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

**“Purificação e caracterização bioquímica da α -
glicosidase termoestável produzida por
Thermoascus aurantiacus CBMAI 756”**

Ana Flávia Azevedo Carvalho

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de concentração: Microbiologia Aplicada).

Rio Claro
04 de março de 2010

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

**“Purificação e caracterização bioquímica da α -
glicosidase termoestável produzida por
Thermoascus aurantiacus CBMAI 756”**

Ana Flávia Azevedo Carvalho

Orientadora: **Profa. Dra. Eleni Gomes**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de concentração: Microbiologia Aplicada).

Rio Claro
04 de março de 2010

Dedico este trabalho aos meus pais, Agda Sandra e Flavio, que sempre me incentivaram com muito amor, carinho e paciência no meu crescimento intelectual e pessoal. A minha avó Sinhazinha que fez parte de toda minha criação e amadurecimento. A minha irmã Mariana que sempre me ajudou em todos os momentos. E ao meu noivo Pedro que me apoiou e esteve presente nessa etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Eleni Gomes, pela valiosa orientação, incentivo e confiança depositada.

Ao Prof Roberto da Silva pelo esclarecimento de dúvidas durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Maurício Boscolo por me receber em seu laboratório para o desenvolvimento de uma parte do projeto.

Ao Prof. Henrique Ferreira pela excelente orientação na última etapa do trabalho.

Ao Prof. Flávio Henrique da Silva por me receber em seu laboratório para a construção da biblioteca de cDNA.

À Fapesp pelo auxílio financeiro, concedendo bolsa de estudo e financiando a compra de reagentes.

A todos os amigos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada que compartilharam momentos agradáveis e contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Paula Martins que me ajudou com os seus conhecimentos em biologia molecular para desenvolvimento da última etapa do meu trabalho.

Gostaria de fazer um agradecimento especial aos meus pais, à minha irmã e ao meu noivo que me escutaram e aconselharam com muita paciência nesses últimos quatro anos.

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

SUMÁRIO

Página

I. RESUMO	10
II. ABSTRACT	11
III. INTRODUÇÃO.....	12
IV. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
1. Enzimas do complexo amilolítico	14
2. Características das Glicosidases	17
2.1. As famílias das α -glicosidases.....	20
2.2. Especificidade, transglicosilação e reação catalítica da α -glicosidase	23
3. Inibidores de glicosidase e suas aplicações	27
4. Microrganismos termofílicos e enzimas termoestáveis.....	28
5. Purificação de α -glicosidase.....	33
V. OBJETIVOS	35
1. Geral	35
2. Específicos.....	35
VI. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
VI. 1. Microrganismos	36
VI. 2. Fermentação submersa (FSM)	36
VI. 2. 1. Obtenção da enzima intracelular	36
VI. 2. 2. Determinação da atividade no micélio do fungo.....	36
VI. 3. Determinação das atividades enzimáticas	37
VI. 3. 1. Medida da atividade enzimática através da liberação de glicose	37
VI. 3. 2. Medida da atividade enzimática pela liberação de p-nitrofenol.....	37
VI. 4. Determinação de proteínas e carboidratos	37
VI. 5. Purificação de α -glicosidase	38
VI. 5.1. Concentração do extrato bruto	38
VI. 5.2. Precipitação com sulfato de amônio.....	38
VI. 5.3. Cromatografias de troca iônica	38

VI. 5.4. Cromatografia de filtração em gel.....	39
VI. 6. Eletroforeses	39
VI.6. 1. Eletroforese para detecção da atividade enzimática das bandas	39
VI.6. 2. Eletroforese para a determinação de glicoproteínas através da coloração do Reativo de Schiff.....	40
VI.6. 3. Focalização isoelétrica e determinação do ponto isoelétrico.....	40
VI. 7. Determinação da massa molecular	40
VI. 7. 1. Determinação da massa molecular por filtração em gel.....	40
VI. 7. 2. Determinação da massa molar em SDS-PAGE.....	40
VI. 8. Caracterização da α -glicosidase purificada	41
VI. 8.1. Avaliação da ação da α -glicosidase sobre diferentes substratos	41
VI. 8.2. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da enzima	41
VI. 8.3. Estabilidade da enzima frente às variações de pH e temperatura, quando em ausência de substrato	41
VI. 9. Determinação do K_m e V_{max}	42
VI. 10. Efeito dos íons sobre a atividade da enzima.....	42
VI. 11. Efeito dos inibidores sobre a atividade da enzima.....	42
VI. 11. Identificação dos produtos de transglicosilação por cromatografia em camada delgada	43
VI. 12. Determinação do N-terminal da α -glicosidase	43
VI. 13. Biologia Molecular	43
VI. 13. 1. Meio de indução do RNAm para a construção da biblioteca de cDNA.....	43
VI. 13. 2. Extração do DNA genômico	44
VI. 13. 3. Extração do RNA total e purificação do RNAm.....	44
VI. 13. 4. Construção da biblioteca de cDNA.....	44
VI. 13. 5. Isolamento dos clones da biblioteca de cDNA.....	44
VI. 13. 6. Extração de DNA plasmidial.....	45
VI. 13. 7. Primers	45
VI. 13. 8. PCR de colônia.....	46
VI. 13. 9. PCR para a amplificação dos genes	46
VII. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
VII. 1. Crescimento fúngico e produção da α -glicosidase produzida pelo fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> CBMAI 756.....	47

VII. 2. Purificação da α -glicosidase produzida pelo fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> CBMAI 756	49
VII. 3. Focalização isoeétrica e determinação do ponto isoeétrico	56
VII. 4. Determinação da massa molar	57
VII. 5. Caracterização da α -glicosidase purificada.....	62
VII. 5. 1. Avaliação da ação da α -glicosidase sobre diferentes substratos	62
VII. 5. 2. Determinação da temperatura e pH ótimos sobre a atividade da enzima e estabilidade da enzima frente à variações de pH e temperatura, quando em ausência de substrato.....	65
VII. 6. Determinação do K_m e V_{max}	70
VII. 7. Efeito dos íons e outros compostos sobre a atividade da α -glicosidase purificada	70
VII. 8. Efeito dos inibidores sobre a atividade da α -glicosidase	73
VII. 9. Identificação dos produtos da reação de transglicosilação por cromatografia em camada delgada.....	75
VII. 10. Determinação do N-terminal da α -glicosidase	77
VII. 11. Biologia molecular.....	77
VII. 11. 1. Construção da biblioteca de cDNA.....	77
VII. 11. 2. Busca das enzimas de interesse.....	79
VIII. CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
IX. CONCLUSÕES	87
X. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	88
ANEXO.....	97

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Estrutura química da amilose e amilopectina	14
Figura 2: Ação das enzimas amilolíticas sobre o amido.	17
Figura 3: Oligossacarídeos ligados em glicoproteínas através das ligações <i>O</i> -glicosídicas e <i>N</i> -glicosídicas.	18
Figura 4: A ação das transferase, mannosidasas e glicosidasas na modificação das glicoproteínas.....	19
Figura 5: O monômero da α -glicosidase MaIA são apresentados de duas formas diferentes. Os quatro domínios e dois subdomínios são mostrados	22
Figura 6: A – Reação de catálise via ataque nucleofílico; B – Reação de catálise via formação do íon oxocarbênio intermediário.....	26
Figura 7: <i>Thermoascus aurantiacus</i> CBMAI 756 em meio sabouroud.	30
Figura 8: Produção de α -glicosidase por <i>Thermoascus aurantiacus</i> em fermentação submersa.	47
Figura 9: Perfil de eluição da α -glicosidase em cromatografia de troca aniônica com resina DEAE Sephadex.	51
Figura 10: Perfil de eluição da α -glicosidase em cromatografia de troca aniônica com resina Q Sepharose.	52
Figura 11: Perfil de eluição da α -glicosidase em cromatografia de filtração em gel na coluna Sephacryl S-200.	53
Figura 12: Perfil de eluição da α -glicosidase em cromatografia de filtração em gel na coluna Superose 12.	54
Figura 13: Eletroforeses em géis SDS-PAGE usando amostras desnaturadas e semi-desnaturadas.	55
Figura 14: SDS-PAGE bidimensional da α -glicosidase purificada.....	57
Figura 15: Retas padrões obtidas para a determinação da massa molar da α -glicosidase.	59
Figura 16: Avaliação da atividade da α -glicosidase purificada de <i>Thermoascus aurantiacus</i> CBMAI 756 sobre diferentes tipos substratos amiláceos, substratos sintéticos e sacarose.	63
Figura 17: Caracterização físico-química da α -glicosidase purificada de <i>Thermoascus aurantiacus</i> CBMAI 756.....	66

Figura 18: Caracterização física-química da α -glicosidase purificada de <i>Thermoascus aurantiacus</i> CBMAI 756.	67
Figura 19: Efeito dos inibidores sobre a α -glicosidase purificada de <i>Thermoascus aurantiacus</i> CBMAI 756.	73
Figura 20: Cromatografia em camada delgada dos produtos obtidos da reação de transglicosilação da α -glicosidase de <i>T. aurantiacus</i>	76
Figura 21: Extração do RNA total a partir do material biológico.	78
Figura 22: Purificação do RNAm a partir do RNA total extraído.	78
Figura 23: Liberação dos fragmentos de cDNA no plasmídeo.	78
Figura 24: Regiões conservadas da proteína α -glicosidase de <i>A. niger</i> ; Regiões conservadas da seqüência de nucleotídeos do gene da α -glicosidase.	79
Figura 25: Regiões conservadas da seqüência de nucleotídeos do gene da glicoamilase; Regiões conservadas da seqüência de nucleotídeos do gene da α -amilase.	80
Figura 26: PCR feito para detectar a presença dos genes de interesse no DNA genômico do fungo <i>T. aurantiacus</i>	81
Figura 27: PCR feito para detectar a presença da β -glicosidase na biblioteca de cDNA.	82
Figura 28: PCR feito para detectar a presença da α -glicosidase na biblioteca de cDNA.	83
Figura 29: Sequências dos fragmentos de cDNA que foram amplificados pelos primers referentes a β -glicosidase e α -glicosidase.	84

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Alguns fungos cujos genes da α -glicosidase foram sequenciados e os seus números de acesso ao GenBank.	23
Tabela 2: Primers.....	45
Tabela 3: Resultados obtidos a partir dos processos de purificação da α -glicosidase produzida pelo fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> CBMAI 756.	50
Tabela 4: Efeito dos íons de metal, EDTA, β -mercaptoetanol e detergentes na atividade α -glicosidase.	72
Tabela 5: Regiões conservadas das glicoamilases, α -amilases e β -glicosidase.	80
Tabela 6: Resultado do Blast dos fragmentos cDNA seqüenciados.....	83

I. RESUMO

As α -glicosidases (EC 3.2.1.20) são exoamilases que atuam nas ligações glicosídicas α -1,4 da extremidade não redutora, preferencialmente em pequenos oligossacarídeos para liberar α -glicose. Os objetivos desse trabalho foram purificar a α -glicosidase produzida, em fermentação submersa, pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756; caracterizar a enzima purificada; avaliar a ação sobre os derivados de amido e substratos sintéticos e construir um biblioteca de cDNA de *Thermoascus aurantiacus* para isolar o gene codificando para esta característica. As estratégias adotadas para isolar a α -glicosidase foram: a) concentração do extrato enzimático bruto usando uma membrana de ultrafiltração, b) por precipitação com sulfato de amônio, c) cromatografias de troca aniônica (Q-Sepharose) e a filtração em gel (Sephacryl S-200 e Superose 12). Após o último passo, filtração em gel na coluna Superose 12, obteve-se uma atividade específica final de 404 (U/mg proteína) e um fator de purificação de 173 vezes. A eletroforese em SDS-PAGE usando amostra semi-desnaturada possibilitou a observação de uma única banda protéica, a qual correspondeu à banda observada em gel de atividade e no gel específico para glicoproteína. A aparente massa molecular da enzima em SDS-PAGE foi 83 kDa. Essa enzima apresentou 42% de carboidrato ligado à estrutura protéica. A atividade máxima foi observada em pH 4,5 e a 70°C. A enzima mostrou-se estável nas faixas de pH 3,0-9,0 e perdeu 40% da atividade original nas temperaturas de 40, 50 e 60°C, incubadas por 1 hora. Na presença dos íons Na^+ , Ba^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} e Ca^{2+} a enzima manteve 90-105% da atividade máxima e foi inibida por Cr^{3+} , Ag^+ e Hg^{2+} . Baseados no cálculo do IC_{50} , a hidrólise da maltose foi mais sensível a castanospermina (0,015 mM) do que a acarbose (0,11 mM) e voglibose (0,06 mM). O K_m foi 0,07 μM e o V_{max} foi 318,0 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. A α -glicosidase apresentou a propriedade de transglicosilação devido à liberação de oligossacarídeos após 3 h de incubação com maltose. Essa enzima foi capaz de hidrolisar eficientemente os substratos com baixa massa molecular como os maltooligosacarídeos, além dos substratos heterogêneos (α -PNPG), mas não hidrolisou sacarose e amido. Assim, a enzima foi inserida no tipo II do grupo das α -glicosidases. Os dados obtidos sugerem a idéia que a α -glicosidase possa ser uma proteína dí ou trimerica, o que dificulta a obtenção de uma sequência N-terminal e sua busca numa biblioteca de cDNAs.

Palavras-chave: *Thermoascus aurantiacus*; purificação da α -glicosidase; enzimas termoestáveis; reação de transglicosilação

II. ABSTRACT

α -Glucosidase (EC 3.2.1.20) are exoamylase that act on α -1,4 bonds from non-reducing end, preferentially short oligosaccharides to release α -glucose. The objective of this work was to purify the α -glucosidase produced in submerged fermentation, with the fungus *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, characterize the purified enzyme and to evaluate its action on starch derivatives and synthetic substrates, and construction of cDNA library of *Thermoascus aurantiacus*. The strategies adopted to isolate the α -glucosidase were: a) concentration of crude enzyme using a membrane ultra filtration b) by ammonium sulphate precipitation, c) anion exchange chromatography (Q-Sepharose) and gel filtration (Sephacryl S-200 and Superose). After the last step, gel filtration on Superose 12 column, it was obtained a final specific activity of 404 (U/mg protein) and 173-fold enzyme purification. The electrophoresis in SDS-PAGE using semi-denatured sample allowed the observation of a single protein band, which corresponded to the bands obtained in gel of α -glucosidase activity and in a specific gel for glycoprotein. The apparent molecular mass of the enzyme in SDS-PAGE was 83 kDa. This enzyme exhibited a carbohydrate content of 42%. Maximum activity was observed at pH 4.5 and at 70°C. It was stable in the pH range 3.0-9.0 and the enzyme lost 40% of its initial activity at 40, 50 and 60 °C, incubated for 1 h. In the presence of ions Na⁺, Ba²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Al³⁺, Zn²⁺, Ca²⁺ the enzyme maintained 90-105% of its maximum activity and was inhibited by Cr³⁺, Ag⁺ and Hg²⁺. Based on IC₅₀ values, hydrolysis of maltose was more sensitive to castanospermine (0.015 mM) than acarbose (0.11 mM) and voglibose (0.06 mM). The K_m was 0.07 μ M, and the V_{max} was 318.0 μ mol/min/mg. The α -glucosidase showed a transglycosylation property, by the release of oligosaccharides after 3h of incubation with maltose. The α -glucosidase was able to hydrolyze efficiently the homogeneous substrates with low molecular mass such as short maltooligosaccharides, as well as a heterogeneous substrate (α -PNPG), but not hydrolyzed sucrose and starch. Thus, the enzyme was included into the type II group of α -glucosidase. Our data supports the idea that the α -glucosidase under investigation might be encoded by more than one gene and that could be the reason why we failed to obtain the N-terminal sequence of our enzyme, which was necessary to construct primers to search the cDNA library of *T. aurantiacus*.

Keywords: *Thermoascus aurantiacus*; α -glucosidase; purification; thermostable enzyme; transglycosylation reaction

III. INTRODUÇÃO

As enzimas são utilizadas nos mais variados processos biotecnológicos, e cada vez mais se busca enzimas com novos perfis de atividade. Desse modo, os microrganismos surgem como a melhor alternativa de fonte de enzimas em função da ampla variedade de espécies, permitindo o isolamento de enzimas com características diversificadas, as quais podem ser aplicadas nas mais variadas condições físico-químicas (BROCK; MADIGAN, 1991; STOLP, 1988).

As α -glicosidases fazem parte do grupo das enzimas amilolíticas, ou α -glicanases, e são capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,4 do amido (VIHINEN; MÄNTSÄLÄ, 1989). Elas têm sido obtidas a partir de culturas de diversos organismos amilolíticos como: bactérias *Bacillus thermoglucosidus*, *B. caldovelox*, *B. stearothermophilus* e *Clostridium* sp; e fungos como *Mucor javanicus*, *Aspergillus niger* e *A. oryzae* (CONSTANTINO et al., 1990). Essas enzimas atuam sobre diversos substratos, desde α -glicosídeos sintéticos, oligossacarídeos, α -glicanos de cadeia curta, amido e glicogênio. Em função da ação preferencial de algumas α -glicosidases por maltose e dextrinas curtas em relação ao amido, estas foram inicialmente denominadas maltases.

O mecanismo de ação e as funções da α -glicosidase constituem um importante enfoque para pesquisa, devido às aplicações biotecnológicas dessa enzima no processamento do amido e na obtenção de importantes derivados desse polímero para a utilização em confeitarias, refrigerantes, cervejarias, fabricação de geléias, sorvetes, entre outros (GLAZER; NIKAIDO, 1995; NAJAFPOUR; SHAN, 2003). As α -glicosidases de eucariotos são também importantes no entendimento de complexos mecanismos, envolvendo o metabolismo de açúcares, e da glicosilação e deglicosilação de proteínas (LEE; LEE, 2001). Além disso, algumas α -glicosidases podem realizar a reação de transglicosilação formando oligossacarídeos que podem ser adicionados aos alimentos melhorando as propriedades químicas e funcionais dos alimentos (MURATA; USUI, 2006).

As α -glicosidases fúngicas são pouco estudadas tendo sido purificadas as enzimas dos fungos mesofílicos, como *Aspergillus awamori* KT-11 (ANINDYAWATI et al., 1998), *Mortierella alliacea* YN-15 (TANAKA et al., 2002), *Acremonium implicatum* (YAMAMOTO et al., 2004), das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CWH41 (FARIDMOAYER; SCAMAN, 2004), *Pichia pastoris* (MUSLIN et al., 2000), *Candida albicans* (TORRE-BOUSCOULET et al., 2004) e *Schizosaccharomyces pombe* (OKUYAMA et al., 2005). A α -glicosidase do fungo termofílico descrito corresponde a de *Chaetomium*

thermophilum var. *coprophilum* (GIANNESI et al., 2006) e desse modo, o estudo da α -glicosidase do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 pode trazer importantes e inéditas informações.

Além disso, o fungo *T. aurantiacus* tem sido descrito na literatura como um ótimo produtor de enzimas de interesse industrial, por exemplo, α -amilases, pectinases, xilanases, β -glicosidases e proteases que se mostram estáveis em uma ampla faixa de pH e temperatura, e com isso possuem enorme potencial comercial (BRIENZO et al., 2008, MARTINS et al., 2002; MERHEB et al., 2007; HONG et al., 2003; LEITE et al., 2007). Neste trabalho foi realizada a produção, purificação e caracterização bioquímica da α -glicosidase desse fungo. Em uma segunda etapa foi feita a construção da biblioteca de cDNA para servir de base para futuros trabalhos.

IV. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Enzimas do complexo amilolítico

As células vegetais possuem a capacidade de sintetizar o amido e a celulose que são as duas principais fontes de carbono no planeta, sendo que o amido é a principal fonte de alimento da população mundial. Esse polissacarídeo de reserva é abundante principalmente nos tubérculos, raiz de mandioca, nas sementes de milho e trigo, no arroz, feijão e cereais como a cevada.

O amido e a celulose são compostos de unidades de glicose que possuem conformação anomérica diferente. A celulose é formada por um único polímero, em que as unidades de glicose estão unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (NELSON; COX, 2002). O amido pode ser formado por dois tipos de polímeros de glicose, amilose e amilopectina (Fig. 1), que aparecem em diferentes proporções na molécula de acordo com a fonte do amido. Normalmente a amilose corresponde a 16-30% e amilopectina a 65-85% (NELSON; COX, 2002; RAIMBAULT, 1998).

A amilose constitui-se de cadeia linear de resíduos de D-glicose unidos por ligação glicosídica α -1,4. Essa cadeia assume uma forma helicoidal, sendo cada volta da espiral formada por seis unidades de glicose. A amilopectina apresenta estrutura altamente ramificada, possuindo cadeias de resíduos de glicose com ligação glicosídica α -1,4 das quais partem ramificações com ligações α -1,6 a cada série de 24 a 30 resíduos de glicose (NELSON; COX, 2002; RAIMBAULT, 1998).

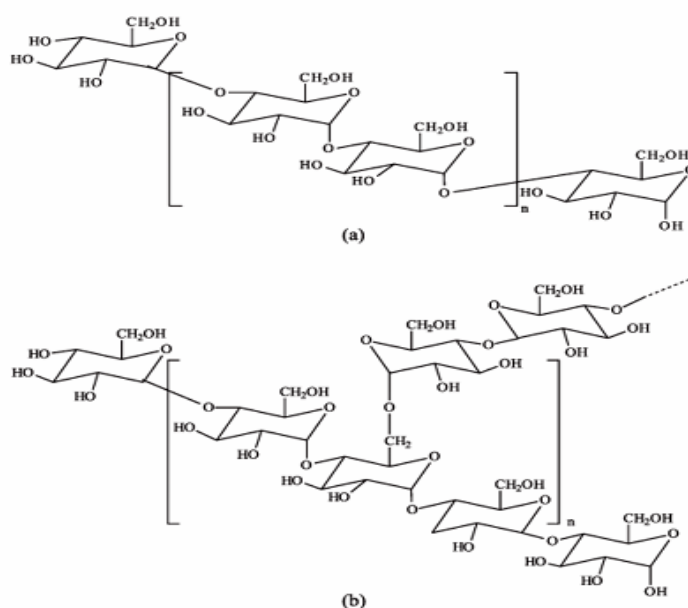


Figura 1: Estrutura química da amilose (a) e amilopectina (b) (CORRADINI et al., 2005).

As enzimas capazes de hidrolisar as ligações α -glicosídicas do amido são chamadas de enzimas amilolíticas ou α -glicanases e os substratos são chamados de α -glicanos. Normalmente, os organismos produzem vários tipos de enzimas para hidrolisar o amido, pois as propriedades e especificidades dessas enzimas são muito diferentes. Os mecanismos de ação das amilases podem ser divididos em duas categorias: as endoamilases que hidrolisam o interior da molécula de amido liberando oligossacarídeos, e as exoamilases que atuam a partir da extremidade não-redutora, resultando em produtos menores.

As principais especificidades das diversas enzimas amilolíticas (Fig. 2) são descritas a seguir (VIHINEN; MÄNTSÄLÄ, 1989).

As α -amilases (1,4- α -glicano glicanoidrolase EC 3.2.1.1) correspondem as endoamilases e atuam ao acaso dentro da molécula de amido, hidrolisando as ligações α -1,4 liberando oligossacarídeos de diversos tamanhos. Além das ligações α -1,4, algumas α -amilases podem hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,6. As α -amilases podem ser divididas em duas categorias de acordo com o grau de hidrólise do substrato: as sacarificantes, que hidrolisam 50 a 60% do substrato e as liqueficientes, que quebram cerca de 30 a 40% do amido.

As α -glicosidases (α -D-glicosideo glicohidrolase EC 3.2.1.20) são exoamilases que catalisam preferencialmente a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 de sacarídeos curtos, e liberam unidades de α -D-glicose. Algumas dessas enzimas também hidrolisam as ligações α -1,1, α -1,2, α -1,3 e α -1,6 presentes em outros oligossacarídeos não derivados do amido (OKUYAMA et al., 2005; GIANNESI et al., 2006).

As Glicoamilases (1,4- α -D-glicano glicohidrolase EC 3.2.1.3) são exoenzimas que removem resíduos de glicose a partir da extremidade não-redutora da molécula do amido por hidrólise das ligações α -1,4, liberando β -D-glicose. Essa enzima é classificada como enzima desramificante, pois é capaz de hidrolisar as ligações α -1,6, das ramificações da amilopectina, embora mais lentamente.

As β -amilases (1,4- α -D-glicano maltohidrolase EC 3.2.1.2) são exoenzimas que hidrolisam a penúltima ligação α -1,4 a partir de extremidade não-redutora da molécula liberando maltose. Além da hidrólise, a enzima causa inversão da configuração anomérica da maltose para o tipo β .

As pululanases (α -dextrina 6-glicohidrolase EC 3.2.1.41) são enzimas desramificantes que quebram as ligações α -1,6 do pululano, polissacarídeo linear que consiste de maltotrioses unidas por ligações de α -1,6, e de outros oligossacarídeos ramificados. Dentro dessa categoria

estão também as isopululanases (pululano 4-glicohidrolase EC 3.2.1.57) que hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,4 do pululano, e não têm nenhuma atividade sobre o amido. O produto liberado pela ação dessas enzimas é a isopanosose (VIHINEN; MÄNTSÄLÄ, 1989).

As isoamilases (glicogen 6-glicanohidrolase EC 3.2.1.68) hidrolisam as ligações α -1,6 da amilopectina, glicogênio e oligossacarídeos, mas não hidrolisam a ligação α -1,6 do pululano (VIHINEN; MÄNTSÄLÄ, 1989).

As exo-1,4- α -D-glicanases (α -D-glicano hidrolases EC 3.2.1.60 e 3.2.1.98) são exoamilases que, ao invés de liberarem sucessivas unidades de maltose, como é o caso da β -amilase, liberam maltotetraose e maltohexaose como principais produtos de sua ação sobre o amido (VIHINEN; MÄNTSÄLÄ, 1989).

As ciclodextrina D-glicanotransferases ou ciclodextrina glicosiltransferases (CGTases) (1,4- α -D-glicano 4- α -D-(1,4- α -D-glicano)-transferase EC 2.4.1.19) são transferases que hidrolisam ligações glicosídicas α -1,4 e posteriormente formam oligossacarídeos cíclicos não redutores com 6, 7 e 8 unidades de glicose que são chamadas respectivamente de α -, β - e γ -ciclodextrina, respectivamente (VIHINEN; MÄNTSÄLÄ, 1989).

As amilases são usadas na conversão do amido em: a) ciclodextrinas que são aplicadas em formulações clínicas, como material para sacarificação enzimática; b) maltose, usada em confeitarias, refrigerantes, cervejaria, fabricação de geléias e sorvetes; e c) glicose usada como adoçante, nas fermentações para produção de etanol, na produção de rações e outros bioprodutos (GLAZER; NIKAIDO, 1995; NAJAFPOUR; SHAN, 2003).

A conversão enzimática do amido na indústria inclui a etapa de gelatinização, que envolve a dissolução do amido em água a altas temperaturas, e depois, sua hidrólise por diferentes enzimas amilolíticas (α -amilase, α -glicosidase e pululanase) (HAKI; RAKSHIT, 2003). As α -amilases são utilizadas na primeira etapa (liquefação) para converter 30 a 40% do amido em dextrinas solúveis com diferentes graus de polimerização, diminuindo a viscosidade da solução de amido. Durante a segunda etapa (sacarificação), essas dextrinas são hidrolisadas em maltose e glicose pelas glicoamilases (LÉVÊQUE et al, 2000; GOMES et al, 2003). As α -glicosidases estão envolvidas na etapa final da hidrólise do amido ou de outros carboidratos (CONSTANTINO et al., 1990) em conjunto com a pululanase, também chamada de enzima desramificante que hidrolisa as ligações α -1,6 na sacarificação do amido (GOMES et al., 2003).

Além das indústrias de alimentos, as amilases têm sido utilizadas nas indústrias têxteis para a remoção da pasta de amido aplicada ao fio, com finalidade de aumentar a resistência do

mesmo à fricção durante o processamento. Essa pasta, quando não totalmente removida, dificulta o processamento final das roupas no tingimento, clareamento ou outro tipo de acabamento (GLAZER; NIKAIDO, 1995; NIELSON; BORCHERT, 2000).

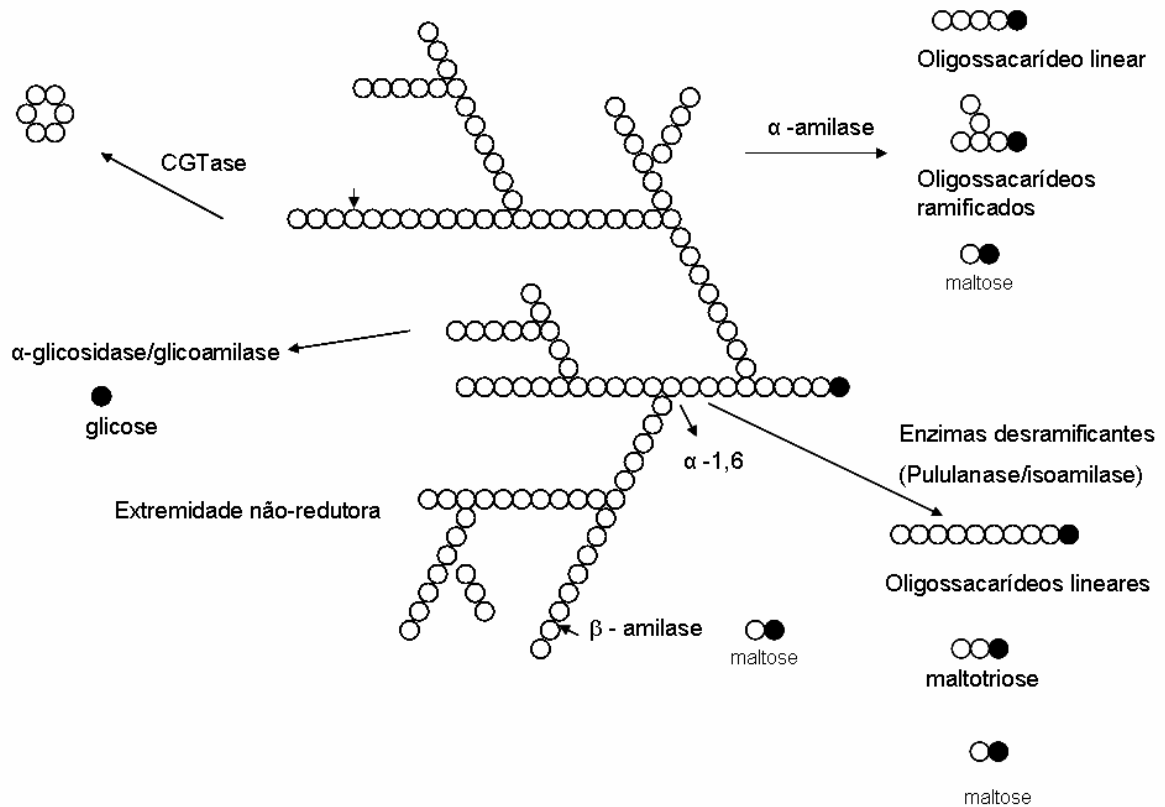


Figura 2: Ação das enzimas amilolíticas sobre o amido. Fonte modificada: (VIHINEN; MÄNTSÄLÄ, 1989; BERTOLDO; ANTRANIKIAN, 2002).

2. Características das Glicosidases

As glicosidases pertencem ao grupo das glicosideo hidrolases (EC 3.2.1.x) capazes de hidrolisar as ligações *O*-glicosídicas (HENRISSAT, 1991) e estão presentes nos mamíferos, vegetais e microrganismos. As glicosidases intracelulares presentes em eucariotos não são somente essenciais para o metabolismo dos carboidratos, mas são também vitais para a formação das glicoproteínas e glicolípídeos (LEE; LEE, 2001). Os glicoconjugados, glicoproteínas, glicolípídeos e proteoglicanos, possuem carboidratos específicos que agem como sinalizadores de funções, por exemplo, resposta imunológica, diferenciação celular, envelhecimento, endereçamento e estabilidade da proteína, entre outras (NELSON; COX, 2002; MELO et al., 2006).

Os oligossacarídeos presentes nas glicoproteínas podem se ligar de duas formas (Fig. 3): por ligação *O*-glicosídica com a união do grupo hidroxila do resíduo da serina (Ser) ou da treonina (Thr) ao carbono anomérico, ou por ligação *N*-glicosídica com o nitrogênio da função amida de um resíduo de asparagina (Asn) (NELSON; COX, 2002). A ligação *N*-glicosil mais freqüente nos eucariotos é catalisada pela enzima oligossacarídeo-transferase (OT) associada à face luminal do retículo endoplasmático (RE) (MELO; CARVALHO, 2006).

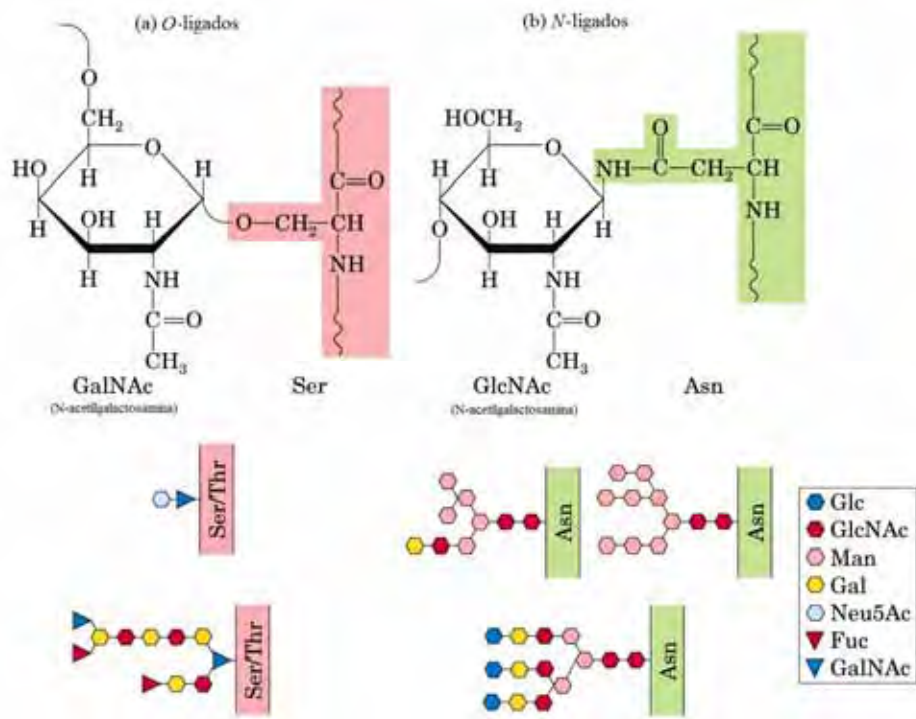


Figura 3: Oligossacarídeos ligados em glicoproteínas através das ligações (a) *O*-glicosídicas e (b) *N*-glicosídicas (NELSON; COX, 2002).

A formação dos oligossacarídeos e sua transferência para a proteína pela enzima OT são semelhantes para a maioria das proteínas nascentes, entretanto, após a síntese da glicoproteína o núcleo oligossacarídeo é elaborado e cortado de diferentes maneiras. O oligossacarídeo comum em eucariotes apresenta 14 resíduos de açúcares ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) que são transferidos de uma molécula doadora de dolicol fosfato para os resíduos de Asn presente nas proteínas (NELSON; COX, 2002).

A modificação das glicoproteínas formadas na primeira etapa é realizada pela ação conjunta das glicosidases e glicosiltransferases que atuam no RE e complexo de Golgi. A α -glicosidase I inicia o processo de remoção da ligação terminal α -1,2 glicose dos oligossacarídeos e então, a α -glicosidase II remove duas ligações de α -1,3 glicose, enquanto a

α -manosidase remove alguns resíduos de manose e a manosiltransferase adiciona resíduos de manose (Fig. 4). As remoções dos resíduos de glicose são idênticas para as leveduras *S. cerevisiae* e as células de mamíferos, entretanto, diferentes resíduos de manoses podem ser clivados dependendo do organismo, gerando $\text{Man}_{(7-9)}\text{GlcNAc}_2$ -proteína (HERSCOVICS, 1999b; MEHTA et al., 1998). As α -glicosidases I e II estão intimamente envolvidas no controle de qualidade das glicoproteínas no RE, pois facilitam os dobramentos das cadeias polipeptídicas recém formadas, a retenção e/ou a degradação das proteínas malformadas (HERSCOVICS, 1999a).

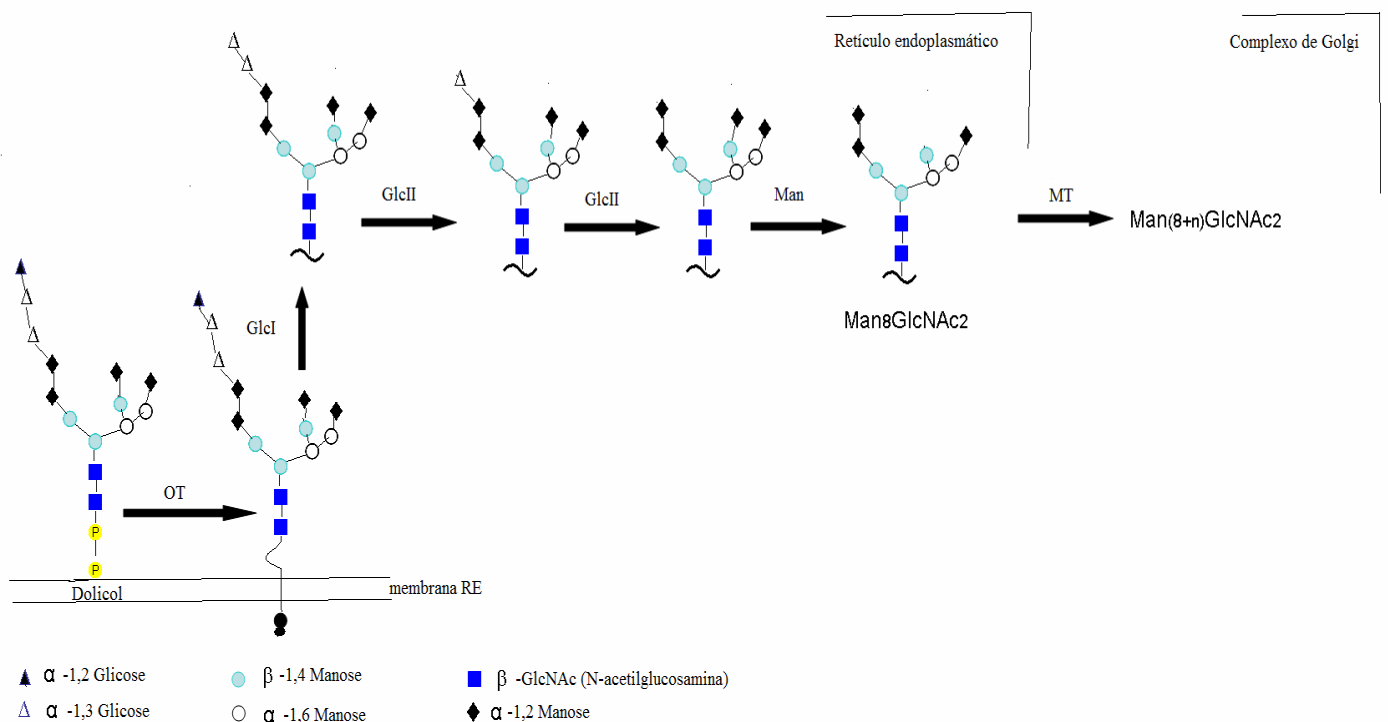


Figura 4: A ação das transferase, mannosidases e glicosidases na modificação das glicoproteínas. Fonte modificada: (HERSCOVICS, 1999b).

Legenda: OT - oligossacarídeo-transferase; Glc I – α -glicosidase I; Glc II – α -glicosidase II; Man – manose; MT – mannosiltransferase.

As α -glicosidases também podem auxiliar na biossíntese e/ou inserção da β -1,6 glucana na parede celular (HERSCOVICS, 1999b). Segundo Okuyama et al. (2005) a presença da α -glicosidase de *S. pombe* na superfície da parede celular e no sobrenadante do meio de cultivo sugeriu que essa enzima participa da biossíntese da parede celular desta levedura, juntamente com invertases e β -glucanases, as quais também são galactomananoproteínas.

Além disso, a α -glicosidase intracelular presente em muitas bactérias representa o estágio final do metabolismo do amido para geração de glicose. Alguns organismos, como *Pyrococcus furiosus*, transportam passivamente ou ativamente a maltose e outros polissacarídeos para dentro da célula induzindo a produção de enzimas amilolíticas intracelulares (CONSTANTINO et al., 1990).

As α -glicosidases extracelulares são utilizadas pelos microrganismos na degradação de oligossacarídeos e α -glicanos (amido e glicogênio) para a obtenção de glicose (JENSEN; OLSEN, 1996). Entretanto, na maioria dos microrganismos procariotos, 90% da α -glicosidase é intracelular, como nas archaeas *P. furiosus* (CONSTANTINO et al., 1990) e *Thermococcus hydrothermalis* (LEGIN et al., 1997) e na bactéria *Lactobacillus fermentum* (SANTOYO et al., 2003).

O metabolismo do amido em bactérias pode ser dependente da secreção de α -amilase que produz maltodextrinas a partir do amido bem como da α -glicosidase, associada à célula, que converte maltose e maltodextrinas em glicose (EZEJI; BAHL, 2006).

2.1. As famílias das α -glicosidases

As α -glicosidases são inseridas em duas famílias, 13 e 31 (FRENDSSEN; SVENSSON, 1998). São exemplos de enzima da família 13, as enzimas produzidas por *S. cerevisiae*, *B. cereus*, *Bacillus* sp. e insetos. Na família 31, estão inseridas as enzimas de plantas, mamíferos e fungos como *A. niger*, *M. javanicus*. (HENRISSAT, 1991; HENRISSAT; BAIROCH, 1993; CHIBA, 1997; FRANDSEN; SVENSSON, 1998; NAESTED et al.; 2006).

A família 13 é conhecida como “família α -amilase” e inclui a maioria das enzimas que degradam o amido (ex.: α -amilase, α -glicosidase, amilases produtoras de maltooligosacarídeos e CGTase) (NASHIRU et al., 2001). O domínio catalítico (domínio A), geralmente na região N-terminal, é o domínio mais conservado dessa família e apresenta resíduos dobrados dentro de uma estrutura 8-barril (β/α) (JANECEK, 2000). Dentre as enzimas amilolíticas, a glicoamilase apresenta uma grande diferença na estrutura tridimensional devido a sua estrutura 6-barril (α/α) (CHIBA, 1997).

O centro ativo da enzima que caracteriza a família 13, a taka-amilase, apresenta três resíduos ácidos, um ácido glutâmico e dois ácidos aspárticos, os quais são essenciais para a catálise. O Glu(230) atua como doador de próton enquanto um dos Asp(206) atua como nucleófilo. O segundo Asp(297) teria como função estabilizar o estado de transição (íon oxocarbônio) e inverter o Glu no estado protonado (MACGREGOR et al., 2001).

Na família 13, o sítio ativo é dividido em subsítios, sendo que cada um é capaz de interagir com um resíduo de glicose do substrato. Devido às variações existentes na arquitetura da interação β - α loop entre as enzimas, o número e a natureza dos subsítios do sítio ativo também variam, dando origem a uma característica própria de cada enzima. No subsítio -1 liga-se somente resíduos de glicose unidos por ligação α e dois resíduos de His (122 e 296) têm sido identificados como sendo importantes nesse subsítio. A clivagem da ligação do polissacarídeo ocorre entre os subsítios -1 e +1 (MACGREGOR et al, 2001).

A estrutura tridimensional característica da família 31 não é ainda totalmente entendida, porém têm sido propostos quatro domínios para a α -glicosidase de MalA de *Sulfolobus solfataricus* (Fig. 5): N (região β N-terminal); A (região central α/β com dois resíduos de ácidos aspárticos catalíticos); C (região β proximal C-terminal); D (região β distal C-terminal). As regiões N, C e D apresentam estruturas β -folhas enquanto a região A central é formada por α -hélice e β -folha. A família 31 possui 7 regiões (I-VII) e 17 resíduos chaves universalmente conservados. As 7 regiões e 16 dos resíduos chaves estão na região A e somente 1 resíduo chave (Gly671) na região C (KASHIWABARA et al., 2000; CHIBA, 1997; ERNST et al., 2006).

O domínio A apresenta dois subdomínios, o B que pode causar diferenças consideráveis no sítio ativo e o B' que devido à proximidade com o sítio catalítico pode representar um importante papel na ligação com o substrato. As diferenças entre os subdomínios das famílias 13 e 31 podem ser um dos determinantes estruturais de especificidade pelo substrato, já que ambas apresentam a estrutura catalítica do barril $(\beta/\alpha)_8$ (ERNEST et al., 2006). No domínio N localizam-se os resíduos Asp87 e Tyr99 altamente conservados que contribuem na estabilidade do sítio ativo, sugerindo que esse domínio influencie diretamente na ligação do substrato e/ou manutenção da conformação do sítio ativo (ERNEST, 2006; MORELAND et al., 2005).

O domínio C apresenta regiões altamente conservadas entre as α -glicosidases da família 31, além de estabilizar o domínio catalítico protegendo-o de solventes. Enquanto o domínio D compreende a região que apresenta a maior diversidade de seqüências entre os membros da família 31 (ERNST et al., 2006). A α -glicosidase MalA de *S. solfataricus* apresenta os resíduos catalíticos Asp320 e Asp416 localizados nas regiões III e IV, respectivamente, pertencentes ao domínio A atuam como nucleófilo e catalisador ácido/base (ERNEST, 2006). A α -glicosidase de *Schizosaccharomyces pombe* perdeu completamente a

atividade quando os resíduos catalíticos Asp482 e Asp647 localizados na região III e IV foram substituídos por Asn (KASHIWABARA et al., 2000; OKUYAMA et al., 1999).



Figura 5: O monômero da α -glicosidase MalA são apresentados de duas formas diferentes. Os quatro domínios e dois subdomínios são mostrados das seguintes cores: N-terminal (domínio N), amarelo; centro catalítico 8-barril (β/α) (domínio A), vermelho; subdomínio B, violeta; subdomínio B', laranja; proximal C-terminal (domínio C), azul; dital C-terminal (domínio D), verde (ERNST et al., 2006).

Análises do alinhamento das α -glicosidases de *M. javanicus* e *A. oryzae* confirmam a presença das 7 regiões conservadas (I-VII), e 17 resíduos de aminoácidos conservados incluindo dois resíduos de Asp do sítio catalítico. Contudo, foram detectadas regiões de baixa homologia nas posições 216 a 217, 450 a 480 e 803 a 864 da enzima do *M. javanicus* (SUGIMOTO et al., 2003).

As famílias 13 e 31 das glicosídeos hidrolases podem não apresentar similaridade entre as seqüências de aminoácidos (HENRISSAT, 1991; HENRISSAT; BAIROCH, 1993). Os genes da α -glicosidase de archaeas hipertermofílicas *T. hydrothermalis* (GALICHET; BELARBI, 1999) e *Sulfolobus solfataricus* (MARTINO et al., 2001) foram seqüenciados, assim como dos fungos mesofílicos. Na tabela 1 estão relacionados alguns fungos cujo genes da α -glicosidase foram sequenciados. Alguns autores diferenciaram a α -glicosidase da família 13 e 31 como α -glicosidase I ou II, respectivamente. Entretanto outras α -glicosidases dos fungos citados não foram relacionados em nenhuma família.

Tabela 1: Alguns fungos cujos genes da α -glicosidase foram sequenciados e os seus números de acesso ao GenBank.

Espécies	Família	GenBank
<i>Acremonium implicatum</i>	-	AB161355
<i>Aspergillus flavus</i>	-	CO139940
<i>Aspergillus nidulans</i>	-	AB057788
<i>Candida albicans</i>	-	M94674
<i>Emericella nidulans</i>	-	DQ490494
<i>Emericella nidulans</i>	-	DQ490470
<i>Mortierella alliacea</i>	-	AB090361
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13 (α -glicosidase I)	A06260
<i>Aspergillus niger</i>	31 (α -glicosidase II)	D45356
<i>Aspergillus oryzae</i>	31 (α -glicosidase II)	AB021876
<i>Aspergillus oryzae</i>	31 (α -glicosidase II)	D45179
<i>Mucor javanicus</i>	31 (α -glicosidase II)	D67034
<i>Penicillium chrysogenum</i>	31 (α -glicosidase II)	CV799230
<i>Schizosaccharomyces</i>	31 (α -glicosidase II)	AB045751

2.2. Especificidade, transglicosilação e reação catalítica da α -glicosidase

As enzimas da família 31 têm sido diferenciadas quanto às suas propriedades e especificidade pelo substrato em função do seu grau de polimerização. As α -glicosidases de *A. niger*, *S. pombe* e de aveia atuam mais eficientemente sobre a maltose e maltotriose do que sobre dextrinas mais longas. Em contraste, α -glicosidases de beterraba, espinafre e *M. javanicus* apresentam maior atividade sobre o amido do que sobre a maltose (FRANDSEN; SVENSSON, 1998; SUGIMOTO et al., 2003; OKUYAMA et al., 2005). Além da preferência pelas ligações glicosídicas α -1,4 muitas α -glicosidases atuam nas ligações glicosídicas α -1,1, α -1,2, α -1,3 e α -1,6 (OKUYAMA et al., 2005; GIANNESI et al.; 2006).

As α -glicosidases da família 13 são mais ativas nos substratos heterogêneos como, por exemplo, p-nitrofenil α -glicosídeo e sacarose do que em relação a maltose, e as enzimas dessa família são incluídas no grupo I. As enzimas da família 31 possuem preferência por substratos homogêneos como maltose, maltotriose e maltotetraose em comparação com os substratos heterogêneos, e compreende as α -glicosidases do grupo II e III. Além disso, α -glicosidases do grupo III hidrolisam polissacarídeos, por exemplo, amilose e amido (CHIBA, 1997; FRANDSEN; SVENSSON, 1998).

Além da classificação bioquímica convencional, faz-se necessário diferenciar as α -glicosidases das glicoamilases, uma vez que ambas fazem parte de um grupo de enzimas do

tipo exo α -glicolítico-*O*-hidrolases que catalisam a hidrólise da ligação α -glicosídica, liberando D-glicose a partir da extremidade não-redutora do substrato. A distinção entre elas é baseada na inversão da configuração anomérica do substrato ($\alpha \rightarrow \beta$ or $\beta \rightarrow \alpha$), típico das β -amilases e glicoamilases, ou a retenção ($\alpha \rightarrow \alpha$ or $\beta \rightarrow \beta$), que caracteriza as α -glicosidases (CHIBA, 1997). Assim, a glicoamilase e α -glicosidase liberam β -glicose e α -glicose, respectivamente. A propriedade adicional das enzimas de retenção (α -glicosidase) é realizar a transglicosilação formando ligações α -1,6 (CHIBA, 1997; SHIMBA et al., 2009).

Algumas α -glicosidases como a de *A. niger*, *M. javanicus* e *Acremonium implicatum* são capazes de catalisar a transglicosilação. Por exemplo, a enzima de *A. implicatum* catalisa a formação da ligação α -1,6-glicosídeo e α -1,2, resultando na produção de nigerose, nigerotriose e maltooligossacarídeos a partir da maltose. Em geral, a transglicosilação forma glicosídeos e oligossacarídeos por transferência do resíduo glicosil doador para o grupo hidroxila acceptor. Entretanto, em caso de altas concentrações do doador, este também funciona como acceptor (YAMAMOTO et al., 2004).

A característica de transglicosilação é importante para indústria de alimentos na produção de isomaltoligossacarídeos (IOS) e nigerosil-maltooligossacarídeos, como gêneros alimentícios (YAMAMOTO et al., 2004). Alguns oligossacarídeos como o IOS são prebióticos, fibras não solúveis que possibilitam o crescimento seletivo de bactérias benéficas (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) que habitam o cólon, capazes de promover benefícios à saúde, além de melhoram as propriedades químicas dos alimentos (FERNÁNDEZ-ARROJO et al., 2007; MURATA; USUI, 2006; NABARLATZ et al., 2007; VÁZQUEZ et al., 2000).

Para reação catalítica de retenção e inversão realizada pelas amilases dois modelos formam propostos: o deslocamento nucleofílico e a formação de um oxocarbênio intermediário (CHIBA, 1997).

O ataque nucleofílico (Fig. 6A) envolve a presença de dois ácidos carboxílicos nos sítios catalíticos, sendo um catalisador ácido/base e outro nucleófilo. Essas enzimas utilizam mecanismos de dupla remoção na qual a protonação ácida do oxigênio glicosídico e ataque nucleofílico ao C₁ levam à clivagem da ligação C-O (ligação glicosídica) e formação de um intermediário enzima-glicosil ligado covalentemente. Esse intermediário é atacado por uma molécula de água (hidrólise) ou glicose (transglicosilação), a qual é ativada pela hidroxila de uma molécula de água que foi hidrolisada pela base (ânion). A formação de um novo grupo hidroxil no C₁ da glicose ou uma nova ligação glicosídica entre as glicoses ocorre devido à substituição do oxigênio da água ou da nova glicose pela ligação do oxocarbênio entre a

glicose e o nucleófilo, este último é liberado da molécula da glicose (FRANDSEN; SVENSSON, 1998; MORAES, 2004; CHIBA, 1997). Para as enzimas que realizam a inversão anomérica da glicose, o grupo COO^- reage com o C_1 antes do ataque da molécula de água, indicando um deslocamento triplo. Entretanto, a ocorrência desse deslocamento parece improvável em uma reação de hidrólise (CHIBA, 1997).

Assim, a formação de um íon oxocarbênio intermediário (Fig. 6B) foi o outro mecanismo proposto para completar a reação da mudança na conformação anomérica realizado pelas enzimas inversoras. Após a quebra da ligação glicosídica pelo grupo COOH , o íon oxocarbênio intermediário formado foi estabilizado pelo grupo COO^- com uma ligação iônica. A retenção e inversão anomérica da glicose é realizada pela direção que o grupo OH^- da água é inserido na molécula de glicose (MORAES, 2004; CHIBA, 1997).

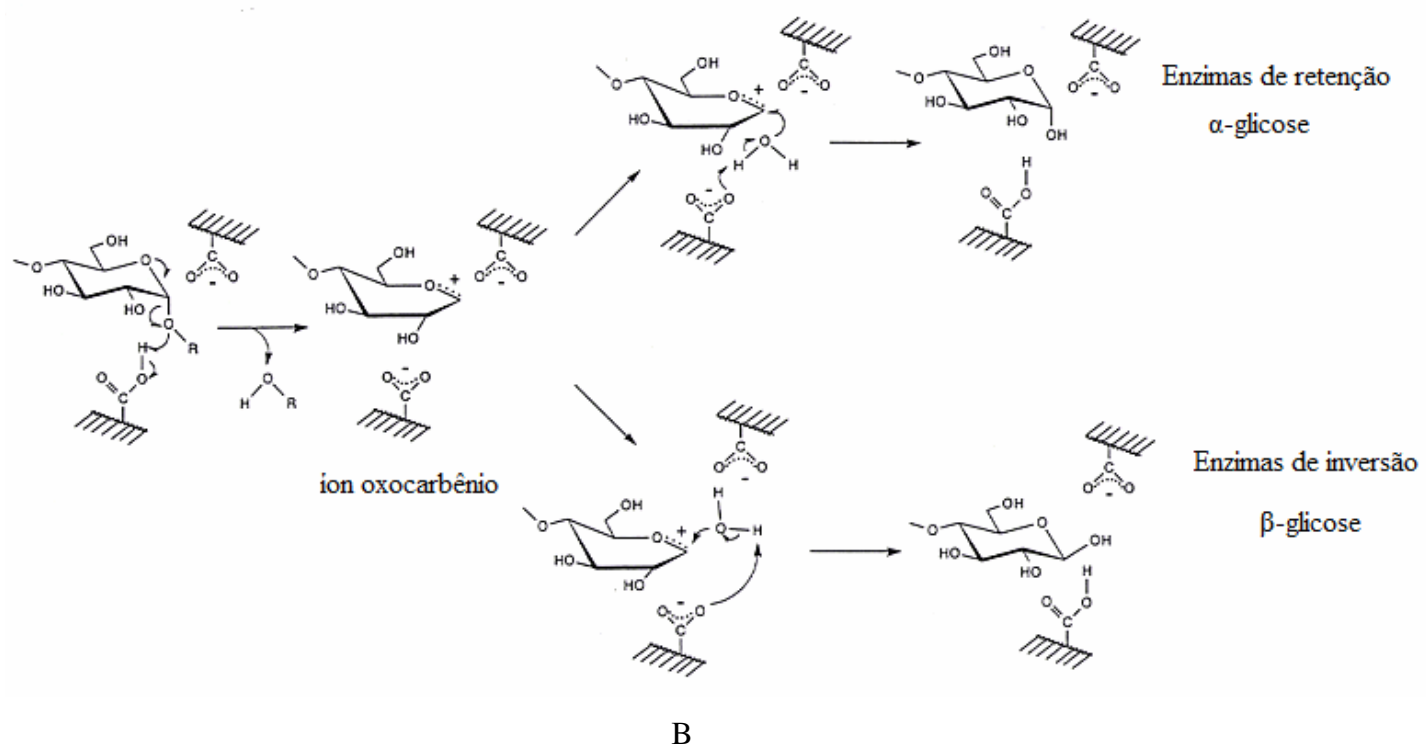
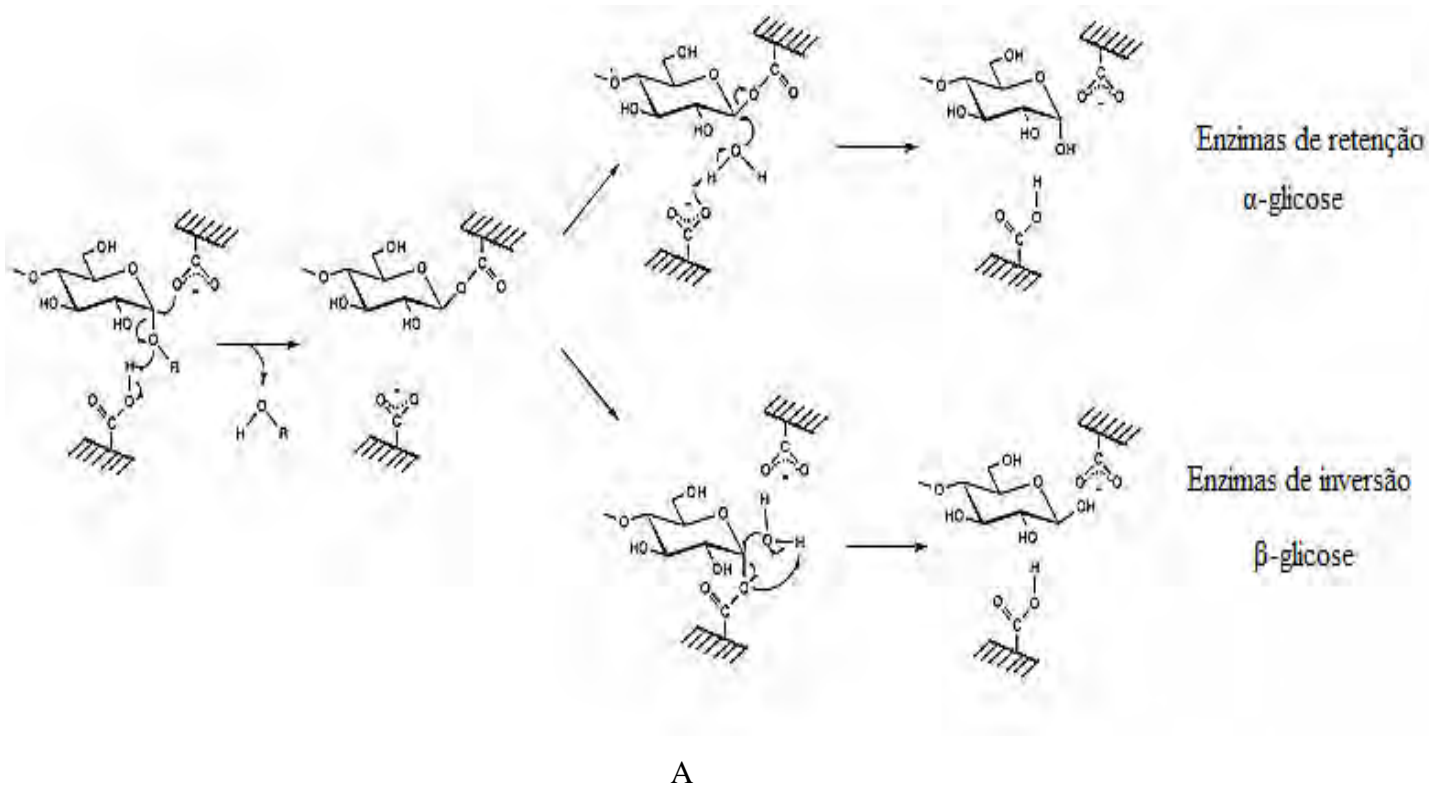


Figura 6: A – Reação de catálise via ataque nucleofílico; B – Reação de catálise via formação do íon oxocarbênio intermediário (CHIBA, 1997).

3. Inibidores de glicosidase e suas aplicações

O entendimento das propriedades e atuação das α -glicosidases intracelulares na biossíntese de glicoproteínas pode trazer importantes avanços na compreensão dos fatores de virulência para o tratamento de organismos infecciosos, como alguns fungos, bactérias e protozoários (BRAVO-TORRES et al., 2004; TORRE-BOUSCOULET et al., 2004). Nos vírus de animais e humanos, estas enzimas participam da montagem do envelope externo, que é composto por uma ou mais glicoproteínas, que são essenciais para o ciclo da partícula viral com importante função no processo infeccioso. Visto que essas glicoproteínas são sintetizadas utilizando a maquinaria do hospedeiro, o estudo para a inibição das glicosidases que participam da glicosilação dessas proteínas, pode ser um caminho para o tratamento da imunodeficiência adquirida (HIV), vírus da hepatite B (HBV) e influenza. Tem sido observado que inibidores da α -glicosidase interferem no processo infeccioso do HIV, enquanto que em HBV, os inibidores previnem a formação e liberação do vírus através da interrupção da formação do envelope viral (MEHTA et al., 1998).

Além disso, alguns pesquisadores têm observado que a ingestão de inibidores de α -glicosidase pode melhorar a hiperglicemia bem como complicações do diabetes (WANG et al., 2004). A acarbose e a voglibose são drogas inibidoras das α -glicosidases usadas terapêuticamente para o tratamento de pacientes diabéticos não dependentes de insulina, o diabetes mellitus tipo II. Em recente estudo observou-se que a voglibose inibe 20 a 30 vezes mais do que a acarbose, deste modo ocorre um aumento da tolerância à glicose por inibição da digestão e da absorção pelo intestino, especialmente depois das refeições (MELO et al., 2006). Diferentes respostas a esses dois inibidores de α -glicosidase pode ser explicado por diferenças farmacológicas entre os agentes (FUJISAWA et al., 2005).

Os inibidores de α -glicosidase utilizados para retardar o processo de digestão inibindo algumas enzimas do sistema digestivo como α -amilase pancreática, que catalisa o primeiro passo na quebra de polissacarídeos como o amido tem tido inúmeras aplicações terapêuticas. A acarbose inibe fortemente a α -amilase enquanto que a voglibose inibe mais especificamente as dissacaridases, tais como α -glicosidase e invertase. Assim, a interação dos dois inibidores no organismo tem se mostrado mais eficiente do que o tratamento com apenas um medicamento (FUJISAWA et al., 2005).

O deoxinojirimicina (dNJ), castanospermina (CAST) e australina (AUST) são inibidores que estão sendo usados para determinar o papel da α -glicosidase I e II no processamento das glicoproteínas (HERSCOVICS et al., 1999; TORRE-BOUSCOULET et al., 2004). A CAST foi inicialmente extraída das sementes de *Castanospermum australe*,

sendo o primeiro alcalóide descrito que exibiu forte inibição contra a α -glicosidase. Esse composto pode ser comparado com um derivado de dNJ por conta da similaridade entre as propriedades biológicas (MELO et al., 2006). O dNJ e a CAST são inibidores da α -glicosidase I e II, entretanto a AUST inibe apenas a α -glicosidase I (BRAVO-TORRES et al., 2004).

Os inibidores podem auxiliar na compreensão dos mecanismos de ação das enzimas nos organismos. Por exemplo, a CAST está sendo usada para auxiliar no desenvolvimento de um modelo animal para estudar a doença de Pompe, que é uma desordem genética característica pela ausência ou deficiência da α -glicosidase (RUSSEL et al., 2007). Além da utilização da CAST em testes para inibir a replicação do vírus HIV ao interromper a α -glicosidase I na *N*-glicosilação, ou seja, o bloqueio dessa enzima induziu a produção de proteínas incapazes de efetuar sua interação à membrana celular do hospedeiro nos primeiros estágios de infecção (MELO; CARVALHO, 2006). Os estudos das α -glicosidasas e de seus inibidores auxiliam na compreensão dos mecanismos de ação dessas enzimas nos organismos.

4. Microrganismos termofílicos e enzimas termoestáveis

Como fonte de enzimas nos mais variados processos biotecnológicos, os microrganismos surgem como a melhor alternativa, em função da variedade de espécies para o isolamento de enzimas com características diversificadas. Essas enzimas podem ser aplicadas nas mais variadas condições físico-químicas e com isso permitem que cada processo possa ter um tipo de enzima que melhor se adapte a ele (BROCK; MADIGAN, 1991; STOLP, 1988).

Através da realização de estudos sobre a distribuição das espécies em ambientes com os mais variados gradientes térmicos ao redor do mundo, determinou-se que organismos procarióticos em geral são capazes de crescer em temperaturas superiores àquelas que permitem o crescimento dos eucariotos. Os procariotos mais termofílicos fazem parte do Domínio *Archaea* e são capazes de crescer em temperaturas entre 80-110°C (MADIGAN et al., 2004). Por outro lado, entre as 50.000 espécies de fungos descritas apenas 30 crescem entre 40 – 45°C (MAHESHWARI et al., 2000) e poucas são capazes de crescer em temperatura em torno de 60°C (MADIGAN et al., 2004).

A correlação entre as condições ambientais do nicho ocupado por um determinado microrganismo e as propriedades de suas enzimas é bastante clara. Organismos termofílicos crescem de maneira ótima em temperaturas entre 50 e 80°C e produzem enzimas que são ativas em temperaturas entre 60 e 80°C e, em geral, são mais termoestáveis que aquelas

produzidas por mesofílicos (LEGIN et al., 1997). As enzimas estáveis a elevadas temperaturas são chamadas de termozimas ou hipertermozimas, contra terminologia equivalente, mesozima para as mais sensíveis (VIEILLE; ZEIKUS, 2001).

Algumas α -glicosidases termoestáveis foram purificadas a partir de uma variedade de bactérias mesófilas, archaea termofílicas e hipertermofílicas. As α -glicosidases produzidas por hipertermofílicos como *P. furiosus*, *T. hydrothermalis*, *S. solfataricus* MT-4 exibem atividade máxima a altas temperaturas, como 96, 95, 98°C, respectivamente (CONSTANTINO et al., 1990; MARTINO et al., 2001). A enzima do *Thermococcus* ANI mostrou-se estável a 110°C (PILLER et al., 1996). Além de outros *Geobacillus* sp termófilos produtores de α -glicosidases que foram isolados de regiões geotérmicas (COLERI et al., 2009) e α -glicosidase do termófilo *Bacillus* sp SAM1606 que apresenta temperatura ótima entre 65 e 70 °C (NOGUCHI et al., 2008).

Na maioria das pesquisas as α -glicosidases são de fungos mesofílicos, como *A. implicatum* (YAMAMOTO et al., 2004), o *A. niger* (KITA et al., 1991), o *M. javanicus* (YAMASAKI et al., 1973), *M. alliacea* (TANAKA et al., 2002) e *A. awamori*. As enzimas desses fungos possuem temperatura ótima entre 37 e 55°C e desnaturam em temperaturas elevadas (ANINDYAWATI et al., 1998). Dentre as poucas α -glicosidases de termófilos estudadas estão a de *Thermomyces lanuginosus* e *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum*, que cresce a 50° C e 40° C cuja atividade ótima ocorre a 50 e 60°C, respectivamente (JENSEN; OLSEN, 1996; GIANNESI et al., 2006).

O *Thermoascus aurantiacus* (Fig. 7) do grupo Ascomiceto é um fungo filamentosamente termofílico que possui crescimento ótimo a 50°C para a produção de algumas enzimas de interesse (CARVALHO et al., 2006; LEITE et al., 2007; MERHEB et al., 2007). As amilases, celulasas e xilanasas produzidas por esse fungo, têm sido pesquisadas devido à alta estabilidade à temperatura e ao pH, características de interesse para a aplicação industrial (BRIENZO et al., 2008). Entretanto, a α -glicosidase desse fungo ainda não havia sido estudada.

As enzimas dos termófilos possuem os mesmos 20 aminoácidos, as mesmas características estruturais principais que as correspondentes termolábeis dos mesofílicos. No entanto, as proteínas termoestáveis tendem a apresentar núcleos altamente hidrofóbicos, maior número de interações iônicas e pontes de hidrogênio que dificultam o desdobramento da proteína resultando em maior termoestabilidade (MADIGAN et al., 2004; BRUINS et al., 2001). Assim a determinação do fator que induziu a estabilidade térmica pode ser difícil, já

que são necessárias comparações entre diversas proteínas homólogas de mesófilos e termófilos. Além disso, as variações estruturais capazes de produzir esta estabilização poderão ser múltiplas e sutis (SANTOS et al., 2001; SADEGHI et al., 2006).

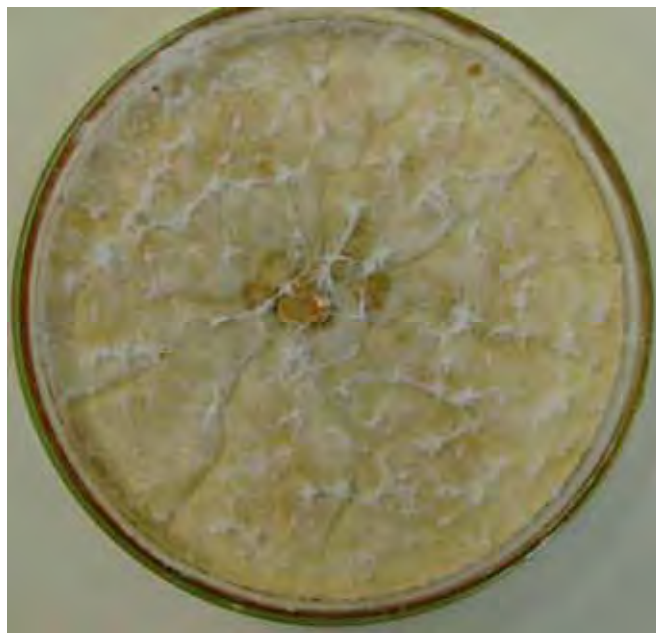


Figura 7: *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 cultivado em meio sabouroud a 50° por 48 h.

A termoestabilidade das proteínas é influenciada por um conjunto de fatores que promovem estabilização do dobramento natural da molécula. A seqüência primária de uma proteína influencia a formação das estruturas secundárias, terciárias e quaternárias sendo, portanto, um importante fator de termoestabilização (NELSON; COX, 2002). Aminoácidos como Alanina (Ala), Valina (Val), Leucina (Leu) e Isoleucina (Ile) são importantes na estabilização das estruturas das proteínas pela promoção de interações hidrofóbicas no interior da molécula. As ligações covalentes dos grupos sulfidril dos aminoácidos de Cisteína (Cys) formam as pontes dissulfeto, que também possuem um importante papel na estabilização das proteínas, em virtude das ligações covalentes entre diferentes partes de uma molécula protéica ou entre duas subunidades protéicas. Ainda, as ligações fracas (não-covalentes), como as pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e interações iônicas são também importantes para a manutenção da forma nativa da proteína, devido ao fato de serem muito numerosas (NELSON; COX, 2002; MADIGAN et al., 2004).

As comparações entre as proteínas homólogas de mesofílicos e termofílicos permitiram avaliar que os termófilos apresentam maior quantidade de pontes salinas e pontes de hidrogênio, e a presença de resíduos hidrofóbicos em maior frequência do que os resíduos polares. Além disso, observou-se que o aumento de Ácido Glutâmico (Glu) e Prolina (Pro) podem estar relacionados à termoestabilidade dos termófilos devido ao aumento da rigidez dessas proteínas. As diferenças entre a estabilidade das proteínas dos mesófilos e termófilos, pode indicar que os microrganismos termofílicos adotaram estratégias diferentes para suportar ambientes com altas temperaturas (SADEGHI et al., 2006).

Estudos com a α -glicosidase de *Bacillus* sp SAM1606 indicou a Thr272, localizada ao lado da Glu272 (resíduo catalítico) e Gly273 (resíduo determinante de especificidade), como um resíduo determinante da temperatura ótima (65-70°C). A substituição desse resíduo por aminoácidos hidrofóbicos como valina, metionina e fenilalanina provocou uma queda de 30 °C da temperatura ótima com o aumento da atividade catalítica a baixas temperaturas. Entretanto as α -glicosidases dos três mutantes apresentaram termoestabilidade até 65°C sendo que a enzima selvagem foi estável até 70°C. Provavelmente as alterações da temperatura ótima e da estabilidade das enzimas dos mutantes ocorreram devido às mudanças conformacionais para formas menos ativas (NOGUCHI et al., 2008).

Outros fatores como a presença de carboidratos nas proteínas também influencia na estabilidade à temperatura e na resistência à proteólise devido à interação entre os carboidratos e peptídeos da molécula. A retirada das cadeias de açúcares causa a flexibilidade e desestabilização da estrutura da proteína acarretando a elevação da sensibilidade ao calor e a proteólise, além da redução da atividade enzimática. Entretanto, o valor relativo da atividade enzimática dos substratos não é alterado ao comparar as enzimas nativas às que foram desglicosiladas (OKUYAMA et al., 2005).

Além disso, a estabilidade das enzimas e atividade catalítica são resultados do equilíbrio entre a flexibilidade, responsável pela função catalítica, e a rigidez, responsável pela estabilidade conformacional, sendo que as termozimas são mais rígidas do que as mesozimas (BRUINS et al., 2001; VIEILLE; ZEIKUS, 2001). Dessa forma, devido à rigidez das proteínas termofílicas, são necessárias altas temperaturas para a promoção do movimento térmico e o aumento da flexibilidade essencial para atividade catalítica (SCANDURRA et al., 1998). Algumas enzimas altamente termoestáveis apresentam atividades catalíticas inferiores às suas homólogas provenientes de mesofílicos (SANTOS et al., 2001).

A maioria das proteínas podem ser desnaturadas pelo calor que afeta as interações fracas; pelos solventes orgânicos, uréia e os detergentes que atuam principalmente no

rompimento das interações hidrofóbicas; pelos pHs extremos que alteram a carga líquida da proteína provocando repulsão eletrostática e rompimento de algumas ligações de hidrogênio (NELSON; COX, 2002; VOET et al., 2002). Entretanto, os termófilos possuem proteínas especializadas, chaperoninas, que auxiliam no dobramento da forma nativa e na restauração de suas funções após a desnaturação protéica (HAKI; RAKSHIT, 2003).

Em temperaturas acima de 100°C, as proteínas normalmente são inativadas por modificações químicas mais do que por desdobramento irreversível. Por exemplo, ocorre a desaminação da Asparagina (Asn) e Glutamina (Gln) e degradação oxidativa da Cys, Metionina (Met) e Triptofano (Trp) (BRUINS et al., 2001). As termozimas normalmente são inativadas por essas modificações químicas a elevadas temperaturas e as mesozimas por desdobramento da molécula devido à inativação térmica (VIEILLE; ZEIKUS, 1996).

Fatores extrínsecos contribuem para a estabilização das proteínas a temperaturas elevadas. Alguns compostos como manosilglicerato, fosfato diglicerol e manosilgliceramida foram detectados apenas em microrganismos termófilos e hipertermófilos, sendo que estes compostos apresentam capacidade termoestabilizadora sobre uma variedade de proteínas (LAMOSA et al., 2000). A presença de sais, o próprio substrato e as chaperoninas que auxiliam no redobramento de proteínas parcialmente desnaturadas também podem contribuir para a estabilização térmica (BRUINS et al., 2001).

A termoestabilidade das amilases é de fundamental interesse biotecnológico (ANTRANNIKIAN et al., 1995). A possibilidade de se usar enzima sob temperaturas elevadas diminui o risco de contaminação por microrganismos mesofílicos, que são a maioria entre a população à temperatura ambiente, além de aumentar a taxa de difusão, solubilidade, redução da viscosidade e tensão superficial dos componentes envolvidos em um determinado processo (HOUGH; DANSON, 1989; NIEHAUS et al., 1999).

Assim, o interesse por microrganismos termofílicos cresceu devido às características de estabilidade das enzimas a altas temperaturas para a aplicação nas indústrias de alimentos. Contudo a produção dessas enzimas pelos termofílicos é limitada pela dificuldade do crescimento das culturas em larga escala a altas temperaturas e devido ao alto custo da fermentação. Os pesquisadores estão tentando solucionar esses problemas através do estudo dos genes das enzimas de interesse para a expressão em microrganismos mesofílicos (MARTINO et al., 2001; HONG et al., 2007).

5. Purificação de α -glicosidase

Os processos de purificação de proteínas são muito diversificados devido às diferentes fontes de obtenção, que podem influenciar o isolamento das moléculas de interesse. É importante conhecer as características cinéticas desta proteína, por exemplo, temperatura e pH de estabilidade, os inibidores e os compostos que podem desnaturá-la durante o processo de purificação. Para iniciar a purificação é necessário remover a proteína de sua fonte natural como os tecidos vegetais, animais e microrganismos. Atualmente os microrganismos são utilizados para a produção, em grande escala, de enzimas extracelulares de interesse que são apropriadamente obtidas no meio de cultivo.

As técnicas de isolamento de proteínas podem variar de acordo com o meio de cultivo e microrganismo utilizado para produzi-la, além da aplicação final do produto. Com isso não existe uma metodologia pré-estabelecida para a purificação de proteínas. Normalmente os pesquisadores iniciam as etapas de purificação com a centrifugação para a separação dos resíduos sólidos, seguido de etapas de concentração seletiva do extrato enzimático como a ultrafiltração, precipitação por sulfato de amônio ou etanol gelado. Etapas de diálise e clarificação podem ser acrescentadas para a retirada de sais e pigmentos presentes nos extratos enzimáticos. Após a retirada do excesso de contaminantes do extrato enzimático são utilizadas etapas para o refinamento da amostra, por exemplo, cromatografias de troca iônica, afinidade e filtração em gel (PESSOA-JÚNIOR; KILIKIAN, 2005).

Vários tipos de α -glicosidases de mamíferos, insetos, fungos e bactérias têm sido investigadas e purificadas (YAMAMOTO et al., 2004). Entre elas, destacam-se as α -glicosidases produzidas por: *B. thermoamyloliquenfaciens* KP1071 (KASHIWABARA et al., 2000), *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10 (EZEJI; BAHL, 2006), *Geobacillus* sp A333 e a bactéria termofílica A343 (CIHAN et al., 2009). Além disso, essa enzima também foi isolada de archaea hipertermofílicas, como *S. solfataricus* MT4 (MARTINO et al., 2001) e *P. furiosus* (CONSTANTINO et al., 1990).

Entre as α -glicosidases de eucariotos foram purificadas, aquela encontrada no intestino de *Rana japonica* (TAKESUE; TEKESUE, 1996), no protozoário parasita *Entamoeba histolytica* (BRAVO-TORRES et al., 2004), no molusco marinho *Aplysia fasciata* (ANDREOTTI et al., 2006) e em vegetais, como enzima detectada durante período de germinação da semente de milho (YAMASAKI et al., 2005) e em grãos de arroz (IWATA et al., 2003).

As α -glicosidases fúngicas já purificadas, normalmente são oriundas de espécimes mesofílicos, tais como: *Aspergillus awamori* KT-11 (ANINDYAWATI et al., 1998), *Mortierella alliacea* YN-15 (TANAKA et al., 2002), *Acremonium implicatum* (YAMAMOTO et al., 2004), das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CWH41 (FARIDMOAYER; SCAMAN, 2004), *Pichia pastoris* (MUSLIN et al., 2000), *Candida albicans* (TORRE-BOUSCOULET et al., 2004) e *Schizosaccharomyces pombe* (OKUYAMA et al., 2005).

Bravo-Torres et al. (2004), obtiveram um rendimento de 42% e um fator de purificação de 3,8 vezes na purificação da α -glicosidase do *Entamoeba histolytica*, o processo de purificação foi realizado apenas em duas etapas: a amostra foi solubilizada com o detergente Lubrol PXO e o sobrenadante foi aplicado em uma coluna Mono Q de troca aniônica. A enzima monomérica apresentou massa molar de 55 kDa em SDS-PAGE.

Uma α -glicosidase produzida pela *Candida albicans* foi parcialmente purificada por Torre-Bouscoulet et al. (2004). Os autores utilizaram a resina Sepharose CL6B em cromatografia de exclusão por tamanho e, posteriormente, foi realizada uma cromatografia de troca iônica em DEAE-Bio-Gel A, seguida por uma cromatografia de hidroxiapatite. O rendimento desta purificação parcial foi de 13% e um fator de purificação de 8,7 vezes. Ela apresentou massa molar de 45 kDa.

O gene da α -glicosidase isolada do termófilo *Sulfolobus solfataricus* foi expresso na *Escherichia coli* BL21 (DE3). A α -glicosidase produzida pela *E. coli* foi purificada até a homogeneidade por precipitação térmica com rendimento de 75,4% e um fator de purificação de 14,5 vezes. Ela apresentou quatro subunidades de 80 kDa (MARTINO et al., 2001).

Tanaka et al. (2002) obtiveram um rendimento de 2,3% e um fator de purificação de 33 vezes da α -glicosidase de *Mortierella alliacea* YN-15, sendo este processo realizado em cinco etapas. A amostra foi precipitada com etanol e aplicada em uma cromatografia de interação hidrofóbica e, posteriormente, aplicaram em duas cromatografias de troca catiônica (Resource S) e por último em uma filtração em gel na coluna Hiload Superdex 200. A α -glicosidase foi estimada em 92 kDa na cromatografia de filtração em gel e apresenta uma banda no gel não-desnaturante e, no gel desnaturante, essa enzima mostrou duas subunidades de 61 e 31 kDa.

A purificação da α -glicosidases foi realizada para poucos fungos filamentosos do grupo Ascomiceto e termofílicos. Dessa forma, o estudo da α -glicosidase de *T. aurantiacus* pode trazer importantes e inéditas informações.

V. OBJETIVOS

1. Geral

Purificar e caracterizar a α -glicosidase produzida por *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 em fermentação submersa e construir a biblioteca de cDNA desse fungo.

2. Específicos

2.1. Purificar a α -glicosidase produzida por *T.aurantiacus* em fermentação submersa.

2.2. Caracterizar a enzima purificada quanto ao:

- pH e temperatura ótimos de atividade.
- estabilidade da enzima, quando em ausência de substrato, em função da variação de pH e temperatura; efeito de íons metálicos e dos inibidores sobre a atividade enzimática.

2.3. Determinar as constantes cinéticas K_m , V_{max} , massa molecular e ponto isoelétrico.

2.4. Avaliar a ação da α -glicosidase sobre diferentes substratos amiláceos e sintéticos.

2.5. Identificar os produtos de transglicosilação da α -glicosidase.

2.6. Construir a biblioteca de cDNA de fungo crescido em meio indutor de amido e buscar gene codificando para tal característica.

VI. MATERIAL E MÉTODOS

VI. 1. Microrganismos

O *Thermoascus aurantiacus* usado no presente estudo foi isolado de material lignocelulósico em decomposição no estado do Amazonas, Brasil, e foi mantido a 7 °C em meio Saboraud. A cultura foi depositada na Coleção Brasileira de Microrganismos para Ambiente e Indústria-CBMAI, CPQBA-Unicamp-Campinas (*Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756).

VI. 2. Fermentação submersa (FSM)

O meio nutriente foi utilizado com pequena modificação conforme descrito por Mandels e Sternberg (1976): 1% de amido solúvel (Reagen); 0,20% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,01% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5% de extrato de levedura; 0,2% de peptona; 0,1% de K_2HPO_4 ; 0,7% de KH_2PO_4 e 0,05% de solução de micronutrientes (0,1% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,005% $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,02% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,005% CaCl_2 ; 0,025% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). O pH foi ajustado a 6,0 com K_2HPO_4 e/ou KH_2PO_4 .

A fermentação submersa foi realizada em Erlenmeyer de 250 ml, contendo 50 ml de meio, nos quais foram inoculados 5,0 ml de suspensão de massa micelial (equivalente a 30 mg massa micelial seca/ml). A fermentação foi realizada em shaker com rotação de 100 rpm a 50 °C, por 360 horas. A biomassa foi separada por filtração a vácuo utilizando papel Whatman nº 1. O filtrado foi usado como solução enzimática de α -glicosidase.

VI. 2. 1. Obtenção da enzima intracelular

Para quantificar a atividade de α -glicosidase intracelular, a massa micelial formada durante a fermentação submersa foi separada por filtração a vácuo em filtro de papel Whatman nº 1, e transferida para tubo falcon com 4,0 ml de tampão acetato 10mM pH 4,0, 0,1 mM de inibidores de proteases (EDTA, pepstatina, protease cisteína e serino protease). Essa solução foi sonicada por 10 segundos. Esse procedimento foi repetido 10 vezes em banho de gelo. Após a lise celular o material foi submetido à centrifugação a 10000 x g por 20 minutos, a 10°C. O sobrenadante foi utilizado para dosar a atividade de α -glicosidase intracelular, segundo o método descrito no item VI. 3. 1.

VI. 2. 2. Determinação da atividade no micélio do fungo

Para a determinação da atividade α -glicosidase foram coletados “pellets” do micélio na FSM, em 120 h. O micélio foi lavado duas vezes em tampão acetato pH 4,5 para a retirada

do meio de cultivo, sendo adicionado à mistura de reação para a medição da atividade em U/g de massa úmida, segundo item VI. 3. 1.

VI. 3. Determinação das atividades enzimáticas

VI. 3. 1. Medida da atividade enzimática através da liberação de glicose

A mistura de reação enzimática foi constituída por 0,4 ml de solução de maltose a 0,20% (m/v) em tampão acetato a 250 mM, pH 4,5 e 0,10 ml de solução enzimática. Após a incubação da mistura de reação a 70°C por 10 minutos, as amostras foram submetidas ao resfriamento em banho de gelo. Dessa mistura de reação foi tomada uma alíquota de 0,10 ml à qual foi adicionado 0,40 ml de tampão fosfato 250 mM, pH 7,0. A glicose liberada foi então, quantificada através do método enzimático peroxidase-glucose oxidase (BERGMEYER; BERNT, 1974 – modificado) utilizando Kit comercial (Glicose-Enz-Color/Biodiagnóstica).

O controle da reação foi preparado conforme descrito acima, substituindo-se a enzima por volume equivalente de água destilada (controle do substrato). Um outro controle foi realizado substituindo-se a solução de maltose por volume de tampão acetato (controle da enzima). Uma unidade de enzima (U/ml) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de glicose, por minuto, nas condições do ensaio.

VI. 3. 2. Medida da atividade enzimática pela liberação de p-nitrofenol

A atividade sobre os substratos sintéticos foi determinada com 0,05 ml da solução enzimática, 0,25 ml de tampão acetato 0,1M, pH 5,0 e 0,25 ml de p-nitrofenil α -D-glucopiranosídeo ou p-nitrofenil β -D-glucopiranosídeo (α ou β -PNPG), reagindo por 10 minutos a 70°C. A reação foi paralisada com 2,0 ml de carbonato de sódio 2 M e o nitrofenol liberado, foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm utilizando uma curva padrão de p-nitrofenol. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto de reação.

VI. 4. Determinação de proteínas e carboidratos

A proteína foi quantificada por meio do método de Hartree-Lowry (1972), utilizando soro albumina bovina como padrão.

O carboidrato foi quantificado pelo método de Dubois et al. (1956), utilizando a glicose como padrão.

VI. 5. Purificação de α -glicosidase

VI. 5.1. Concentração do extrato bruto

A concentração do extrato bruto foi realizada por ultrafiltração usando-se sistema Quixstand™ Benchtop da Amersham Bioscience com uma membrana de corte limite de 50 kDa de massa molecular. Primeiramente, o extrato bruto foi concentrado por esse sistema e, em seguida, o concentrado foi misturado a tampão acetato de sódio a 10 mM, pH 4,0 (200 ml de concentrado para 800 ml de tampão) seguindo-se nova concentração. Esse processo foi repetido quatro vezes até a retirada de pigmentos presentes.

VI. 5.2. Precipitação com sulfato de amônio

O extrato concentrado por ultrafiltração foi precipitado de forma fracionada com sulfato amônio – 0 - 55% e 55 - 90% de saturação. Primeiramente, o sulfato de amônio foi adicionado lentamente até a saturação de 55% (m/v). O extrato foi mantido em repouso a 4°C por 6 h, sendo depois centrifugado. Na segunda etapa, foi completada a saturação de sulfato de amônio para 90% (m/v) no sobrenadante, com agitação branda a 4°C. O sobrenadante foi mantido em repouso a 4°C por 12 h, sendo depois centrifugado a 12.000 x g por 20 min, a 1°C. O precipitado foi ressuspenso em um volume mínimo de tampão acetato a 10 mM, pH 4,0. Esta suspensão foi dialisada contra esse mesmo tampão a 4°C, por 24 horas, com quatro trocas, utilizando-se membrana de diálise com corte limite de massa molecular entre 12 e 14 kDa. Após a diálise, o material foi filtrado em filtro de membrana com poros de 0,22 μ m (Millipore).

VI. 5.3. Cromatografias de troca iônica

A amostra dialisada, após a precipitação com sulfato de amônia, foi aplicado à cromatografia de troca iônica em coluna Tricorn 10/50 (Pharmacia Biotech, Sweden) empacotada com 20 ml de resina aniônica Q Sepharose Fast Flow e equilibrada com tampão acetato a 50 mM, pH 4,0. A amostra foi eluída com este mesmo tampão, com um fluxo de 0,4 ml/min e gradiente salino de 0 a 1,0 M de NaCl (5 volumes de coluna). Foram coletadas frações de 1,5 ml. Essa etapa cromatográfica foi realizada utilizando-se o sistema ÄKTÄ purifier (Pharmacia Biotech, Sweden) e as frações foram coletadas utilizando-se o coletor de frações (Amersham Biosciences Frac-900).

VI. 5.4. Cromatografia de filtração em gel

O sistema ÄKTÄ purifier foi utilizado para as cromatografias de filtração em gel em coluna fechada HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 de 1,6 cm x 60 cm, contendo 120 ml de gel e Superose 12 10/300GL pré empacotado com Superdex em coluna fechada de 10 cm x 30 cm, contendo aproximadamente 24 ml de gel.

As frações coletadas da troca iônica com resina aniônica Q Sepharose Fast Flow, as quais foram reunidas, liofilizadas e suspensas em 0,8 ml de tampão fosfato a 10 mM, pH 7,0. A amostra foi aplicada na coluna Sephacryl S-200 (fracionamento de 5-250 kDa) e eluída em tampão fosfato a 50 mM contendo 150 mM de NaCl, pH7,0, com fluxo de 0,3 ml/min, coletando-se frações de 1,0 ml. As frações contendo a enzima foram liofilizadas e suspensas em tampão fosfato a 50 mM, pH 7,0 e então aplicadas à cromatografia de filtração em gel Superose 12 10/300 (fracionamento de 1-300 kDa) como descrito acima.

O perfil de eluição das proteínas foi acompanhado a 280 nm e a atividade de α -glicosidase foi determinada nas frações eluídas.

VI. 6. Eletroforeses

As amostras coletadas das etapas de cromatografia foram analisadas por SDS-PAGE, segundo Laemmli (1970). As proteínas foram visualizadas pelo método de prata (BLUM et al., 1987).

O gel utilizado para a separação continha 8 ou 10% (m/v) de poliacrilamida e o gel de empilhamento continha 4% (m/v). As proteínas submetidas à eletroforese foram misturadas ao tampão TRIS-HCl 100 mM, pH 6,8, contendo 0,2% de SDS, 10% de glicerol e 0,002% de azul de bromofenol.

Antes de aplicar em SDS-PAGE, cada amostra foi tratada por dois métodos diferentes:

1) amostra semi-desnaturada (sem ferver e sem adição de β -mercaptoetanol) foi aplicada em gel 8%.

2) amostra desnaturada (fervida por cinco minutos na presença de 2% (m/v) β -mercaptoetanol) foi aplicada em gel 10% (m/v).

VI.6. 1. Eletroforese para detecção da atividade enzimática das bandas

O gel de atividade enzimática foi feito segundo protocolo descrito para a amostra semi-desnaturada. Após a corrida, o gel foi lavado quatro vezes, durante vinte minutos, usando tampão acetato a 250 mM, pH 4,5. Em seguida, foi imerso em tampão de reação

(acetato 250 mM, pH 4,5) contendo maltose (10 mg/ml), azul de nitro tetrazólio (0,4 mg/ml), metassulfato de fanazina (0,2 mg/ml) e 30 Unidades de glicose oxidase. O gel foi incubado a 37°C nessa mistura de reação, por 40 minutos (GABRIEL; WANG, 1968).

VI.6. 2. Eletroforese para a determinação de glicoproteínas através da coloração do Reativo de Schiff

O gel para determinação das glicoproteínas foi feito segundo o protocolo descrito para a amostra semi-desnaturada. Para a revelação do gel foi utilizado o método do ácido periódico de Schiff (PAS) que é específico para coloração de carboidrato (ZACHARIUS et al., 1969).

VI.6. 3. Focalização isoeétrica e determinação do ponto isoeétrico

A focalização isoeétrica desnaturante foi realizada utilizando o sistema de focalização isoeétrica Ettan IPGphor II (Amershan) em gel de 8% de poliacrilamida (14 x 15 cm) contendo anfólitos (Pharmalyte - pH 3.0-10.0), seguindo as instruções do fabricante. Para a revelação do gel foi utilizado o método com reagente de prata de acordo com Blum et al. (1987).

VI. 7. Determinação da massa molecular

VI. 7. 1. Determinação da massa molecular por filtração em gel

A massa molecular da proteína nativa foi estimada por filtração em gel utilizando a coluna Sephacryl S-200 como descrito no item VI. 5. 4. O perfil de eluição foi acompanhado por medidas da absorbância a 280 nm para as proteínas padrões e pela atividade da enzima.

As proteínas β -amilase (P.M. 200000), álcool desidrogenase (P.M. 150000), anidrase carbônica (P.M. 29000) foram utilizadas para a padronização da coluna e o azul de dextrana, para a determinação do volume morto (V_0). O volume de eluição de cada proteína (V_e) e do azul de dextrana (V_0) foram medidos e a relação V_e/V_0 calculada. A massa molecular da enzima foi estimada através da reta padrão obtida por inserção em gráfico, dos logaritmos das massas moleculares das proteínas padrões contra a razão V_e/V_0 de cada uma.

VI. 7. 2. Determinação da massa molar em SDS-PAGE

O marcador com massa molecular de 6,5 a 180 kDa (Sigma – M6539) foi utilizado para estimar a massa molar da proteínas em SDS-PAGE.

A massa molecular da enzima foi determinada por meio da reta padrão obtida por inserção em gráfico, do logaritmo das massas moleculares das proteínas padrões contra o fator de retenção (dr/dm) e posterior regressão linear.

dr = distância de retenção do soluto (distância percorrida pela proteína)

dm = distância percorrida pelo solvente

VI. 8. Caracterização da α -glicosidase purificada

VI. 8.1. Avaliação da ação da α -glicosidase sobre diferentes substratos

O substrato específico foi determinado usando como substrato o amido solúvel, celobiose, sacarose, trealose, maltooligossacrídeos (duas a sete unidades de glicose) a 2mM em 250 mM de tampão acetato de sódio, pH 4,5, e os substratos sintéticos p-nitrofenil α -D-glicopiranosídeo (α -PNPG) e p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo (β -PNPG) a 4mM no mesmo tampão, e nas condições ótimas para a atividade da enzima.

VI. 8.2. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da enzima

O pH ótimo foi avaliado pela medição da atividade enzimática a 70°C usando tampão acetato de sódio (2,5 a 5,0), citrato-fosfato (5,0 a 7,0) e Tris-HCl (7,0-8,0) na mistura de reação contendo 0,4 ml de maltose 0,2% (m/v) em tampão 250 mM e 0,1 ml da enzima purificada. O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi avaliado incubando-se a mistura de reação em temperaturas de 50 a 85°C, durante 10 minutos, em pH determinado como ótimo.

VI. 8.3. Estabilidade da enzima frente às variações de pH e temperatura, quando em ausência de substrato

Para a estabilidade ao pH foi utilizado o tampão McIlvaine (pH 2,5 a 8,0) e tampão Glicina-NaOH (pH 8,0 a 10,0) a 10 mM. Uma alíquota de 0,5 ml de solução enzimática pura foi misturada a 0,5 ml de tampão em cada valor de pH, e a mistura mantida a 25°C por 24 horas. Após esse período, as atividades enzimáticas foram determinadas no pH e temperatura ótimos de cada enzima.

O efeito da temperatura de incubação da enzima, em ausência de substrato, sobre a estabilidade da mesma, foi avaliada em dois ensaios. Num primeiro teste, a solução enzimática pura foi incubada (em ausência de substrato) em temperaturas de 40°C a 95°C por uma hora, sendo o controle, a atividade da enzima no início do ensaio. Num segundo ensaio

foi incubada a solução enzimática pura, em ausência de substrato, a 60 e 70°C, sendo retiradas amostras para a determinação da atividade residual a cada 20 minutos, durante 4 h. Foi mantida uma amostra da enzima pura em geladeira por uma hora. As atividades enzimáticas foram determinadas na temperatura e pH ótimos da enzima.

A estabilidade da enzima também foi expressa em atividade residual (% da atividade original obtida no pH e temperatura ótimos).

VI. 9. Determinação do K_m e V_{max}

As constantes cinéticas foram determinadas incubando a enzima pura com o substrato maltose, nas concentrações entre 2.8×10^{-2} and $8.9 \mu\text{M}$, na temperatura e pH ótimo de atividade enzimática. Os valores do K_m e V_{max} foram determinados plotando os dados no modelo Michaelis-Menten usando o programa GraFit5. O substrato utilizado na cinética enzimática foi preparado por diluição.

VI. 10. Efeito dos íons sobre a atividade da enzima

O efeito dos íons de metal (Ag^+ , Na^+ , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+}), EDTA and β -mercaptoethanol na atividade enzimática foi avaliado nas concentrações de 1,7 e 10 mM na mistura de reação. O efeito do SDS, tween 20, tween 80, triton-X e triton 100 na concentração de 0,2% (v/v) na atividade enzimática foi testado seguindo-se o mesmo procedimento dos itens anteriores.

VI.11. Efeito dos inibidores sobre a atividade da enzima

Os ensaios de inibição foram feitos na presença do substrato maltose, sendo testados os inibidores acarbose, voglibose (WATANABE et al., 2004), genisteína (WANG et al., 2004), dietilpirocarbonato, castanospermina (BRAVO-TORRES et al, 2004) e iodoacetamida (LI; CHAN, 1993). A mistura de reação foi composta de 0,4 ml de maltose 0,2% (m/v) em 250 mM de tampão acetato de sódio, pH 4,5, 0,10 ml de enzima e 10 μl de inibidor em diferentes concentrações, 250 mM, 10 mM e 0,018 mM – 1,5 mM; as reações foram incubadas a 70 °C por 10 min. O IC_{50} foi calculado para cada inibidor usando o programa GraFit5.

VI. 11. Identificação dos produtos de transglicosilação por cromatografia em camada delgada

O perfil da atividade transglicosilação da α -glicosidase purificada foi avaliado a 70°C, utilizando uma mistura de reação contendo 5% (m/v) de maltose e 0,2 ml (3 U) da enzima purificada, com um volume final de 5 ml em pH 4,5 por 30 h. As amostras foram retiradas da mistura de reação a 0, 3, 8, 22 e 30 h, sendo a reação interrompida a 100°C em banho de ebulição por 5 min. Os produtos da reação foram analisados por cromatografia ascendente em camada delgada de sílica, em placas de 10 x 20cm (DC-Alufolien Kieselgel 60 sem indicador fluorescente, Merck), usando uma mistura de n-butanol/ etanol/ água destilada (5:3:2, v/v/v) como fase móvel. Após a primeira corrida (+/- 6h) os cromatogramas foram deixados à temperatura ambiente para secar (+/- 12h), e então submetido a uma segunda corrida. As bandas separadas foram visualizadas por pulverização da matriz com solução de orcinol 0,2% (m/v) em metanol e ácido sulfúrico (9:1, v/v), seguido por aquecimento a 100 °C por 10 min (FONTANA et al., 1988).

VI. 12. Determinação do N-terminal da α -glicosidase

A seqüência de aminoácidos da região N-terminal da α -glicosidase foi analisada por degradação seqüencial de Edman usando sequenciador automático, após adsorção da α -glicosidase pura em membrana de PVDF, segundo instruções do fabricante.

Essas análises foram realizadas no laboratório de Biofísica da UNIFESP, tendo como responsável o professor Luiz Juliano Neto.

VI. 13. Biologia Molecular

Técnicas básicas de biologia molecular de DNA foram realizadas segundo Sambrook et al., 2001. As reações de ligação de DNA e os passos de clonagem nos quais foram utilizados os vetores comerciais pJET1.2 seguiram as instruções do fabricante (Fermentas).

VI. 13. 1. Meio de indução do RNAm para a construção da biblioteca de cDNA

O meio nutriente utilizado para a indução de *T. aurantiacus* CBMAI 756 foi descrito no item VI. 2.

A fermentação ocorreu a 50 °C e 100 rpm, por 72 horas. O micélio coletado foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido para evitar a degradação do RNA e posteriormente foi armazenado a -80°C.

VI. 13. 2. Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando-se o kit ZR Fungal/Bacterial DNA (Zymo reasearch), seguindo as instruções do fabricante.

VI. 13. 3. Extração do RNA total e purificação do RNAm

O RNA total foi extraído pelo método Trizol (Invitrogen – Cat. No 15596-026), seguindo as instruções do fabricante com modificações. Antes da etapa de precipitação do RNA total foi acrescentado um passo de lavagem com fenol(25)/clorofórmio(24)/álcool isoamyl(1) para a retirada de contaminantes; esse processo foi repetido duas vezes.

O kit utilizado para o isolamento do RNAm foi o PolyAtract mRNA Isolation Systems (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

VI. 13. 4. Construção da biblioteca de cDNA

O kit utilizado para a construção da biblioteca de cDNA do fungo *T. aurantiacus* CBMAI 756 foi o CloneMiner cDNA Library Construction, e o processo adotado para a construção desta biblioteca foi o não radioativo de acordo com fabricante. O isolamento dos RNAm e construção do banco foi realizada sob supervisão do Prof. Flavio Henrique da Silva, departamento de Genética e Evolução, da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR).

A transformação foi realizada através da reação de ligação dos fragmentos de cDNA do banco no vetor pDONR 222, sendo o volume total da reação de 9 µl. Em seguida procedeu-se a eletrotransformação de *E. coli* (250 µl) com 1,5 µl do DNA plasmidial (ligação). As células foram resgatadas mediante a adição de 1 ml de meio S.O.C. às cubetas e transferidas para tubos de polipropileno (15 ml) e mantidas sob agitação (225 rpm) a 37°C por 1 h. A seleção de clones foi realizada semeando-se 100 µl da diluição 10⁻⁴ em placa de petri contendo meio Luria Bertani (LB) com kanamicina (25 µg/ml). As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

VI. 13. 5. Isolamento dos clones da biblioteca de cDNA

Para o isolamento dos clones da biblioteca de cDNA foram distribuídos 200 µl de meio LB contendo 10% glicerol e kanamicina (25 µg/ml) em cada poçinho de uma placa de cultura de 96 poços com tampa. As colônias foram repicadas da placa de petri com palito de dente autoclavado, sendo uma colônia, por palito, por poçinho. As placas de cultura foram

incubadas a 37°C, por 20 horas. Após o crescimento das colônias as placas foram armazenadas a -80°C.

VI. 13. 6. Extração de DNA plasmidial

Para a extração do DNA plasmidial foram retiradas de cada poçinho alíquotas de 40 µl que foram misturadas em três microtubos de 1,5 ml. As colônias dos três microtubos foram unidas em um único microtubo através de centrifugação a 10.000 x g por 1 min para a extração dos plasmídeos. O kit utilizado para a extração dos plasmídeos foi o Gene Jet Plasmid Miniprep (Ferments), seguindo as instruções do fabricante. O procedimento de extração do plasmídeos foi realizado antes da placa de cultura ser armazenada no freezer - 80°C.

Os clones de cDNA foram isolados em 103 placas com 96 poços, sendo que cada placa possui um microtubo correspondente com os DNAs plasmidiais extraídos da placa (mistura).

VI. 13. 7. Primers

Os primers foram desenhados baseados nas regiões conservadas das α -glicosidases, glicoamilases, α -amilases e β -glicosidases. Estes primers estão listados na tabela 2.

Tabela 2: Primers.

Nome	Sequência	Enzimas de interesse
Aglico-F	5'GTAYGACATGKCTGAAGTTTC	α -Glicosidase
Aglico-R	5'GGTAGAAWGGRAARAAGKCSGA	α -Glicosidase
GlicoF	5'CCTACGGCGAGAACATCTAC	Glicoamilase
GlicoR	5'TCGGTTGGGATCACTCTCC	Glicoamilase
AmiF	5'CAGGGCATCATCGACAAGTTGG	α -Amilase
AmiR	5'CATCCCCCTTCATGAAGG	α -Amilase
AnaF	5'GGCAGAACTGGGAGGGTTTC	β -Glicosidase
Ana2R	5'-GCCCTGAAAATCAAGCTCCG	β -Glicosidase
M13F	5'GTAAAACGACGGCCAG	-
M13R	5'CAGGAAACAGCTATGAC	-

VI. 13. 8. PCR de colônia

Para o PCR de colônia foram utilizados 1 µl de uma cultura de células crescida por 16 h a 30°C em meio LB/kanamicina. A reação de PCR foi feita segundo o item VI. 13. 9.

VI. 13. 9. PCR para a amplificação dos genes

As reações de PCRs foram realizadas da seguinte forma: molde, tampão da Taq platinum para 1X final (Invitrogen - Platinum), 100µM cada dNTP, 2mM MgCl₂, 0,1U Taq, 0,4 µM cada primer e água para 20 µl finais. PCR “touch down”: desnaturação inicial a 94°C/2’30”, seguido de 19 ciclos de 94°C/30”, A°C/1’ e 70°C/1’30” (A= 68°C até 50°C; a temperatura de anelamento inicial foi de 68°C com diminuição de um grau a cada ciclo num total de 19 ciclos). Realizou-se mais 25 ciclos de 94°C/32”, 50°C/1’ e 70°C/30’ para a multiplicação das bandas inicialmente isoladas no touch down.

VI. 13. 10. Triagem da biblioteca de cDNA

A busca pelos genes de interesse na biblioteca foi realizada através de PCRs usando os pares de primers referentes as enzimas de interesse e o DNA plasmidial purificado como molde. Para o controle positivo da reação de PCR foi utilizado o DNA genômico como molde e no controle negativo o molde foi substituído por água miliq autoclavada.

Os plasmídeos extraídos conforme o item VI. 13. 6 foram utilizados para as reações de PCRs na triagem da biblioteca. As placas que indicaram a presença dos genes de interesse foram retiradas do -80°C e os clones foram repicados nas placas de 96 poços com meio LB/kanamicina. Após o crescimento dos clones foram retiradas de cada poçinho alíquotas de 10 µl e misturadas às alíquotas da mesma coluna em um microtubo de 1,5 ml. Para a reação de PCR foi retirado 1 µl da mistura (item VI. 13. 8).

Outros PCRs de colônia foram feitos para cada clone pertencente a coluna que sinalizou a presença dos genes de interesse. Os clones que indicaram a presença dos insertos de interesse foram novamente crescidos em meio LB para a extração do plasmídeo (item VI. 13. 6) e enviados para sequenciamento.

VII. RESULTADOS E DISCUSSÃO

VII. 1. Crescimento fúngico e produção da α -glicosidase produzida pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756

Os ensaios de FSM para a avaliação da produção da α -glicosidase e crescimento micelial foram realizados em duas repetições. As médias das atividades enzimáticas totais determinadas no meio de cultivo (extracelular) e das produções de biomassa das duas fermentações estão apresentadas na Figura 8.

A atividade α -glicosidase sobre a maltose detectada na solução enzimática bruta nas primeiras 144 horas de fermentação foi baixa ($< 1,3$ U/ml), sendo a máxima produção dessa enzima detectada em 192 h (8,0 U/ml). A atividade total de α -glicosidase manteve-se praticamente constante entre os períodos de 192 e 336 horas (199 U), sendo que em 360 horas houve um declínio da atividade total (Fig. 8).

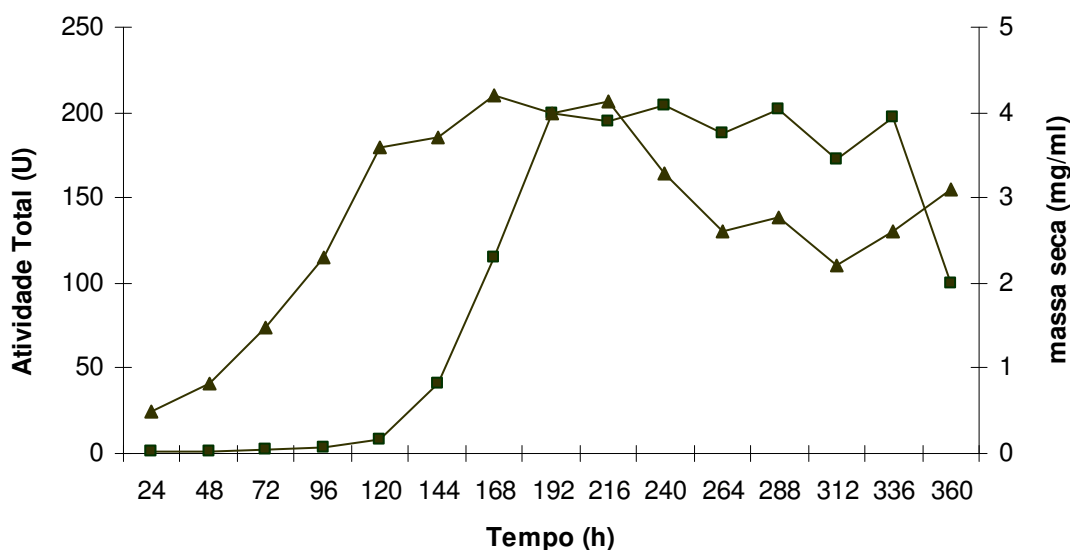


Figura 8: Produção de α -glicosidase por *Thermoascus aurantiacus* em fermentação submersa. ▲ Massa Seca (mg/ml); ■ Atividade Total (U/ml).

Comparando a curva da atividade enzimática com a curva de produção da biomassa fúngica indica que a atividade da enzima que atua sobre a maltose iniciou-se no final da fase de crescimento logarítmico, atingindo seu máximo na fase estacionária e durante a fase de morte a atividade total manteve-se praticamente constante até 336 horas. Esses resultados são compatíveis com o tipo de fonte de carbono usada. Visto que o amido foi a única fonte de carbono, a produção de algumas enzimas capazes de hidrolisá-lo seria condição essencial para

o início do crescimento do fungo (CARVALHO, 2006). As enzimas que hidrolisaram o amido podem ter liberado dextrinas indutoras de um segundo tipo de enzima, a qual teria especificidade pela maltose.

Comparando a atividade máxima da α -glicosidase do *T. aurantiacus* sobre a maltose (8,0 U/ml) com a α -glicosidase da bactéria *T. hydrothermalis* AL662 (0,014 U/ml) (LEGIN et al., 1998), com a α -glicosidase citoplasmática do *Thermus thermophilus* HB-8, 0,2 U/ml, (ZEDZIEBLO; SYNOWIECKI, 2002) e com a α -glicosidase do fungo *C. thermophilum* var. *coprophilum* (5,0 U/ml) (GIANNESI et al., 2006) sobre o mesmo substrato, pode-se concluir que a atividade enzimática obtida nesse experimento foi bastante elevada.

Segundo Rowe e Margaritis (2004), a enzima intracelular α -1,4-glicosidase, de *B. thuringiensis* subespécie *Kurstaki* IID-I é induzida por maltooligossacarídeos e mais fracamente por maltose, durante a fase de crescimento vegetativo. A α -amilase que também é induzida por maltooligossacarídeos, atua sobre o amido, gerando derivados capazes de induzir a formação de um sistema completo de enzimas que são capazes de processar e assimilar oligossacarídeos lineares formados a partir do amido. Foi demonstrado por Constantino et al. (1990), que a α -glicosidase intracelular do *P. furiosus* é produzida nas etapas finais do metabolismo do amido.

A produção de α -glicosidase por *T. aurantiacus* mostrou diferente perfil descrito para os fungos *T. lanuginosus* e *A. niger*, nos quais a secreção das enzimas ocorre na fase de crescimento logarítmico (AALBAEK, et al., 2002; PAPAGIANNI; MOO-YUNG, 2002. JENSEN; OLSEN, 1996).

Para avaliação da possibilidade da enzima α -glicosidase ser intracelular e ser liberada ao final do crescimento logarítmico com lise de hifas, foram dosados as atividades intracelulares por ruptura do micélio e atividade celular de enzima aderida à hifa. Os dados foram negativos para a atividade intracelular, porém, quando utilizado o micélio como fonte da enzima observou-se considerável atividade (20,0 U/g).

De acordo com Okuyama et al. (2005) a presença de atividade de α -glicosidase na superfície da célula bem como no sobrenadante da cultura pode indicar que essa enzima participa na biossíntese da parede celular, além da degradação de maltooligossacarídeos.

A partir dos dados apresentados podemos sugerir que o fungo *T. aurantiacus* produz uma α -glicosidase capaz de hidrolisar maltooligossacarídeos e a presença de atividade na superfície celular pode sugerir a atuação dessa enzima na biossíntese da parede celular.

VII. 2. Purificação da α -glicosidase produzida pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756

Nessa fase do projeto, grande parte do trabalho experimental foi centrada na busca das melhores técnicas cromatográficas para purificação da enzima. Dessa forma, os quatro diferentes procedimentos e resinas testados serviram para auxiliar na busca pelo isolamento da α -glicosidase.

Na primeira tentativa de purificar a α -glicosidase foi feita com quatro passos de purificação. O primeiro passo foi a concentração da solução enzimática bruta usando o sistema QuixstandTM. A amostra concentrada foi submetida à cromatografia de filtração em gel Sephadex G-150, em coluna aberta (2,6 cm x 150 cm), contendo 600 ml de gel, a qual foi equilibrada com tampão acetato 20 mM, com 50 mM de NaCl, pH 4,0. As frações eluídas com atividade de α -glicosidase obtida na filtração em gel foram dialisadas contra tampão acetato 10 mM, pH 4,0, e aplicada em coluna Tricorn (XK 50/20) contendo 2 ml de resina catiônica (SP Sepharose Fast Flow), acoplada ao sistema AKTA purifier (Pharmacia Biotech, Swedwn). No quarto passo, as frações coletadas com atividade enzimática foram unidas e dialisadas para a aplicação na coluna Tricorn (XK50/20) contendo 2 ml de resina aniônica Q sepharose Fast Flow.

O primeiro experimento permitiu apenas uma purificação parcial da α -glicosidase. Na tentativa de isolar a α -glicosidase foram feitos alguns ajustes nos procedimentos do segundo e terceiro experimento. As alterações realizadas foram mudanças no pH das cromatografias de troca iônica para alterar a força iônica entre as proteínas e resinas, entretanto, as modificações realizadas nesses experimentos não foram suficientes para purificar a α -glicosidase. Portanto, no quarto experimento foram realizadas modificações a partir da primeira etapa para conseguir isolar a α -glicosidase. Abaixo está descrito procedimento encontrado para purificar a enzima de interesse.

Concentração do extrato bruto

O primeiro passo foi a concentração da solução enzimática bruta usando o sistema QuixstandTM. Houve uma melhora nesta etapa de purificação, repetindo o processo de ultrafiltração quatro vezes ao acrescentar-se tampão acetato de sódio 10 mM, pH 4,0, ao extrato enzimático para a retirada de pigmentos e proteínas. Esta etapa apresentou um rendimento de 71% e um fator de purificação de 11,2 vezes (Tabela 3).

Precipitação com sulfato de amônio

O segundo passo foi a precipitação fracionada com saturação 55% e 90% de sulfato de amônio. Esta etapa apresentou um rendimento de 45% e um fator de purificação de 28 vezes (Tabela 3).

Tabela 3: Resultados obtidos a partir dos processos de purificação da α -glicosidase produzida pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756.

Etapas	Vol (ml)	U/ml	U Total	Proteína (mg/ml)	Proteína Total (mg)	Ativ Esp (U/mg)	Rend %	Fator de Purificação
Bruta	260	5,0	1300	2,10	554,0	2,34	100	1
Ultrafiltração	23,0	40,0	920	1,50	35,0	26,0	71,0	11
Precipitação com Sulfato de amônio	6,6	89,0	587	1,35	8,90	66,0	45,0	28
Troca aniônica (Q Sepharose)	7,5	70,0	525	0,60	4,30	105,0	35,0	45
Filtração em gel (Sephacryl S-200)	4,5	32,9	148	0,08	0,37	400,0	11,0	171
Filtração em gel (Superose 12)	3,6	15,5	55,8	0,046	0,138	404,0	4,3	173

Cromatografia de troca iônica

Para a realização dessa etapa, foram testadas duas resinas de troca aniônica, a Q Sepharose e a DEAE Sephadex. A amostra foi dialisada contra tampão acetato de sódio 10 mM, pH 5,0 durante 24 horas e posteriormente, aplicada na coluna de troca aniônica DEAE Sephadex. As proteínas foram eluídas com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 com fluxo de 0,27 ml/min. Foram coletadas frações de 4,0 ml por tubo, realizando gradiente linear 0 a 1 M de NaCl. A cromatografia apresentou apenas um pico de proteína que foi eluído durante o gradiente salino entre a concentração de 0,3 M e 0,5 M (Fig. 9).

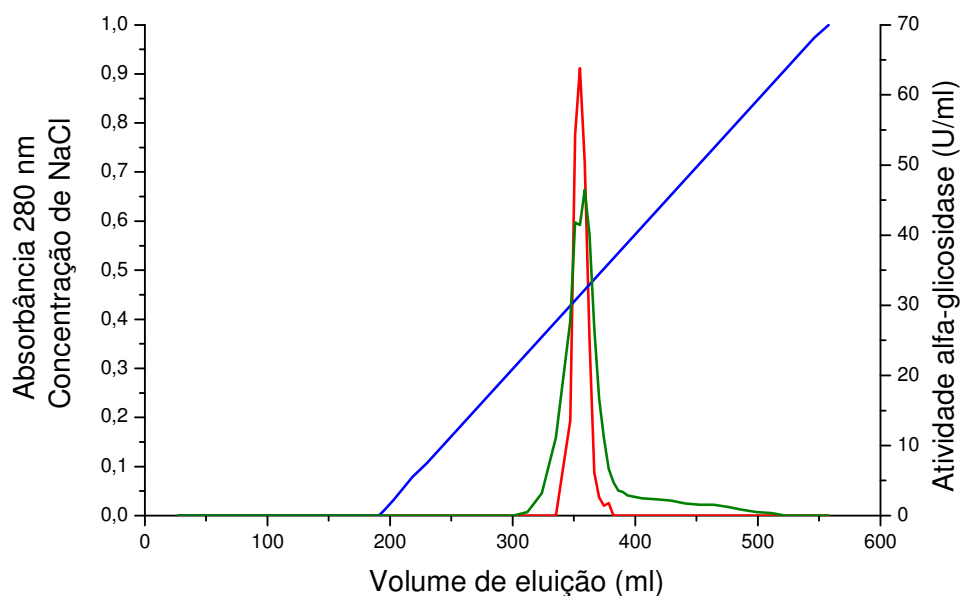


Figura 9: Perfil de eluição da α -glicosidase em cromatografia de troca aniônica com resina DEAE Sephadex.

Legenda: — abs 280 nm; — α -glicosidase; — Concentração de NaCl.

Posteriormente, foi testada a resina de troca aniônica Q Sepharose, acoplada ao sistema AKTA purifier ((Pharmacia Biotech, Swedwn). A amostra precipitada com o sulfato de amônio foi dialisada contra tampão acetato de sódio 10 mM, pH4,0 e aplicada na resina. Observou-se dois picos de proteínas, sendo um antes do gradiente salino e o outro durante o gradiente salino entre as concentrações de 0,12 M e 0,32 M. As frações com atividade enzimática foram coletadas entre os volumes de eluição 71 a 83 ml e entre as concentrações de NaCl 0,22 e 0,32 M (Fig. 10). Esta etapa apresentou um rendimento de 35% e um fator de purificação de 45 vezes (Tabela 3). A comparação entre os cromatogramas da DEAE Sephadex (Fig. 9) e da Q Sepharose (Fig. 10) permitiu a escolha da cromatografia de troca aniônica em resina Q Sepharose, devido a separação da α -glicosidase de outras proteínas durante a eluição da amostra.

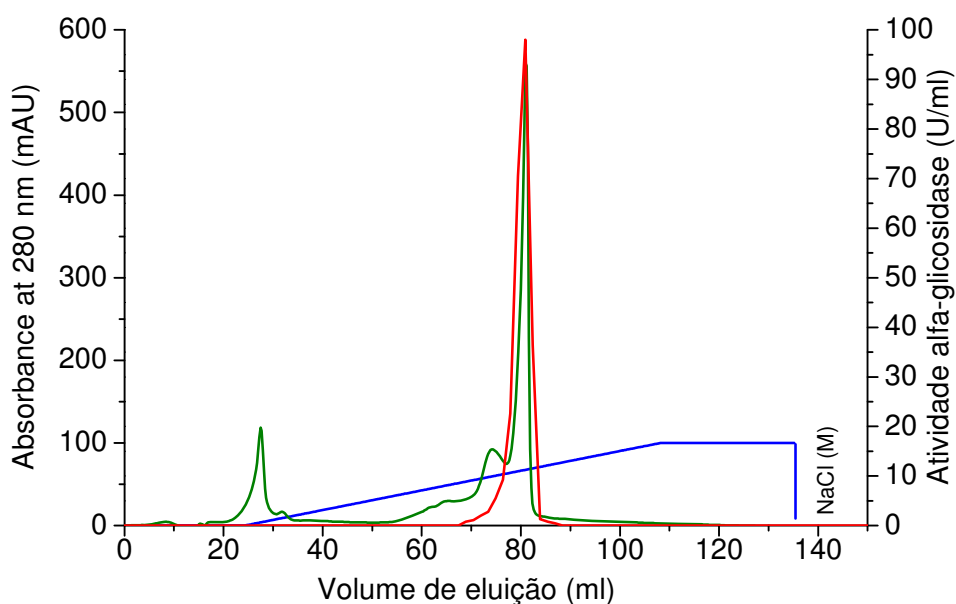


Figura 10: Perfil de eluição da α -glicosidase em cromatografia de troca aniônica com resina Q Sepharose.

Legenda: — abs 280 nm; — α -glicosidase; — Concentração de NaCl.

As amostras unidas na cromatografia de troca aniônica foram dialisadas e liofilizadas para a aplicação na filtração em gel na coluna Sephacryl S-200. As frações foram coletadas entre os volumes de eluição de 40 a 52 ml (Fig. 11). Esta etapa apresentou um rendimento final de 11% e um fator de purificação de 171 vezes (Tabela 3).

O gel SDS-PAGE com amostra semi-desnaturada apresentou uma banda protéica nítida e outra em menor quantidade. Assim, foram unidas as frações entre os volumes 45 a 50 representadas nas linhas 7, 8, 9 e 10 (Fig. 13A) para a próxima etapa.

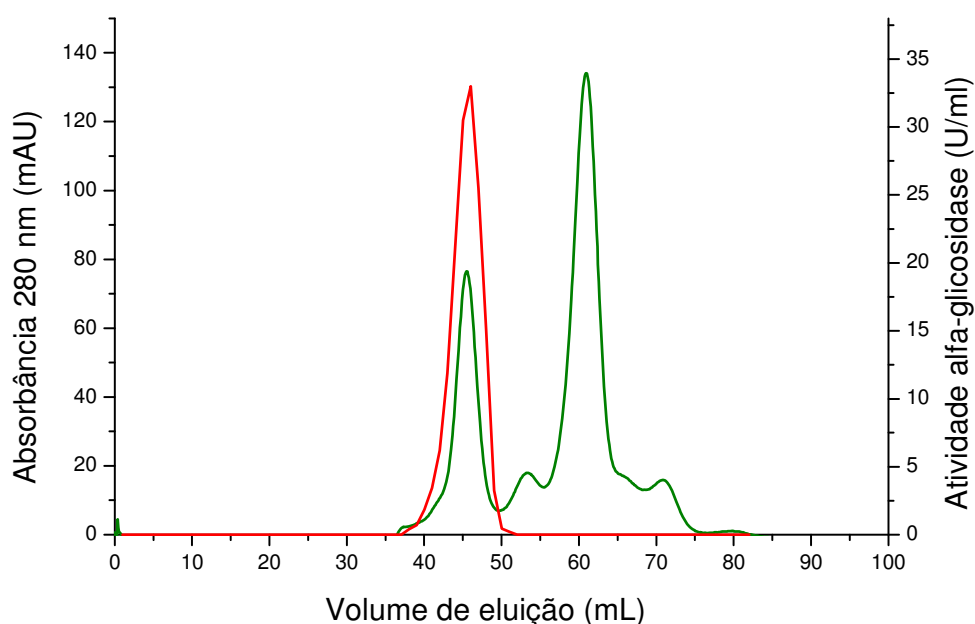


Figura 11: Perfil de eluição da α -glicosidase em cromatografia de filtração em gel na coluna Sephacryl S-200.

Legenda: — abs 280 nm; — α -glicosidase

Por último, as frações com atividade de α -glicosidase obtidas por cromatografia de filtração em gel na coluna Sephacryl S-200 foram unidas e liofilizadas para a aplicação na filtração em gel na coluna Superose 12. As frações com atividade de α -glicosidase foram coletadas entre os volumes de eluição de 12,51 e 14,51 ml (Fig. 12). Esta etapa apresentou um rendimento final de 4,3% e um fator de purificação de 173 vezes (Tabela 3)

A eletroforese em gel SDS-PAGE com amostra semi-desnaturada revelou apenas uma banda (Fig. 13B), a qual foi coincidente com aquela observada no gel de atividade de α -glicosidase (Fig. 13B, linha 3) e no gel para coloração de glicoproteína (Fig. 13B, linha 4). Entretanto, quando submetida à eletroforese em gel SDS-PAGE com amostra desnaturada (amostra fervida e com adição de mercaptoetanol) foram reveladas 3 bandas no gel (Fig. 13C), sugerindo que a α -glicosidase é uma proteína trimérica com 3 subunidades. Outra possibilidade é que a proteína tenha duas subunidades (112 e 39 kDa) que continuam associadas durante as etapas de purificação, e tenha na sua forma íntegra 144 kDa (112 + 39 kDa), ou seja, uma quantidade dessas moléculas permaneceram com as duas subunidades ligadas durante a desnaturação da amostra.

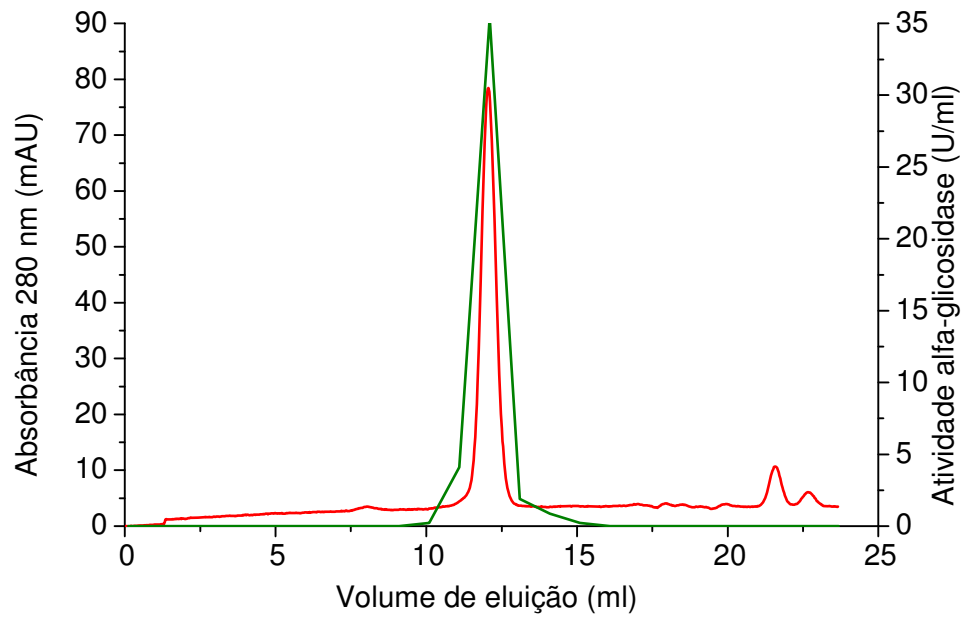
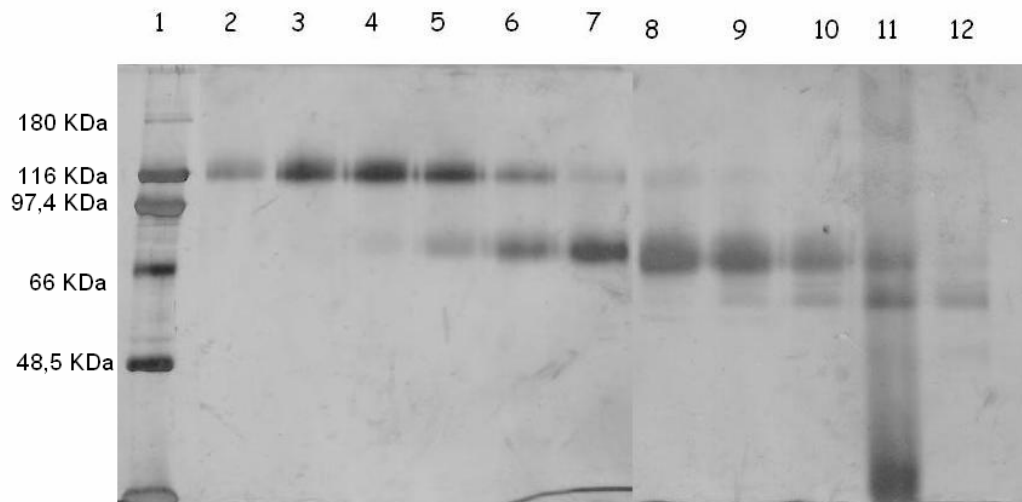
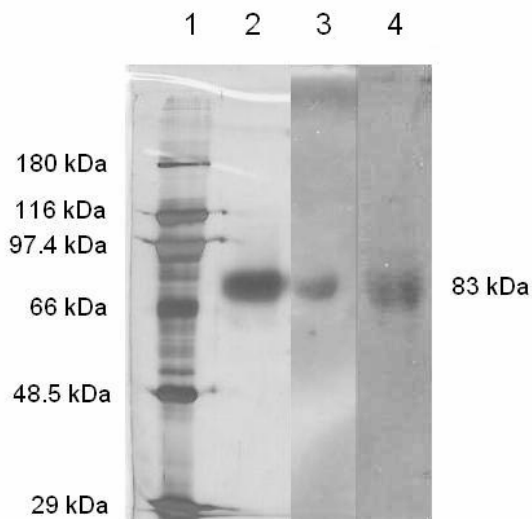


Figura 12: Perfil de eluição da α -glicosidase em cromatografia de filtração em gel na coluna Superose 12.

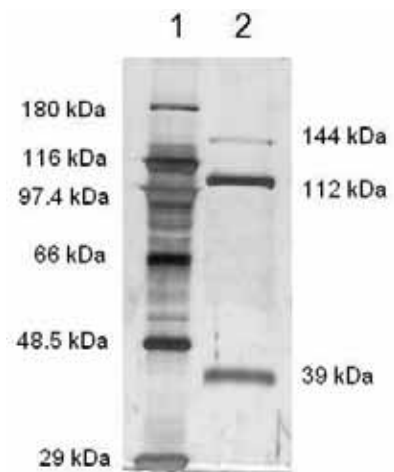
Legenda: — abs 280 nm; — α -glicosidase



A



B



C

Figura 13: Eletroforeses em géis SDS-PAGE usando amostras desnaturadas e semi-desnaturadas.

A = SDS-PAGE usando amostra semi-desnaturada corresponde à cromatografia de filtração em gel na coluna Sephacryl S-200 (linha 2 a 12); linha 1 marcador de massa molecular em kDa.

B = SDS-PAGE usando amostra semi-desnaturada corresponde à cromatografia de filtração em gel na coluna Superose 12 (linha 2); linha 1 marcador de massa molecular em kDa; linha 3 gel de atividade enzimática; linha 4 gel para coloração de glicoproteína.

C = SDS-PAGE usando amostra desnaturada corresponde à cromatografia de filtração em gel na coluna Superose 12 (linha 2); linha 1 marcador de massa molecular em kDa.

VII. 3. Focalização isoeétrica e determinação do ponto isoeétrico

A comparação entre o gel de focalização isoeétrica e o SDS-PAGE com amostra desnaturada mostraram ambos 3 bandas, sendo duas de massa molar acima de 100 kDa e uma abaixo de 45 kDa (Fig. 14 e 13C). Os resultados observados na eletroforese SDS-PAGE com amostras semi-desnaturada revelaram apenas uma banda (Fig. 13B, linha 2), quando submetido a eletroforese em SDS-PAGE com amostra desnaturada foram reveladas 3 bandas no gel (Fig. 13C, linha 2), sugerindo que a α -glicosidase é uma proteína com três subunidades. Por outro lado, na focalização isoeétrica (amostra não-aquecida, com adição de iodoacetamida e DTT) foram reveladas três spots, sendo que eles foram coincidentes à eletroforese unidimensional em SDS-PAGE com amostra desnaturada (Fig. 14A).

Foram calculados os valores do pI dos três spots observados no gel de focalização isoeétrica, sendo o primeiro valor do pI 4,5 (Fig. 14, linha 2) e os outros dois valores de pI foram 3,7 (Fig. 14, linha 3).

Durante os experimentos de purificação observou-se que a enzima de interesse ligava-se tanto às resinas de troca-aniônica e troca-catiônica em pH 4,0. Assim, o pI das subunidades corrobora com os dados de purificação, ou seja, aparentemente a subunidade que apresentou pI 4,5 ligava-se à resina de troca catiônica em pH 4,0, enquanto as subunidades com pI 3,7 ligaram-se à resina de troca aniônica no mesmo pH.

Na maioria dos artigos publicados de purificação de α -glicosidases não constam o pI das enzimas purificadas. Apenas foram encontrados dois artigos para a comparação do ponto isoeétrico.

Segundo Dillon; Kordy (1997) foram encontradas sete α -glicosidases com ponto isoeétrico entre 4,3-5,8 no inseto *Phlebotomus langeroni*. Já a α -glicosidase isolada da germinação da semente de milho apresentou pI de 8,3 (YAMASAKI et al., 2005).

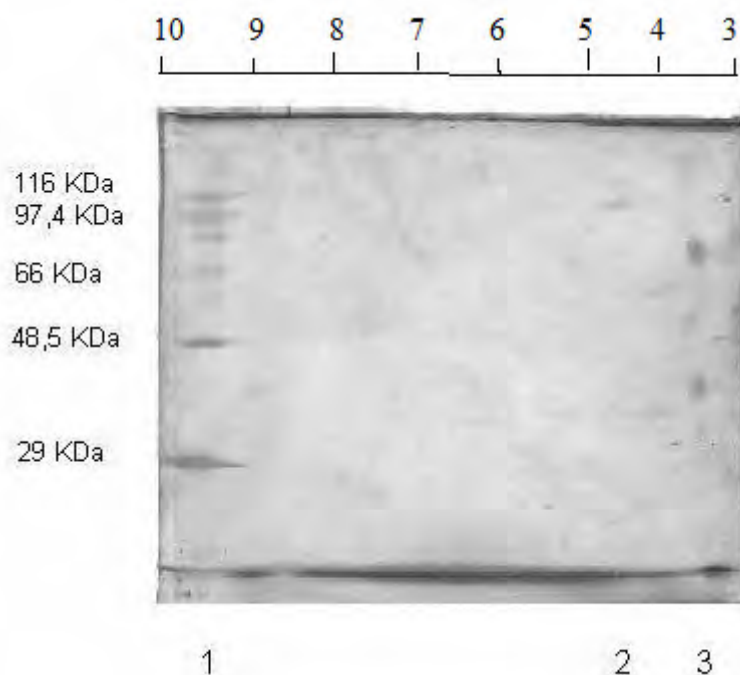


Figura 14: SDS-PAGE bidimensional da α -glicosidase purificada (linha 2 – pI 4,5; linha 3 – pI 3,7); linha 1 marcador de massa molecular em kDa;

VII. 4. Determinação da massa molar

A massa molar da enzima foi estimada através de SDS-PAGE com amostra semi-desnaturada, por cromatografia de filtração em gel Sephacryl S-200 e as subunidades da α -glicosidase no gel SDS-PAGE com amostra desnaturada.

A análise de regressão linear, plotando os valores do logaritmo da massa molar dos padrões utilizados *versus* os valores dos fatores de retenção da migração relativa de cada padrão e da enzima, permitiu estimar a massa molar da α -glicosidase pura em 83 kDa (Fig. 15A), enquanto a massa molar estimada pela reta padrão e posterior regressão linear na cromatografia de filtração em gel, plotando os valores do logaritmo da massa molar dos padrões utilizados *versus* a razão V_e/V_0 de cada padrão e da α -glicosidase, foi de 154 kDa (Fig. 15B).

Por outro lado, a análise da regressão linear permitiu estimar a massa molar de cada subunidade da α -glicosidase pura e a somatória dessas subunidades foi de 295 kDa (Fig. 15C).

Regressão linear da α -glicosidase no gel SDS-PAGE

$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error
A	2,39692	0,04200
B	-1,06568	0,09406
R	SD	N
-0,98841	0,03841	5
	P	
	0,00148	

$$Y = A + B * X$$

$$Y = 2,39692 - 1,06568 * 0,4500$$

$$Y = 1,91731$$

Massa Molar = antilog y = 83 KDa

Regressão linear da α -glicosidase na filtração em gel Sephacryl S-200

$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error
A	3,80744	0,05015
B	-1,29928	0,03495
R	SD	N
-0,99964	0,0172	3
	P	
	0,01712	

$$Y = A + B * X$$

$$Y = 3,80744 - 1,29928 * 1,2472$$

$$Y = 2,18694$$

Massa Molar = antilog y = 154 KDa

Regressão linear das subunidades da α -glicosidase no gel SDS-PAGE

1ª subunidade: $Y = A + B * X$

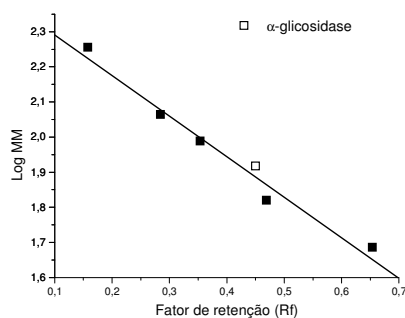
$Y = 2,39692 - 1,06568 * 0,2250$ $Y = 2,157142$ Massa Molar = antilog y = 144 KDa

2ª subunidade: $Y = A + B * X$

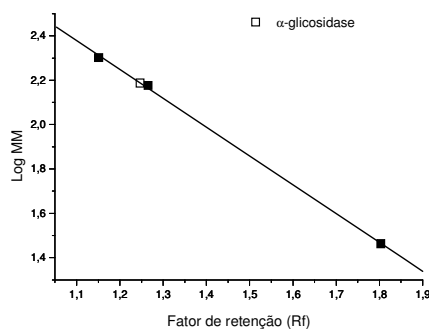
$Y = 2,39692 - 1,06568 * 0,3250$ $Y = 2,050574$ Massa Molar = antilog y = 112 KDa

3ª subunidade: $Y = A + B * X$

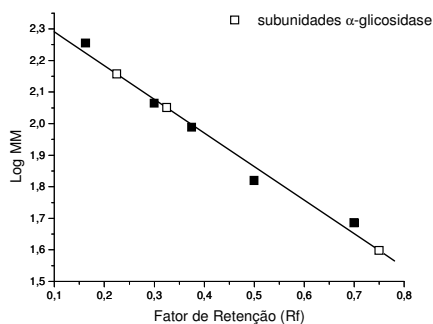
$Y = 2,39692 - 1,06568 * 0,7500$ $Y = 1,59766$ Massa Molar = antilog y = 39 KDa



A



B



C

Figura 15: Retas padrões obtidas para a determinação da massa molar da α -glicosidase. A = Reta Padrão obtida pela plotagem do log da massa molar dos padrões *versus* a migração dos fatores de retenção de cada padrão e da enzima no gel SDS-PAGE com amostra semi-desnaturada. B = Reta Padrão obtida pela plotagem do log da massa molar dos padrões *versus* V_e/V_0 de cada padrão e da enzima na cromatografia de filtração em gel Sephacryl S-200. C = Reta Padrão obtida pela plotagem do log da massa molar dos padrões *versus* a migração dos fatores de retenção de cada padrão e das subunidades da α -glicosidase no gel SDS-PAGE com amostra desnaturada.

As diferenças entre as massas molares estimadas por cromatografia de filtração em gel com amostra nativa (154 kDa) e por SDS-PAGE com amostra semi-desnaturada (83 kDa) podem ser devido a presença dos carboidratos na enzima que podem interagir com a resina. O valor estimado de carboidrato na α -glicosidase foi 42%. Diferenças similares foram observadas para a massa molar da α -glicosidase de *C. thermophilum* var. *coprophilum*, *Acremonium implicatum* IFO30538, levedura *S. pombe* e *Archachatina ventricosa*, que apresentam 14, 43, 91 e 25% de carboidratos, respectivamente (GIANNESI et al., 2006; YAMAMOTO et al., 2004; OKUYAMA et al., 2005; SORO et al., 2007).

De acordo com dados de literatura, as α -glicosidases são purificadas de diversas maneiras e apresentam valores de massa molares bastante distintos, em função do organismo de origem.

Segundo Okuyama et al. (2005), a α -glicosidase da levedura *S. pombe*, possui massa molar entre 106 e 139, após a remoção glicídica da glicoproteína, sendo que a massa molar total da enzima estimada por filtração em gel foi de 1120 kDa. A α -glicosidase foi purificada com um rendimento de 42,8% após quatro passos de purificação. Primeiramente, a enzima foi precipitada com etanol e, posteriormente, foi realizada uma cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose CL-6, seguida de duas cromatografias em Sepharose 6B.

A α -glicosidase I produzida pela levedura *S. cerevisiae* CWH41 foi purificada com um rendimento de 26% e um fator de purificação de 79,6 vezes. Faridmoayer e Scaman (2004) precipitaram a enzima com sulfato de amônio e aplicaram em uma troca iônica Toyopearl DEAE. Posteriormente realizaram uma cromatografia de troca aniônica FPLC Mono Q e em seguida aplicaram em uma resina de CPDJM. Ela possui massa molar de aproximadamente 98 kDa, porém, quando essa é hidrolisada com tripsina produz polipeptídios com massa molecular de 59, 37, 32 e 29 kDa.

A α -glicosidase produzida pelo fungo *A. implicatum* apresenta duas bandas de polipeptídios em SDS-PAGE com massas molares de 51 e 60 kDa. Esta enzima é uma glicoproteína que contém 24,5% e 18,3% de carboidratos como glicose e manose, respectivamente. Uma massa molar total de 440 kDa foi estimada por meio de filtração em gel em resina Superdex 200. A enzima foi purificada com um rendimento de 33,5% e um fator de purificação de 105 vezes. Primeiramente, a amostra foi aplicada em uma coluna de troca iônica DEAE-Toyopearl, e em seguida aplicada em cromatografia hidrofóbica Butyl-Toyopearl. Por último, aplicada em uma coluna Toyopearl HW-5S (YAMAMOTO et al., 2004).

Giannesi et al. (2006), estimaram a massa molar da α -glicosidase de *C. thermophilum* var. coprophilum em 107 kDa por cromatografia de filtração em gel e a presença de 14% de carboidrato na molécula. Em gel SDS-PAGE desnaturante a enzima apresenta duas subunidades idênticas de 22 kDa e duas de 26 kDa. Eles obtiveram um rendimento de 13% e um fator de purificação de 64 vezes da α -glicosidase desse fungo, após quatro etapas. O extrato bruto foi precipitado com acetona e aplicado na cromatografia de troca iônica DEAE-celulose. Posteriormente, aplicaram em uma coluna de troca iônica CM-celulose e por último na cromatografia hidrofóbica Octyl-Sepharose CL-4B.

O fungo mesofílico *A. nidulans* produz α -glicosidase B (AgdB) que foi purificada até a homogeneidade, após três etapas. Primeiramente, o extrato foi aplicado na cromatografia de troca iônica DEAE-Toyoperal, seguida de uma cromatografia hidrofóbica Phenyl Sepharose CL-4B e novamente uma cromatografia iônica em resina Resource Q. O rendimento final foi de 22% e apresentou um fator de purificação de 52 vezes. A enzima apresentou duas subunidades que foram estimadas em 74 e 55 kDa usando o SDS-PAGE (KATO et al., 2002).

Ezeji e Bahl (2006) obtiveram um rendimento de 32% e um fator de purificação de 25,4 vezes para a α -glicosidase de *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10. A amostra foi precipitada com sulfato de amônio e posteriormente dialisada, em seguida foi aplicada em uma cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex A-50. Por último, foi aplicada na cromatografia de filtração em gel Superdex-200. A massa molar foi estimada em 45 kDa da α -glicosidase, em SDS-PAGE.

Uma α -glicosidase recombinante da cevada expressa em *Pichia pastoris* foi purificada até a homogeneidade por diafiltração, ultrafiltração, cromatografia de afinidade e filtração em gel. A última etapa apresentou um rendimento de 23% e um fator de purificação de 25,6 vezes. A α -glicosidase nativa da cevada apresenta massa molar de 92 kDa, enquanto a α -glicosidase recombinante da cevada expressa em *Pichia pastoris* apresentou massa molar de 100 kDa (NAESTED et al., 2006).

Anindyawati et al. (1998) estimaram as massas molares das α -glicosidases nativas de *A. awamori* KT-11 (α -G I e α -G II), por cromatografia líquida, em 108 e 106 kDa, respectivamente. Em SDS-PAGE, cada enzima foi separada em duas subunidades cujas massas molares foram estimadas em 62 e 31 kDa para α -G I, e 59 e 31 kDa para α -G II.

O termófilo *Thermus caldophilus* GK24 apresentou uma unidade monomérica com massa molar de 60 kDa em SDS-PAGE (NASHIRU et al., 2001). Segundo Kashiwabara et al. (2000), a α -glicosidase II de *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KP1071 é uma proteína

homohexamérica com subunidades de 90 kDa, em SDS-PAGE. Já a massa molar estimada em PAGE sem SDS e filtração em gel foi 530 kDa e 540 kDa, respectivamente.

VII. 5. Caracterização da α -glicosidase purificada

VII. 5. 1. Avaliação da ação da α -glicosidase sobre diferentes substratos

Observa-se na figura 16 a ação da enzima sobre diferentes substratos amiláceos, substratos sintéticos e sacarose.

A α -glicosidase apresentou maior atividade sobre a maltose (28,7 U/ml) e dextrinas curtas. A atividade enzimática foi decrescente com o aumento da polimerização das pequenas dextrinas, sendo 10,2 U/ml a atividade sobre maltoheptaose. A enzima foi capaz de atuar sobre o substrato sintético p-nitrofenil α -D-glicopiranosídeo (α -PNPG) com 5,3 U/ml (Fig. 16).

A hidrólise dos substratos trealose (α -1,1) e dextrinas longas do amido foi muito baixo em ambos com 0,2 U/ml. Já os substratos celobiose (β -1,4), sacarose (α -1,2- β) e o substrato sintético p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo (β -PNPG) não foram hidrolisadas pela enzima, que mostram que a enzima é uma α -glicosidase específica que hidrolisa as ligações α -1,4 (Fig. 16).

A enzima purificada apresentou perfil semelhante ao do extrato enzimático bruto obtido pelo *T. aurantiacus* em FSM, o que indica a maior atividade observada no extrato bruto foi referente à α -glicosidase.

As hidrolases de glicosídeos são inseridas nas famílias 13 e 31, e dentro de três grupos (I, II e III) baseado na estrutura primária dos aminoácidos e na especificidade pelos substratos, respectivamente. Normalmente as α -glicosidases pertencentes à família 13 são inseridas no grupo I, pois hidrolisam os substratos heterogêneos como sacarose e α -PNPG mais rapidamente do que os substratos homogêneos como maltooligossacarídeos e apresenta pequena ou nenhuma atividade sobre α -glicanos. Enquanto as enzimas pertencentes à família 31 hidrolisam mais eficientemente os substratos homogêneos do que os heterogêneos e são convencionalmente introduzidas nos grupos II e III. As α -glicosidases do grupo II e III são similares à especificidade pelo substrato, mas o grupo III hidrolisa mais eficientemente os α -glicanos do que os maltooligossacarídeos (CHIBA, 1997; FRANDBSEN; SVENSSON, 1998).

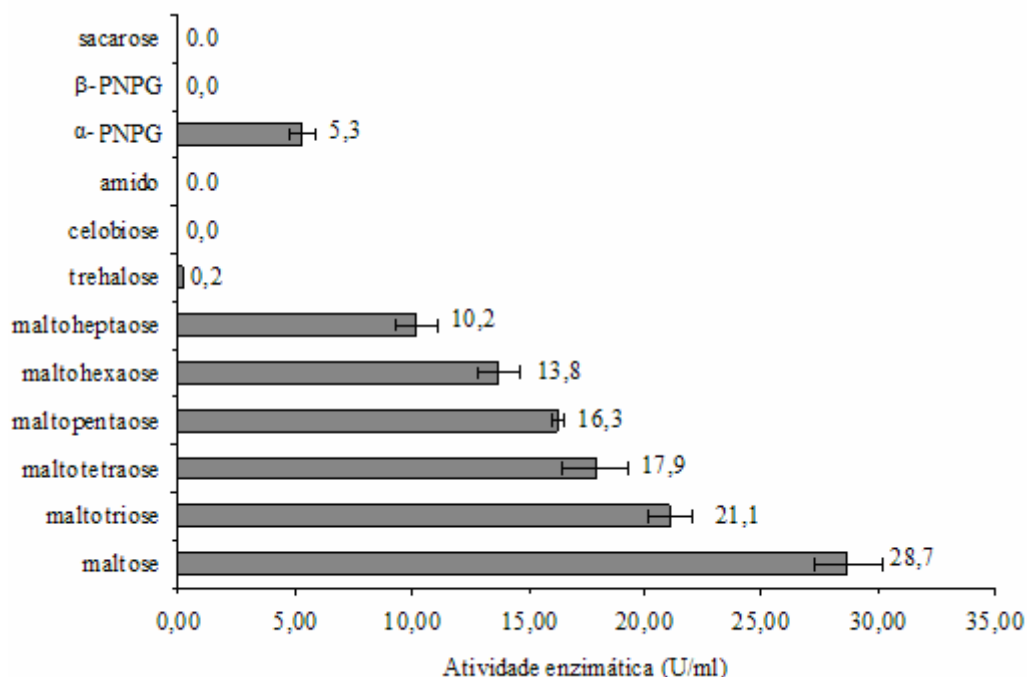


Figura 16: Avaliação da atividade da α -glicosidase purificada de *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 sobre diferentes tipos substratos amiláceos, substratos sintéticos e sacarose.

A α -glicosidase do fungo *C. thermophilum* var. *coprophilum* hidrolisou preferencialmente a maltose, quando comparado com a amilose, amido, maltooligossacarídeos e isomaltose, sendo que não houve atividade sobre os substratos sintéticos (α -PNPG e β -PNG). Com isso os autores incluíram essa enzima no grupo II (GINNESI et al., 2006). O mesmo foi observado para α -glicosidase de *G. thermodenitrificans* HRO10 ao hidrolisar a maltose e pequenos oligossacarídeos, como maltotriose e maltoheptaose (EZEJI; BAHL, 2006).

A enzima imobilizada α -glicosidase do *S. solfataricus* MT4 possui alta afinidade por maltose, entretanto, é totalmente inativa sobre a amilose, amilopectina e amido (SCHIRALDI et al., 2004). O mesmo foi observado para a α -glicosidase produzida por *S. pombe* que atua igualmente sobre a maltose e maltotriose, porém a partir da maltopentaose a hidrólise sobre esses maltooligossacarídeos diminui. Elas atuam fracamente em uma grande variedade de substratos com ligações glicosídicas α -1,2, α -1,3 e α -1,6, como kojibiose, nigerose e isomaltose, respectivamente. Além disso, a enzima atua sobre os substratos sintéticos fenil α -glicoside e fenil α -maltoside. De acordo com a especificidade pelo substrato a enzima foi incluída na família 31 e no grupo II (OKUYAMA et al., 2005).

Segundo Sugimoto et al. (2003), o tipo de α -glicosidase produzido influencia nos tipos de substratos hidrolisados. A α -glicosidase produzida por *M. javanicus* apresenta alta

atividade sobre o amido solúvel e maltooligossacarídeos. Em contrapartida, a enzima de *A. oryzae* e *A. niger* apresentam alta atividade sobre maltooligossacarídeos e baixa sobre o amido. As duas α -glicosidases hidrolisam substratos em um único sítio ativo, sendo que na enzima de *M. javanicus*, o sítio ativo possui seis subsítios, que são mais prolongadas do que a do *A. niger* que apresenta três subsítios (SUGIMOTO; SUZUKI, 1994).

Yamamoto et al. (2004), purificaram a α -glicosidase de *A. implicatum* IFO30538 que apresenta atividade hidrolítica sobre substratos homogêneos, como maltooligossacarídeos e amido solúvel, e mostra pequena ou nenhuma atividade em substratos heterogêneos. Do mesmo modo, a α -glicosidase do fungo *M. alliacea* YN-15 que hidrolisa substratos homogêneos, como maltose e amido solúvel mais rapidamente do que os heterogêneos como sacarose e PNPG, pois atacam preferencialmente as ligações glicosil com configuração anomérica α -1,4 (maltose, amido, amilose, amilopectina e glicogênio) e α -1,3 (nigerose) (TANAKA, et al., 2002).

Por outro lado, a α -glicosidase do *T. thermophilus* HB-8 atua mais rapidamente sobre o α -PNPG do que sobre a maltose. Entretanto, esta enzima também apresenta alta atividade sobre maltose e maltotriose. Houve um decréscimo da atividade sobre a maltotetraose, maltopentoase e maltohexaose, devido ao aumento da massa molecular dos substratos (ZDZIEBLO, SYNOWIECKI, 2002).

A α -glicosidase de *T. aurantiacus* assemelha-se à enzima de *A. niger* (SUGIMOTO; SUZUKI, 1994), *C. thermophilum* var. *coprophilum* (GINNESI et al., 2006), *G. thermodenitrificans* HRO10 (EZEJI; BAHL, 2006), *S. solfataricus* MT4 (SCHIRALDI et al., 2004) e *S. pombe* (OKUYAMA et al., 2005) ao hidrolisarem mais rapidamente pequenos maltooligossacarídeos como maltose do que o amido solúvel e substratos sintéticos.

A enzima purificada foi capaz de hidrolisar eficientemente os substratos homogêneos como, a maltose e pequenas dextrinas, além de hidrolisar o substrato heterogêneo (α -PNPG), entretanto não foi capaz de hidrolisar a sacarose. Assim, os resultados apresentados permitiram concluir que a α -glicosidase pode ser incluída no grupo II da classificação de Chiba (1997) e com isso pertence à família 31 apesar de não se saber a sequência primária dos aminoácidos.

VII. 5. 2. Determinação da temperatura e pH ótimos sobre a atividade da enzima e estabilidade da enzima frente à variações de pH e temperatura, quando em ausência de substrato

O substrato utilizado para a caracterização bioquímica da α -glicosidase purificada foi a maltose, devido a alta eficiência da enzima para hidrolisá-lo em relação aos outros substratos testados.

Os resultados da caracterização da α -glicosidase purificada são apresentados nas figuras 17 e 18.

A α -glicosidase apresentou pH ótimo de 4,5, embora atividades muito próxima do máximo tenham sido obtidas em pH entre 3,0 e 5,0. Em pH alcalino, a atividade enzimática diminuiu consideravelmente em relação ao pH ácido obtendo-se em pH 6,5 menos de 50% da atividade máxima da enzima (Fig. 17A). A atividade máxima da enzima foi obtida a 70°C, com 74% e 80% dessa atividade em temperaturas de 65 e 75°C, respectivamente (Fig. 17B).

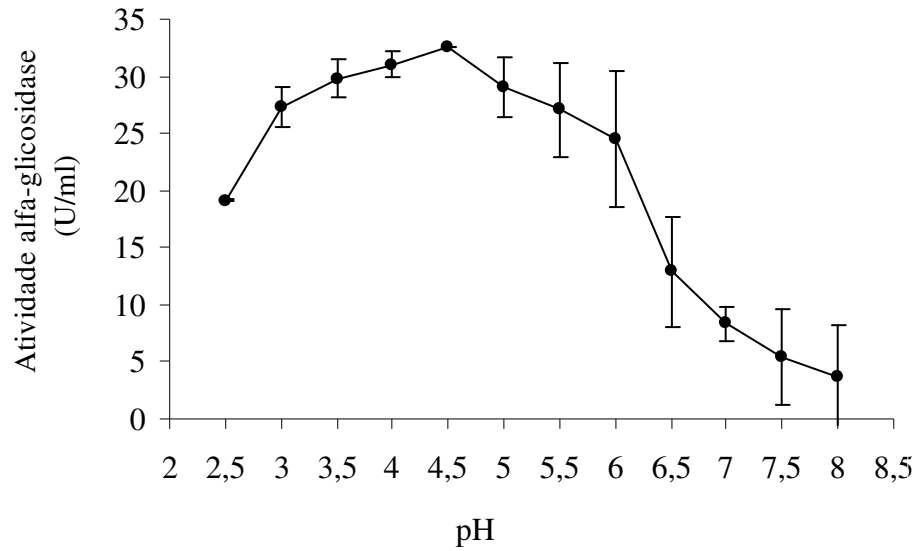
Com relação à estabilidade ao pH em ausência de substrato, a α -glicosidase manteve entre 90% e 116% da atividade original entre os pH 3,0 e 9,0. Já em pH 10 houve uma perda de 87% dessa atividade (Fig. 18A).

A enzima frente à variação de temperatura em ausência de substrato teve preservada 60% de atividade enzimática após ser mantida por 1 hora em temperaturas de 40, 50 e 60°C (Fig. 18B). A meia-vida da α -glicosidase a 60 e 70°C foi cerca de 120 e 17 minutos, respectivamente, sendo que a 60°C a enzima manteve sua atividade original entre 55% e 42% durante o período de 60 e 180 minutos de incubação (Fig. 18C). Enquanto, a 70°C houve a inativação da enzima com 140 minutos (Fig. 18D).

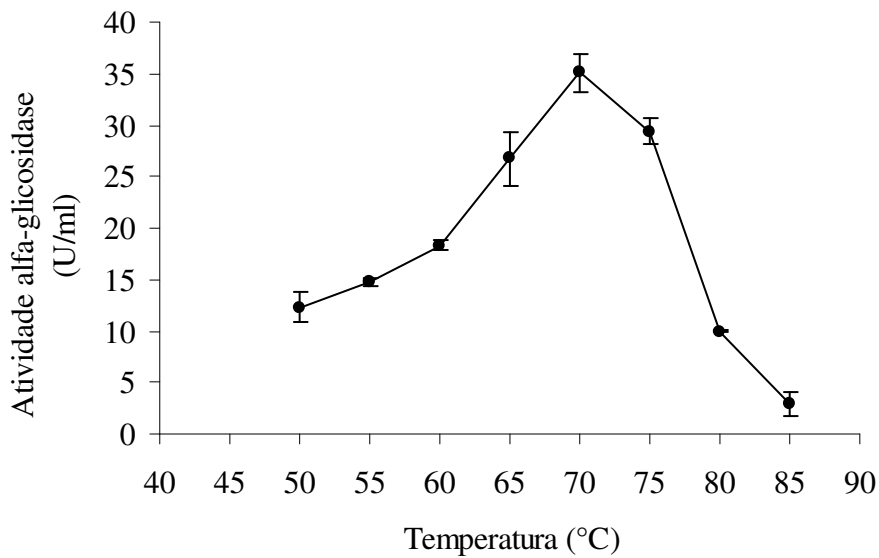
Em estudos anteriores o pH e a temperatura ótimos dos extratos enzimáticos brutos de α -glicosidase produzido pelo fungo *T. aurantiacus* por FSM e fermentação em estado sólido (FES) foram 4,5 e 70°C, respectivamente. O extrato enzimático obtido em FMS manteve-se estável a 60°C durante 10 horas, sendo que a 70°C o extrato bruto perdeu 30% da atividade original durante 1 hora de incubação em ausência de substrato (Carvalho et. al., 2006).

Nota-se que a α -glicosidase purificada a partir do extrato enzimático obtido por FSM apresentaram o mesmo pH e temperatura ótimos, porém o extrato bruto foi mais termoestável quando em ausência de substrato. O mesmo ocorreu no pH de estabilidade em ausência de substrato, o extrato enzimático apresentou 100% de estabilidade entre os pH 3 e 9, sendo que a α -glicosidase purificada perdeu 86% da atividade original no pH 10. A diminuição da estabilidade da enzima frente à variação de pH e de temperatura pode ter sido influenciada

pela ausência de alguns íons, compostos primários e secundários presentes no extrato bruto que foram retirados durante o processo de purificação.

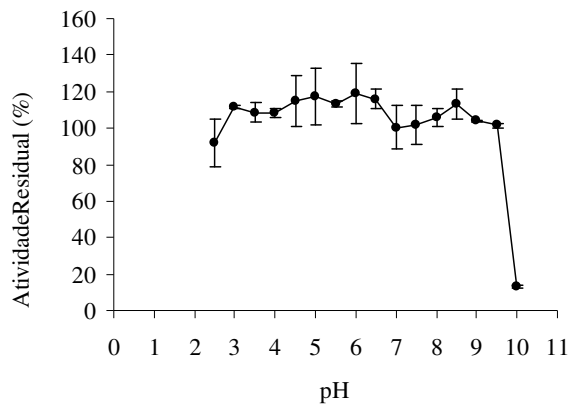


A

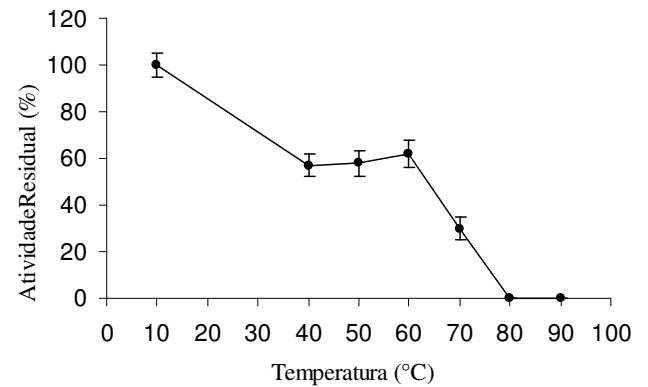


B

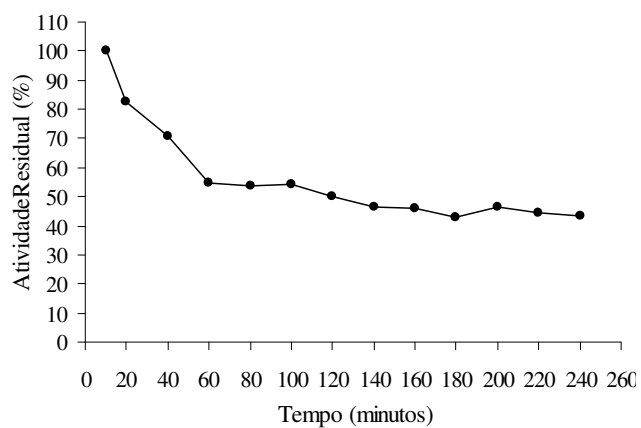
Figura 17: Caracterização físico-química da α -glicosidase purificada de *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756. A = efeito do pH sobre a atividade enzimática; B = efeito da temperatura sobre a atividade enzimática;



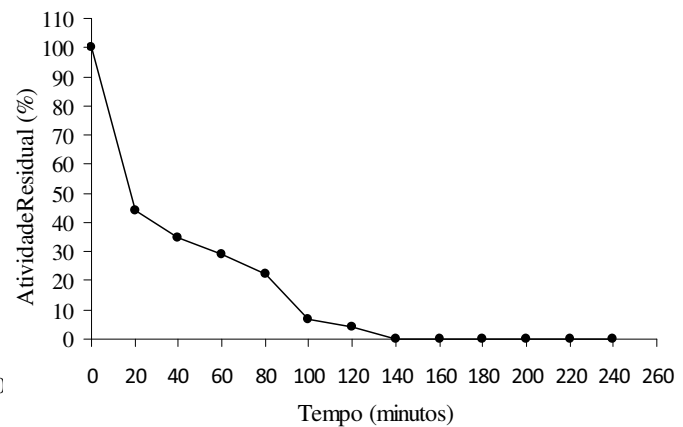
A



B



C



D

Figura 18: Caracterização física-química da α -glicosidase purificada de *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756. A = estabilidade da enzima, em ausência de substrato, frente à variação de pH; B = estabilidade da enzima, em ausência de substrato, frente à variação de temperatura; C = estabilidade da enzima, em ausência de substrato, frente ao tempo de incubação a 60°C; D = estabilidade da enzima, em ausência de substrato, frente ao tempo de incubação a 70°C.

Várias α -glicosidases purificadas de várias fontes exibem pH e temperatura ótimo ente 4,0 - 7,5 e 50 - 70°C, respectivamente (GINNESI et al., 2006; ANINDYAWATI et al., 1998; YAMAMOTO et al., 2004; BRAVO-TORRES et al., 2004; OKUYAMA et al., 2005; TANAKA et al., 2002; ZDZIEBLO; SYNOWIECKI, 2002; MARTINO et al., 2001; EZEJI; BAHL, 2006; IWATA et al., 2003).

O microrganismo mesofílico *S. pombe* produz uma α -glicosidase que a temperatura ótima é 35°C, permanecendo estável até 40°C e perde sua estabilidade a 50°C, em 15 minutos. O pH ótimo dessa enzima é 4,5 e mantêm-se estável entre os pHs 3,0 e 8,0 (OKUYAMA et al., 2005).

O fungo mesofílico *A. niger* produz uma α -glicosidase que possui pH ótimo de 4,3 e permanece estável em faixa de pH de 3,5 a 8,0. Esta enzima foi estável até 55°C e perdeu a atividade a 70°C em 15 min (KITA et al., 1991). Assim como a α -glicosidase de *A. niger* as α -glicosidases das plantas apresentam atividade máxima em pH 4,0 ~ 5,0, e poucas em pH 6,0 ~ 7,0 (FRANDSEN; SVENSSON, 1998).

Tanaka et al. (2002) purificaram uma α -glicosidase produzida pelo fungo mesofílico *M. alliacea*, o qual perde a estabilidade a 60°C, em 15 minutos, sendo estável na faixa de pH 4,0 a 10,0. O mesmo foi observado para a α -glicosidase purificada de *A. implicatum* IFO30538 que perde a estabilidade a 60°C, em 15 minutos, sendo estável na faixa de pH 6,0 a 11,0 (YAMAMOTO et al., 2004).

Por outro lado, segundo Ginnesi et al. (2006), a α -glicosidase do fungo termofílico *C. thermophilum* var. coprophilum foi estável até 20 min quando incubada a 55°C em ausência de substrato, sendo a meia-vida de 54 e 8 min quando incubada a 55 e 60°C, respectivamente. Em relação à estabilidade sob variações de pH essa enzima manteve 100% da atividade entre os pH 4,5- 7,0. Uma α -glicosidase de *G. thermodenitrificans* foi relativamente estável em estreito pH alcalino (8,0-8,5) e apresentou 70% de atividade original quando incubada a 60°C por 30 min. Contudo, quando incubada a 70°C por 20 min, essa enzima reteve somente 3,7% da atividade original (EZEJI; BAHL, 2006).

Esses dados corroboram com a α -glicosidase purificada produzida pelo fungo *T. aurantiacus*, pois se encontra dentro da faixa de pH e termoestabilidade descrita para as α -glicosidases fúngicas.

Por outro lado, a bactéria termofílica *T. hydrothermalis* produz uma α -glicosidase com estabilidade por 24 h a 80°C, sendo que entre 96 e 116°C ocorre a

perda de 50% da atividade enzimática e a 120°C, a enzima é inativada (LEGIN et al., 1997). Segundo Rolfsmeier e Blum (1995), a archaea extremófila *S. solfataricus* apresenta uma maltase com 105°C de temperatura ótima, sendo que o pH ótimo da enzima purificada em 85°C é de 4,5, com 50% de atividade entre os pHs 3,5 e 6,5.

Segundo Piller et al. (1996), a α -glicosidase purificada da archaea extremófila *Thermococcus* AN1 apresenta pH e temperatura ótimos de 7,5 e 75°C. A α -glicosidase termoestável parcialmente purificada da bactéria *Thermus thermophilus* por Zdziebło e Synowiecki (2002), possui pH ótimo 6,2 e retém 80% da atividade entre os pHs 5,8 e 6,9. A temperatura ótima foi de 85°C e reteve 50% de sua atividade durante 2h a 85°C. Da mesma forma, o gene da α -glicosidase isolada do termófilo *S. solfataricus* que foi expresso na bactéria *Escherichia coli* BL21 (DE3), apresentou a temperatura ótima de 100°C, sendo que após 2h de incubação em temperaturas acima de 85°C essa enzima perde a atividade. A enzima reteve 100% da atividade na faixa de pH 3,5 a 8,5. (MARTINO et al., 2001).

A comparação das características das enzimas de *T. aurantiacus* com aquelas de fungos mesofílicos, de bactérias termofílicas e de archaea hipertermofílicas permite concluir que as mesmas estão em escala intermediária de termotolerância. Além disso, as proteínas glicosiladas exibem alta termoestabilidade e resistência a proteólise (YAMAMOTO et al., 2004; OKUYAMA et al., 2005). Provavelmente a alta quantidade de carboidratos na α -glicosidase de *T. aurantiacus* contribuiu para essa estabilidade.

É bem caracterizado que eucariotos termofílicos crescem em temperaturas de 40 a 55°C, sendo considerados de termofilia moderada, enquanto as bactérias, por serem organismos procariotos, são capazes de tolerar uma termofilia extrema (80 – 110°C) (MADIGAN et al., 2004). Dessa forma, espera-se que a termoestabilidade das enzimas fúngicas esteja acima da dos mesofílicos, porém que não atinjam a extremofilia dos procariotos.

As características da α -glicosidase do *T. aurantiacus* são de grande importância na hidrólise do amido, visto que, as enzimas amilolíticas termoestáveis são freqüentemente usadas na indústria de processamento do amido. Neste processo, primeiramente o amido é liquefeito usando a α -amilase termoestável produzida pelo *B. licheniformis* que é ativa a 95°C, em pH 5,9. No passo seguinte, o amido sofre uma segunda hidrólise, a sacarificação, que é catalisada pela mistura de pululanase e glicoamilase, ambas ativas a 60°C, em pH 4,5. Este processo poderia ser melhorado

pelo uso de α -glicosidase e pululanase mais termoestáveis, de modo que não houvesse necessidade de resfriamento da solução de amido após o passo de dextrinização (LEGIN et al., 1998).

A termoestabilidade da α -glicosidase é importante na hidrólise do amido a açúcares simples para a produção de cerveja, destilar bebida e etanol, visto que, a hidrólise do amido ocorre em altas temperaturas (60 - 75°C) (CLARK et al., 2004).

VII. 6. Determinação do K_m e V_{max}

O valor do K_m e V_{max} da α -glicosidase purificada quando a maltose foi utilizada como substrato foi estimada em $7,0 \times 10^{-5}$ mM e o V_{max} foi 318,0 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, respectivamente.

A afinidade da α -glicosidase estudada pela maltose foi consideravelmente superior a outras α -glicosidases purificadas. Segundo Ginnesi et al. (2006), a α -glicosidase do fungo *C. thermophilum* var. coprophilum apresentaram K_m de 0,04 mM e V_{max} de 34,2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. Ezeji; Bahl (2006) purificaram uma α -glicosidase com K_m de 17 mM e V_{max} de 23 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. A α -glicosidase purificada de *S. pombe* apresentou um K_m de 6,4 mM (OKUYAMA et al., 2005). Naested et al. (2006) expressaram em *Pichia pastoris* a α -glicosidase pertencente à família 31, que apresentou K_m de 1,7 mM.

VII. 7. Efeito dos íons e outros compostos sobre a atividade da α -glicosidase purificada

Os resultados de adição de diferentes íons, de EDTA, SDS, tween 20, tween 80, triton-X e β -mercaptoetanol na mistura de reação são mostrados na tabela 4.

Os íons Cr^{3+} , Ag^+ e Hg^{2+} inibiram fortemente a atividade α -glicosidase e Fe^{3+} and Cu^{2+} inibiram somente 8-27% dessa atividade. Os outros íons testados como Na^+ , Ba^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} não alteraram a atividade da enzima. O EDTA a 10 mM e o triton-X, tween 80 e tween 200 em 0,2% não exerceram nenhum efeito sobre a atividade da enzima, enquanto o β -mercaptoetanol a 10 mM inibiu a atividade em 76% e SDS 0,2% inibiu 47% (Tabela 4).

A cadeia primária e outros fatores como os íons presentes nas enzimas termoestáveis podem influenciar na termoestabilidade e atividade (KUMAR; SATYANARAYANA, 2003). A estabilização de proteínas por sais inorgânicos pode

ser por dois caminhos: pelo efeito específico, no qual o íon metal interage com a proteína interferindo na sua conformação; e pelo efeito do sal, que reduz a solubilidade da enzima no meio aquoso. Entretanto, o papel dos metais na estabilidade das proteínas dos hipertermofílicos é difícil de ser comprovada, devido à dificuldade de removê-los das enzimas (VIEILLE; ZEIKUS, 2001).

Segundo Wang et al. (2004), a α -glicosidase de *S. cerevisiae* foi fortemente inibida por metais de transição como cobre, vanádio, níquel e zinco, enquanto o ferro e o bário causam uma menor inibição. O magnésio exerceu um fraco efeito inibitório, e o manganês, cálcio e alumínio não inibiram a atividade da α -glicosidase. A α -glicosidase de *M. javanicus* não foi inibida na presença do EDTA e de íons de K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} . Entretanto, foi inibida em presença de íons de Hg^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} (YAMASAKI et al., 1973). Do mesmo modo, a α -glicosidase de *Thermococcus* AN1 (PILLER et al., 1996) e de *T. thermophilus* (ZDZIEBLO; SYNOWIECKI, 2002), que não foram inibidas por EDTA, perderam a atividade na presença dos íons de Hg^{2+} . A α -glicosidase de *Thermotoga marítima* possui uma característica incomum, pois requer Mn^{2+} para a atividade enzimática (BERTOLDO, ANTRANIKIAN; 2002).

A amilase produzida pelo *A. niger* UO-1 foi fortemente inibida por Hg^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} (HERNÁNDEZ et al., 2006). Algumas enzimas como a α -amilase do *Thermococcus profundus* e a glicoamilase de *Acremonium* sp. YT-78 permanecem ativas após serem dialisadas em tampão com EDTA, enquanto a α -amilase de *P. furiosus* foi totalmente inibida (LÉVÊQUE et al., 2000). Segundo Zdziebło e Synowiecki (2002), as enzimas que não são inibidas pelo EDTA não necessitam de íons de metal para atividade enzimática.

A α -glicosidase de *C. thermophilum* var. coprophilum foi completamente inibida por Hg^{2+} e Ag^{2+} , enquanto Al^{3+} , Zn^{2+} , Co^{2+} e Cu^{2+} inibiram 35, 70 51 e 46% da atividade original, respectivamente. Outros íons como Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , K^+ , F^{2+} , NH_4^+ e Mn^{2+} testados na concentração de 1 mM, ou EDTA e β -mercaptoetanol não afetaram a atividade enzimática (GINNESI et al., 2006). Por outro lado, o EDTA inibiu a α -glicosidase de *G. thermodenitrificans* HRO10 em 80% da atividade original (EZEJI; BAHL, 2006).

Os detergentes são anfifílicos e possui um papel crítico na conformação das enzimas devido à formação de micelas, o que pode levar à instabilidade da enzima. Por outro lado, os detergentes podem reduzir a tensão superficial e pode facilitar o acesso da

enzima ao substrato melhorando a ação da enzima (KUMAR; SATYANARAYANA, 2003).

A inibição observada por Hg^{2+} e β -mercaptoetanol sugere a presença de pontes dissulfeto na enzima, que podem contribuir para a estabilização dessa estrutura e aumentar a termoestabilidade (KUMAR; SATYANARAYANA, 2003; VIEILLE; ZEIKUS, 2001).

Tabela 4: Efeito dos íons de metal, EDTA, β -mercaptoetanol e detergentes na atividade α -glicosidase.

	Concentração (mM)	
	1.7	10
Controle	100	100
Na^+	100	98
Ba^{2+}	104	103
Co^{2+}	101	102
Ni^{2+}	103	100
Mg^{2+}	101	100
Mn^{2+}	105	103
Al^{3+}	100	99
Zn^{2+}	93	93
Ca^{2+}	94	94
Cu^{2+}	84	73
Fe^{3+}	92	79
Hg^{2+}	3	0
Cr^{3+}	0	0
Ag^+	0	0
EDTA	104	97
β -	80	24
SDS (0.2%)	53	-
Tween 20	109	-
Tween 80	109	-
Triton-X (0.2%)	100	-

VII. 8. Efeito dos inibidores sobre a atividade da α -glicosidase

O efeito da adição de iodoacetamida, voglibose, acarbose, dietilpirocarbonato, ginesteína e catanospermina foram avaliados na inibição da α -glicosidase.

Iodoacetamida e dietilpirocarbonato (DEPC) não inibiram a α -glicosidase purificada na concentração de 250 mM (dado não apresentado). Esses resultados podem indicar que os resíduos de cisteína e/ou histidina não são constituintes do sítio catalítico e/ou do sítio de afinidade da α -glicosidase (BRAVO-TORRES et al., 2004).

A ginesteína tem sido classificada como um inibidor não competitivo que se liga lentamente a algumas α -glicosidases e são susceptíveis a reversão. O uso de isoflavonoides na concentração de 10 mM não inibiu a atividade enzimática, sendo encontrado resultados similares para as α -glicosidases de *S. cerevisiae* e *B. stearothersophilus* (KIM et al., 2008).

Acarbose, voglibose e castanospermina (CAST) a 1,5 mM inibiram a atividade original em 93%, 96% e 100%, respectivamente, com IC_{50} de 0,11, 0,06 e 0,016 mM, respectivamente (Fig. 19). Eles atuam na α -glicosidase como inibidores não competitivos na concentração de 1,5 mM.

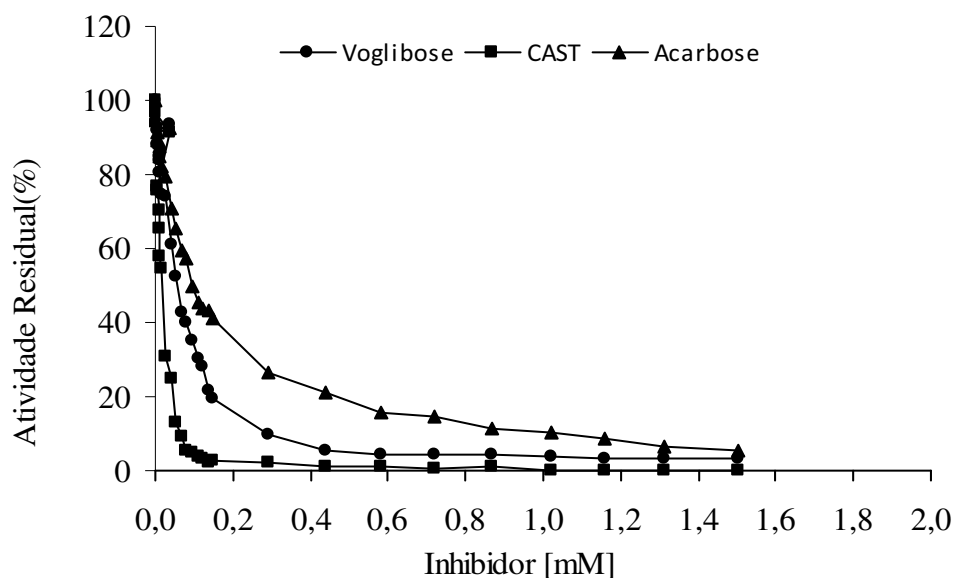


Figura 19: Efeito dos inibidores sobre a α -glicosidase purificada de *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756.

A sensibilidade da α -glicosidase para os inibidores voglibose, acarbose, deoxinojimidina (dNJ), CAST, DEPC, ginesteina e iodoacetamida variam entre α -glicosidases de diferentes organismos.

A α -glicosidase I expressa em *S. cerevisiae* AH22 foi inibida em 50% por DEPC na concentração de 1 mM (DHANAWASA et al., 2002). Segundo Ezeji; Bahl (2006), a α -glicosidase de *G. thermodenitrificans* HRO10 teve uma inibição de 27% com a concentração de 10 mM de iodoacetamida.

A atividade da α -glicosidase II purificada de *Candida albicans* sobre o 4-methylumbeliferil- α -D-glicopiranosideo (MU α Glc) foi preferencialmente inibida por dNJ (60%) seguida por AUST e CAST que reduziram a atividade em 20% e 10%, respectivamente, todos em 10 μ M (TORRE-BOUSCOULET et al., 2004).

O efeito da CAST tem sido determinado principalmente em células de plantas onde a α -glicosidase I é mais sensível do que a α -glicosidase II, com IC₅₀ de 1-3 μ M (SZUMILO et al., 1986) e 25-50 μ M (KAUSHAL et al., 1989), respectivamente.

A CAST inibiu fortemente a hidrólise da nigerose e kojibiose pela α -glicosidase do parasita *E. histolytica*, cujos valores de IC₅₀ foram 0,8 μ M e 3,4 μ M, respectivamente. Entretanto, a AUST não apresentou efeito sobre essa enzima. Já o DEPC modifica o aminoácido histidina diminuindo a atividade enzimática, sendo o IC₅₀ 0,1 mM (BRAVO-TORRES et al., 2004).

Assim, o estudo de inibição da α -glicosidase purificada permitiu observar algumas semelhanças a outras α -glicosidase, como a forte inibição pela voglibose e CAST. Esses inibidores não são específicos para a α -glicosidase, pois são capazes de causar efeito inibitório nas α -amilases e β -glicosidases (MELLO et al., 2006).

VII. 9. Identificação dos produtos da reação de transglicosilação por cromatografia em camada delgada

O perfil cromatográfico da liberação dos açúcares pela incubação da α -glicosidase purificada com 5% maltose evidenciou a habilidade de transglicosilação da enzima com a formação de oligossacarídeos após 3 h de reação (Fig. 20). Em 8, 22 e 30 h foram observados a formação de pentassacarídeos, hexassacarídeos e uma pequena quantidade de heptassacarídeos. De acordo com Chiba (1997), somente enzimas que produzem α -anômeros por retenção são capazes de catalisar a transglicosilação.

O mesmo foi apresentado para a α -glicosidase de *C. thermophilum* var. coprophilum, sendo que o início da formação de maltooligossacarídeos foi com 8 h de reação (GIANNESI et al.; 2006). Já a α -glicosidase de *A. nidulans* utilizou 0,5% de maltose com 2 h de reação para a formação dos produtos panose e isomaltose. Segundo os autores não foi possível diferenciar através da cromatografia de camada delgada a panose e isomaltose de maltotriose e maltotetraose, respectivamente. Assim, foi realizada a diferenciação dos produtos da transglicosilação por HPEAC-PAD que permitiram observar traços de maltotriose e maltotetraose (KATO et al.; 2002).

A α -glicosidase de *A. implicatum* apresentou a habilidade de formar ligações glicosídicas α -1,3 duas vezes maior do que α -1,4. Através da análise por HPLC foi observada a formação dos produtos glicobioses, glicotrioses e glicotetroses (YAMAMOTO et al.; 2004). Entretanto existem algumas α -glicosidases como a de *G. thermodenitrificans* HRO10 que não apresentam atividade de transglicosilação (EZEJI; BAHL, 2006).

A reação de transglicosilação é uma propriedade importante da α -glicosidase na síntese de açúcares com aplicações comerciais, que destaca a importância da α -glicosidase de *T. aurantiacus* estudada nesse artigo.

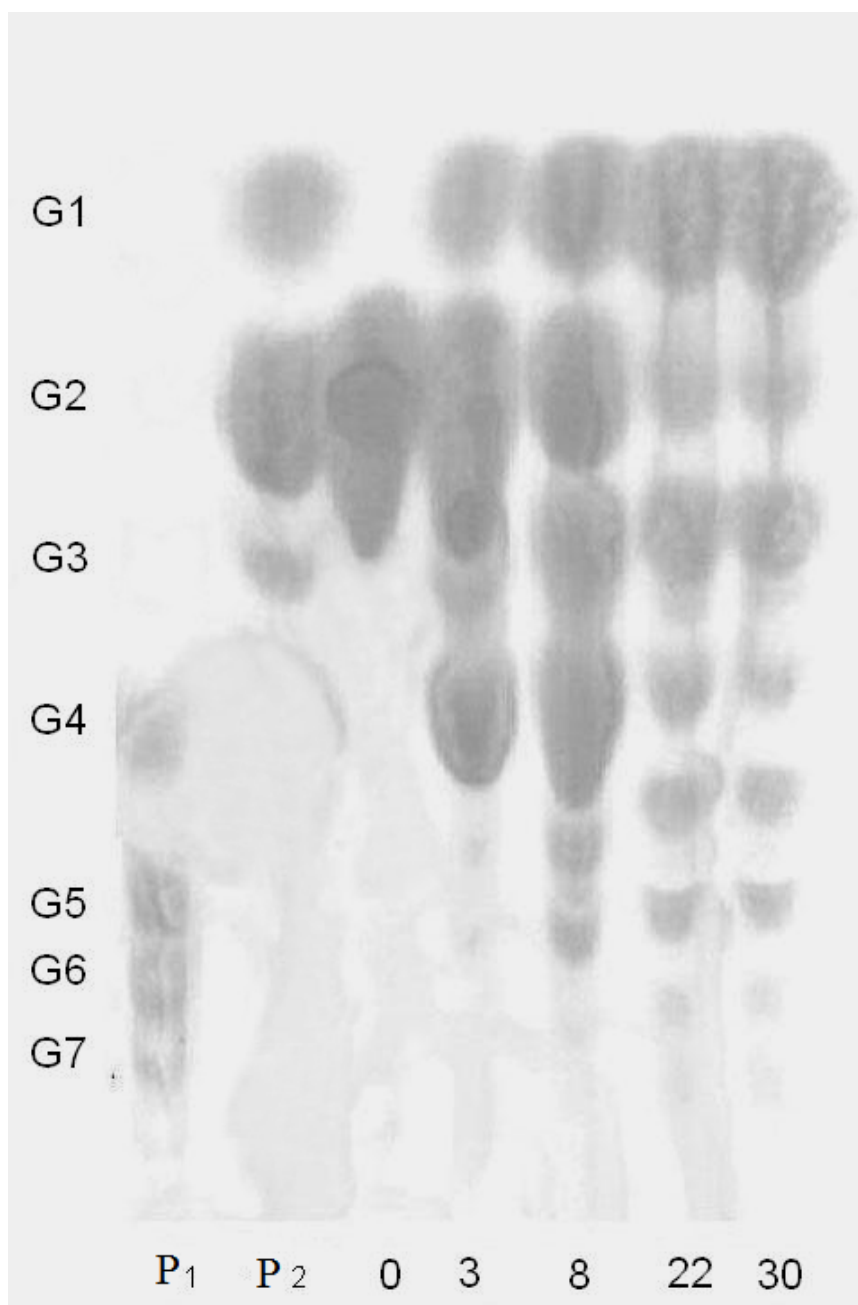


Figura 20: Cromatografia em camada delgada dos produtos obtidos da reação de transglicosilação da α -glicosidase de *T. aurantiacus*. Linhas 1-5, produtos da reação de transglicosilação a 0, 3, 8, 22 e 30 h, respectivamente; Padrões: P₁ (G₇ = maltoheptaose, G₆ = maltohexaose, G₅ = maltopentaose, G₄ = maltotetraose,); P₂ (G₃ = maltotriose, G₂ = maltose, G₁ = glucose).

VII. 10. Determinação do N-terminal da α -glicosidase

Os resultados obtidos na purificação da α -glicosidase indicam que a enzima possui três subunidades diferentes, possivelmente codificadas por genes distintos. Essas subunidades foram separadas através de SDS-PAGE, transferidas para membrana de PVDF e enviadas para seqüenciamento N-terminal por degradação de Edman. Neste procedimento, não foi possível obter sequências N-terminais dos polipeptídeos isolados devido a uma provável presença de contaminantes nas amostras; contaminantes estes que poderiam ser resultado de interações covalentes entre as próprias subunidades constituintes da enzima.

VII. 11. Biologia molecular

Tendo em vista as dificuldades para a obtenção do N-terminal pelo caráter trímérico da proteína foi proposto a construção de um banco de cDNA do fungo *Thermoascus aurantiacus* para a busca de enzimas de interesse como a α -glicosidase e β -glicosidase. Esse fungo tem sido relatado na literatura como produtor de xilanases, celulases, proteases, pectinases e amilases (BRIENZO et al. 2008; CARVALHO et al., 2006; LEITE et al., 2007; MERHEB et al., 2007; MARTINS et al., 2002), sendo as enzimas desse fungo muito estudadas pelo grupo de pesquisa do laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada.

Esta biblioteca teria por finalidade não só o isolamento de genes codificando para as enzimas estudadas no presente trabalho, mas serviria também para uma posterior prospecção de novos genes para enzimas de interesse biotecnológico.

VII. 11. 1. Construção da biblioteca de cDNA

Os procedimentos de construção da biblioteca foram iniciados com 280 mg de material biológico que permitiram extrair 200 μ g RNA total (Fig. 21). Todo o RNA total obtido foi utilizado para a obtenção de 1,5-2,5 μ g de RNAm (Fig. 22) através da coluna de afinidade para a cauda poli(A). A construção da biblioteca foi iniciada com 1,0-1,5 μ g de RNAm.

A biblioteca construída apresentou uma eficiência de $2,1 \times 10^7$ clones e foram isolados 98.888 clones em 103 placas de 96 poços. Para verificar o tamanho dos fragmentos de cDNA ligados no vetor pDONR 222 foi realizada a digestão de alguns

plasmídeos. Na figura 23 podemos visualizar que os plasmídeos analisados apresentaram insertos entre 300 e 3000 pb.

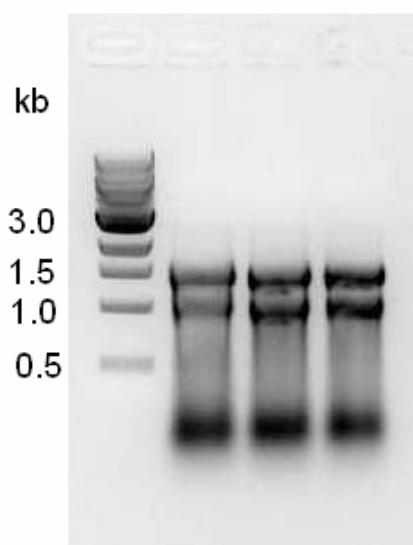


Figura 21: Extração do RNA total a partir do material biológico.

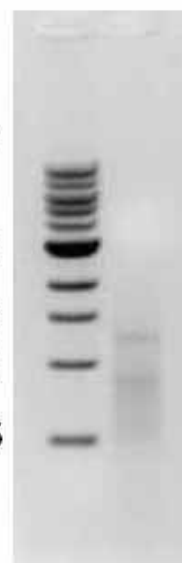


Figura 22: Purificação do rRNAm a partir do RNA total extraído.

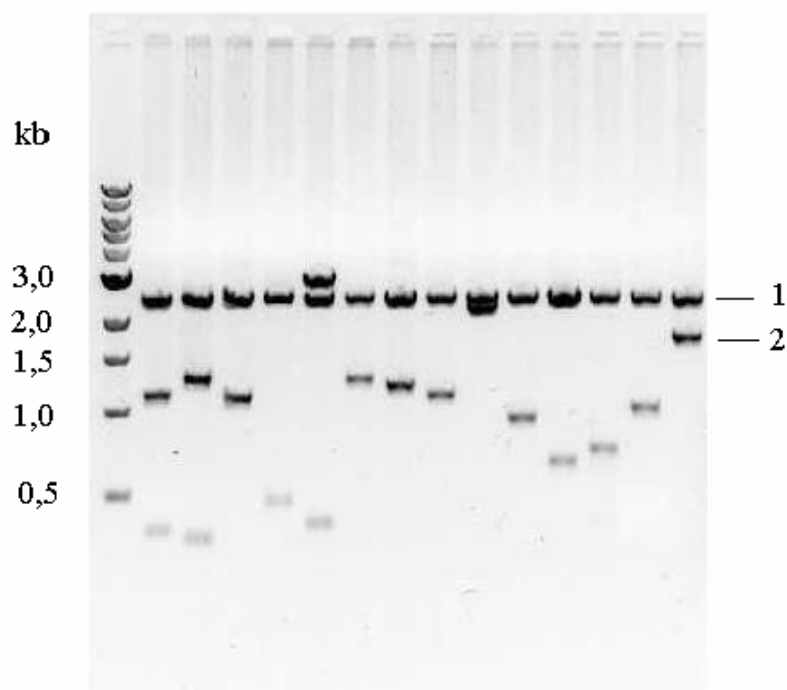


Figura 23: Liberação dos fragmentos de cDNA no plasmídeo.

Legenda: 1 – Plasmídeo linearizado sem a presença do fragmento de cDNA; 2 – o fragmento de cDNA liberado pela digestão dos sítios BsrGI.

VII. 11. 2. Busca das enzimas de interesse.

Para iniciar a busca foram desenhados primers das regiões conservadas com base na sequência completa de cDNA encontrada no GenBank.

As regiões conservadas III e VI (KASHIWABARA et al., 2000) presentes nas α -glicosidases da família 31 (Fig. 24A) foram selecionadas para o reconhecimento dessa enzima na biblioteca. Para isso foram desenhados pares de primers a partir da sequência de nucleotídeos da α -glicosidase, regiões conservadas III e VI, sendo selecionadas três espécies de *Aspergillus* que possuíam a sequência completa de cDNA depositada no GenBank (Fig. 24B).

A escolha do gênero *Aspergillus* está relacionada à proximidade filogenética entre esse gênero e *Thermoascus*, ambos pertencentes à família *Trichocomaceae*. Além disso, na literatura é relatado que as α -glicosidases de *Aspergillus* pertencem à família 31 e atuam mais eficientemente sobre a maltose do que sobre dextrinas mais longas (NAESTED et al.; 2006; FRANSEN; SVENSSON, 1998; SUGIMOTO et al., 2003; OKUYAMA et al., 2005), o mesmo foi concluído para a α -glicosidase purificada de *T. aurantiacus* CBMAI 756.



Figura 24: A) Regiões conservadas da proteína α -glicosidase de *A. niger* (nº de acesso BAA23616.1); B) Regiões conservadas da sequência de nucleotídeos do gene da α -glicosidase.

Além da síntese de primers para a α -glicosidase também foram sintetizados primers específicos para a glicoamilase, α -amilase e β -glicosidase. O desenho dos primers da glicoamilase e α -amilase (Tabela 5) foram baseados nas regiões conservadas do gênero *Aspergillus* encontrado no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). As regiões conservadas da glicoamilase apresentaram as bases nucleotídicas semelhantes para as espécies de *A. awamori* e *A. niger* (Fig. 25A). O mesmo foi encontrado para as espécies de *A. shirousami*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. awamori* (Fig. 25B) e *A. niger* em relação à α -amilase (Tabela 5).

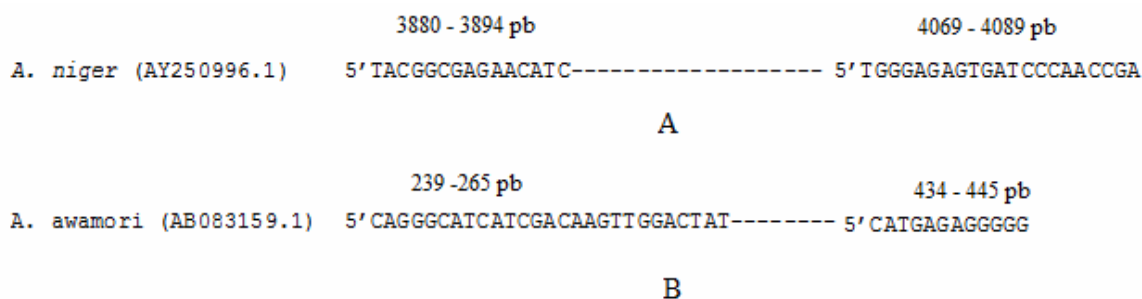


Figura 25: A) Regiões conservadas da sequência de nucleotídeos do gene da glicoamilase; B) Regiões conservadas da sequência de nucleotídeos do gene da α -amilase.

O primer da enzima β -glicosidase foi desenhado segundo a região conservada e o sítio ativo de *T. aurantiacus* IFO9748 depositados no GenBank (Tabela 5). A busca pelo gene da β -glicosidase nessa biblioteca de cDNA induzida por amido, única fonte de carbono, foi realizada devido a presença de atividade enzimática sobre o substrato β -PNPG na solução enzimática bruta (dado não publicado).

Tabela 5: Regiões conservadas das glicoamilases, α -amilases e β -glicosidase.

	<u>Enzima</u>	<u>Regiões conservadas</u>	
<i>A. niger</i> (AAP04499.1)	Glicoamilase	YGENI	WESDPNR
<i>A. niger</i> (P_001395749.1)	α -Amilase	QGIIDKLDY	HERG
<i>T. aurantiacus</i> (AAZ95588.1)	β -Glicosidase	GRNWEFG	GFVMSDW (sítio ativo)

Antes de iniciar a triagem na biblioteca de cDNA foi realizado um PCR para cada par de primers utilizando o DNA genômico de *T. aurantiacus* como molde. A realização desse PCR permitiu avaliar a presença do gene de interesse no genoma do fungo, bem como foi utilizada para padronizar a reação de busca. Os PCRs que utilizaram os pares de primers

específicos para a glicoamilase e α -amilase não apresentaram a amplificação de fragmentos de DNA de tamanhos 211 e 206 pb, respectivamente. No entanto, o PCR referente à amplificação do gene da β -glicosidase apresentou uma banda de 434 pb, tamanho correspondente ao esperado (Fig. 26) e o produto da amplificação do PCR referente à α -glicosidase mostrou várias bandas no gel de agarose, sendo que uma dessas bandas apresentou +/- 685 pb como seria adequado para a presença de tal gene (Fig. 26). A presença de produtos inespecíficos na amplificação com o par de primers para a α -glicosidase, ou mesmo a ausência de amplificação nos outros casos, pode ter sido causada devido à natureza degenerada dos pares de primers em uso. Entretanto, devemos salientar que a não detecção por PCR de fragmentos de DNA que seriam correspondentes aos genes para α -amilase e glicoamilase no genoma de *T. aurantiacus* não descarta a possibilidade de esses genes estarem presentes. Já que foi detectada atividade sobre o amido das soluções enzimáticas brutas obtidas por FSM e FES de *T. aurantiacus* (CARVALHO et al., 2006) e na literatura também foi descrita a produção de α -amilase por *T. aurantiacus* (GUZMAN-MALDONADO; PEREDES-LÓPEZ, 1995; OHNO et al., 1998).

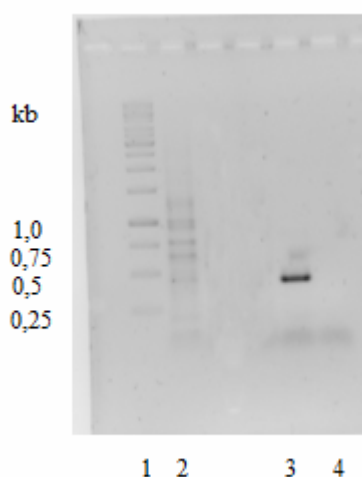


Figura 26: PCR feito para detectar a presença dos genes de interesse no DNA genômico do fungo *T. aurantiacus*.

Legenda: 1 – marcador molecular (1 kb DNA ladder, Fermentas); 2 – PCR usando os primers específicos à α -glicosidase e o DNA genômico como molde; 3 – PCR usando os primers específicos à β -glicosidase e o DNA genômico como molde; 4 – Controle negativo do PCR (ausência de molde).

Devido aos resultados apresentados o “screening” da biblioteca foi realizado para a α -glicosidase e β -glicosidase através da técnica de PCR, utilizando como molde os plasmídeos extraídos da biblioteca de cDNA (item VI. 13. 6). As reações de PCRs foram realizadas individualmente para cada par de primers específicos em busca das enzimas de interesse.

Na busca por essas enzimas foram testadas 103 placas e com isso obtivemos 3 bandas de PCR com tamanho esperado para a β -glicosidase (Fig. 27) e 1 banda com tamanho esperado para a α -glicosidase (Fig. 28).

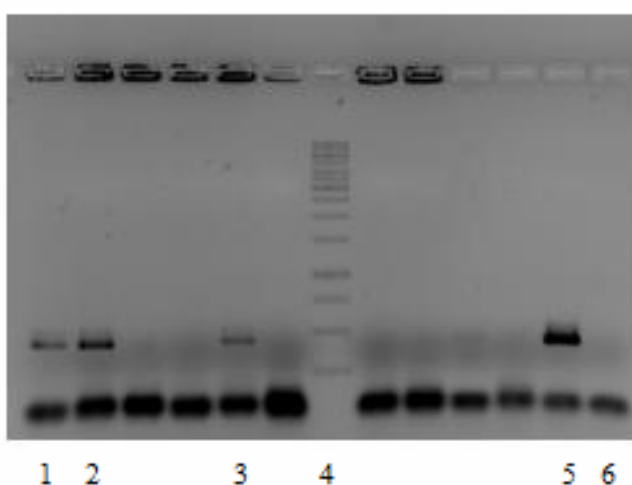


Figura 27: PCR feito para detectar a presença da β -glicosidase na biblioteca de cDNA.
Legenda: 1 – Produto de PCR do plasmídeo presente na placa 29 coluna 10A (Fragmento A); 2 – Produto de PCR do plasmídeo presente na placa 29 coluna 10B (Fragmento B); 3 – Produto de PCR do plasmídeo presente na placa 29 coluna 10E (Fragmento C); 4 – marcador molecular (1 kb DNA ladder, Fermentas); 5 – Produto de PCR do DNA genômico (controle positivo); 6 – Controle negativo do PCR (ausência de molde).

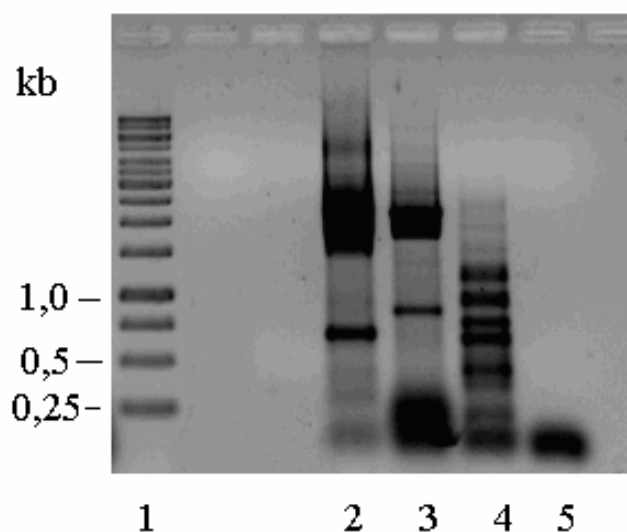


Figura 28: PCR feito para detectar a presença da α -glicosidase na biblioteca de cDNA.

Legenda: 1 – marcador molecular (1 kb DNA ladder, Fermentas); 2 – Produto de PCR do plasmídeo presente na placa 36 coluna 3F (Fragmento D); 3 – Produto de PCR do plasmídeo presente na placa 36 coluna 3G; 4 – Produto de PCR do DNA genômico (controle positivo); 5 – Controle negativo do PCR (ausência de molde).

Os plasmídeos referentes às amplificações que indicaram positivo para a presença do gene da α -glicosidase e β -glicosidase foram enviados para sequenciamento (Fig. 29), sendo que posteriormente as seqüências foram comparadas com depósitos no Genbank utilizando-se o aplicativo Blast. De acordo com os resultados do Blast os fragmentos seqüenciados foram similares às seqüências listadas na tabela 6. Entretanto, os fragmentos não apresentaram similaridade às enzimas de interesse, α -glicosidase e β -glicosidase, representando assim um resultado falso positivo. Esse resultado mostra que as amplificações foram inespecíficas, onde em 100 mil clones testados, encontramos apenas 4 possíveis genes de interesse.

Tabela 6: Resultado do Blast dos fragmentos cDNA seqüenciados.

Fragmento	Nº de acesso	Descrição	E-value
A	AC108137.8	Homo sapiens chromosome 15	0,73
B	BT059924.1	Salmo salar clone ssal-rgg-510-022 40S ribosomal protein S25 putative mRNA, complete cds	$4e^{-10}$
C	XM 001271198.1	Aspergillus clavatus NRRL 1 sigma-70 region 2 family protein (ACLA_039890), partial mRNA	$3e^{-43}$
D	XM 001270052.1	Aspergillus clavatus NRRL 1 cytokinesis protein SepA/Bni1 (ACLA_095600), partial mRNA	$1e^{-124}$

```

> Fragmento A
AAAAAGTTGGTATTTTCCCTTTGGATGCTGGAGAAAGCCTCAGTTTCCTCGTAGCCTTGT
CGTICGCTATTGAGATCTGAGGCCTTTTCTCCAGCTTCTTGGATTGGGGCTGATCGGGCA
TCGCGAGGCGCTTGGGGATCCTGCTTTTTCAATCTGCCCTTGTTATCGCGGAGCCGGAAGTG
TCAGGAAGGCTTTCAGTCCATTGTTACGAGAACGAGCGAAGCATTAAAGGGTCTTGTTTC
CGGATCGAGTATTTTCGGGAGCGATGTIATCTGTCCGTCGTCTTTAACTGTCTTTACCTTA
CTCACGGTTACTCGTCCATCGTTATTCGGGTCGATCGGTTCCACCAGCGAACGCAAGCGCGA
CGCGGACTGACGCCGTTCTACGAATACATTCTAGNAGGCTACCACGCCCTTGATTACTAGA
AAGTCTTTCTTTTATCCCAACACGGTGCACGCNTTCTGAAANACCAAACGAAAAACC
AATGACTTCGACAATCTCAANCCCGNCGTTTTCCTTNTGCCNATTTTACCANCCAGGCTA
CGGTTATANATCCTIGNNGCTACCNCTCTTTANANGAATTNNNCCTTGTNTGTCATACTT
NCCGTTCCGGGGCTTTAACCTCCANAAANNAANNAATTNTNTNNNATTTNTAATNTNNNTN
NANTC

> Fragmento B
AGAAAGTTGGGTTTITTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTITGAGATAATGAAAATAAATA
AGCTTCATGATAGGNAGAGNGGATAICGCATCTAGTCAAGACAGAACAGTACAGTACAGTT
CATGAATATCTATAATATGCTCTTCTCCCAATTGCTTTTTTTTTTTCATGACTGTAAAGCG
TCTGGCCAAATAATGCCCTGTCTATCTATAGACCCTTATTTTCCAATATGCAACCTTTTGTG
CAATTCCTCTAATAAACAAGGCTTGTACTTGCTTGCCTGCCCTTTTTTTTTTCTTTTCTGC
ACACACCTCANAGCTAGCTCCGTTTAGGAGNAGAGCATGAGTGAGGCTGCACCCGANANNTG
CGGCGCCNTGCGTGTGGACACGGTANCAAACTTACCGTNTCCTNNCCTGACCCCGCCCTCC
TGGGAGCGNINTGNNGGAGNGTNNCCCCNNCCGCGANGTCNNCTGNCNATCCTTCAATT
CACNCAANNINCCTCCNGAGTTCCCTCCCNCTCNCNAATCCGNCCNNGNTGCCCCACCN
ATCTNNNTCTCCNNTNTTCCNNGGGTTTCNGNGTAANAANNAGATNTTCANTCCGCC

> Fragmento C
AAAAAGTTGATCTGCCTCATCCGGTCACATACCGTCTCTCCGACGGAATCATACTATCTT
CCC CGGAGCGCCGACGCCCTCTCACCAATAGAGGAGATCCAATATCAITGGGAGGCATTCAT
CAGCTTTCTCAAGCGCTGCGAACACCTCGCTATCCAACAACGGACCGCCCTCCAAGAGGT
CCGCACCCACCCGCGCACACAGCTTTCCAGACTGGATCCCTCTGTACCGGATCCTGGCGTCT
CCC CGGGCGCCGTTCACTTCCA CGGGGACCGCAAGCAGATCATCTCGCGCCAGGCTCTC
GCTGATGATGCTCAACGCCGCGCTCTGGGACTACCGGTTCTCGATCCATCGGACCGAGTCT
TCTGAAAGACCTGATCATGAAAGTCTCGAGAGCGAGGTCGACATGACCGGCTCCGTGAG
GCCCTCTTGAGATCCTCCTGGCGTGCAAGGACGGCTTCNCCGACGAGCCGGAACNAATGG
TTNTCNTCCCGGGATNNTCATNCGAATTACTACCGGACGANGTTCTGATTTAGCCNNTA
NTCCTCGATGGNNANTTCNNNTTNTNCNTTTNANGGTATCTGCCGTATTTTAAAANNNTA
NTTTTTNTNATTTNNANCTNGNGNANTTTTNTTAANTTATTTTTNTNNNNANNTTNTTTTC

> Fragmento D
AGAAAGTTGGGTTTITTTTTTTTTTTTTTTTTTTTITAGCATACAGGAATAGCAGAAAATGTC
TGCGTGATATGGGAATATGGAGCTGAAGTCCAGAACTGTATAGCCCGGCACGAGCAGTTAA
AAT AAGATAAAAACAGAAAATAGTAGCAAAAGGGGGCAGAA GAAATTAAGAAATAAGGTCAA
GGCAGGTAAAATATAGGGGACTTGTCCACCAATCCAAATGCAAAAGAACATAGAACAAAAT
GCCGTCGGTCCCGGACCCGCCACACGCGGACCAACGGCTTGAAGACAAATCAAGGGAAT
AGGACAAGAAAATGCGGAAGAAAAGCTGGCAGGAGAATAGTATACATATGCGCCGTAGACA
CAATTTCCC GACCGACATCTAATACTATCACACATTAACAGAAAGCTGTACCAAGGCTTA
GAGATTACTCTGAAGTTTCAACGGACTTGTGGGTGCAGGACCCCTCGGGGGTGCATTTCA
GANGGTIGATCCGGGGTTCAGGACACANCNATGGACGGAGGAGNGCTTCTGGGAACCATAGG
NNIIGGGCTTTTNC CGGGCTTTCTGCTNTGCTTTTCCGTTNNNNCTTCCCNNTTTTTA
NNGGGNAACGGNTCNTTCCNNGNTGGNANCNNNGATTNCTNC

```

Figura 29: Sequências dos fragmentos de cDNA que foram amplificados pelos primers referentes a β -glicosidase (fragmentos A, B e C) e α -glicosidase (fragmento D).

Uma provável explicação para tal resultado seria de que o tempo de indução utilizado foi inadequado para a expressão do gene da α -glicosidase e β -glicosidase em quantidade suficiente para uma boa representatividade e/ou durante a construção da biblioteca pode ter ocorrido à perda desses RNAm.

A tentativa de induzir a α -glicosidase de *T. auranticus* em um menor tempo de cultivo foi adotada devido à degradação do RNA em tempos maiores de FSM. A coleta do micélio foi realizada com 72 h de fermentação, entretanto a FSM era mantida por 216 h para a obtenção da solução enzimática bruta utilizada na purificação da α -glicosidase.

Uma alternativa para solucionarmos tal impasse seria, talvez, a utilização de novas técnicas de sequenciamento automático (ex. Solid, Applied Biosystems), que permitem a obtenção de seqüências completas de todos os RNAm em uma amostra. Com isso é possível avaliar os diversos genes de interesse que foram expressos nos meios de indução antes de iniciar a busca por genes, entretanto, essa técnica possui um alto custo. Apesar do tempo de indução ter sido inadequado para as triagens propostas, o sequenciamento total da biblioteca ainda poderia servir como informativo útil do perfil enzimático e de expressão gênica de nosso isolado de *T. aurantiacus*, e seria com certeza uma aplicação valiosa na prospecção de fatores com aplicações biotecnológicas.

VIII. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos na purificação da α -glicosidase indicam que a enzima possui três subunidades diferentes, possivelmente codificadas por genes distintos. Assim o fato da enzima ser multimérica provavelmente dificultou o sequenciamento do N-terminal por degradação de Edman.

Tendo em vista as dificuldades encontradas para sequenciar o N-terminal da α -glicosidase multimérica optou-se pela construção da biblioteca de cDNA, na tentativa de buscar a enzima do presente estudo e outras proteínas monoméricas de interesse produzidas por *Thermoascus aurantiacus*.

Além disso, a construção da biblioteca foi uma iniciativa para implantar uma linha de pesquisa em biologia molecular no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, na Unesp de São José do Rio Preto, para a busca de enzimas de interesse.

IX. CONCLUSÕES

- Os procedimentos utilizados para isolar a α -glicosidase, ultrafiltração, precipitação por sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e filtração em gel, resultaram em uma fração enzimática pura com atividade específica de 404 U/mg de proteína e um fator de purificação de 173 vezes.
- O gel específico para coloração de glicoproteína revelou que a enzima purificada é uma glicoproteína.
- A massa molecular da α -glicosidase estimada por filtração em gel foi 154 kDa e em gel SDS-PAGE com amostra semi-desnaturada foi 83 kDa. Quando desnaturada por calor em presença de mercaptoetanol, a proteína apresentou 3 bandas em gel SDS-PAGE, cuja somatória da massa molar foi de 295 kDa.
- A α -glicosidase purificada apresentou especificidade pela maltose, dextrinas curtas e substrato sintético e não apresentou atividade sobre a sacarose e amido o que a classifica como uma α -glicosidase do grupo II na família 31.
- O pH e temperatura ótimos da enzima purificada foram 4,5 e 70°C, respectivamente.
- A α -glicosidase foi inibida por íons metálicos como: Hg^{2+} , Cr^{3+} e Ag^+ .
- Essa enzima apresentou uma alta afinidade pela maltose, com K_m de 0,07 μM e $V_{m\acute{a}x}$ 318,0 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.
- A presença da catálise de transglicosilação na enzima purificada corrobora para a confirmação de que se trata de uma α -glicosidase.
- As α -glicosidases podem ser aplicadas em estudos para o tratamento da imunodeficiência adquirida (HIV), vírus da hepatite B (HBV) e influenza. Além disso, a compreensão nos mecanismos de atuação da α -glicosidase podem auxiliar no tratamento da diabetes mellitus tipo II e da doença de Pompe.

X. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AALBAEK, T.; REESLEV, M.; JENSEN, B.; ERIKSEN, S.H. Acid protease and formation of multiple forms of glucoamylase in batch and continuous cultures of *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 410-415, 2002.

ANDREOTTI, G.; GIORDANO, A.; TRAMICE, A.; MOLLO, E.; TRINCONE, A. Hydrolyses and transglycosylation performed by purified α -D-glucosidase of the marine mollusk *Aplysia fasciata*. **Journal of Biotechnology**, v. 122, p. 274 - 284, 2006.

ANINDYAWATI, T.; ANN, YG.; ITO, K.; IZZUKA, M.; MINAMIURA, N. Two kinds of novel α -glucosidases from *Aspergillus awamori* KT-11: their purifications, properties and specificities. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 5, p. 465-469, 1998.

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

BERTOLDO, C.; ANTRANIKIAN, G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 6, p. 151-160, 2002.

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

BRAVO-TORRES, J. C.; VILLAGÓMEZ-CASTRO, J. C.; CALVO-MÉNDEZ, C.; FLORES-CARREÓN, A.; LÓPEZ-ROMERO, E. Purification and biochemical characterization of a membrane-bound α -glucosidase from the parasite *Entamoeba histolytica*. **International journal for Parasitology**, v. 34, p. 455-462, 2004.

BRIENZO, M.; ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Review: Enzymology of the thermophilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, p. 120-130, 2008.

BROCK, D. T.; MADIGAN, M. T. **Biology of microorganisms**, 6. ed. New York: Prentice Hall Internacional Inc., 1991.

BRUINS, M. E.; JANSSEN, A.E.M.; BOOM, R.M. Thermozyms and their applications. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 90, p. 155-182, 2001.

CARVALHO, A.F.A.; GONÇALVES, A.Z.; SILVA, R.; GOMES, E. A Specific Short Dextrin-Hydrolyzing Extracellular Glucosidase from the Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus* 179-5. **The Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p.276-283, 2006.

CHIBA, S. Molecular mechanism in α -glucosidase and glucoamylase. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, n. 8, p. 1233-1239, 1997.

CIHAN, A. C.; OZCAN, B.; COKMUS, C. Characterization of thermostable α -glucosidases from newly isolated *Geobacillus* sp. A333 and thermophilic bacterium A343. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 25, p. 2205–2217, 2009.

CLARCK, S.E.; MUSLIN, E.H.; HENSON, C.A. Effect of adding and removing N-glycosylation recognition sites on the thermostability of barley α -glucosidase. **Protein Engineering Design & Selection**, v. 17, n. 3, p. 245-249, 2004.

CONSTANTINO, H. R.; BROWN, S. H.; KELLY, R. M. Purification and characterization of an α -glucosidase from a hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, exhibiting a temperature optimum of 105 to 115°C. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 7, p. 3654-3660, 1990.

COLERI, A.; COKMUS, C.; OZCAN, B.; AKKOC, N.; AKCELIK, M. Isolations of α -glucosidase-producing thermophilic Bacilli from hot springs of Turkey. **Microbiology**, v. 78, p. 56-66, 2009.

DHANAWANSA, R.; FARIDMOAYER, A.; MERWE, G.; LI, Y. X.; SCAMAN, C. H. Overexpression, purification, and partial characterization of *Saccharomyces cerevisiae* processing alpha glucosidase I. **Glycobiology**, v. 12, p. 229-234, 2002.

DILLON, R. J.; KORDY, E. E. Carbohydrate digestion in sandflies: α -glucosidase activity in the midgut of *Phlebotomus langeroni*. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 116B, p. 35-40, 1997.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

ERNST, H. A.; LEGGIO, L. L.; WILLEMOES, M.; LEONARD, G.; BLUM, P.; LARSEN, S. Structure of the *Sulfolobus solfataricus* α -glucosidase: implications for Domain Conservation and substrate recognition in GH31. **Journal of Molecular Biology**, v. 358, p. 1106-1124, 2006.

EZEJI, T.C.; BAHL, H. Purification, characterization, and synergistic action of phytate-resistant α -amylase and α -glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10. **Journal of Biotechnology**, v. 125, p. 27-38, 2006.

FARIDMOAYER, A.; SCAMAN, C. H.; An improved purification procedure for soluble processing α -glucosidase I from *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing CWH41. **Protein Expression and Purification**, v. 33, p. 11-18, 2004.

FERNÁNDEZ-ARROJO, L.; MARÍAN, D.; SEGURA, A.G.; LINDE, D.; ALCALDE, M.; GUTIÉRREZ-ALONSO, P.; GHAZI, I.; PLOU, F.J.; FERNÁNDEZ-LOBATO, M.; BALLESTEROS, A. Transformation of maltose into prebiotic isomaltooligosaccharides by a novel α -glucosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1530-1536, 2007.

FONTANA, J. D.; GEBARA, M.; BLUMEL, M.; SCHNEIDER, H.; MACKENZIE, C. R.; JOHNSON, K. G. A-4-0-methyl-glucuronidase component of xylanolytic complexes. **Methods in Enzymology**, v.169, p. 560-571, 1988.

FRANDBSEN, T.; SVENSSON, B. Plant α -glucosidases of the glycoside hydrolase family 31. Molecular properties, substrate specificity, reaction mechanism, and comparison with family members of different origin. **Plant Molecular Biology**, v.37, p.1-13, 1998.

FUJISAWA, T; IKEGAMI, H.; INOUE, K.; KAWABATA, Y.; OGIHARA. Effect of two α -glucosidase inhibitors, voglibose and acarbose, on postprandial hyperglycemia correlates with subjective abdominal symptoms. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 54, p. 3887-390, 2005.

GABRIEL, O.; WANG, S.F. Determination of enzymatic activity in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 27, p. 545-554, 1968.

GALICHET, A.; BELARBI, A. Cloning of an α -glucosidase gene from *Thermococcus hydrothermalis* by functional complementation of a *Saccharomyces cerevisiae* mal11 mutant strain. **FEBS Letters**, v. 458, p. 188-192, 1999.

GIANNESI, G. C., POLIZELI, M. L. T. M.; TERZINE, H. F.; JORGE, J. A. A novel α -glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var. coprophilum that converts maltose into trehalose: Purification and partial characterization of the enzyme. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1729-1735, 2006.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. **Microbial Biotechnology**, W. H. Freeman and Company, New York, p.662, 1995.

GOMES, I.; GOMES, J.; STEINER, W. Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization. **Bioresource Technology**, v. 90, p. 207-214, 2003.

GUZMÁN-MALDONADO, H.; PAREDES-LÓPEZ, O. Amylolytic enzymes and products derived from starch: A review. **Critical Reviews Food Science Nutrition**, v. 35, p.373-403, 1995.

HAKI, G.D.; RAKSHIT, S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 17-34, 2003.

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

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

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

HERNÁNDEZ, M.S.; RODRÍGUES, M.R.; GUERRA, N.P.; ROSÉS, R.P. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. **Journal of Food Engineering**, v. 73, p. 93-100, 2006.

HERSCOVICS, A. Importance in mammalian glycoprotein biosynthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1473, p. 96-107, 1999a.

HERSCOVICS, A. Processing glycosidases of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1426, p. 275-285, 1999b.

HONG, J.; TAMAKI, H.; YAMAMOTO, K.; KUMAGAI, H. Cloning of a gene encoding thermostable cellobiohydrolase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 42–50, 2003.

HONG, J.; TAMAKI, H.; KUMAGAI, H. Cloning and functional expression of thermostable β -glucosidase gene from *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 1331–1339, 2007.

HOUGH, D. W.; DANSON, M. J. Archaeobacteria: Ancient organisms with commercial potential. **Letters in Applied Microbiology**, v. 9, p. 33-39, 1989.

IWATA, H.; SUZUKI, T.; ARAMAKI, I. Purification and characterization of rice α -glucosidase, a key enzyme for alcohol fermentation of rice polish. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, n. 1, p. 106-108, 2003.

JANECEK, S. Structural features and evolutionary relationship in the α -amylase family. **Glycoenzymes**, v. p. 19-54, 2000.

JENSEN, B.; OLSEN, J. Extracellular α -glucosidase with dextran-hydrolyzing activity from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. **Current Microbiology**, v. 33, p. 152-155, 1996.

KASHIWABARA, S. S.; AZUMA, S.; TSUDUKI, M.; SUZUKI, Y. The primary structure of the subunit in *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KP1071 molecular weight 540,000 homohexameric α -glucosidase II belonging to the glycosyl hydrolase family 31. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, n. 7, p. 1379-1393, 2000.

KATO, N.; SUYAMA, S.; SHIROKANE, M.; KATO, M.; KOBAYASHI, T.; TSUKAGOSHI, N. Novel α -glucosidase from *Aspergillus nidulans* with strong transglycosylation activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1250-1256, 2002.

KAUSHAL, G. P.; PASTUSZAK, I; HATANAKA, K.; ELBEIN, A. D. Plant glucosidase II catalyzes a transglucosylation reaction in addition to the hydrolytic reaction. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 272, p. 481-487, 1989.

KIM, K. Y.; NAM, H.; KURIHARA, H.; KIM, S. M. Potent α -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2820-2825, 2008.

KITA, A.; MATSUI, H.; SOMOTO, A.; KIMURA, A.; TAKATA, M.; CHIBA, S. Substrate specificity and subsite affinities of crystalline α -glucosidase from *Aspergillus niger*. **Agricultural and Biological Chemistry**, n. 9, v. 55, p. 2327-2335, 1991.

KUMAR, S.; SATYANARAYANA, T. Purification and kinetics of a raw starch – hydrolyzing, thermostable, and neutral glucoamylase of the thermophilic mold *Thermomucor indiciae-seudaticae*. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 936-944, 2003.

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

LAMOS, P.; BURKE, A.; PEIST, R.; HUBER, R.; LIU, M.Y.; SILVA, G. RODRIGUES-POUSADA, C.; SANTOS, H. Thermostabilization of proteins by diglycerol phosphate, a new compatible solute from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. **Applied and Environment Microbiology**, v. 66, p. 1974-1979, 2000.

LEE, D.; LEE, S. Genistein, a soy isoflavone, is a potent α -glucosidase inhibitor. **FEBS Letters**, v. 501, p. 84-86, 2001.

LEGIN, E.; COPINET, A.; DUCHIRON, F. Production of thermostable amylolytic enzymes by *Thermococcus hydrothermalis*. **Biotechnology Letters**. v. 20, n. 4, p. 363-367, 1998.

LEGIN, E.; LADRAT, C.; GODFROY, A.; BARBIER, G.; DUCHIRON, F. Thermostable amylolytic enzymes of thermophilic microorganisms from deep-sea hydrothermal vents. **Life Sciences**, v. 320, p. 893-898, 1997.

LEITE, R. S. R.; GOMES, E.; SILVA, R. Characterization and comparison of thermostability of purified β -glucosidases from a mesophilic *Aureobasidium pullulans* and a thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1101-1106, 2007.

LÉVÊQUE, E.; JANECEK, S.; HAYE, B.; BELARBI, A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 3-14, 2000.

LI, K.B.; CHAN, KY. Production and properties of α -glucosidase from *Lactobacillus acidophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 1380-1387, 1983.

MACGREGOR, E. A.; JANECEK, S.; SVENSSON, B. Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1546, p. 1-20, 2001.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Person Education, 2004.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, 2000.

MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulases technology. **Journal of Fermentation Technology**, v. 54, p. 267-286, 1976.

MARTINO, A.; SCHIRALDI, C.; FUSCO, S.; DI LERNIA, I.; COSTABILE, T.; PELLICANO, T.; MAROTTA, M.; GENEROSO, M.; VAN DER OOST, J.; SENSEN, C. W.; CHARLEBOIS, R. L.; MORACCI, M.; ROSSI, M.; DE ROSA, M. Properties of the recombinant α -glucosidase from *Sulfolobus solfataricus* in relation to starch processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 787-794, 2001. +

- MARTINS, E. S.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 949–954, 2002.
- MEHTA, A.; ZITZMANN, N.; RUDD, P. M.; BLOCK, T. M.; DWEK, R. A. K-Glucosidase inhibitors as potential broad based anti-viral agents. **FEBS Letters**, v. 430, p. 17-22, 1998.
- MELO, E.; CARVALHO, I. α e β -Glucosidases como alvos moleculares para desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v. 29, p. 840-843, 2006.
- MELO, E. B.; GOMES, A. S.; CARVALHO, I. α - and β -glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. **Tetrahedron**, v. 62, p. 10277-10302, 2006.
- MERHEB, C. W.; CABRAL, H.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**, v. 104, p. 127–131, 2007.
- MORAES, L. M. P. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. 1. ed. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.
- MORELAND, R. J., JIN, X., ZHANG, X. K., DECKER, R. D., ALBEE, K. L., LEE, K. L. et al. Lysosomal acid α -glucosidase consists of four different peptides processed from a single chain precursor. **Journal of Biological Chemistry**, 280, 6780–6791, 2005.
- MURATA, T.; USUI, T. Enzymatic synthesis of oligosaccharides and neoglycoconjugates. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 70, p. 1049-1059, 2006.
- MUSLIN, E. H.; KANIKULA, A. M.; CLARK, S. E.; HENSON, C. A. Overexpression, purification and characterization of a barley α -glucosidase secreted by *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 18, p. 20-26, 2000.
- NABARLATZ, D.; EBRINGEROVÁ, A.; MONTANÉ, D. Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**. v. 69, p. 20-28, 2007.
- NAESTED, H.; KRAMHØFT, B.; LOK, F.; BOJSEN, K.; YU, S.; SVENSSON, B. Production of enzymatically active recombinant full-length barley high pI α -glucosidase of glycoside family 31 by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris* and affinity purification. **Protein Expression and Purification**, v. 46, p. 56-63, 2006.
- NAJAFPOUR, G. D.; SHAN, C. P. Enzymatic hydrolysis of molasses. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 91-94, 2003.
- NASHIRU, O.; KOH, S.; LEE, S.Y.; LEE, D.S. Novel α -glucosidase from extreme thermophile *Thermus caldophilus* GK24. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 4, p. 347-354, 2001.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NIEHAUS, F. G.; BERTOLDO, C.; KAHLER, M.; ANTRANIKIAN, G. Extramophiles as a source of novel enzymes for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 711-729, 1999.

NIELSON, J. E.; BORCHERT, T. V. Protein engineering of bacterial α -amylases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, p. 253-274, 2000.

NOGUCHI, A.; NISHINO, T.; NAKAYAMA, T. Kinetic and thermodynamic characterization of the cold activity acquired upon single amino-acid substitution near the active site of a thermostable α -glucosidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. xxx, p. xxx-xxx, 2008.

OHNO, N.; FUKUDA, H.; WANO, H.; KASAMIJRA, M.; SEIDIOYAU, H.; FUMI, T. Amylases produced by a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and some of their properties. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.76, p. 3-4, 1998.

OKUYAMA, M.; TANIMOTO, Y.; ITO, T.; ANZAI, A.; MORI, H.; KIMURA, A.; MATSUI, H.; CHIBA, S. Purification and characterization of the hyper-glycosylated extracellular α -glucosidase from *Schizosaccharomyces pombe*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 472-480, 2005.

PAPAGIANNI, M.; MOO-YOUNG, M. Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1271-1278, 2002.

PESSOA-JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. 1. ed. Barueri, SP: Manoele Ltda, 2005.

PILLER, K.; DANIEL, R.M.; PETACH, H.H. Properties and stabilization of an extracellular α -glucosidase from the extremely thermophilic archaeobacteria *Thermococcus* strain AN1: enzyme activity at 130°C. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1292, p. 197-205, 1996.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Journal of Biotechnology**.v.1, n.3, p.174-188,1998.

ROLFESMEIER, M.; BLUM, P. Purification and characterization of a maltase from the extremely thermophilic Crenarchaeote *Sulfolobus solfataricus*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 2, p. 482-485, 1995.

ROWE, G. E.; MARGARITIS, A. Enzyme kinetic properties of α -1,4-glucosidase in *Bacillus thuringiensis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 17, p. 121-128, 2004.

RUSSEL, J. M.; STEPHEN, T. L.; GARDNER, D. R.; PANTER, K. E.; JAMES, L. F. Phytochemicals: The good, the bad and the ugly? **Phytochemistry**, v. 68, p. 2973-2985, 2007.

SADEGHI, M.; NADERI-MANESH, H.; ZARRABI, M.; RANJBAR, B. Effective factors in thermostability of thermophilic proteins. *Biophysical Chemistry*, v. 119, p. 256 – 270, 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory manual** 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, H.; LAMOSA, P.; COSTA, M.S. Extremófilos: microrganismos à prova de agressões ambientais extremas. **Biotecnologia Microbiana**, p. 2-10, 2001.

SANTOYO, M. C.; LOISEAU, G.; SANOJA, R. R.; GUYOT, J. P. Study of starch fermentation at low pH by *Lactobacillus fermentum* Ogi EI reveals uncoupling between growth and α -amylases production at pH 4,0. **International Journal of Food Microbiology**, v.80, p.77-87, 2003.

SCANDURRA, R.; CONSALVI, V.; CHIARALUCE, R.; POLITI, L.; ENGEL, P.C. Protein thermostability in extremophiles. **Biochimie**, v. 80, p. 933-941, 1998.

SCHIRALDI, C.; MARTINO, A.; COSTABILE, T.; GENEROSO, M.; MAROTTA, M.; DE ROSA, M. Glucose production from maltodextrins employing a thermophilic immobilized cell biocatalyst in a packed-bed reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 415-421, p. 2004.

SHIMBA, N.; SHINAGAWA, M.; HOSHINO, W.; YAMAGUCHI, H.; YAMADA, N.; SUZUKI, E. Monitoring the hydrolysis and transglycosylation activity of α -glucosidase from *Aspergillus niger* by nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, xxx, xxx-xxx, 2009.

SORO, R. Y.; DIOPOH, J. K.; WILLEMOT, R. M.; COMBES, D. Enzymatic synthesis of polyglucosylfructosides from sucrose alone α -glucosidase isolated from the digestive juice of *Archachatina ventricosa* (Achatinidae). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 44-51, 2007.

STOLP, H. **Microbial ecology: organisms, habitats, activities**. Cambridge, Cambridge University Press, 1988.

SUGIMOTO, M.; OHTA, T.; KAWAI, F. Change in maltose- and soluble starch-hydrolyzing activities of chimeric α -glucosidases of *Mucor javanicus* and *Aspergillus oryzae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1645, p. 1-5, 2003.

SUGIMOTO, M.; SUZUKI, Y. Hydrolytic action on the mixture of maltose and soluble starch by α -glucosidase from *Mucor javanicus* IFO4570. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 8, p. 1535-1536, 1994.

SZUMILO, T.; KAUSHAL, GP. ELBEIN, A. D. Purification and properties of α -glucosidase I from mung bean seedlings. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 247, p. 261-271, 1986.

TANAKA, Y.; AKI, T.; HIDAKA, Y.; FURUYA, Y.; KAWAMOTO, S.; SHIGETA, S.; ONO, K.; SIZUKI, O. Purification and characterization of a novel fungal α -glucosidase from *Mortirella alliacea* with high starch-hydrolytic activity. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, n. 11, p. 2415-2423, 2002.

TAKESUE, Y.; TAKESUE, S. Purification and characterization of α -glucosidase complex from the intestine of the frog, *Rana japonica*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1296, p. 152-158, 1996.

TORRE-BOUSCOULET, M. E.; LÓPEZ-ROMERO, E.; BALCÁZAR-OROZCO, R.; CALVO-MÉNDEZ, C.; FLORES-CARREÓN, A. Partial purification and biochemical characterization of a soluble α -glucosidase II-like activity from *Candida albicans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, p. 123-128, 2004. +

WANG, Y.; MA, L.; LI, Z.; DU, Z.; LIU, Z.; QIN, J.; WANG, X.; HUANG, Z.; GU, L.; CHEN, A.S.C. Synergetic inhibition of metal ions and genistein on α -glucosidase. **FEBS Letters**, v. 576, p. 46-50, 2004. +

WATANABE, K.; UCHINO, H.; OHMURA, C.; TANAKA, Y.; ONUMA, T.; KAWAMORI, R. Different effects of two α -glucosidase inhibitors, acarbose and voglibose, on serum 1,5-anhydroglucitol (1,5AG) level. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v. 18, p. 183-186, 2004.

VÁZQUEZ, M.J.; ALONSO, J.L.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 387-393, 2000.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, J.G. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 1, p. 1-43, 2001.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, J.G. Thermozyms: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. **Tibtech**, v. 14, p. 183-190, 1996.

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

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

YAMAMOTO, T.; UNNO, T.; WATANABE, Y.; YAMAMOTO, M.; OKUYAMA, M.; MORI, H.; CHIBA, S.; KIMURA, A. Purification and characterization of *Acremonium implicatum* α -glucosidase having regioselectivity for α -1,3-glucosidic linkage. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1700, p. 189-198, 2004.

YAMASAKI, Y.; FUJIMOTO, M.; KARIYA, F.; KONNO, H. Purification and characterization of an α -glucosidase from germinating millet seeds. **Phytochemistry**, v. 66, p. 851-857, 2005.

YAMASAKI, Y.; MIYAKE, T.; SUZUKI, Y. Properties of crystalline α -glucosidase from *Mucor javanicus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 251-259, 1973.

ZACHARIUS, R. M.; MORRISSON; T. E. Z. H.; Woodlock, J. J. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 30, p. 148-152, 1969.

ZDZIEBLO, A.; SYNOWIECKI, J. New source of the thermostable α -glucosidase suitable for single step starch processing. **Food Chemistry**, v. 79, p. 485-491, 2002.

ANEXO

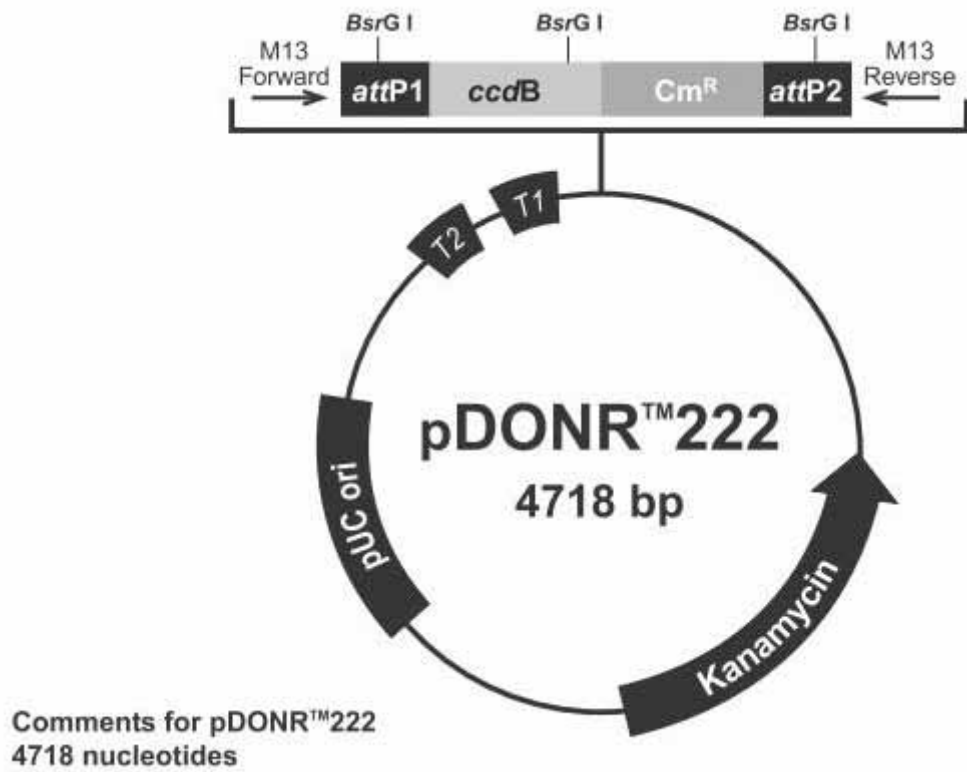


Figura 1: Vetor pDONR™222 utilizado para a ligação dos fragmentos de cDNA.