

Glucoamilase: Estrutura e termoestabilização

Estrutura e termoestabilização de glucoamilase por técnicas moleculares

Carla M. Y. Lemos

Lab. de Bioquímica e Microbiologia aplicada
IBILCE - UNESP, Pós Graduação em Microbiologia
Aplicada IB/UNESP - Rio Claro-SP

Erica Fuchs

Department of Food Science and Human Nutrition
Iowa State University, IA-USA

Eleni Gomes

Lab. de Bioquímica e Microbiologia aplicada
Departamento de Biologia
IBILCE - UNESP - São José Rio Preto-SP

Roberto Da Silva

Lab. de Bioquímica e Microbiologia aplicada,
Departamento de Química e Ciências Ambientais,
IBILCE - UNESP - São José Rio Preto-SP
dasilva@qca.ibilce.unesp.br

Ilustrações cedidas pelos autores

Resumo

A glucoamilase (GA) é uma enzima hidrolítica que catalisa a liberação sucessiva de β -D-glucose a partir do amido e oligossacarídeos relacionados. A GA catalisa eficientemente a reação de sacarificação do amido dentro de uma faixa estreita de temperatura. A sua termoestabilidade limitada afeta seu uso no processo industrial, onde a incubação prolongada em altas temperaturas é necessária. As estratégias tradicionais para melhorar a termoestabilidade da GA de *Aspergillus*, tais como a imobilização e modificação química têm falhado no uso industrial. Atualmente, as técnicas de evolução dirigida utilizando a biologia molecular proporcionam uma importante ferramenta para melhorar ou mesmo criar novas propriedades nas enzimas existentes, em um curto espaço de tempo. Esta revisão apresenta a importância, estrutura e função da glucoamilase e as recentes estratégias da biologia molecular como ferramenta para melhorar a termoestabilidade desta enzima.

1. Glucoamilase de *Aspergillus*

A glucoamilase (α -1,4-glucan glucohidrolase, EC 3.2.1.3), também conhecida como amiloglicosidase, é uma enzima hidrolítica que catalisa a quebra das ligações glicosídicas α -1,4 a partir de uma extremidade não redutora das moléculas de amilose ou amilopectina do grânulo de amido e oligossacarídeos relacionados liberando β -D-glucose. Em uma ve-

locidade menor, a glucoamilase também atua hidrolisando as ligações α -1,6 (Fleetwood e Weigel, 1962). Sugere-se, portanto, que a ação da glucoamilase ocorra através de um mecanismo multisseriado no qual a enzima atua aleatoriamente em toda a molécula de substrato (James e Lee, 1997).

A glucoamilase (GA) é amplamente usada na indústria alimentícia para a produção de xaropes com alto teor de glucose e também é empregada na produção de álcool e xaropes com alto teor de frutose (1989; Brumm, 1998; Mathewson, 1998).

Vários microrganismos, plantas e animais produzem glucoamilase. Estas enzimas disponíveis comercialmente são, na sua maior parte, produzidas por linhagens dos fungos *Aspergillus* e *Rhizopus*. Dentre estas, a glucoamilase de *Aspergillus* é a mais termoestável, apresentando a máxima atividade em torno do pH 4,5, em temperaturas de 50 a 55°C, mas ela é rapidamente inativada em temperaturas próximas a 60°C (Manjunath *et al.*, 1983; Brumm, 1998).

A glucoamilase catalisa eficientemente a reação de sacarificação dentro de um limite relativamente estreito de temperatura, porque a sua conformação cataliticamente ativa muda com o aumento da temperatura. Esta termoestabilidade limitada afeta seu uso no processo industrial, onde a atuação prolongada em altas temperaturas é necessária. Na produção de xaropes com alto teor de glucose, uma pasta de amido (30-40% BS) é primeiro liquefeita a 105°C por 5 minutos e em seguida,

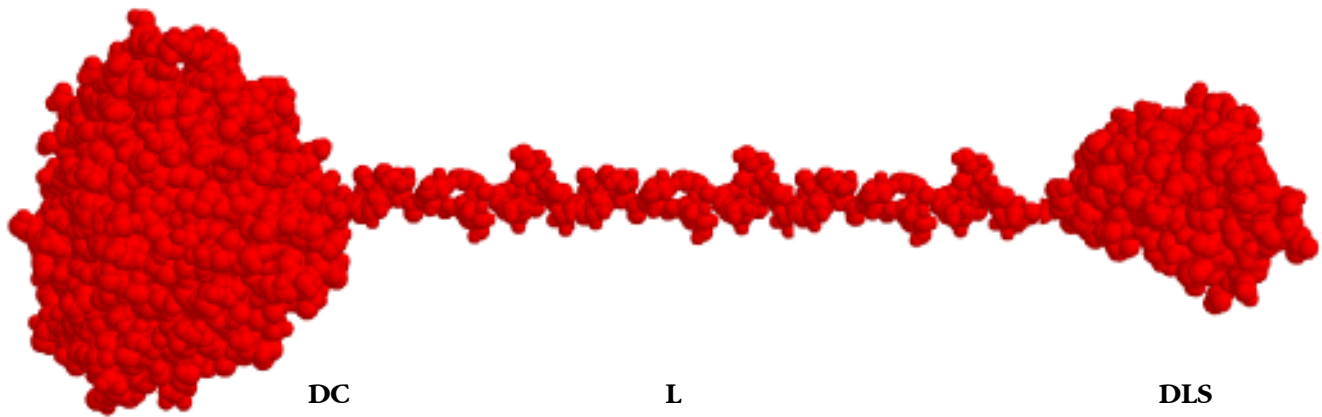


Figura 1. Imagem da estrutura estendida da glucoamilase de *Aspergillus niger* idêntica a glucoamilase de *Aspergillus awamori*. No lado esquerdo o domínio catalítico (DC), ao centro o filamento ligante ou “linker” (L) e à direita o domínio de ligação ao substrato (amido) (DLS).

http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/nte/heyde/www.public.iastate.edu/_pedro/glase/glase.html (10/10/03)

a 95°C por 2 horas, usando a amilase bacteriana termoestável, em pH 6.0-6.5. Finalmente, o amido liquefeito é resfriado a 60°C e hidrolisado por mais 48 a 72 horas usando a glucoamilase (James e Lee, 1997, Brumm, 1998). Está claro que a termoestabilidade da glucoamilase determina a velocidade do processo como um todo. Trabalhar em altas temperaturas não apenas pode acelerar a taxa da reação e consequentemente diminuir o tempo do processo, como também pode prevenir a contaminação microbiológica, além de reduzir a viscosidade da mistura de reação. Portanto, o desenvolvimento de uma glucoamilase mais termoestável poderá contribuir para a otimização do processo de sacarificação do amido. Entretanto, o conhecimento da estrutura da proteína e o processo de termoinativação da enzima são necessários para elaboração de prognósticos racionais e planos efetivos de experimentos de estabilização da estrutura proteica.

A glucoamilase de *Aspergillus niger* é codificada por um único gene, mas existem duas ou três formas variáveis da enzima produzidas por proteólise limitada (Svensson *et al.*, 1986). Pazur *et al.* (1971) constatou que as formas da glucoamilases de *Aspergillus niger* são glicoproteínas que possuem quantidades diferentes de glicosilações. Como em outras proteínas, após a síntese no citoplasma, a GA é transportada em um estado desdobrado através da membrana do retículo

endoplasmático (RE). Durante o subsequente processo de dobramento, ocorre a O-glicosilação do “linker”, filamento que liga o domínio catalítico (CD) ao domínio de ligação ao substrato (DLS), e pontes dissulfetos são formadas (Pryer *et al.*, 1992; Gaut e Hendershot, 1993). Assim, a GA, na sua conformação nativa estendida, assume uma forma de alteres, onde dois domínios volumosos, o domínio catalítico e o domínio de ligação ao amido, estão ligados por um filamento fino como mostra a figura 1. Esta é uma imagem simplificada ilustrativa, uma vez que a estrutura real da GA completa ainda não está disponível. A organização dos domínios da molécula tem sido deduzida através das diferentes técnicas biofísicas e relatos disponíveis (Coutinho, 1997; Sauer, 2000).

As inúmeras proteínas desdobradas, que entram no lúmen do RE, devem ser protegidas de quaisquer agressões e serem mantidas em um estado de dobramento-competente. Dobramentos ineficientes ou mutações em proteínas secretadas resultam em enzimas com conformação incorreta e defeito na atividade (Bonifacino e Klausner, 1994).

Em *Aspergillus awamori*, o gene codifica uma GAI de tamanho completo contendo de 615 a 616 resíduos de aminoácidos (figura 2), bem como o peptídeo sinalizador de secreção no N-terminal. O peptídeo sinalizador é cortado após a secreção da proteína pela célula. O outro maior produto de proteólise da GAI (diz-se da GA

competente) é a GAIII resultante da perda do sítio de ligação ao substrato localizado na extremidade C-terminal. A GAIII é uma mistura de polipeptídeos de tamanhos entre 512 e 514 resíduos de aminoácidos, com atividade catalítica normal mas sem a habilidade para se ligar ao amido no estado natural, não gelatinizado (Svensson *et al.*, 1986).

As proteínas originais de *Aspergillus niger* e *Aspergillus awamori*, cujas seqüências são idênticas (Svensson *et al.*, 1989; Nunberg *et al.*, 1984), consistem de três principais áreas funcionais (Coutinho e Reilly, 1994 a-b, Coutinho e Reilly, 1997): (1) o domínio catalítico, constituído dos resíduos 1 ao 440, (2) o filamento ligante, formado pelos resíduos 441 ao 512, que é altamente O-glicosilado, e (3) um domínio de ligação ao amido no estado natural na extremidade C-terminal, contendo os resíduos 513 a 616 (Svensson *et al.*, 1986; *et al.*, 1989). Além da região de O-glicosilação do “linker”, dois outros sítios de N-glicosilação estão localizados nos resíduos Asn 171 e Asn 395 (Svensson *et al.*, 1989; Aleshin *et al.*, 1992). Acredita-se que os resíduos de carboidratos desempenham uma importante função na estabilização da glucoamilase (Manjunath *et al.*, 1983, Svensson *et al.*, 1989; Williamson *et al.*, 1992a). Em altas temperaturas, a GA de *A. niger*, quimicamente desglicosilada, (Shenoy *et al.*, 1984) e a glucoamilase de *A. awamori*, geneticamente truncada, sem parte da região de O-glicosilação

(Evans *et al.*, 1990), deterioraram-se mais rapidamente do que as suas formas selvagens. Além disso, a GAI em que falta apenas do domínio de ligação ao substrato, tem termoestabilidade similar a da GAI (Svensson *et al.*, 1986), enquanto que uma glucoamilase especial (GAI'), na qual faltam parte da região O-glicosilada e o domínio de ligação ao amido, é menos estável do que a sua forma original (Hayashida *et al.*, 1989). A região de O-glicosilação também facilita a secreção de GA (Evans *et al.*, 1990).

A estrutura da GA nativa é muito difícil de determinar em função do alto grau de glicosilação. Aleshin *et al.* (1992) determinou a estrutura cristalina de uma GA muito próxima da forma nativa denominada *A. awamori* var. *X100* (GA') (figura 3), a qual foi obtida por proteólise limitada com subtilisina e apresenta os primeiros 470 resíduos de aminoácidos da proteína original. Esta seqüência de aminoácidos da GA' é 99,4% similar a GAI de *A. niger* e *A. awamori*, com uma deleção no resíduo 102 (Aleshin *et al.*, 1992, 1994a). Assim, o estudo desta estrutura cristalina elucidou a conformação do domínio catalítico completo e a conformação da primeira metade N-terminal da região O-glicosilada da glucoamilase de *Aspergillus*. A estrutura cristalina da GA de *A. awamori* var. *X100* mostrou que o domínio catalítico consiste de treze α -hélices que compreendem cerca de 51% dos resíduos de aminoácidos do polipeptídeo total, e regiões menores de β filamentos antiparalelos. Doze das α -hélices estão arranjadas dentro de uma estrutura denominada barril α/α , consistindo de seis α -hélices externas e seis internas que envolvem o sítio catalítico em forma de funil, constituído por seis segmentos α/α altamente conservados (Sauer, 2000). O sítio catalítico da GA possui uma barreira de resíduos hidrofóbicos no centro, os quais separam o núcleo em duas regiões de volume morto (void), contendo apenas água. Uma serve como o sítio ativo propriamente dito e a outra, tem uma função ainda não conhecida (Aleshin *et al.*, 1994a). O sítio ativo contém Glu179 e Glu400

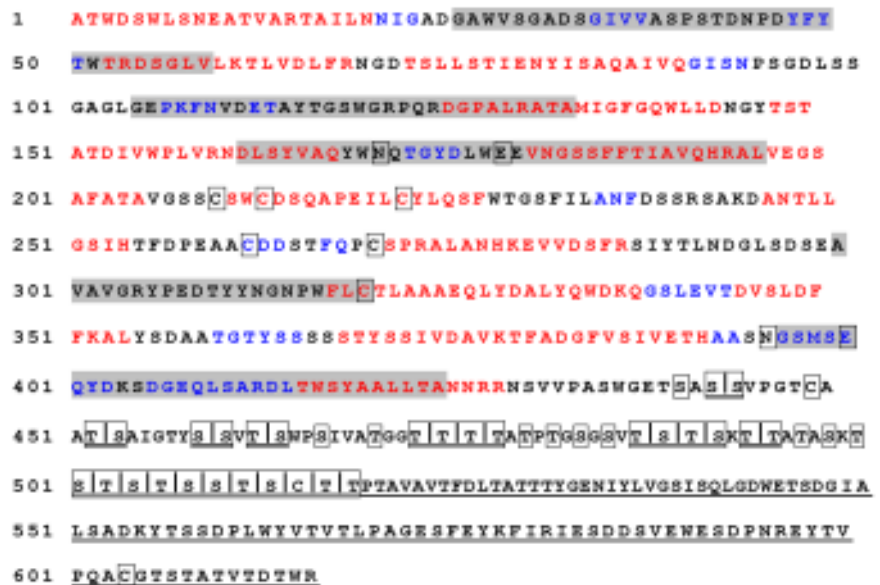


Figura 2. Seqüência de aminoácidos (1 letra) da GA de *A. niger*. Letras vermelhas: α -hélice; letras azuis: fita- β ; C dentro dos retângulos: resíduos de cisteínas envolvidos em pontes dissulfetos; N dentro dos retângulos: sítios N-glicosilados; T e S dentro dos retângulos: sítios O-glicosilados; E dentro dos retângulos: resíduos dos aminoácidos catalíticos glutâmico 179 e 400; seqüências sombreadas: regiões conservadas S1 a S5; seqüência sublinhada: sítio de ligação ao substrato. Fonte: Flory, 1993.

como os dois resíduos de aminoácidos catalíticos localizados no fundo do sítio (Harris *et al.*, 1993; Sauer, 2000). A estrutura em barril α/α do DC da GA de *A. awamori*, *A. niger* e de *Saccharomyces fibuliger* são similares, sendo que esta última apresenta 14 α -hélices, 12 das quais estão na conformação barril α/α (Sevcik *et al.*, 1998; Sauer *et al.*, 2000). Esta conformação contrasta com a topologia de organização em barril α/β encontrada em outras enzimas amilolíticas tais como α e β -amilases (Buisson *et al.*, 1987; e Mikami *et al.*, 1993) e ciclodestrina glucosiltransferases (Klein e Schulz, 1991). Observou-se uma pequena similaridade entre a estrutura da GA e proteínas transportadoras de glicose. Assim, a organização das hélices na GA pode ser relevante para a conformação de proteínas que transportam glicose (Aleshin *et al.*, 1994a).

O segmento O-glicosilado está numa conformação de cinto estendido em torno do barril α/α catalítico. Isto sugere que este segmento serve como um elo de ligação estrutural entre o domínio catalítico e o domínio de ligação. A primeira parte (aminoácidos 441 a 471) desta região O-glicosilada possui cerca de 10 resíduos de manoses expostos, que juntos

com 2 unidades de glicose ligadas N-glicosidicamente nos resíduos Asn 171 e Asn 395, formam um cinto de glicosilações ao redor do domínio catalítico (Aleshin *et al.*, 1992). Foi sugerido que a outra parte altamente O-glicosilada (aminoácidos de 472 a 512) envolva o domínio catalítico como uma continuação do resíduo 471, fazendo com que o domínio de ligação ao amido fique próximo ao sítio ativo (Sauer *et al.*, 2000). O segmento C-terminal do "linker" contém cerca de 30 aminoácidos, principalmente serina e treonina, sendo, portanto, muito O-glicosilado. A esta parte particular do linker tem sido atribuída papéis na estabilidade, secreção e na digestão do amido cru (Libby *et al.*, 1994; Sauer *et al.*, 2000). Embora algumas características como a compactação da conformação do barril α/α , a proteção dos carboidratos e a região O-glicosilada, façam a GA de *Aspergillus* mais estável do que algumas proteínas, uma maior estabilidade ainda é requerida para os processos industriais, como explicado anteriormente.

O domínio de ligação ao amido possui este nome por causa da sua capacidade de se ligar ao grânulo de amido nativo e permitir sua digestão pelo domínio catalítico (Svensson *et*

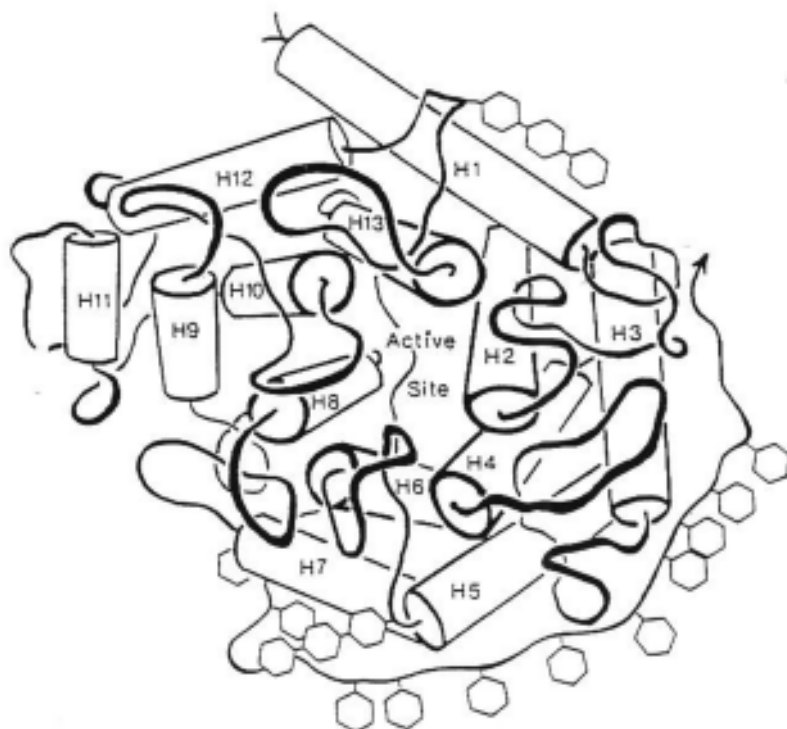


Figura 3. Esquema da glucoamilase (GA) de *Aspergillus awamori* var. X100 (Aleshin *et al.*, 1992). α - hélices (H1 a H12) são simbolizadas por cilindros, sítios de O-glicosilação são representados por hexágonos simples, e sítios de N-glicosilação são simbolizados por cadeias de três hexágonos.

al., 1983). Este domínio parece ter a capacidade de ligar a GA à parede da célula isto porque tem afinidade por α -1,4 e α -1,6 glucanos que pertencem à parede celular. Esta afinidade aumenta a concentração de GA próxima da micromembrana da célula (Neustroev *et al.*, 1993). A GAI, na qual faltam os resíduos 513 a 616, tem uma habilidade semelhante a GAI para digerir amido solúvel, mas possui uma habilidade drasticamente reduzida para se ligar e hidrolisar o amido nativo (Svensson *et al.*, 1989). Recentemente, foi demonstrado que o DLS isolado, atuando em grânulos de amido juntamente com a GAI, apresentaram um efeito sinérgico na degradação do substrato insolúvel, sugerindo que o domínio de ligação ao substrato se liga ao amido como uma porção individual e rompe a compacta estrutura do grânulo de amido facilitando a hidrólise pelo domínio catalítico (Southall *et al.*, 1999; Sauer *et al.*, 2000). O domínio de ligação ao amido da GA possui uma significativa similaridade de sequência de aminoácidos com o domínio de ligação ao amido da ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) (Svensson

et al., 1989). A estrutura tridimensional da CGTase é globular, contendo de 6 a 8 fitas β (Klein e Schulz, 1991). A estrutura do domínio de ligação ao amido da GA revela uma estrutura bem definida em fitas β consistindo de um par paralelo e 6 pares antiparalelos que formam um barril β aberto na lateral. Dois sítios de ligação para outros ligantes foram encontrados neste domínio, sendo cada um no final da molécula em faces opostas (Sorimachi *et al.*, 1996). O mecanismo proposto de ligação deste domínio aos grânulos de amido, parece envolver a formação de um complexo de inclusão entre os resíduos hidrofóbicos do domínio de ligação e os grânulos de amido (Goto *et al.*, 1994).

Existem quatro pontes dissulfetos na GA, das quais três estão no domínio catalítico e uma no domínio de ligação. No domínio catalítico, as pontes estão entre os resíduos 210 e 213 (conectando o N-terminal com o meio da hélice 7), 262 e 270 (contendo um filamento β antiparalelo) e 222 e 449 (associando o trigésimo resíduo O-glicosilado do "cinto" com o domínio catalítico) (Aleshin *et al.*, 1992). Experimentos sugerem que

existe uma ligação dissulfeto entre os resíduos 509 e 604 que conecta o N-terminal com o C-terminal do domínio de ligação ao substrato (Coutinho e Reilly, 1994 b).

Existem dois resíduos N-glicosilados (Asn 171 e Asn 395) na GA, nos arredores do sítio ativo. Em cada caso, o N da Asn está ligado à posição C1 do primeiro resíduo de açúcar (N-acetil-D-glucosamina), que está ligado por β (1 \rightarrow 4) ao segundo (N-acetil-D-glucosamina) que por sua vez se liga ao terceiro resíduo (D-manose) (Aleshin *et al.*, 1992). O número total de resíduos de açúcares para formar a cadeia glicosil ligada a Asn 171 e Asn 395 é 5 e 8 respectivamente (Aleshin *et al.*, 1994 a). A mutação Asn 395 \rightarrow Gln que removeu o sítio de N-glicosilação no resíduo 395, diminuiu drasticamente tanto a secreção como a termoestabilidade, mas não alterou a atividade específica (Chen *et al.*, 1994 b).

Embora a GA de *A. awamori* primariamente catalise a clivagem hidrolítica de ligações a (1,4) com liberação de β -glucose a partir de uma extremidade não redutora da cadeia de amido e oligossacarídeos, ela também cliva ligações glicosídicas a (1,6) com uma eficiência catalítica (Kca/ Km) por volta de 500 vezes menor do que para as ligações a (1,4) (Fleetwood e Weigel, 1962).

2. Termoestabilização da Glucoamilase

2.1. Estratégias tradicionais

A modificação química e a imobilização são as duas principais estratégias tradicionais que têm sido exploradas para melhorar a termoestabilidade da GA.

Modificação química: altera um grupo funcional específico nas proteínas, tal como um grupo carboxila, por reação química. Embora esta técnica tenha aumentado a estabilização da α -quimotripsina em 1000 vezes (Moshaev *et al.*, 1988), ela geralmente tem um rendimento negativo ou relativamente muito pequeno na termoestabilização da GA (Sinitsyn *et al.*, 1978; Munch e Tritsch, 1990).

Imobilização: geralmente resulta em alguma perda da atividade enzimática (Lee *et al.*, 1976; Svensson e Ottesen, 1981; Lenders e Crichton, 1988), mas apesar disso, foi usada em GA porque ela permite o processo contínuo de operação. Embora muitas GAs imobilizadas tenham melhor estabilidade do que as formas solúveis, elas ainda não substituíram estas últimas no uso industrial, isto porque as GAs imobilizadas devem ser usadas em temperaturas operacionais baixas a fim de serem preservadas por vários meses, e continuarem viáveis (Lee *et al.*, 1976). Desde que a energia de ativação para a atividade enzimática deva ser menor do que para a inativação da enzima, uma temperatura de 38 a 40°C é recomendada para a GA imobilizada. Entretanto, o decréscimo na temperatura operacional resulta numa baixa taxa de reação e em contaminação microbiológica, que é menos facilmente controlado em fábricas do que em laboratório. Lee *et al.*, (1976) relataram que a GA imobilizada rendeu xaropes com teores mais baixo de glucose, 1,0-1,5%, e de Dextrose Equivalente (DE), 1,0-1,5 unidades, do que aqueles produzidos por enzimas solúveis. Isto é atribuído a limitação da difusão de partículas de glucose, que resulta em um gradiente de concentração de glucose e, conseqüentemente, leva a uma maior incidência de reações reversíveis do que se o gradiente não estivesse presente (Lee *et al.*, 1980). Além disso, numa aplicação real, as altas concentrações do substrato estabilizam tão bem a GA que o aumento da termoestabilização proporcionado pela imobilização torna-se relativamente insignificante (Klesov e Gerasimas, 1979).

2.2. Estratégias moleculares (Evolução Dirigida de Enzimas)

O advento da engenharia de proteínas, empregando técnicas de biologia molecular, proporcionou novas estratégias para a termoestabilização de enzimas. O gene da GA de *A. awamori* foi clonado e expressado em *Saccharomyces cerevisiae* (Innis

et al., 1985) e em *Pichia pastoris* (Fierobe *et al.* 1997), o que permitiu o emprego da manipulação genética como uma maneira de modificar a enzima para melhorar suas propriedades catalíticas ou físicas.

Estas estratégias para criar novas ou melhoradas propriedades em enzimas, atualmente podem ser separadas em duas estratégias complementares 1) *desenho racional* e 2) *evolução dirigida*. O desenho racional de proteínas é baseado no conhecimento detalhado da seqüência primária, estrutura, função e mecanismo de catálise. Através destes conhecimentos, alterações são introduzidas, principalmente, por mutação sítio dirigida, como será discutido abaixo. A evolução dirigida, (Zhang, 1997) não exige conhecimento da relação estrutura-função da enzima. A evolução dirigida é também chamada de biotecnologia evolutiva (Arnold e Volkov, 1999; Reetz e Jaeger, 1999; Sutherland, 2000). O termo evolução dirigida subtende uma série de experimentos que reproduzem, de forma acelerada e em tubos de ensaios, a evolução da diversidade natural e adaptação ambiental. Mutações e recombinações são feitas dando ao processo uma direção no sentido de atingir a otimização de uma propriedade específica (Lehman e Wyss, 2001). Muitas pistas de como melhorar enzimas vêm dos estudos de como as enzimas evoluem na natureza. Assim, esta poderosa técnica objetiva otimizar o processo de melhoramento das enzimas utilizando mecanismos envolvidos na evolução natural (mutação, recombinação e seleção natural). Entretanto, a evolução dirigida difere do processo natural no sentido em que são os pesquisadores que definem as propriedades a serem otimizadas e o processo biotecnológico acontece em um período curto de tempo (semanas ou meses) (Reetz, 1999).

Num experimento de evolução dirigida, primeiramente é induzida uma alteração no DNA visando uma resposta específica. Isto resulta em uma biblioteca de populações com diferentes graus de possíveis respostas, incluindo ou não a resposta esperada. O próximo passo é encontrar

dentre as milhões de possibilidades, a solução ou as soluções corretas, ou seja, a enzima que exhibe a propriedade desejada (Arnold, 1996).

Em suma, este processo consiste na combinação de técnicas da biologia molecular apropriadas para a mutação e expressão do gene, acopladas a um eficiente e rápido sistema de seleção. (Reetz e Jaeger, 2000). A idéia é partir de uma enzima selvagem, realizar a mutagênese no gene que codifica a enzima e selecionar os melhores mutantes de acordo com a característica fenotípica desejada (Zhang, 1997). Após a seleção dos mutantes, segue-se novos ciclos de mutações buscando melhores mutantes.

Quando a taxa de mutação, tamanho da biblioteca e o processo de seleção são adequados, o fenótipo desejado de uma enzima geralmente aumenta a cada ciclo de mutações (Zhang, 1997).

Existe um grande número de diferentes estratégias de mutagênese para criar diversidade de seqüências, tais como a mutação pontual ao acaso por PCR mutagênico (error-prone PCR), e o embaralhamento de DNA (DNA shuffling). Combinações destas técnicas também vêm sendo utilizadas. Tais estratégias serão discutidas a seguir:

2.2.1 Mutação Sítio Dirigida (MSD)

É uma poderosa técnica na qual apenas um ou poucos aminoácidos específicos são substituídos por outros aminoácidos, por alteração nos correspondentes nucleotídeos no gene codificador da proteína. Quando realizada com sucesso, ela tem a vantagem de melhorar a característica desejada da enzima sem afetar outras propriedades e até mesmo de criar mutantes carregando várias características melhoradas.

Nesta ferramenta, as mudanças precisas, efetuadas na seqüência dos aminoácidos, são baseadas no conhecimento detalhado da estrutura da proteína, função e mecanismo (Chen, 1999). Por exemplo, um resíduo particular de aminoácido pode ser identificado como sendo importante para

a atividade catalítica da enzima (Reetz, 1999), sendo assim, uma substituição individual deste aminoácido poderia provocar mudanças na estrutura secundária resultando em enzimas com características desejáveis (Chen, 1999). Entretanto, seria impossível prever qual dos 19 aminoácidos remanescentes seria o melhor alvo para a mutação que resultaria em subsequente melhoria da propriedade procurada (Reetz, 1999). Muitas tentativas para alterar especificamente algumas das propriedades das enzimas através desta técnica falharam, isto porque a introdução de aminoácidos substituídos têm efeitos inesperados na estrutura e função da enzima. (Kikuchi, 1999). Além disso, tem sido observado que em muitos estudos de mutação sítio dirigida, o aumento da termoestabilidade está vinculada ao decréscimo da atividade catalítica (Carrea e Colombo, 2000). As falhas também podem ser porque este processo requer conhecimento de detalhes da estrutura tridimensional da enzima, de seu mecanismo de catálise, bem como um certo grau de intuição na escolha do aminoácido a ser substituído (Reetz, 1997). Em muitos casos, estas substituições foram feitas sem levar em consideração as propriedades estruturais da proteína (Chen, 1999).

2.2.2. PCR mutagênico (Error-prone PCR):

A introdução de mutações através desta técnica envolve uma modificação no protocolo de PCR (Jaeger e Reetz, 2000). Uma reação de PCR é normalmente realizada de modo a amplificar qualquer dado DNA com alta fidelidade. A atividade de correção de erro 3' → 5' da DNA polimerase assegura que a amplificação do DNA siga de maneira precisa. Ocasionalmente, nucleotídeos errados são incorporados durante a amplificação levando a mutações com uma frequência de 0,1 a 2×10^{-4} por nucleotídeo para a DNA polimerase termoestável do *Thermus aquaticus* (Taq polimerase). Esta baixa taxa de erro pode ser aumentada para 7×10^{-3} por nucleotídeo através de um ou mais dos seguintes procedimentos: aumento da concentração de $MgCl_2$,

adição de $MnCl_2$, aumento na concentração de dCTP e dTTP e aumento na quantidade de Taq polimerase. Para o propósito de evolução dirigida de enzima, estas condições devem ser modificadas a fim de se obter uma taxa média de 1 a 2 nucleotídeos mutados por gene, levando a uma mudança média de 1 aminoácido por enzima mutante (Reetz, 1999). A vantagem de tal processo é que pode ser realizado rapidamente envolvendo qualquer proteína, mesmo sem o conhecimento preciso de sua estrutura (Zhang *et al*, 1997 e Jaeger e Reetz, 2000).

2.2.3. Embaralhamento de DNA (DNA shuffling)

Este poderoso processo de evolução dirigida, que gera diversidade por recombinação, é baseado na combinação de mutações úteis de genes individuais. Bibliotecas de genes químicos podem ser geradas por fragmentação aleatória de um gene, seguido por recombinação dos fragmentos em uma reação de PCR (Cramer, 1998).

O embaralhamento de DNA combinado com uma seleção para a atividade pode acelerar a evolução dirigida das características desejadas. Nesta técnica, a diversidade é introduzida a partir de uma biblioteca de mutações pontuais aleatórias (Christians *et al*, 1999). Os genes selecionados podem ser submetidos a mais ciclos de mutações (reembaralhamento) e melhorar ainda mais a sua mutação benéfica original (Stemmer, 1994a) simulando de forma acelerada, o processo natural de recombinação sexual (Christians *et al*, 1999).

A técnica consiste basicamente na fragmentação de um gene com diferentes mutações pontuais por *DNase I*. A recombinação dos fragmentos aleatoriamente resulta em moldes trocados e recombinados. Um gene recombinante contendo 4 "crossovers" pode ser selecionado da biblioteca de recombinantes baseado na função melhorada. O conjunto selecionado promove o ponto de partida para outro ciclo de mutações e recombinações. Este processo iso-

lado causa um baixo número de mutações pontuais, mas se for desejado, mutações adicionais podem ser incorporadas por PCR mutagênico ou mutagênese por UV no "pool" de genes (Stemmer, 1994a).

A técnica de embaralhamento pode ser realizada com mutantes do mesmo gene e também com genes homólogos de diferentes espécies (family shuffling) (Reetz e Jaeger, 1999). Esta recente adaptação permite que duas ou mais seqüências que ocorram naturalmente sejam usadas como material genético iniciador. Neste método, genes similares são misturados, fragmentados aleatoriamente e recombinados sob condições que permitam o anelamento e a extensão de fitas complementares não idênticas (Christians *et al*, 1999). A recombinação que ocorre nesta técnica é causada pela incorporação de um fragmento derivado de uma seqüência dentro de outra, baseado na homologia.

Análises evolutivas de famílias de enzimas sugerem que mudanças drásticas na função da enzima exigem uma considerável mudança na seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo. Tais mudanças provavelmente não ocorrem durante o processo de evolução *in vitro*, no qual as enzimas são principalmente melhoradas por mutações de ponto com uma tendência a transições e transversões limitando o acesso a um amplo espectro de substituições. Em contraste, a mutação natural, tipicamente resultante de recombinação sexual ou homóloga, gera deleções, inserções, duplicações ou fusões. Neste último processo, tais mutações alteram o espaçamento entre os resíduos de aminoácidos e segmentos de cadeias de polipeptídeos e pode resultar em mudanças na especificidade e novas atividades catalíticas (Chen, 2001).

"Screening" e Seleção: Grandes bibliotecas de mais de 10^{10} genes mutantes podem facilmente ser criadas usando as técnicas acima. Portanto, o desenvolvimento de um sistema apropriado de seleção é de importância chave no processo de evolução dirigida de enzimas (Reetz, 1999). Seleções efetivas, nas quais

apenas aqueles clones carregando a característica desejada sobrevivam ou cresçam mais rápido são raras (Arnold e Volkov, 1999). No caso do emprego de vetores (plasmídios), o “screening” é feito para obter os mutantes que incorporaram o vetor contendo o gene desejado. O vetor geralmente carrega um gene para resistência a algum antibiótico, por isso utiliza-se o plaqueamento das linhagens submetidas ao processo de mutagênese em um meio contendo o antibiótico. As colônias que crescerem neste meio, certamente incorporaram o vetor e podem ser escolhidas para a próxima etapa. Em outros casos, a mutação positiva resulta em reparo de algum defeito que poderá ser usado como ferramenta para a seleção. Por exemplo, a recuperação da habilidade de produção de enzimas formadoras de halos na placa de seleção. A etapa seguinte é a escolha de colônias que tenham a característica desejada, por exemplo, o aumento na termoestabilidade enzimática. Assim, as enzimas das colônias positivas no “screening” serão submetidas a testes de termoinativação a fim de se isolar as colônias produtoras de enzimas termoestáveis.

2.3. Enzimas termoestabilizadas por estratégias moleculares

Akanuma *et al* (1998) introduziram o gene *leuB* (que codifica para a 3-isopropilmalato desidrogenase envolvida na biossíntese de leucina) no microrganismo termofílico *Thermus thermophilus* usando técnicas de evolução dirigida de enzimas. Após mutação no gene da enzima, eles obtiveram uma variante termoestável. A estabilidade térmica da enzima mutante foi 10°C acima da observada na enzima selvagem.

A técnica da evolução dirigida foi aplicada à kanamicina nucleotidiltransferase (KNTase), uma enzima que confere resistência ao antibiótico kanamicina. Variantes desta enzima apresentaram resistência a kanamicina a uma temperatura de 63°C e foram produzidas por dois ciclos seguidos de mutações resul-

tando em duas substituições de aminoácidos (Reetz e Jaeger, 1999).

Kikuchi *et al* (1999) aplicaram esta técnica nos genes *xylE* e *nabH* que codificam para a enzima catecol 2,3-dioxigenase. Mais de 2000 clones híbridos foram criados e posteriormente selecionados para estabilidade térmica. A melhor enzima química selecionada foi testada a 50°C e a vida média foi de 70 min, muito maior do que a enzima codificada pelos genes selvagens *xylE* (2,7min) e *nabH* (5,4min).

Yang *et al* (2000) criaram um mutante para o gene da subtilisina E através da técnica de PCR mutagênico. Análises do seqüenciamento revelaram apenas uma substituição (A→G). O tempo de vida médio da atividade da enzima mutante, quando encubada a 65°C, foi de aproximadamente 80 min enquanto que uma outra linhagem mutante (mutante original usado no PCR mutagênico) e a linhagem selvagem apresentaram um tempo de 13 e 15 min respectivamente.

Miyazaki *et al* (2000) usaram a técnica de embaralhamento de DNA em uma subtilisina S41 psicrófila com o objetivo de aumentar sua termoestabilidade e atividade. Após a terceira geração de bibliotecas criadas por PCR mutagênico, três variantes termoestáveis foram identificadas. Das três, uma enzima mutante em particular teve a maior atividade residual após incubação a 70°C. Esta subtilisina S41 variante contém 7 substituições de aminoácidos, todas contribuindo para o aumento da sua termoestabilidade.

A temperatura ótima da lipase foi aumentada em até 15°C através da mutagênese aleatória utilizando a técnica de PCR com tendência ao erro (Kohno *et al*, 2001).

Utilizando-se da técnica de embaralhamento de DNA Hayashi *et al*. (2001), obtiveram quimeras de β -glucosidase com a termoestabilidade aumentada em até 16°C quando comparadas com a enzima original.

A evolução dirigida foi também usada para melhorar a termoestabilidade da galactose oxidase (Sun *et al*, 2001). Foi observado que as enzimas mutantes obtidas, mantinham a atividade enzimática e a

especificidade pelo substrato semelhantes às da enzima selvagem, entretanto, a termoestabilidade foi aumentada. O T_{50} (temperatura na qual as enzimas perdem 50% da sua atividade) foi aumentado para 67°C para os dois mutantes mais termoestáveis enquanto que a selvagem não ultrapassou 63°C.

Experimentos com a GA usam na sua grande maioria a MSD como ferramenta para a obtenção de características desejadas melhoradas, uma boa revisão neste assunto foi apresentada por Ford (1999). Várias abordagens preconizadas para estabilização podem ser acessadas pela MSD, como por exemplo, as substituições dos resíduos flexíveis de glicina em α -hélices, substituições de seqüências susceptíveis a desamidação e quebra Asn-Gly, alterações em ligações frágeis como Asp-X, introdução de prolina que reduz o número de conformações no estado desdobrado, acréscimo de cisteínas para aumentar o número de pontes dissulfetos, além de combinações destas abordagens em mutantes múltiplos etc. (Ford, 1999; Sauer, 2000).

Libby *et al* (1994) testaram o efeito de deleções de aminoácidos na região O-glicosilada da GA de *Aspergillus awamori*. Foram feitas deleções para remover os resíduos de 466 a 512 (GAD), de 485 a 512 (GAI) e de 466 a 483 (GAII). Analisando as frações intracelulares e extracelulares, observou-se que a região deletada da GAII afetou a secreção enquanto que a deleção da GAII contribuiu para a produção e uma estrutura estável da proteína. Para todos os mutantes foram encontradas atividades catalíticas similares à selvagem indicando que as deleções não afetaram o sítio catalítico.

Chen *et al*. (1994) substituíram a seqüência susceptível a desamidação, Asn182-Gly, por Ala182-Gly, o que resultou em decréscimo de 2,5 vezes na taxa de termoinativação a 60 e 65°C.

O efeito da substituição de resíduos flexíveis de glicina por alanina em quatro diferentes α -hélices na GA de *Aspergillus awamori* foram estudados (Chen *et al*, 1996). Substituições simples de Gly137 e Gly139 e

no mutante múltiplo contendo ambas as mutações estabilizaram a GA contra a termoinativação irreversível.

Com o objetivo de estudar o papel das regiões conservadas na GA de *Aspergillus awamori*, Sierks *et al* (1993) realizaram substituições nos resíduos de Leu177, Trp178 e Asn182 por His, Arg e Ala, respectivamente. Quando se substituiu Leu177 por His houve um grande aumento na energia de ativação para substratos com ligação $\alpha(1\rightarrow4)$ e $\alpha(1\rightarrow6)$; na substituição Trp178 por Arg, a energia aumentou para substratos com ligações $\alpha(1\rightarrow6)$, mas não para $\alpha(1\rightarrow4)$. Estas substituições indicaram que os resíduos de aminoácidos Leu177 e Trp178 estão localizados no subsítio 1 e 2 respectivamente. Por outro lado, a substituição Asn182 por His não alterou os valores de energia de ativação para nenhum tipo de ligação do substrato, sugerindo que este resíduo não é crucial para o mecanismo catalítico da GA.

Fiorobe *et al.* (1996) substituíram Ala246 por Cys, criando mais uma ponte dissulfeto entre este resíduo e o resíduo Cys320. O mutante apresentou maior atividade residual e atividade catalítica por 15 minutos comparado a linhagem selvagem. Fiorobe *et al.* (1998) produziram um mutante substituindo o Glu 400 por Cys. A atividade do mutante, após oxidação da cisteína para ácido cisteinosulfínico, elevou a atividade do mutante para 160% em relação a linhagem selvagem. Entretanto, não houve ganho de termoestabilidade.

Uma ponte dissulfeto foi criada substituindo Asn20 e Ala27 por Cys na GA de *Aspergillus awamori* e observou-se um aumento na termoestabilidade de 1,2 kJ/mol a 65°C (Li *et al.*, 1998).

Mutantes contendo prolina em substituição a vários aminoácidos foram estudados por Allen *et al.* (1998). O maior sucesso com mutação simples foi obtido no mutante Ser30→Pro, resultando em um aumento da energia livre de termoinativação de 1,6 kJ/mol a 65°C. Os autores ainda combinaram diferentes mutações termoestáveis e obtiveram um triplo mutante contendo Gly137→Ala, Ser30→Pro e Asn20→Cys/Ala27→Cys que apresen-

tou aumento cumulativo de termoestabilidade de 4,4 kJ/mol.

Estes experimentos, embora tenham como objetivo principal a melhora em propriedades da enzima, paralelamente desempenham um papel de extrema importância, o de elucidar as funções de inúmeros segmentos da cadeia polipeptídica da proteína.

3. Conclusão e perspectivas futuras

As técnicas de evolução dirigida disponíveis, associadas a considerações teóricas e às várias experiências relatadas de sucesso ou não, disponíveis na literatura, têm levado a uma crescente seleção de mutações bem sucedidas para termoestabilização da GA. Todavia, este sucesso ainda não refletiu significativamente na produção de enzima industrialmente satisfatória, deixando o campo ainda aberto para novas experiências.

Os organismos atualmente disponíveis para clonagem e expressão da GA são mesofílicos, criando dificuldades para a seleção de enzimas mais termoestáveis. Além disso as linhagens de *E. coli* utilizadas são deficientes em glicosilação e formação de pontes dissulfetos, essenciais para a GA ativa. Pesquisas com bactérias termofílicas e/ou bactérias competentes para a clonagem e expressão da GA estruturalmente ativa, podem ser alternativas viáveis para reduzir tempo e manipulação.

A maior parte das informações sobre seqüências de GA são dos fungos mesofílicos, *A. niger* e *A. awamori*. Informações de seqüências de GAs termoestáveis, seriam importantes para orientação racional de desenhos de experimentos de evolução dirigida. Entretanto, poucas GAs termoestáveis de fungos termofílicos foram relatadas. Dentre estes estão *Humicola grisea* var. *thermoidea* (Tosi *et al.* 1993), *Aspergillus fumigatus* (Brandani e Peralta, 1998) e *Thermomyces lanuginosus* (Li *et al.* 1998). Informações sobre seqüências genéticas são ainda mais raras. A procura por novas fontes de GAs termoestáveis, bem como informações sobre a proteína e seu gene

codificador são um campo aberto e com enormes perspectivas futuras.

Bibliografia

- Akanuma, S.; Yamagishi, A.; Tanaka, N.; Oshima, T. *Protein science*, v.7, p. 698-705, 1998.
- Aleshin, A.; Golubev, A.; Firsov, I. M.; Honzatko, R. B. *J. Biol. Chem.*, v. 267, p. 19291-19298, 1992.
- Aleshin, A. E.; Hoffman, C.; Firsov, I. M.; Honzatko, R. B. *J. Mol. Biol.*, V. 238, p. 575-591, 1994a.
- Arnold, F.H.; Volkov, A. A. *Current opinion in chemical biology*, v. 3, p. 54-59, 1999.
- Arnold, F. H. *Chemical engineering science*, v. 51, n. 23, p. 5091-5102, 1996.
- Brandani, W.; Peralta, R.M. *Can. J. Microbiol.* v. 44, p. 493-497, 1998.
- Bonifacino, J. S.; Klausner, R. D. *Celular proteolytic systems.*, A. Ciechanover and a. L. Schwartz, eds (wiley - liss, new york), v.15, p. 137 - 160, 1994.
- Brumm, p.J. *Cereal food world*, v. 43, p. 804 - 807, 1998.
- Buisson, G.; Duwe, E.; Haser, R.; Payan, F. *Embo J.*, V. 6, p. 3909-3916, 1987.
- Carrea, G.; Colombo, G. *Tibtech*, v. 18, p. 401-402, 2000.
- Chen, H-M., Ford, C., Reilly, P. J. *Biochem. J.*, V. 301, p. 275-281, 1994.
- Chen, H. M.; Li, Y. X.; Panda, T.; Buehler, F.; Ford, C.; E reilly, P. J. *Protein engineering*, v. 9, n. 6, p. 499-505, 1996.
- Chen, R. *Trends biotechnology*, v. 17, p. 344-345, 1999.
- Chen, R. *Trends biotechnology*, v. 19, p. 13-14, 2001.
- Christians, F. C.; Scapozza, I.; Cramer, A.; Folkers, G.; Stemmer, W. P. C. *Nature biotechnology*, v. 17, p. 259-264, 1999.
- Coutinho, P. M.; Reilly, P. J. *Protein. Eng.*, V. 7, p. 393-400, 1994a.
- Coutinho, P. M.; Reilly, P. J. *Protein. Eng.*, V. 7, p. 749-760, 1994b.
- Coutinho, P. M.; Reilly, P. J. *Proteins*, v. 29, p. 334-347, 1997.
- Cramer, A.; Raillard, S-A.; Bermudez, E.; Stemmer, W. P. C. *Nature*, v. 391, p.288-291, 1998.
- Evans, R.; Ford, C.; Sierks, m.; Nikolov,

- Z.; Svensson, B. *Gene*, v. 91, p. 131-134, 1990.
- Fang, T.; Honzakto, R.B.; Reilly, P.J.; Ford, C. *Protein Eng.* v. 11, p. 127-133, 1998.
- Fierobe, H.P.; Mirgorodskaya, E.; Frandsen, T.P.; Roepstorff, P.; Svensson, B. *Protein Expr. Purif.* V. 9, p. 159-170, 1997.
- Fleetwood, J. D.; Weigel, J., *Nature*, v. 196, p. 984, 1962.
- Flory, N.M. Ms Thesis. Department of Chemical Engineering. Iowa State University. Ames, Iowa. 1993.
- Ford, C. *Curr. Opin. Biotechnol.* v. 10, p. 353-357, 1999.
- Gaut, J. R.; Hendershot, I. M., *Curr. Opin. Cell Biol.*, v. 5, p. 589-595, 1993.
- Goto, M.; Seminaru, T.; Furukawa, K.; Hayashida, S., *Appli. Env. Microbiol.*, V. 60, p. 3926-3930, 1994.
- Harris, E. M. S.; Aleshin, A. E.; Firsov, I. M.; Honsatko, R. B., *Biochem.*, V. 32, p. 1618-1626, 1993.
- Hayashi, H.; Ying, I.; Singh, S.; Kaneko, S.; Nirasawa, S.; Shimonishi, T.; Kawata, Y.; Imoto, T.; Kitaoka, M. *J. Molecular catalysis b: enzymatic*, v. 11, p. 811-816, 2001.
- Hayashida, S.; Kuroda, K.; Ohta, K.; Kuhara, S.; Fukuda, K.; Sakaki, Y. *Agric Biol Chem.*, V. 53, p. 923-929, 1989.
- Innis, M.A.; Holland, M.J.; McCabe, P.C.; Cole, G.E.; Wittman, V.P.; Tal, R.; Watt, K.W.K.; Gelfand, D.M.; Holland, J.P.; Mead, J.H. *Science*, v. 228, p. 21-26, 1985.
- Jaeger, K-E; Reets, T. M. *Current opinion in chemical biology*, v. 4, p. 68-73, 2000.
- James, J.A.; Lee, B.H. *Food Nut. Press Inc.* v. 21, p. 1-52, 1997.
- Kikuchi, M.; Ohnishi, K.; Harayama, S. *Gene*, v. 236, p. 159-167, 1999.
- Klein, C.; Schulz, G. E., *Journal of molecular biology.*, V. 217, p. 737-750, 1991.
- Klesov, A.A.; Gerasimas, V.B., *Biokhim.*, V. 44, p. 1084-1092, 1979.
- Kohno, M.; Enatsu, M.; Funatsu, J.; Yoshiizumi, M.; Kujimiya, W. *Journal of biotechnology*, v. 87, p. 203-210, 2001.
- Lee, D. D.; Lee, Y. Y.; Reilly, P. J.; Collins, JR.; E. V.; Tsao, G. Y., *Biotechnol. Bioen.*, V. 18, p. 253-267, 1976.
- Lee, D. D.; Lee, G. K.; Reilly, P. J.; Lee, Y. Y., *Biotechnol. Bioen.*, V. 22, p. 1-17, 1980.
- Lehman, M.; Wyss, M. *Cur. Opinion Biotec.* v. 12, p. 371-375, 2001
- Lenders, J. P.; Crichton, R. R. *Biotechnol. Bioeng.*, V. 31, p. 267-277, 1988.
- Li, Y.; Coutinho, P. M.; Ford, C. *Protein engineering*, v. 11, p. 661-667, 1998.
- Li, D.C.; Yang, Y.J.; Peng, Y.L.; Shen, C.Y. *Mycol. Res.* V. 102, p. 568-572, 1998.
- Libby, C. B.; Cornett, C. A. G.; Reilly, P.J.; Ford, C. *Protein engineering*, v. 7, n. 9, p. 1109-1114, 1994.
- Manjunath, P.; B. C. Shenoy; R. Raghavendra Rao. *J. Appl. Biochem.*, V. 5, p. 235-260, 1983.
- Mikami, B.; Hehre, E. J.; Sato, M.; Katsube, Y.; Hirose, M.; Morita, Y.; Mozhaev, V. V., *Tibtech.*, v. 11, p. 88-95, 1993.
- Miyazaki, K.; Arnold, F. H. *Journal of molecular evolution*, v. 49, p. 716-720, 1999.
- Miyazaki, K.; Wintrobe, P. L.; Graylin, R. A.; Rubingh, D. N.; Arnold, F. H. *Journal of molecular evolution*, v. 297, p. 1015-1026, 2000.
- Mozhaev, V. V., Berezin, H. V., Martinek, K., *Crc crit. Rev. Biochem.*, V. 23, p. 235-281, 1988.
- Munch, O.; Tritsch, D. *Biochim. Biophys. Acta.*, V. 1041, p. 111-116, 1990.
- Neustroev, K. N., Valter, S. N., Timchenko, N. V., Firsov, I. M., Golubev, A. M., Khokhlov, S. E., 1993. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **30**, 115-120.
- Nunberg, J. H.; Meade, J. H.; Cole, G.; Lawyer, E. C.; McCabe, P.; Schweickert, V.; Tal, R.; Wittman, V. P.; Flatgaard, J. E.; Innis, M. A. *Molec. Cell Biol.*, V. 4, p. 2306-2315, 1984.
- Pazur, J. H.; Kleppe, K. *Carbohydr. Res.*, V. 20, p. 83-96, 1971.
- Pryer, N. K.; Wuestehube, I. J.; Schekman, R., *Annu. Rev. Biochem.*, 61, p. 471-516, 1992.
- Reetz, M. T.; Jaeger, K-E. *Topics in current chemistry*, v. 200, p. 31-57, 1999.
- Reetz, M. T.; Jaeger K-E. *Chem. Eur. J.*, V. 6, n. 3, p. 407-412, 2000.
- Reetz, M. T.; Zonta, A.; Schimossek; Liebeton, K.; Jaeger, K-E. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, V. , n. 24, p. 2830-2832, 1997.
- Shenoy, B. C.; Appu Rao, A. G.; Raghavendra Rao, M. R., *J. Biosci.*, V. 6, p. 601-611, 1984.
- Sauer, J.; Sigurskjold, B.W.; Christensen, U.; Frandsen, T.P.; Mirgorodskaya, E.; Harrison, M.; Roepstorff, P.; Svensson, B. *Biochem. Biophys Acta.*, V. 1543, p. 275-293, 2000
- Sevcik, J.; Solovikova, A. Hostinova, E.; Gasperick, J. Wilson, K.S.; Dauter, Z. *Acta Crystallog. D. Biol. Crystallog.* v. 54, p. 854-866, 1998.
- Sinitsyn, A. P.; Klivanov, A. M.; Klesov, A. A.; Martinek, K., *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, V. 14, p. 236-242, 1978.
- Sorimachi, K.; Jacks, A. J.; Le-Gal-Coeffet, M. F.; Williamson, G.; Archer, D. B.; Williamson, M. P., *J. Mol. Biol.*, V. 259, p. 970-987, 1996.
- Southall, S.M.; Simpson, P.J.; Gilbert, H.J.; Williamson, M.P. *Febs Lett.* v. 447, p. 58-60, 1999.
- Stemmer, W. P. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.*, V. 91, p. 10747-10751, 1994a.
- Sun, I.; Petrounia, I. P.; Yagasaki, M.; Bandara, G.; Arnold, F. H. *Protein engineering*, v. 14, n. 9, p. 699-704, 2001.
- Svensson, B.; Ottesen, M., *Carlsberg res. Commun.*, V. 46, p. 13-24, 1981.
- Svensson, B.; Larsen, K.; Svendsen, I. *Carlsberg res. Commun.*, V. 48, p. 517-527, 1983.
- Svensson, B.; Larsen, K. E Gunnarson, A. *Eur. J biochem.*, V. 154, p. 497-502, 1986.
- Svensson, B.; Jespersen, H.; Sierks, M.R.; MacGregor, E.A. *Biochem. J.* v. 264, p. 309-311, 1989.
- Tosi, L.R.O.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A. *Can. J. Microbiol.* v. 39, p. 846-852, 1993.
- Zhang, J.; Dawes, G.; Stemmer, W. P. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.*, V. 94, p. 4504-4509, 1997.
- Williamson, G.; Belshaw, N. J.; Williamson, M. P., *Biochem. J.*, V. 282, p. 423-428, 1992a.
- Yang, Y.; Jiang, I.; Zhu, I.; Wu, Y.; Yang, S. *J. Biotechnology*, v. 81, p. 113-118, 2000.