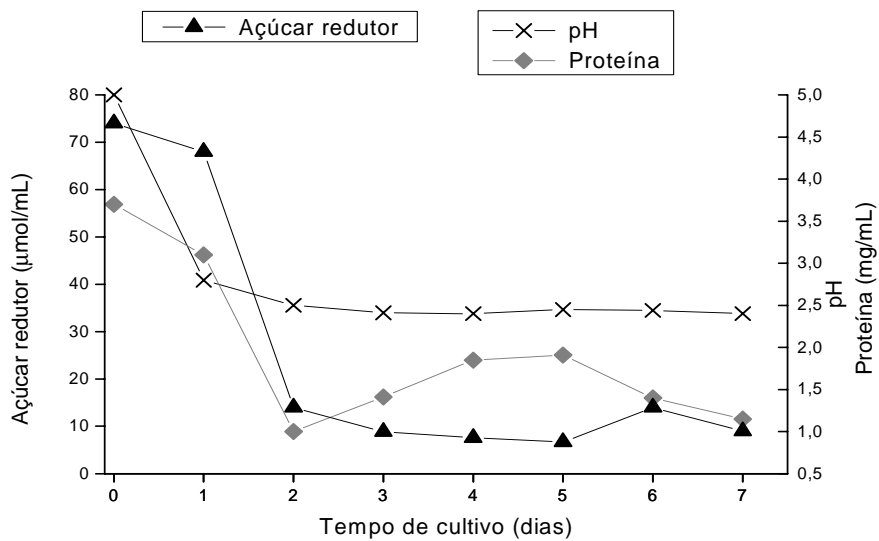
A Figura 7 B refere-se a variação do pH do meio de cultura e a dosagem de açúcar redutor. É claramente observado neste caso, que também ocorre uma acidificação do meio de cultura, e uma redução no nível de açúcar redutor, assim como ocorreu para as outras linhagens.

Os dados obtidos com o cultivo das linhagens mutantes MUT, M1 e M2 e a linhagem selvagem WT indicam diferenças na atividade de glucoamilase, quando em presença de amido solúvel e maltose como substrato de reação. A glucoamilase mutante MUT atuou melhor quando o substrato utilizado foi à maltose, enquanto as demais enzimas mutantes e a selvagem hidrolisaram melhor o amido solúvel.

As diferenças na atividade podem estar relacionada com o tamanho da molécula do substrato, uma vez que a taxa de hidrólise de ligações α -1,4 por glucoamilase aumenta com o peso molecular, sendo mais eficientes em seqüências maiores que maltopentaose e cerca de cinco vezes menor em maltose (MANJUNATH et al., 1983). Essa diferença também pode ser explicada pelas características intrínsecas da maltose e do amido como, por exemplo, a presença de maior concentração de extremidades não redutoras do amido, quando comparado com a maltose (FAGERSTRON et al., 1990). Visto que, a ação da enzima ocorre no final das extremidades não redutoras dessas moléculas.



(A)



(B)

FIGURA 7. Produção de glucoamilase pela linhagem selvagem WT. (A) reação com amido e maltose como substrato e biomassa; (B) variação do pH do meio de cultivo, concentração de proteínas e de açúcar redutor.

Analisando o gráfico de peso seco referente à biomassa de todas as linhagens, observa-se uma curva de crescimento típica. Apenas a linhagem selvagem apresentou crescimento nas primeiras 24 horas de cultivo, para os mutantes, não foi observado crescimento significativo nesse período, representando a fase de adaptação do microrganismo ao meio de cultura. Após o 1º dia de cultivo todas as linhagens iniciaram a fase de crescimento máxima. Para as linhagens M1 e M2 a fase estacionária foi mais longa, entre o 2º e 6º dia de cultivo, para a linhagem MUT a fase estacionária foi mais curta entre o 2º e 4º dia de cultivo. A linhagem selvagem provavelmente, apresentou a menor fase estacionária, sendo inferior a 24 horas, já que não foi observada. A redução da biomassa começa a ocorrer a partir do 3º dia para a linhagem selvagem WT, e do 4º para a linhagem MUT, e somente no 6º dia as linhagens M1 e M2. A redução da biomassa, geralmente é acompanhada pela depleção dos nutrientes essenciais do meio de cultura, e também por acúmulo de produtos metabólicos inibitórios produzidos durante a fermentação.

Em resumo, a biomassa das linhagens mutantes MUT, M1, M2 e a linhagem selvagem WT indicaram que, a linhagem selvagem e a linhagem MUT apresentaram crescimento de cerca de 2 mg de biomassa por mL do meio de cultivo, enquanto as linhagens mutantes M1 e M2, apresentaram praticamente a metade desse valor, em média 0,9 mg/mL de biomassa. Entretanto, essa maior concentração da biomassa não mostrou ser vantajosa para as linhagens selvagem e mutante MUT, pois quando a atividade específica em U/mg de biomassa foi calculada observa-se um melhor desempenho da linhagem M1 (8,75 U/mg biomassa) Tabela 4. A linhagem mutante M2 e a linhagem selvagem apresentaram desempenho comparável em relação à atividade específica com 7,40 e 7,16 U/mg de biomassa, respectivamente (Tabela 4). Porém, quando a atividade específica foi calculada em U/mg de proteína (Tabela 5) verificou-se um excelente desempenho da linhagem mutante M2 com 7,37 U/mg de proteínas, seguido pela linhagem selvagem e mutante M1, que também apresentaram um bom desempenho. Observa-se, em ambos os casos que a linhagem mutante MUT apresentou uma baixa atividade específica (Tabela 4 e 5).

De forma geral, observa-se que, a maior produção enzimática ocorre no final da fermentação entre o 5º e 6º dia de cultivo, quando a massa celular começa a ser reduzida. Esses dados diferem de outros encontrados na literatura, que mostram que a maior produção de glucoamilase de origem fúngicas em meio contendo amido ocorre no início do crescimento (FIEROBE, et al., 1997; JIN et al., 1999; STAMFORD et al., 2002; KAUR; SATYANARAYANA, 2004 e SILVA et al., 2005). Como a produção enzimática é um

complexo processo dependente do metabolismo celular, uma possível explicação para o fato é a repressão catabólica exercida pela glicose, onde este açúcar em alta concentração no meio de cultura pode atuar como um inibidor da síntese protéica, porém, quando há escassez de glicose, o amido se torna à fonte alternativa, levando o microrganismo a produzir enzimas para degradá-lo, por isso, a produção de glucoamilase foi tardia.

A análise dos gráficos referente ao consumo dos açúcares redutores de todas as linhagens, confirma a idéia de repressão catabólica, já que após 24 horas de fermentação ocorre uma redução no nível de glicose, que é mantida baixa até que o amido seja degradado, ocorrendo uma elevação na concentração de glicose no 6º dia de cultivo, que corresponde ao pico de produção da glucoamilase.

A mutação parece não ter afetado a produção de glucoamilase nas linhagens mutantes M1 e M2, quando comparada com a linhagem selvagem. Já que esses mutantes apresentaram um ótimo desempenho em relação à atividade específica (Tabela 4 e 5).

Tabela 4. Atividade específica (U/mg de biomassa) das glucoamilases mutantes e a selvagem.

Linhagens	Atividade Específica (U/mg de biomassa)	
	<i>Substrato Amido</i>	<i>Substrato Maltose</i>
Mutante MUT	0,5	0,79
Mutante M1	8,75	2,68
Mutante M2	7,40	2,56
Selvagem WT	7,16	2,70

Tabela 5. Atividade específica (U/mg de proteína) das glucoamilases mutantes e a selvagem.

Linhagens	Atividade Específica (U/mg de proteína)	
	<i>Substrato Amido</i>	<i>Substrato Maltose</i>
Mutante MUT	0,44	0,65
Mutante M1	3,75	1,12
Mutante M2	7,37	2,91
Selvagem WT	4,50	1,76

Com os resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que não houve diferenças significativas na quantidade de proteína secretada pelas linhagens mutantes em relação à enzima produzida pela linhagem selvagem, indicando possivelmente, que a mutação também não afetou a produção de proteínas pelos microrganismos. No trabalho de Wallis e colaboradores (2001), mutantes de *A. niger* produziram 50% menos proteínas no meio extracelular durante o cultivo, quando comparado com outra linhagem estudada.

Embora a concentração protéica no extrato bruto e a biomassa da linhagem mutante MUT sejam relativamente altas, quando comparada com as outras linhagens estudadas, esta não refletiu em uma melhor atividade da enzima, possivelmente indicando que, apesar da enzima estar sendo produzida pelo microrganismo, ela apresenta uma baixa taxa de hidrólise em ambos os substratos, mais precisamente sobre o amido.

Alguns trabalhos correlacionam mutações com baixa atividade da enzima. 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 feitas na região da α -hélice 11 de glucoamilase de *A. awamori*, sintetizada e excretada por levedura tornaram a enzima inativa (Da SILVA, 1999).

As mutações feitas nos resíduos Asp 176 \rightarrow Glu e Glu 180 \rightarrow Asp realizadas no gene da glucoamilase 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).

A comparação dos resultados obtidos no presente trabalho com dados da literatura indica que os mesmos são satisfatórios, em se tratando de microrganismos mutantes. Fierobe e colaboradores (1997) produziram mutantes de *Aspergillus awamori* expressas por *Pichia pastoris* em maltose depois de 48 horas com atividade de $7,8 \pm 0,8$ U/mL. Quando a mutação no resíduo Ala 39 \rightarrow Val foi realizada em glucoamilase de *Aspergillus awamori* expressa em *Saccharomyces cerevisiae*, esta apresentou uma atividade de 0,09 U/mL. A mutação no resíduo Pro 128 \rightarrow Ser, produziu glucoamilase com atividade de 0,26 U/mL (FLORY et al., 1994).

Quando os resultados foram comparados com outras glucoamilases fúngicas, estes também foram significativos. Souza (2003) produziu glucoamilase de *Thermoascus aurantiacus*, cuja atividade máxima foi de 13,56 U/mL na presença do substrato maltose e

glucoamilase de *Aspergillus* sp A1.2 com atividade máxima de 6,58 U/mL na presença de amido. A glucoamilase produzida pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626 exibiu uma atividade máxima de 4,5 U/mL (NGUYEN et al., 2002). Já a glucoamilase produzida pelo fungo *Mucor* sp A 13.36 apresentou atividade de 0,33 U/mL em 48 horas de cultivo (SILVA et al., 2005). A glucoamilase do fungo *A. awamori* estudada por Koutinas e colaboradores (2003), em fermentação líquida apresentou um pico de produção de 5,1 U/mL próximo a 50 horas de fermentação.

Foi uma constante no processo fermentativo para todas as linhagens estudadas a acidificação do meio em função do tempo de cultivo. Antes da fermentação o valor do pH do meio de cultura era pH 5,0, sendo reduzido para pH 2,4 no final do processo fermentativo. Essa intensa redução de pH pode ser devido à liberação de prótons para o meio de cultura derivado do consumo de sais de amônia. Segundo Raimbault (1998), os valores de pH durante o processo fermentativo podem ser alterados em função dos produtos do metabolismo produzido pelo microrganismo, podendo ocorrer à produção de ácido acético, ácido láctico e ácido cítrico que causam uma redução dos valores de pH. Para Crabb e Mitchinson (1997), a glicose pode servir de substrato para fermentação e ser convertida em etanol, aminoácidos, ácidos orgânicos ou outros produtos com ou sem valor comercial.

O valor do pH de um meio de cultura pode influenciar o crescimento microbiano, pois os microrganismos, são capazes de crescer numa variação de pH de aproximadamente duas unidades fora do ponto ótimo de crescimento do microrganismo. Essa limitação do crescimento tem sido associada com a redução da produção e também atividade de enzimas extracelulares (MADIGAN et al., 2003). Além disso, após as 24 horas iniciais de fermentação, o pH do meio de cultura cai, e 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 CO₂ com produção de oxaloacetato para a manutenção de ciclo do ácido cítrico (GUPTA; MAHESHWARI, 1985).

Foi observado que alterações nos valores de pH durante a fermentação pode depender do tipo de microrganismo utilizado no processo fermentativo. Geralmente, em fermentação líquida os fungos *Aspergillus* sp, *Penicilium* sp e *Rhizopus* sp provocam uma intensa redução do pH, que pode ser abaixo de 3,0. Para outros fungos, como *Trichoderma*, *Pleurotus* sp o valor do pH do meio tende a permanecer mais estável entre 4,0 e 5,0 (RAIMBAULT, 1998). Para as leveduras essa redução vai depender do tipo de metabolismo desenvolvido pelo microrganismo durante o cultivo, 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. Para a levedura *S. cerevisiae* a glicose em alta concentração pode causar a repressão da respiração em um efeito conhecido como efeito Crabtree, ou também como fermentação aeróbica. Assim, algumas enzimas do ciclo do ácido cítrico como a fumarase, a citrato sintetase e a malato desidrogenase são inibidas por compostos intermediários. Isso poderá causar a repressão da respiração levando o microrganismo a fazer a fermentação aeróbica, e assim poderá ocorrer à produção de etanol e ácidos mesmo na presença de oxigênio.

A *Saccharomyces* também é bem conhecida pelo seu alto poder de fermentação com habilidade para sobreviver em ambientes extremos com altas concentrações de etanol, entretanto, naturalmente não possui habilidade para hidrolisar o amido ou dextrinas (KNOX, et al., 2004).

Swift e colaboradores (2000), estudaram fontes de nitrogênio para produção de glucoamilase recombinante de *Aspergillus niger*. Observaram que a escolha do pH também é importante na produção de glucoamilase, quando o microrganismo cresceu em pH baixo a enzima foi produzida por um período de tempo maior.

A característica mais fascinante dos microrganismos é sem dúvida a sua habilidade em adaptar-se a ambientes inóspitos para a maioria dos seres, onde a variação de fatores como pH, temperatura, teor de umidade e a concentração de sal ultrapassam os valores considerados como ótimos para a maioria dos organismos vivos.

4.2 Caracterização físico-química das glucoamilases de *A. awamori* expressas em *S. cerevisiae*.

Os ensaios para a caracterização das enzimas foram realizados a partir das soluções enzimáticas brutas obtidas por fermentação submersa. O tempo de cultivo usado foi aquele correspondente ao de melhor atividade. Foram avaliados pH e temperatura ótima de atividade, assim como, a estabilidade das glucoamilases frente às variações de pH e temperatura.

Todas as enzimas apresentam um valor de pH ótimo, ou uma faixa de pH no qual sua atividade é máxima. As curvas de variação da atividade das enzimas em diferentes valores de pH refletem o pH no qual importantes grupos doadores ou receptores de prótons no sítio catalítico estão em seus estados de ionização adequados (LEHNINGER, 1995). Frequentemente valores extremos de pH desnaturam as proteínas, inativando-as.

As glucoamilases mutantes M1 e M2 e a selvagem apresentaram atividade ótima em pH 3,5 – 4,0 (Fig. 9, 10 e 11 respectivamente), enquanto que a enzima mutante MUT exibiu atividade ótima em pH 4,0 (Fig. 8). O valor do pH ótimo encontrado para as enzimas estudadas neste trabalho está na faixa relatadas em outros estudos da literatura, e também se enquadra ao 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) produziram glucoamilase com pH ótimo de atividade de 4,5. A glucoamilase produzida por *Aspergillus oryzae* estudada por Hata e colaboradores (1997) também apresentou um pH ótimo de 4,5.

A glucoamilase de *Aspergillus* sp N-2 apresentou pH ótimo na faixa de 3,5 - 4,5 e a glucoamilase de *A. awamori* var. *Kawachi* um pH ótimo de 3,8 (VIHINEN; MANTSALA, 1989). O pH ótimo da glucoamilase desglicosilada de *Aspergillus niger* foi de 4,8 (JAFARI-AGHDAM et al., 2005). A glucoamilase obtida da linhagem mutante de *Neurospora crassa* exibiu pH ótimo de 5,0 unidades em maltose (SPINELLI et al., 1996).

Em relação à estabilidade das enzimas frente às variações de pH, verifica-se que a enzima mutante MUT (Fig. 8) obteve a melhor estabilidade no pH 5,5. Essa glucoamilase apresentou estabilidade numa faixa estreita de pH, entre 4,0 a 6,5, ocorrendo uma perda na estabilidade de 40% no pH 7,0. A glucoamilase MUT não apresentou estabilidade em valores de pH maiores que 7,5.

Comportamento distinto à variação de valores de pH foi observado para a glucoamilase mutante M1 (Fig. 9). Esta enzima foi estável numa ampla faixa de pH, apresentando 100% de atividade no pH 6,5 e manteve acima de 80% de atividade entre pH 6,0 e 10,0.

A enzima mutante M2 também foi estável numa faixa ampla de pH, com 100% de atividade em pH 7,0, retendo mais de 80% da atividade entre o pH 6,0 e 9,5 (Fig. 10).

A Figura 11 refere-se à estabilidade da enzima selvagem, esta reteve 100% de atividade no pH 6,5. Sua faixa de estabilidade foi mais estreita que as glucoamilases mutantes M1 e M2, pois manteve 80% de sua atividade apenas entre o pH 5,0 e 7,0. Quando em pH básico, esta teve sua atividade reduzida, perdendo mais de 50% de sua atividade em pH 9,0 e quase 80% em pH 10,0.

Esses dados corroboram com dados divulgados na literatura para glucoamilases. As glucoamilases fúngicas geralmente são estáveis em uma faixa de pH entre 3,0 a 8,0. Como a glucoamilase de *Streptosporangiuns* sp estudada por Stamford e colaboradores (2002), e a

glucoamilase do fungo *Acremonium* sp (MARLIDA et al., 2000), que foram estáveis a valores de pH entre 3,0 e 8,0. A glucoamilase produzida pelo fungo *Paecilomyces variotii* foi estável entre o pH 3,0 a 7,5 (MICHELIN, 2005).

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 desglicosilada 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 desglicosilada a faixa de estabilidade foi de 2,0 a 9,0.

Em relação à estabilidade ao pH das glucoamilases, verifica-se que as enzimas mutantes M1 e M2, mostraram-se bastante estáveis em toda a faixa de pH testada. A ampla faixa de atuação das glucoamilases pode ser uma vantagem segura na indústria, visto que não há necessidade de correção do pH no processo de sacarificação do amido na produção de xarope.

McMahon e colaboradores (1999) mencionaram que o pH leva a diferenças de ionização dos aminoácidos no interior da estrutura primária das enzimas e, dessa forma, pode influenciar características como a termoinativação e suscetibilidade da enzima.

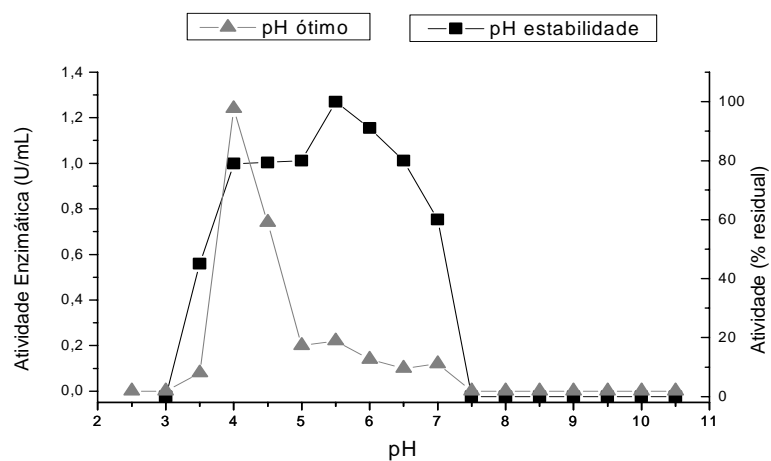


Figura 8. pH ótimo e de estabilidade da glucoamilase mutante MUT (pH ótimo: tampão citrato-NaOH pH 2,5; tampão acetato de sódio pH 3,0 a 4,5; tampão citrato-fosfato pH 5,0 a 7,0; tampão Tris-HCl pH 7,5 a 8,5 e tampão glicina-NaOH pH 9,0 a 10,5). Estabilidade em ausência de substrato, frente à variação de pH (tampão McIlvaine pH 3,0 a 8,0 e glicina-NaOH pH 8,5 a 10,5).

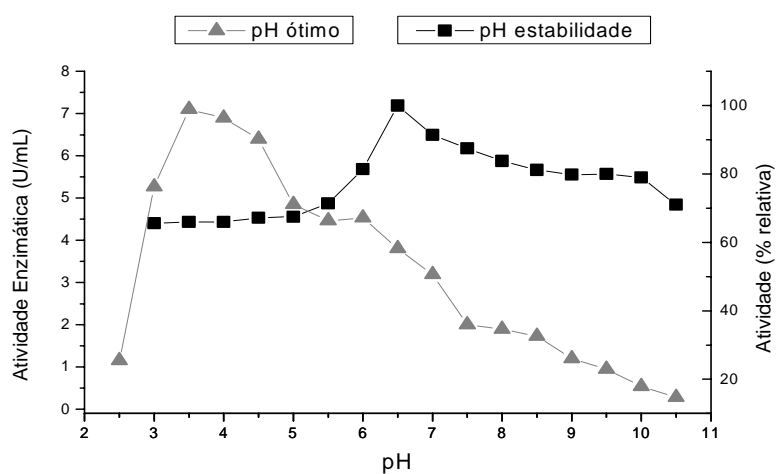


Figura 9. pH ótimo e de estabilidade da glucoamilase mutante M1 (pH ótimo: tampão citrato-NaOH pH 2,5; tampão acetato de sódio pH 3,0 a 4,5; tampão citrato-fosfato pH 5,0 a 7,0; tampão Tris-HCl pH 7,5 a 8,5 e tampão glicina-NaOH pH 9,0 a 10,5). Estabilidade em ausência de substrato, frente à variação de pH (tampão McIlvaine pH 3,0 a 8,0 e glicina-NaOH pH 8,5 a 10,5).

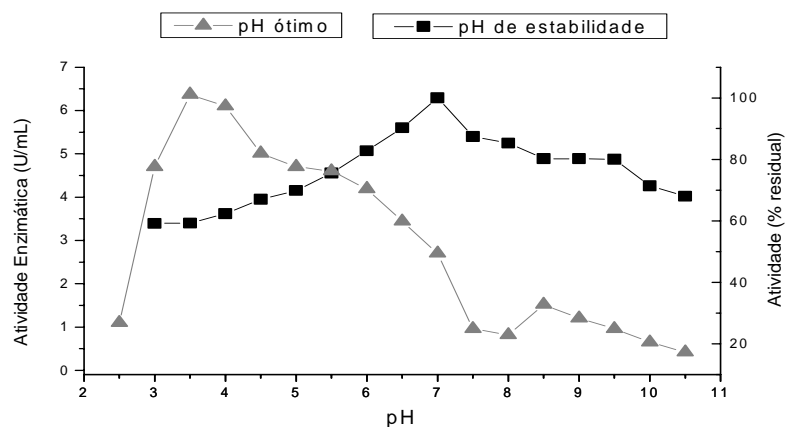


Figura 10. pH ótimo e de estabilidade da glucoamilase mutante M2 (pH ótimo: tampão citrato-NaOH pH 2,5; tampão acetato de sódio pH 3,0 a 5,0; tampão citrato-fosfato pH 5,5 a 7,0; tampão Tris-HCl pH 7,5 a 8,0 e tampão glicina-NaOH pH 8,5 a 10,5). Estabilidade em ausência de substrato, frente à variação de pH (tampão McIlvaine pH 3,0 a 8,0 e glicina-NaOH pH 8,5 a 10,5).

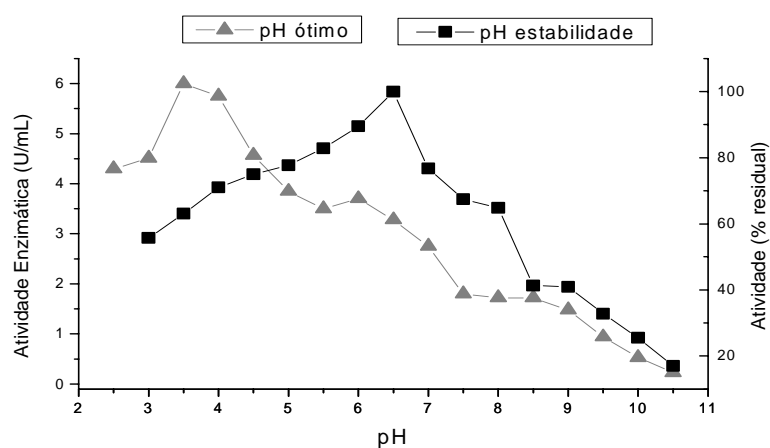


Figura 11. pH ótimo e de estabilidade da glucoamilase selvagem WT (pH ótimo: tampão citrato-NaOH pH 2,5; tampão acetato de sódio pH 3,0 a 5,0; tampão citrato-fosfato pH 5,5 a 7,0; tampão Tris-HCl pH 7,5 a 8,5 e tampão glicina-NaOH pH 9,0 a 10,5). Estabilidade em ausência de substrato, frente à variação de pH (tampão McIlvaine pH 3,0 a 8,0 e glicina-NaOH pH 8,5 a 10,5).

O efeito da temperatura numa reação enzimática pode ser observado inicialmente através do aumento progressivo na atividade, devido ao aumento da velocidade de formação do produto e conseqüentemente consumo do substrato. Entretanto, verifica-se que há uma temperatura limite para cada enzima, acima da qual começa a ocorrer perda gradativa da atividade, possivelmente devido à desnaturação protéica pelo calor, como resultado da perda da conformação nativa (LEHNINGER et al., 1995).

A temperatura na qual os níveis enzimáticos são máximos corresponde a temperatura ótima e representa o estado em que a molécula apresenta-se numa conformação ideal para a sua melhor eficiência.

A temperatura ótima de atividade da glucoamilase mutante MUT foi de 50°C (Fig.12). As linhagens M1 e M2 apresentaram temperatura ótima a 68 e 65°C, respectivamente. Esses dados estão representados nas Figuras 13 e 14. Acima dessa temperatura foi observada uma queda brusca da atividade para ambas glucoamilases.

A glucoamilase selvagem apresentou atividade ótima a 58°C (Fig. 15). Acima dessa temperatura a atividade cai, sendo que, a 60°C perde cerca de 20% de sua atividade e a 65°C retém apenas cerca de 50% da atividade. A 75°C a enzima é totalmente inativada devido à desnaturação protéica.

A temperatura ótima das glucoamilases fúngicas geralmente está na faixa de 50 a 60°C (NOROUZIAN et al., 2006). 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 (2005). A glucoamilase de *Aspergillus oryzae* cultivada em fermentação submersa apresentou temperatura ótima de 65°C, e a enzima produzida em fermentação sólida apresentou temperatura de 56°C (HATA et al., 1997).

A glucoamilase mutante de *Aspergillus terreus* NA -170 pesquisada por Grosh e colaboradores (1991), e a glucoamilase de *Neurospora crassa* denominada de *Exo-1* mutante, estudada por Spinelli e colaboradores (1996), apresentaram temperaturas ótimas 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.

De forma geral, as linhagens estudadas apresentaram tolerância a temperaturas inferiores aos seus valores de temperaturas ótimos. Observa-se na Figura 12, que a glucoamilase mutante MUT foi extremamente instável a elevação de temperatura retendo 100% de atividade, apenas em temperaturas menores que 10°C no intervalo de tempo de 1

hora. Após o mesmo tempo, a 25°C a enzima apresentou 79% de sua atividade. Quando incubada em temperaturas de 45 e 50°C, essa reteve 41% da atividade, sendo totalmente inativada a 65°C.

A enzima mutante M1 mostrou-se estável em temperatura de até 50°C, preservando 100% de sua atividade (Fig. 13). Quando incubada a 55°C por 1 hora a enzima ainda manteve 95% da atividade, porém a 60°C perdeu 50% da atividade, e a 95°C, esta ainda apresentou 1% da sua atividade residual.

A glucoamilase mutante M2, (Fig. 14) exibiu uma faixa maior de estabilidade frente à variação de temperatura com 100% de sua atividade quando incubada por 1 hora em temperatura de até 55°C, mantendo 91% da atividade a 60°C, e a 65°C apresentou 73%. A 95°C ainda reteve 2,4% de sua atividade residual.

A glucoamilase selvagem WT (Fig. 15) apresentou estabilidade numa faixa mais estreita de temperatura, sendo 100% estável até a temperatura de 45°C por 1 hora na ausência de substrato, após o mesmo tempo a 50°C esta apresentou 92% de sua atividade. Quando incubada a 55°C a enzima reteve 70%, 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 enzima de *Aspergillus awamori* IFO 4033 apresentou temperatura de estabilidade abaixo de 50°C (VIHINEN; MANTSALA, 1989). A glucoamilase produzida pelo fungo *Mucor* sp A 13.36 apresentou estabilidade até 60°C (SILVA et al., 2005). A glucoamilase do fungo *Paecilomyces variotii* a 60°C apresentou 95% de estabilidade por 5 minutos (MICHELIN, 2005).

Muitas glucoamilases fúngicas são estáveis a altas temperaturas, porém, por um curto intervalo de tempo (OKOLO et al., 2001).

A mutação ocorrida no gene de expressão das linhagens M1 e M2 mostraram bons resultados, pois estas apresentaram características de temperatura ótima e de estabilidade superiores aos da enzima selvagem.

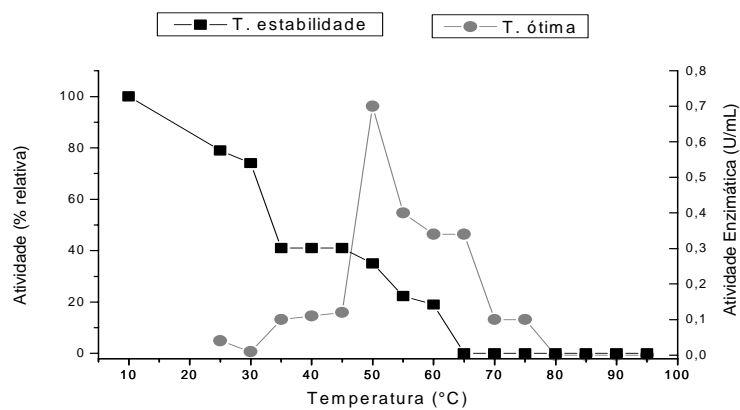


Figura 12. Temperatura ótima e de estabilidade da glucoamilase mutante MUT.

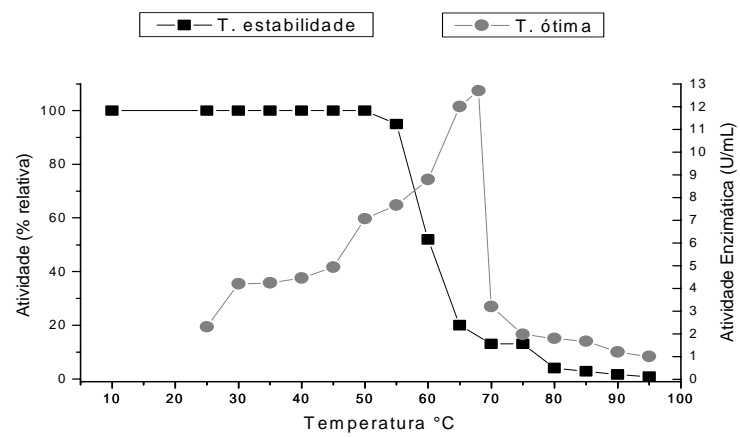


Figura 13. Temperatura ótima e de estabilidade da glucoamilase mutante M1.

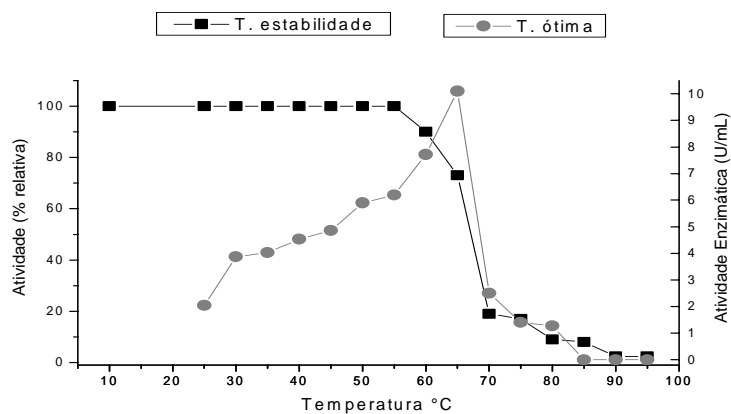


Figura 14. Temperatura ótima e de estabilidade da glucoamilase mutante M2.

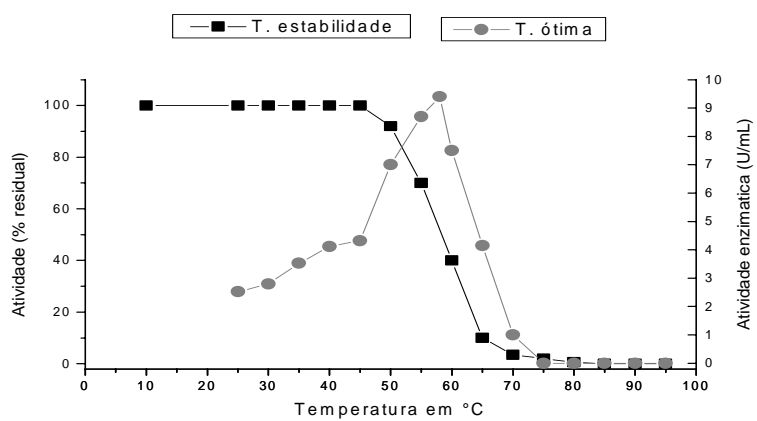


Figura 15. Temperatura ótima e de estabilidade da glucoamilase selvagem WT.

4.3 Comparação da estabilidade das glucoamilases mutantes em relação a glucoamilase selvagem frente às variações de pH e temperatura.

Os dados rerepresentados na Figura 16 A e B, referem-se as estabilidades das glucoamilases mutantes e a selvagem, esses resultados também estão sumarizados na Tabela 6. Observar-se na Figura 16 A que todas as enzimas são estáveis no pH neutro (próximo ao intervalo 6,0 – 7,5). No gráfico também é evidenciado que a glucoamilase selvagem foi ligeiramente mais estável que os mutantes M1 e M2 na faixa de pH ácido. No pH 7,0 a enzima perdeu 20% da atividade, e no pH básico (10) a perda foi mais significativa chegando a 80%.

A glucoamilase MUT novamente mostrou-se bastante instável, atuando em uma faixa estreita de pH, entre os valores de pH 3,5 – 7,0.

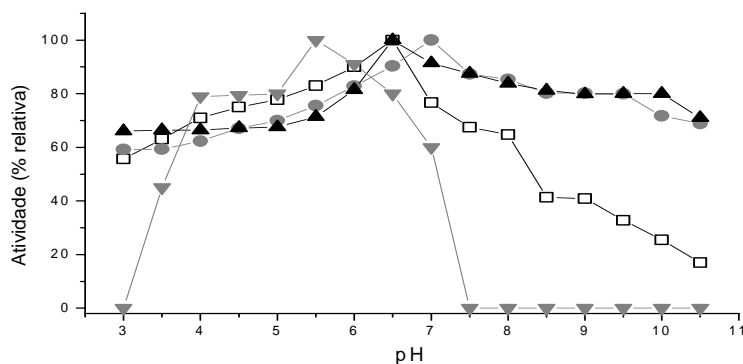


Figura 16 A. Comparação da estabilidade ao pH das glucoamilases mutantes em relação a selvagem.

□ – linhagem selvagem; ▲ – mutante M1; ● – mutante M2 e ▼ – mutante MUT.

A glucoamilase selvagem e a mutante MUT apresentaram valores que coincidem com dados encontrados na literatura, para glucoamilases produzidas por espécies do gênero *Aspergillus*, as quais têm se mostrado estável em pH que variam entre 3,0 – 8,0. Como, por exemplo, a glucoamilase de *A. terreus* CTC 826 (ALI; HOSSAIN, 1991) e a glucoamilase mutante de *A. terreus* NA - 170 (GHOSH et al., 1991) com estabilidade na faixa de pH 3,0 a 7,0. Já a glucoamilase de *Streptosporangium* sp estudada por Stamford e colaboradores

(2002) foi estável a pH 3,0 - 8,0. Entretanto, as glucoamilases produzidas pelas linhagens M1 e M2 apresentaram estabilidade superiores àquelas relatadas na literatura.

As glucoamilases M1 e M2 apresentaram perfis semelhantes com relação à estabilidade ao pH. Entretanto, a glucoamilase mutante M2 exibiu a maior estabilidade no pH 7,0, enquanto a glucoamilase secretada pelo mutante M1 foi mais estável no pH 6,5 coincidindo, neste aspecto, com a enzima selvagem.

Pode-se observar que as glucoamilases M1 e M2 foram mais estáveis à variação do pH alcalino, quando comparado com a glucoamilase selvagem. Esse resultado contribui para mostrar que houve mutação, resultando em alterações na estrutura da proteína, e, conseqüentemente, possibilitando maior estabilidade à variação de pH alcalino das enzimas mutantes.

As observações efetuadas na Figura 16 B referentes a termoestabilidade permitem concluir que, as glucoamilases mutantes M1 e M2 apresentaram termoestabilidade superior a glucoamilase selvagem.

A glucoamilase secretada pela linhagem MUT foi a que se mostrou mais termolábil à variação de temperatura. Perdendo atividade a partir de 10°C.

A glucoamilase mutante M2 mostrou ser a mais termoestável dentre todas as enzimas estudadas. Quando incubada a 55°C por 1 hora, ela apresentou 100% de sua atividade, sendo superior às demais, que apresentaram 70% para a glucoamilase selvagem; 95% para a linhagem M1 e 22,3% para o mutante MUT, quando incubadas nas mesmas condições de ensaio. Porém, quando mantida a 60°C, essa diferença foi ainda mais significativa, pois a glucoamilase mutante M2 reteve 91% da atividade residual, contra 52% do mutante M1, 40% da selvagem; e 19% do mutante MUT.

As linhagens M1 e M2 apresentaram sinais positivos à mutação, já que bons resultados foram alcançados. Estas enzimas apresentaram termoestabilidade superior a glucoamilase selvagem, sendo, portanto, mais resistentes à desnaturação protéica. Entretanto, sem o conhecimento da estrutura da proteína é impossível dizer quais estruturas foram responsáveis pela maior termoestabilidade. Estudos posteriores como o sequenciamento, podem dizer quais foram as estruturas responsáveis por essa melhora.

Enzimas que atuam em altas temperaturas e em ampla faixa de pH são desejadas pelas indústrias, uma vez que o processamento de amido e outros produtos alimentícios envolvem altas temperaturas e correção de pH. Portanto, a utilização de enzimas que suportem essas condições é industrialmente interessante porque reduzem os custos operacionais.

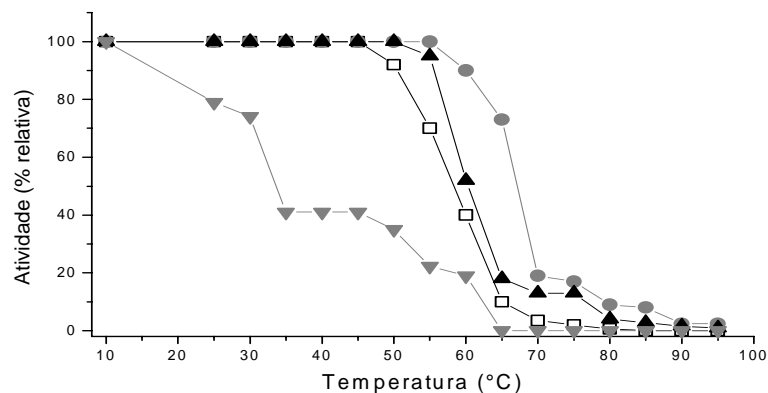


Figura 16 B. Comparação da termoestabilidade das glucoamilases mutantes em relação a selvagem.

□ – linhagem selvagem; ▲ – mutante M1; ● – mutante M2 e ▼ – mutante MUT.

A tabela a seguir resume os dados da caracterização encontrados para as glucoamilases estudadas.

Tabela 6. Resumo dos parâmetros da caracterização das glucoamilases mutantes e a selvagem.

LINHAGENS	PARÂMETROS DA CARACTERIZAÇÃO			
	pH		Temperatura	
	<i>Ótimo</i>	<i>Estabilidade</i>	<i>Ótima</i>	<i>Estabilidade</i>
MUT	4,0	4,0 - 6,5	50°C	Até 10°C
M1	3,5 – 4,0	6,0 - 10,0	68°C	10 – 50°C
M2	3,5 – 4,0	6,0 – 9,5	65°C	10 – 55°C
WT	3,5 – 4,0	5,5 – 7,0	58°C	10 – 45°C

4.4 Termoinativação irreversível das enzimas

A termoinativação irreversível das glucoamilases realizou-se em 7 temperaturas no pH ótimo das enzimas. A Figura 17 mostra o tratamento a 70°C, que resultou em uma inativação progressiva das enzimas. A glucoamilase produzida pela linhagem mutante M2 novamente apresentou maior termoestabilidade em relação às demais linhagens. A 70°C o $t_{(1/2)}$ da enzima M2 foi obtido após 8,3 minutos de incubação, para a linhagem mutante M1 foi de 4,1 minutos, enquanto, a glucoamilase selvagem após 3,1 minutos já apresentava 50% de sua atividade original. Quando calculada pela equação 1 (item 3.10 material e método), o $t_{(1/2)}$ das enzimas (Tabela 7) confirmam os resultados obtidos graficamente.

Tabela 7. Tempo de meia vida ($t_{1/2}$) das glucoamilases em diferentes temperaturas.

LINHAGEM	TEMPERATURA						
	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	3,4 min	2,1 min	1,5 min	0,7 min
Mutante M1	40,8 min	8,3 min	3,8 min	2 min	0,9 min	0,7 min	0,6 min
Selvagem WT	30,2 min	8 min	3 min	1,6 min	0,6 min	0,6 min	-

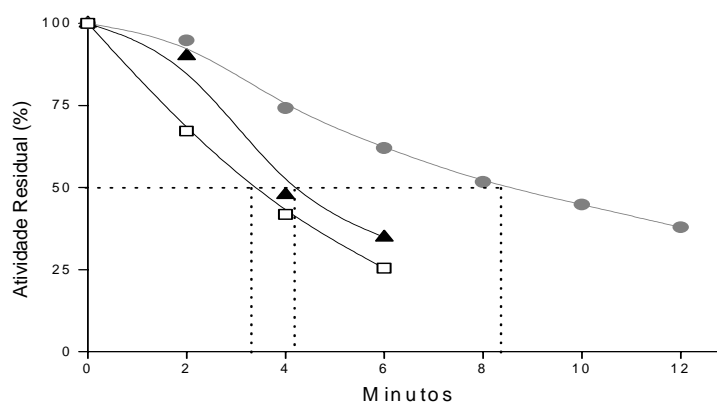


Figura 17. Atividade residual das glucoamilases em função do tempo de incubação a 70°C.
□ – linhagem selvagem; ▲ – mutante M1 e ● – mutante M2.

Os valores do K_d apresentaram um coeficiente de correlação maior que 0,98. A termoinativação das glucoamilases obedeceram 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; ESTRADA, 2003). Liu e colaboradores (2000) e, Liu e Wang (2003) também reportaram cinética de primeira ordem para glucoamilases de *A. awamori*.

O K_d foi calculado para todas as temperaturas, porém, na Figura 18 somente está representado a 70°C. A glucoamilase selvagem apresentou os maiores valores de K_d , quando comparado com as enzimas mutantes, indicando que esta proteína foi mais sensível ao calor. Na termoinativação realizado por Liu e Wang (2003) e Rajoka e colaboradores (2004) os valores de K_d encontrados, também foram maiores para as enzimas nativas e menores para os mutantes.

O plote do Ln do K_d versus a temperatura absoluta (Figura 19) confirmam a maior termoestabilidade do mutante M2, tanto em temperaturas mais baixas (65°C) quanto em temperaturas mais elevadas (80°C). Os parâmetros termodinâmicos da desnaturação mostrados na Tabela 8 comprovam esses resultados, é evidenciado que a energia livre (ΔG) diminui com o aumento da temperatura, isto mostra que, as enzimas tornaram-se mais sensíveis ao calor. A ΔG da glucoamilase M2 foi maior que as demais linhagens em todas as temperaturas, a 65°C a enzima apresentou 105,8 KJ mol⁻¹ enquanto que a energia da glucoamilase selvagem foi de 102,5 KJ mol⁻¹, a 70°C a ΔG foi de 103,5 KJ mol⁻¹ para a glucoamilase M2 e de 100,7 KJ mol⁻¹ para a enzima selvagem, sendo que, a 80°C a diferenças ainda foi significativa (1,9 KJ mol⁻¹). Vários trabalhos na literatura confirmam que, altos valores de ΔG indica uma melhor termo resistência da molécula, enquanto que, um valor menor mostra uma proteína termo sensível. LI e colaboradores (1998) encontrou valores semelhantes durante a termoinativação de glucoamilases mutantes e selvagem, a ΔG do mutante denominado N20C/A27C/S436 foi 2,2 KJ mol⁻¹ maior que a enzima selvagem estudada. Rajoka e colaboradores (2004) também encontrou bons resultados durante o estudo termodinâmico de glucoamilase mutante e nativa de *Aspergillus niger*, sendo a ΔG do mutante 2 KJ mol⁻¹ maior que a enzima nativa estudada.

Observa-se na Tabela 8 que a entalpia (ΔH) não mostra dependência direta da temperatura, pois não sofre variações consideráveis nos extremos 65 e 80°C. A entropia (ΔS) aumenta em determinada temperatura e, a partir desta se torna constante, essa característica é evidenciada para as enzimas mutante M2 e selvagem, 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; ESTRADA, 2003).

O plote da Figura 19 ($\ln K_d$ versus $1/T$) e a ΔG (Tabela 8) apresentam similaridades para a glucoamilase selvagem e para a glucoamilase mutante M1, sugerindo de acordo com esses resultados que as duas enzimas, possivelmente podem ter apresentado o mesmo mecanismo de inativação.

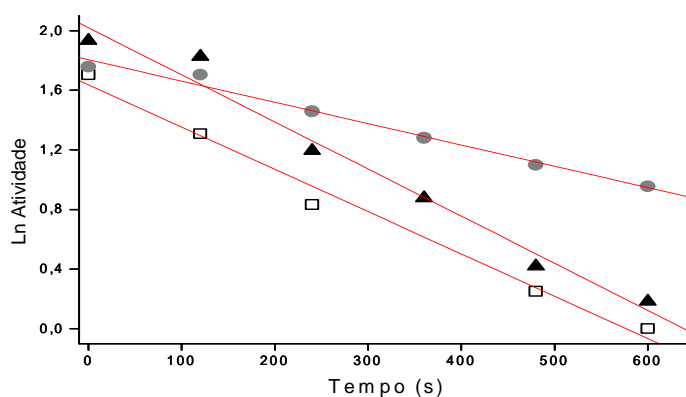


Figura 18. Ln da atividade a 70°C. □ – linhagem selvagem WT; ▲ – mutante M1 e ● – mutante M2.

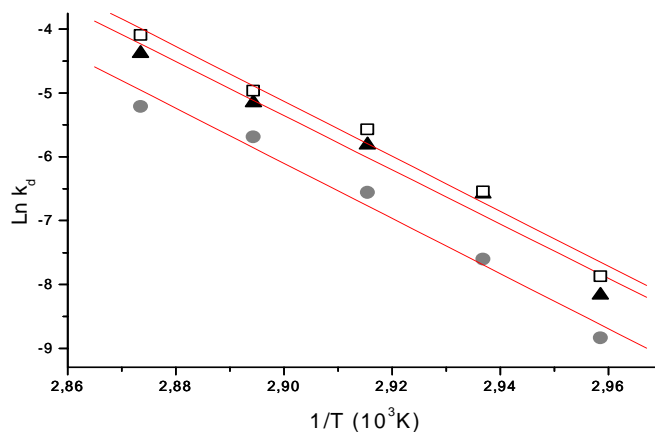


Figura 19. Efeito da temperatura na terminativação irreversível das glucoamilases.
□ – linhagem selvagem WT; ▲ – mutante M1 e ● – mutante M2.

Tabela 8. Parâmetros termodinâmicos da termoinativação das glucoamilases.

PARÂMETROS	LINHAGENS		
	Selvagem	Mutante M1	Mutante M2
ΔG (KJ mol ⁻¹) 65°C	102,5	103,4	105,8
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 necessário para que a molécula entre num estado de transição. Porém, a menor energia de desnaturação da enzima selvagem sugere que, não exista uma alta barreira energética para a desestruturação protéica.

A glucoamilase sofre termoinativação irreversível em pH moderadamente ácido e temperaturas na faixa de 70°C. O processo de termoinativação da glucoamilase é ocasionado pela conformação incorreta da proteína (MUNCH; 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 seu 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 e também o número e o tipo de aminoácidos envolvido 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.

4.5 Avaliação da ação das glucoamilases sobre diferentes substratos

Visto que nos ensaios anteriores houve diferenças acentuadas na atuação das enzimas sobre o amido e sobre a maltose, realizou-se a análise das atividades enzimáticas sobre outros substratos amiláceos e substratos sintéticos descritos no item 3.11.

A hidrólise em diferentes fontes amiláceas mostrou que o amido de milho gelatinizado foi mais suscetível a ação enzimática, como se observa nas Figuras 21, 22 e 23, com taxas de hidrólises de 9,5 U/mL para a linhagem selvagem, 12,5 U/mL para a glucoamilase M1 e 10,0 U/mL para a enzima mutante M2. Para a glucoamilase mutante MUT (Fig. 20) a melhor atividade entre todos os amidos foi observada na presença do amido de batata gelatinizado com 0,85 U/mL.

As enzimas mostraram preferências pelos substratos com maior grau de polimerização, sendo a maltoheptaose a que sofreu maior taxa de hidrólise. Estes resultados são típicos de glucoamilases, uma vez que a atividade aumentou com o peso molecular do substrato. Segundo Manjunath e colaboradores (1983) a taxa de hidrólise de ligações α -1,4 por glucoamilase aumentam com o peso molecular, sendo mais eficientes em seqüências maiores que maltopentaose e cerca de cinco vezes menor em maltose. A glucoamilase é uma enzima que pode hidrolisar 100% do amido em glicose, atuando melhor em polissacarídeos de alto peso molar (HORVATHOVA et al. 2001).

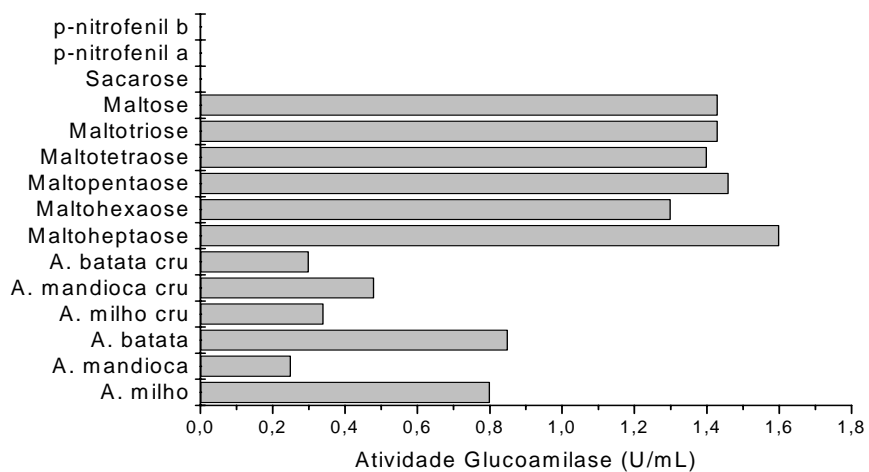


Figura 20. Atividade enzimática sobre diferentes substratos da glucoamilase mutante MUT a 50°C pH4,0. Cada valor representa a média de triplicatas.

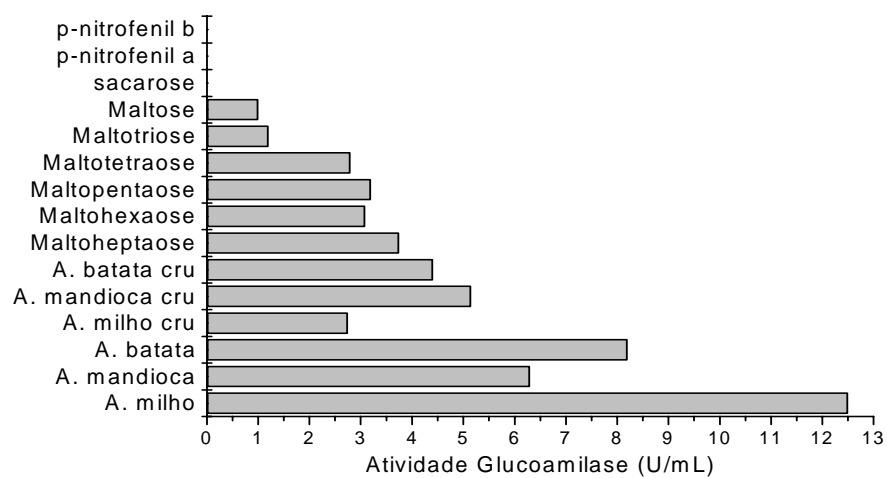


Figura 21. Atividade enzimática sobre diferentes substratos da glucoamilase mutante M1 a 68°C pH 4,0. Cada valor representa a média de triplicatas.

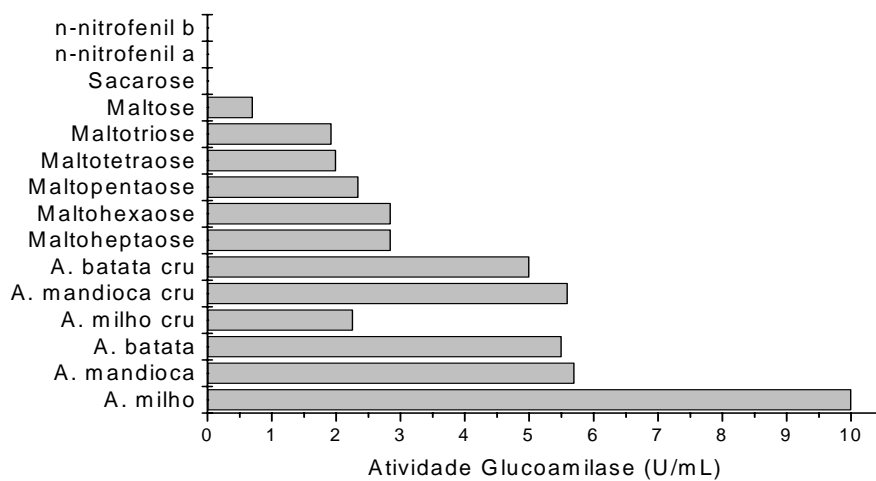


Figura 22. Atividade enzimática sobre diferentes substratos da glucoamilase mutante M2 a 65°C pH 4,0. Cada valor representa a média de triplicatas.

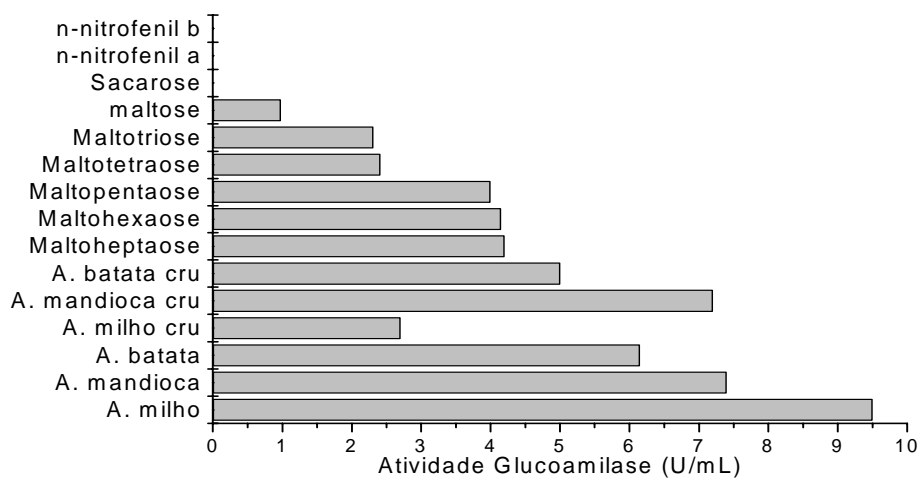


Figura 23. Atividade enzimática sobre diferentes substratos da glucoamilase selvagem WT a 58°C pH 4,0. Cada valor representa a média de triplicatas.

Os substratos sintéticos p-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo, p-nitrofenil- β -glucopiranosídeo e também a sacarose, não foram hidrolisados pelas glucoamilases.

Michelin (2005) estudando a especificidade da glucoamilase do fungo *Paecilomyces variotti* por diferentes tipos de substratos também encontrou que o amido foi o melhor substrato para a hidrólise. Marlida e colaboradores (2000) estudaram a taxa de hidrólise pela ação da glucoamilase do fungo *Acremonium* sp em amidos de diferentes fontes: batata, tapioca, milho, arroz, trigo e sagu, verificaram que a enzima degradou todos eles, porém, o amido de milho foi mais resistente a hidrólise, diferentemente do encontrado no presente estudo.

A ação de enzimas amilolíticas sobre o grânulo de amido tem sido estudada e os amidos classificados em função da susceptibilidade. Em ordem decrescente são citados os amidos de milho ceroso, mandioca, sorgo ceroso, sorgo, milho, arroz, sagu, araruta e batata (LEACH; SCHOCH; 1961). Embora, o complexo sistema enzimático das amilases seja capaz de hidrolisar o amido no seu estado natural, a suscetibilidade do grânulo a ação enzimática é aumentada quando o amido se encontra na forma gelatinizada (CIACCO; CRUZ, 1982). Com o aquecimento, as complexas interações da amilose com ácidos graxos e outros componentes do grânulo são rompidas, facilitando o acesso das enzimas ao grânulo de amido.

Na gelatinização, a região central do grânulo é mais sensível ao calor, desorganizando-se primeiro, o que reforça as indicações da existência de uma camada externa nos grânulos que seja mais resistente a ação das amilases (PANCHOT et al., 1995).

Segundo Tharanathan e colaboradores (1980) a diferença na ação das enzimas amilolíticas sobre diferentes tipos de amidos está relacionada com as diferenças na composição da molécula, em particular, no teor de amilose e amilopectina, e no comprimento de suas cadeias.

Outros fatores podem interferir no mecanismo de ação das amilases sobre os grânulos de amido. A associação entre os componentes do grânulo o torna mais ou menos suscetível a hidrólise enzimática. Outro fator que atua de forma decisiva na atividade das enzimas sobre os grânulos de amido é a porosidade do mesmo (HUBER; BEMILLER, 1997).

A suscetibilidade dos grânulos pela glucoamilase não está relacionada apenas com a fonte botânica do amido, mas também com a fonte produtora da enzima (NODA et al., 1992).

A glucoamilase pode penetrar no interior dos grânulos através de poros na superfície e realizar a hidrólise no interior dos grânulos, esses poros aparentemente são aumentados pela ação da enzima (KIMURA; ROBYT, 1996).

A maior digestibilidade do amido de milho parece ser uma propriedade inerente deste amido, as amilases de uma maneira geral agem na superfície do grânulo, talvez inicialmente numa fissura ou outra imperfeição estrutural e então se estende lateralmente formando cavidades cônicas.

O amido de mandioca, comparativamente aos de cereais, é o de menor resistência à degradação enzimática (RICKARD et al., 1991).

Tharanathan e colaboradores (1980) e Paramahans e Tharanathan (1982) postularam que a atividade enzimática era limitada devido: estabilidade da enzima durante o processo de hidrólise; razão enzima-substrato; habilidade desramificante para hidrolisar substratos grandes e pequenos que sugeriram que as glucoamilases devam conter uma α -amilase para assegurar a completa hidrólise do amido.

4.6 Hidrólise do amido pela ação das glucoamilases mutantes e a selvagem

O experimento foi realizado com o objetivo de avaliar a estabilidade das glucoamilases na presença de amido ao longo do tempo de incubação e, também verificar a taxa de conversão do amido em glicose pela ação das enzimas. As glucoamilases foram incubadas a 60°C em uma solução de amido solúvel 0,5% em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 4,0, durante 96 horas. Em intervalos pré-determinados alíquotas foram retiradas e mantidas em banho de gelo, e posteriormente foi realizado o ensaio, pelo método descrito no item 3.4 (material e método). Neste experimento foi feito um controle, que correspondeu à atividade no tempo inicial de incubação (tempo zero). Também foi realizado um controle do substrato (amido) nas mesmas condições, porém substituindo o volume de enzima por água destilada. Para cada alíquota do hidrolisado retirado também era tomada uma amostra do controle do substrato, para garantir que a hidrólise do amido ocorreu pela ação da enzima e não pelo aquecimento contínuo.

A atividade inicial (tempo zero) foi em média de 6,5 U/mL para as enzimas mutantes M1 e M2, já a enzima selvagem apresentou atividade inicial de 8,9 U/mL. Após 12 horas de incubação ocorreu um aumento considerado na atividade enzimática, em média de 500 U/mL para todas as linhagens. Após esse período, a atividade aumenta lentamente até 600 U/mL em 48 horas de incubação, que foram mantidos praticamente inalterados até o final do processo.

Em resumo os dados indicam que nas primeiras 12 horas de reação ocorre um rápido aumento na ação das enzimas, com conseqüente aumento da formação de produto (glicose),

que após 48 horas de hidrólise tendem a permanecer quase que constantes até o final do processo. Essa alta velocidade de reação no início da hidrólise se deve a grande quantidade de substrato disponível para se ligar à enzima, porém, em determinado momento da reação, quando o nível de substrato diminui e, aumenta o nível de produto, a velocidade da reação tende a permanecer constante por algum tempo, e gradativamente vai diminuindo devido à escassez do substrato.

O complexo enzima-substrato é mais estável do que a enzima sozinha, assim, a interação do substrato com a proteína evita que as forças que mantêm a estrutura do centro ativo sejam rompidas pela temperatura, e desta forma, desnatura a enzima (SCHULZ; SCHIRMER, 1979).

Uma outra característica bem conhecida é a capacidade que o substrato tem de prevenir a desnaturação térmica, a glicose que é o principal produto da hidrólise pode atuar como um agente estabilizante para a enzima (BRYJAK et al., 2004). Sob condições de alta concentração de açúcares redutores e altas temperaturas, as proteínas em geral podem sofrer glicação (“glycation”) (BELITZ; GROSCH, 1999; SUTTHIRAK et al., 2005). Esta modificação não enzimática ocorre quando grupamentos aminas da molécula interagem com grupos carbonil de açúcares redutores, alterando a sua conformação e aumentando sua atividade catalítica (BELITZ; GROSCH, 1999; YEBOACH et al., 1999; SUTTHIRAK et al., 2005).

Outro fenômeno também pode ocorrer quando a glucoamilase é mantida em um nível alto de glicose, onde a enzima pode repolimerizar moléculas deste açúcar em uma reação conhecida como reversão, formando maltose e isomaltose (SLOMINSKA; MACZYNSKI, 1985; LABELLE et al., 1997).

A quantidade de glicose liberada pela ação da glucoamilase depende do tempo de reação e também do tipo de amido envolvido na hidrólise (KIM; ROBYT, 1999).

As observações realizadas ainda nos permitem concluir que as enzimas apresentaram praticamente o mesmo comportamento durante as 96 horas de hidrólise, comprovando mais uma vez que a mutação não afetou a atividade hidrolítica das enzimas mutante M1 e M2.

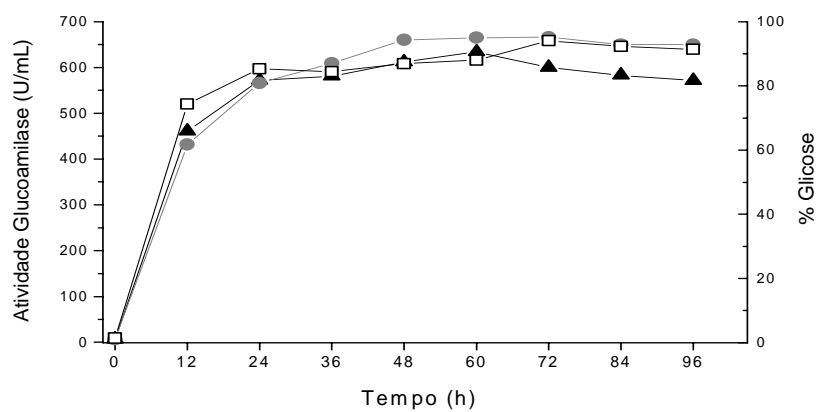


Figura 24. Hidrólise do amido pela ação das glucoamilases a 60°C.

□ – selvagem; ▲ – mutante M1 e ● – mutante M2.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- As glucoamilases mutantes e a glucoamilase selvagem secretada pelas linhagens de *S. cerevisiae* apresentaram perfis diferentes de atividades sobre os substratos amido e maltose durante o cultivo.
- A glucoamilase secretada pela linhagem mutante MUT apresentou atividade ótima em pH 4,0 e temperatura ótima a 50°C, a glucoamilase selvagem apresentou temperatura ótima de atividade a 58°C e pH ótimo de atividade em 3,5 – 4,0. As linhagens mutantes M1 e M2 também apresentaram atividades ótimas no pH 3,5 - 4,0, porém, temperaturas ótimas de atividades a 68 e 65°C, respectivamente.
- A mutação realizada no gene de expressão da glucoamilase de *A. awamori* foi positiva, para as linhagens mutantes M1 e M2, pois estas apresentaram termoestabilidade superior a enzima selvagem sendo, portanto, mais resistentes à desnaturação protéica. A temperatura ótima desses mutantes foi melhorada em média 8°C, assim como a termoestabilidade a 65°C, que teve um ganho de mais de 60% para a glucoamilase mutante M2 e um ganho de 8% para o mutante M1, o que pode viabilizar a utilização da enzima em temperaturas elevadas. Os mutantes também apresentaram boa estabilidade a variação do pH, atuando numa faixa maior que a glucoamilase selvagem. A melhora na termoestabilidade foi confirmada pela cinética de termoinativação irreversível das enzimas.
- A mutação, porém não afetou a atividade hidrolítica das enzimas M1 e M2, pois estes mutantes apresentaram um perfil semelhante de hidrólise a da enzima selvagem em diferentes substratos. Entretanto, a enzima mutante MUT teve sua atividade e estabilidade a variação de pH e temperatura fortemente afetada pela mutação.
- As enzimas atuaram preferivelmente no substrato amido, com atividade reduzida sobre dextrinas, de modo proporcional à diminuição do grau de polimerização.

Os bons resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho, justifica que, estudos posteriores sejam realizados a fim de um maior detalhamento da estrutura das enzimas mutantes. Destacando-se principalmente, a linhagem mutante M2 que foi claramente mais resistente a altas temperaturas em comparação com a enzima selvagem. Trabalhos posteriores como o sequenciamento é que pode dizer que alteração estrutural foi responsável

pelo ganho na termoestabilidade dos mutantes. Também, os estudos com as enzimas no seu estado puro, podem revelar outras características dessas enzimas, como o grau de glicosilação, que é uma característica comum para as glucoamilases fúngicas e que, também pode ser um fator importante na estabilidade protéica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ALI, S.; HOSSAIN, Z. Characteristic for glucoamylase from *Aspergillus terreus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, p. 144-146, 1991.

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.

BELITZ H. D.; GROSCH, W. **Food chemistry**, 2 ed. Springer-Verlag Germany, 1999.

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.

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.

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

BRYJAK, J.; CIESIELSKI, K.; ZBICINSKI, I. Modelling of glucoamylase thermal inactivation in the presence of starch by artificial neural network. **Journal the Biotechnology**, v. 114, p. 177-185, 2004.

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

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.

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.

FAGERSTRON, R.; VAINIO, A.; SUORANTA, K.; PAKULA, T.; KALKKINEN, N.; TORKKELI, H. Comparison of two glucoamylase from *Hormoconis resinae*. **Journal of General Microbiology**, v. 136, p. 913-920, 1990.

FIEROBE, H. P.; STOFFER, B. B.; FRANDBSEN, 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.; FRANDBSEN, 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.

FRANDBSEN, 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.

FRANDBSEN, 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.

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.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. **Microbial biotechnology**. New York: W.H. Freeman, 1995.

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.

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

GUZMÁN-MALDONATO, H.; PAREDES-LOPEZ, O. Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. **Critical Review Food and Science Nutrition**, v. 35, p. 373-403, 1995.

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.

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.

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.

HORVATHOVA, V.; JANECEK, S. A.; STURDIK, E. Amylolitic enzymes: molecular aspects of their properties. **General Physiology and Biophysics**, v. 20, p. 33-39, 2001.

HUBER, K. C.; BEMILLER, J. N. Visualization of channels and cavities of corn and sorghum starch granules. **Cereals Chemistry**, v. 74, p. 537-541, 1997.

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.

JIN, B.; LEEUWEN, H. J.; PATEL, B.; DOELLE, H. W.; YU, Q. Production of fungal protein and glucoamylase by *Rhizopus oligosporus* from starch processing wastewater. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 59-65, 1999.

KAUR, P.; SATYANARAYANA, T. Production and starch saccharification by a thermostable and neutral glucoamylase of a thermophilic mould *Thermomucor indicae-seudaticae*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 419-425, 2004.

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

KIM, Y-K.; ROBYT, J. F. Enzyme modification of Starch granules: in situ reaction of glucoamylase to give complete retention of D-glucose inside the granule. **Carbohydrate Research**, v. 318, p. 129-134, 1999.

KIMURA, A.; ROBYT, J. F. Reaction of enzymes with starch granules: Reaction of isoamylase with native and gelatinized granules. **Carbohydrate Research**, v. 287, p. 255-261, 1996.

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 *Saccharomyces fibuligera*. **Enzyme and microbial technology**, v. 34, p. 453-460, 2004.

KOHNO, M.; ENATSU, M.; FUNATSU, J.; YOSHIIZUMI, M.; KUJIMIYA, W. Improvement of the optimum temperature of lipase activity for *Rhizopus niveus* by random mutagenesis and structural interpretation. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 203-210, 2001.

KOUTINAS, A. A.; WANG, R.; KOOKOS, I. K.; WEBB, C. Kinetic parameters of *Aspergillus awamori* in submerged cultivations on whole wheat flour under oxygen limiting conditions. **Journal Biochemical Engineering**, v. 16, p. 23-34, 2003.

LABELLE, P.; BARET, J. L.; BEAUX, Y.; DUCHIRON, F. Comparative study of wheat flour saccharification and ethanol production with two glucoamylase preparations. **Industrial Crops and Products**, v. 6, p. 291-295, 1997.

LEACH, H. W.; SCHOCH, T. J. Structure the starch granule. II action of various amylases on granular starches. **Cereal Chemistry**, v. 38, p. 34-46, 1961.

LEHNINGER, A. C.; NILSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**, 2 ed. Worth Publishers, 1995.

LEMOS, 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 on thermostability and catalytic activity of introducing disulfide bonds into *Aspergillus awamori* glucoamylase. **Protein Engineering**, v. 11, p. 661-667, 1998.

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.

MACMAHOM, H.; KELLY, C. T.; FORGARTY, W. M. Thermostability of three α -amylase of *Streptomyces* sp. IMD 2679. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 96-99, 1999.

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

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.

MICHELIN, M. **Estudo da glucoamilase e da α -amilase produzidas pelo fungo *Paecilomyces variotii*: purificação, caracterização bioquímica e relações filogenéticas.**

Dissertação de mestrado - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 141 f., 2005.

MILLER, G. L. Use of dinitrossalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

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.

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.

NGUYEN, Q. D.; REZESSY-SZABÓ, J. M.; CLAEYSSSENS, M.; STALS, I.; HOSCHIKÉ, 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.

NIELSEN, B. R.; LEHMBECK, J.; FRANDBSEN, 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.

NODA, T.; TAKAHATA, Y.; NAGATA, T. Digestibility of sweet-potato raw starches by glucoamylase. **Starch-Starke**, v. 44, p. 32-35, 1992.

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

OKOLO, B. N.; IRE, F. S.; EZEUGU, L. I.; ANYANWU, C. U.; ODIBO F. J. C. Purification and some properties of a novel raw starch-digesting amylase from *Aspergillus carbonarius*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 329-336, 2001.

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.

PARAMAHANS, S. V.; THARANATHAN, R. N. Scanning electron microscopy of enzyme digested varagu starch granules. **Starch/Stärke**, v. 34, p. 73-76, 1982.

PLANCHOT, V.; COLONNAP, P.; GALLANT, D. J. Extensive degradation of native starch granules by alpha-amylase from *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Cereal Science**, v. 21, p. 163-171, 1995.

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 in Applied Microbiology**, v. 39, p. 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.

RICHARD, J. E.; ASOAKA, M.; BLANSHARD, J. M. V. The physicochemical properties of cassava starch. **Tropical Science**, v. 31, p. 189-207, 1991

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.

SAUER, J.; SIGURSKJOLD, B. W.; CHRISTENSEN, U.; FRANDBEN, 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.; FRANDBEN, 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.

SCHULZ, G. E.; SCHIRME, R. H. Principles of protein structure. Cap. 3 – Springer – verlag, Berlin and New York, 1979.

SHAW, A.; BOTT, R.; DAY, A. G. Protein engineering of α -amylase for low pH performance. **Current Opinion Biotechnology**, v. 10, p. 349-352, 1999.

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.

SILVA, T. M.; ATTILI-ANGELIS, D.; CARVALHO, A. N. A.; DA SILVA, R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E. Production of Saccharogenic and dextrinogenic amylase by *Rhizomucor pusillus* A 13.36. **The Journal of Microbiology**, v. 43, p. 561-568, 2005.

SLOMINSKA, L.; MACZYNSKIM, M. Studies on the application of pullulanase in starch saccharification process. **Starch**, v. 37, p. 386-390, 1985.

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.

SOUZA, S. R. **Estudo da produção de glucoamilases por fungos filamentosos termofílicos e caracterização das enzimas produzidas**. Dissertação de mestrado-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 154 f, 2003.

SPINELLI, L. B. B.; DE LOURDES, POLIZELI, M. L. T. M.; TERENCEZI, 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.

THANARATHAN, R. N.; PARAMAHANS, S. V.; WANKHEDE, D. B. Amylolytic susceptibility of native groundnut and Ragi starch granules as viewed by Scanning Electron Microscopy. **Starch/Stärke**, v. 32, p. 158-161, 1980.

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

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.

YANG, Y.; JIANG, L.; ZHU, L.; WU, Y.; YANG, S. Thermal stable and oxidation-resistant variant of subtilisin E. **Journal of Biotechnology**, v. 81, p. 113-118, 2000.

YEBOAH, F. K.; ALLI, I.; YAYLAYAN, V. A. Reactivities of D-glucose and D-fructose during glycation of bovine serum albumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, 3164-3172, 1999.

