

Enzymatic hydrolysis of raw cassava starch and bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* CENPK2 expressing a glucoamylase from *Aspergillus awamori*

Hidrólise enzimática do amido de mandioca e produção de bioetanol por *Saccharomyces cerevisiae* CENPK2 expressando uma glicoamilase de *Aspergillus awamori*

Títulos abreviados:

Enzymatic hydrolysis of cassava starch by a recombinant glucoamylase

Hidrólise enzimática do amido de mandioca por uma glicoamilase recombinante

Deisielly Ribeiro Marques¹, Flaviane Silva Coutinho¹, Patrícia Aparecida Fernandes Ribeiro¹, José Antônio da Silva², Paulo Afonso Granjeiro², Daniel Bonoto Gonçalves², Alexsandro Sobreira Galdino^{1*}

ABSTRACT

This study aimed to verify the hydrolysis of starch raw cassava using a glucoamylase from *Aspergillus awamori* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. The glucoamylase activity test plate showed that *S. cerevisiae* recombinant is able to degrade cassava starch without the needs for either acid pretreatment or cooking. The recombinant yeast was able to form 2.7 g / L of biomass and degrades cassava starch up to 90%, releasing a large amount of glucose to the culture medium. The N-deglycosylation assay showed that the recombinant glucoamylase (75 kDa) has 10% carbohydrate in their structure compared with enzyme treated (65 kDa). Our preliminary results showed that recombinant yeast was able to produce 4.22 g/L in 96 hours fermentation. The results of starch hydrolysis shown that *S. cerevisiae* recombinant has a great potential for producing ethanol from cassava starch without the need for pretreatment of the substrate.

¹ Universidade Federal de São João Del-Rei, Laboratório de Biotecnologia de Microrganismos (LABIOM), 35501-296 Divinópolis, MG.

² Universidade Federal de São João Del-Rei, Laboratório Processos Biotecnológicos e Purificação de Macromoléculas, Universidade Federal de São João Del-Rei (UFSJ) – Divinópolis, MG.

* Autor para correspondência: asgaldino@gmail.com

Keywords: Cassava, *Saccharomyces cerevisiae*, glucoamylase

RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo verificar a hidrólise do amido bruto de mandioca, usando a glicoamilase de *Aspergillus awamori* expressa em *Saccharomyces cerevisiae*. O teste de atividade de glicoamilase em placa mostrou que a *S. cerevisiae* recombinante é capaz de degradar o amido de mandioca sem a necessidade de pré-tratamento ácido ou cozimento. A levedura recombinante foi capaz de formar 2,7 g/L de biomassa que degradou 90% do amido, liberando uma grande quantidade de glicose para o meio de cultura. O ensaio de deglicosilação mostrou que a glicoamilase recombinante (75 kDa) possui 10% de carboidrato na sua estrutura comparado com a enzima deglicosilada (65 kDa). Nossos resultados preliminares mostraram que a levedura recombinante produziu 4,22 g/L de bioetanol em 96 horas de fermentação. Os resultados da hidrólise do amido mostraram que a *S. cerevisiae* recombinante utilizada nesse trabalho tem um grande potencial de produzir etanol a partir de amido de mandioca sem a necessidade de um pré-tratamento do substrato.

Palavras-chave: Mandioca, *Saccharomyces cerevisiae*, glicoamilase

INTRODUÇÃO

Glicoamilases (E.C.3.2.1.3) também conhecida como amiloglicosidase são enzimas capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,4 do amido, a partir da extremidade redutora, produzindo glicose (HISADA et al., 2013). Estas enzimas têm grande importância industrial na produção de xaropes de glicose e em processos de fermentação e sacarificação simultânea (SSF) para a produção de etanol (SAVILLE et al., 2006). O uso de enzimas em indústrias tem como vantagens o aumento no rendimento do produto gerado e a economia do processo biotecnológico (SHARMA; SATYANARAYANA, 2012). Uma grande variedade de microrganismos produz glicoamilases para hidrolisar o amido, permitindo a sua utilização como fonte de energia. Contudo, a aplicação industrial de glicoamilases tem sido restrita às espécies *Aspergillus awamorii* (GA) e *Rhizopus oryzae* uma vez que estes microrganismos produzem glicoamilases estáveis e com alta atividade enzimática (MERTERS e SKORY, 2006). Embora estes microrganismos sejam capazes de metabolizar amido, eles não são capazes de produzir grandes quantidades de etanol. Por outro lado, a *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura mais usada industrialmente para a produção de etanol (LALUCE et al., 2012), existindo atualmente várias linhagens geneticamente manipuladas, destacando-se entre elas a cepa de laboratório CENPK2. Entretanto, os microrganismos destas linhagens não possuem a habilidade de degradar amido, sendo necessária a clonagem de genes de glicoamilases (STEYN; PRETORIUS, 1990). Por esta razão, a cepa CENPK2 foi modificada geneticamente com a glicoamilase de *A. awamorii*. Assim, este trabalho teve como objetivos modificar geneticamente a levedura com o gene da glicoamilase de *A. awamori* e verificar a habilidade de degradação do amido bruto de mandioca sem a necessidade de um pré-tratamento do substrato.

MATERIAL E MÉTODOS

Fonte de amido

A fécula de mandioca utilizada neste estudo foi cedida pela empresa HALOTEK da Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca (ABAM)

Cepas e plasmídios

As cepas de *S. cerevisiae* CENPK2 foram mantidas no laboratório de Biotecnologia de Microrganismos (LABIOM, Universidade Federal de São João Del-Rei, Divinópolis, Brasil). Os Plasmídios pG5, contendo a GA, previamente clonada, e o vetor YEp352PGK foram cedidos por Moraes et al. (1995) A cepa *S. cerevisiae* CENPK2 ((*MaTa*/ α , *ura3-52/ura3-52*, *leu2-3,112*, *trp1-289/trp1-289*, *his3-1/his3-1*) foi usada para expressão da GA.

Condições de cultivo

Para a expressão heteróloga em *S. cerevisiae* foi utilizado o meio mínimo com dextrose (SD), contendo 0,67% de base nitrogenada de leveduras (YNB), glicose 2%, tampão acetato 50 mM pH 5,5, ágar 2% e os requerimentos nutricionais histidina, triptofano e leucina 0,002%. Para a atividade de glicoamilase em placa, foram utilizadas estas mesmas condições, substituindo-se a glicose por amido bruto.

Clonagem da GA

O gene GA, previamente clonado no vetor pG5, foi digerido com a enzima de restrição HindIII, liberando o cassete de expressão de aproximadamente, 3.5 kb e, posteriormente, subclonado no vetor YEp352PGK, previamente, digerido com Hind III, originando o plasmídio YEpGA (GALDINO, 2008). Este vetor contém o gene da glicoamilase de *A. awamori* sob o controle do

promotor constitutivo *PGK*, que codifica para a enzima glicolítica fosfoglicerato kinase.

Expressão Heteróloga da GA em *S. cerevisiae* CENPK2

As cepas de *S. cerevisiae* CENPK2 foram transformadas com esse vetor YEpGA, segundo protocolo desenvolvido por Chen et al. (1992). Transformantes expressando a GA foram selecionados pela produção de halo de hidrólise depois de 72 horas de incubação a 28 °C em meio SD suplementado com histidina, triptofano e leucina 0,002% e posterior coloração com vapor de iodo, conforme protocolo descrito por Moraes et al. (1995).

SDS-PAGE, Ensaio de atividade enzimática no gel (Zimograma) e Ensaio de deglicosilação

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada segundo protocolo descrito por Laemmli (1970).

O gel de atividade enzimática foi preparado, segundo protocolo descrito por Galdino (2008). Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado com água destilada e, posteriormente, incubado com tampão acetato de sódio 50 mM em pH 5,5 por 1 hora e, em seguida, incubado a 4°C, por 12 horas, em uma solução, contendo 0,5% de amido solúvel (SIGMA) em tampão acetato de sódio 50 mM em pH 5.5. Após este período, o gel foi incubado a 37°C, por 2 horas, e as bandas proteicas com atividade de glicoamilase foram detectadas após coloração com uma solução de iodo (I₂ 1% em KI 0,5M). O ensaio de deglicosilação foi realizado, usando a enzima PNGase F (New England Biolabs), conforme recomendações do fabricante.

Análise da degradação do amido bruto de mandioca pela GA recombinante

Uma colônia de *S. cerevisiae* recombinante foi pré-inoculada em meio SD e 2 mL desta cultura foram transferidos para um erlenmeyer de 1L, contendo 200mL do mesmo meio. As culturas foram incubadas em *shaker* a 28 °C , 200 rpm, e o crescimento celular foi monitorado a 600 nm. Em intervalos de 24 horas, 2 mL foram coletados e centrifugados a 5000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi usado para medir a quantidade de biomassa, degradação do amido e liberação de glicose para o meio de cultura. A degradação do amido foi dosada pelo método de Fuwa (1954) e a quantidade de glicose liberada no meio foi dosada pelo kit glicose monorreagente (Bioclin). Todas as análises foram feitas em triplicata.

Produção de Bioetanol

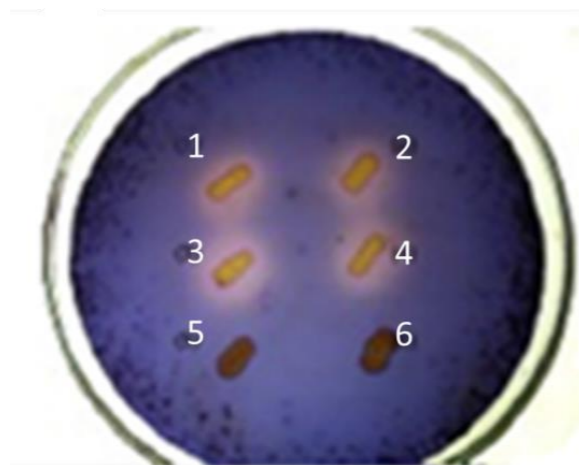
Para a detecção de Bioetanol 1mL da cultura de 96 horas foi retirado e centrifugado por 5000 x g. Após a centrifugação o sobrenadante foi filtrado usando um filtro de 0,22 µm. Após a centrifugação, a concentração de etanol foi determinada usando uma cromatografia Líquida de Alta performance (HPLC) Prominence Model LC-20^a (Shimadzu). Para a dosagem de etanol , açúcares e ácidos foi usado uma coluna SUPERCOGEL C-610H (30 cm x 7,8 mm (SIGMA)) e um detector de índice de refração RID-10A. A separação ocorreu a 65 °C e a fase móvel formada por H₂SO₄ 5mM teve um fluxo 0,6 mL/min com o detector da célula na temperatura de 45 °C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os clones de *S. cerevisiae* CENPK2 foram transformados com o vetor episomal de leveduras YEpGA. Após a transformação, os clones foram selecionados em meio mínimo sem uracila, sendo transferidos, em seguida,

para placas, contendo meio mínimo com amido 0,5%. As placas foram coradas com vapor de iodo e, após 72 horas, a análise visual mostrou que todos os clones estavam expressando a glicoamilase, sendo capazes de degradar o amido bruto de mandioca como única fonte de carbono (FIGURA 1).

FIGURA 1 Atividade da GA em placa. 1-4, Clones recombinante de *S. cerevisiae* CENPK2 transformados com o plasmídeo YEpGA e crescidos em meio mínimo SD + amido 1% . corados com vapor de iodo após 72 horas de crescimento a 28 °C. Em 5 e 6 clones de *S.cerevisiae* transformadas com o vetor vazio YEp351PGK (controle negativo)



Esses resultados são promissores, uma vez que o amido bruto de mandioca é um polissacarídeo altamente heterogêneo. Dessa forma, a degradação deste amido bruto, utilizando-se somente uma enzima, sem um pré-tratamento prévio do polímero, abre um campo de possibilidades para o uso deste microrganismo ou desta enzima em bioprocessos.

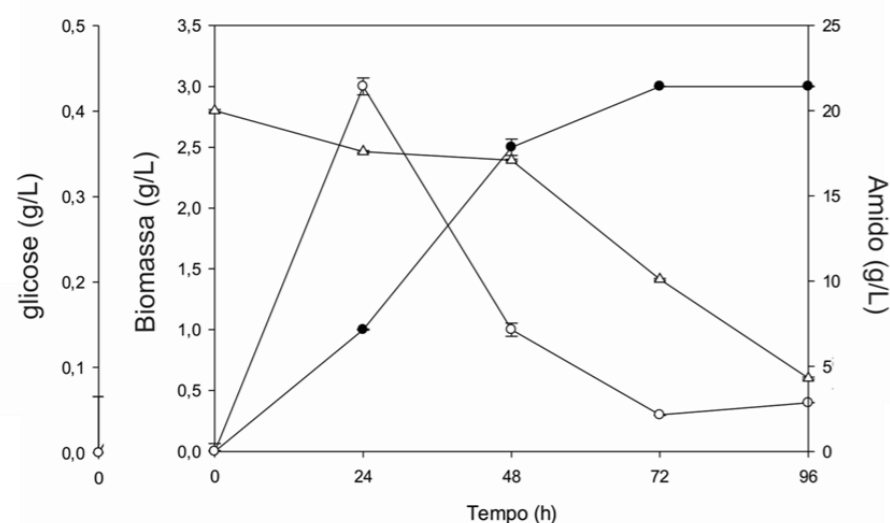
Vários autores já conseguiram expressar genes de glicoamilases de fungos filamentosos em *S. cerevisiae*, tais como *Aspergillus awamorii* GA1 (LIN et al., 1998), *Aspergillus awamori* Sga1 (FAVARO et al., 2010), *Aspergillus oryzae* GlaA (KOTAKA et al., 2008), *Rhizopus oryzae* GAI

(ASHIKARI et al., 1989), *Rhizopus arrhizus* GA (YANG et al., 2011). No entanto, nenhum desses autores relata o potencial destas glicoamilases degradarem amido bruto de mandioca.

Clones recombinantes de *S. cerevisiae* CENPK2, expressando GA, foram inoculados em meio SD líquido; e em intervalos de 24 horas, uma alíquota foi retirada do meio para verificar a formação de biomassa, degradação do substrato e liberação de glicose durante um período de 96 horas de fermentação.

De acordo com a figura 2, um clone recombinante de *S. cerevisiae*, expressando GA, alcançou a produção máxima de biomassa (3 g/L), em 72 horas de fermentação, havendo uma estabilização do crescimento celular após este período. Durante as 96 horas de fermentação, a levedura consumiu praticamente todo o amido do meio, e liberou nas primeiras 24 horas de cultivo cerca de 0,45 g/L de glicose.. Isso provavelmente se deve a quebra do substrato por parte da glicoamilase recombinante, liberando glicose para o meio. Durante esse período a levedura pode estar usando parte dessa glicose para a formação de biomassa e formação de etanol e isso é explicado pelo rápido declínio na concentração de glicose liberada para os meios nos tempos de 72 e 96 horas. Existem poucos trabalhos na literatura que relatam a hidrólise de amido bruto sem pré-tratamento do substrato por glicoamilases recombinantes. No entanto, nenhum deles descreve o potencial dessas enzimas em hidrolisar o amido bruto de mandioca. Quanto a detecção de bioetanol, pôde-se observar que os dados preliminares mostraram que a produção de etanol no tempo de 96 horas de fermentação foi de 4,22 g/L.

FIGURA 2 Hidrólise do amido de mandioca pela GA recombinante. Clones de *Saccharomyces cerevisiae* expressando a glicoamilase de *Aspergillus awamori* foram crescidos em meio mínimo contendo amido como única fonte de carbono para análise da produção de biomassa (●), degradação do amido (Δ) e liberação de glicose (○).

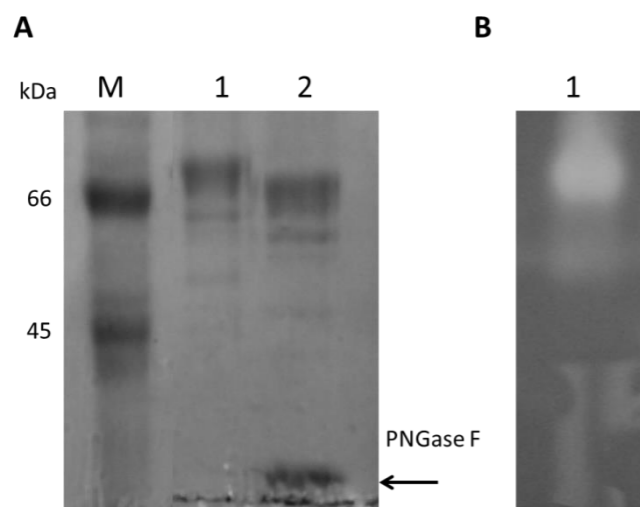


A literatura cita o uso de fungos filamentosos selvagens ou suas glicoamilases nativas para hidrolisar amido, porém, esses microorganismos não possuem a capacidade de produzir grande quantidade de etanol. Por exemplo, Fujio et al. (1984) descreveram o potencial do fungo *Rhizopus koji* em fermentar amido bruto de mandioca para produção de etanol alcançando uma produção de 12,1 g/L a partir de 30 g/L de amido; Flor e Hayashida (1983) relataram pela primeira vez a capacidade de glicoamilase nativa de *Aspergillus awamori* var; *Kawachi* em degradar amido bruto de milho mas os autores não informaram a quantidade de etanol produzido; Inlow et al. (1988) descreveram o potencial de *S. cerevisiae*, expressando GA em produzir etanol, a partir da fermentação de amido solúvel de milho. Kumar, Venkateswara, Das (1995) descreveram o potencial da GA em sacarificar amido de batata; Favaro et al (2010) relataram que uma cepa de laboratório de *S. cerevisiae* haploide expressando a glicoamilase SgAI de *Aspergillus awamori* conseguiu uma produção de etanol de 5,4 g/L durante

48 horas de fermentação usando 20g/L de um amido solúvel. No presente trabalho, a *S. cerevisiae* empregada é uma cepa haploide, mas que produziu 4,22 g/L em 96 horas de fermentação usando 20 g/L de um substrato altamente impuro e não solúvel que é o amido industrial de mandioca o que tem um apelo maior por ser de baixo custo. Lin et al. (2011) descreveram o potencial do fungo *Penicillium* sp. GXU20 em produzir enzimas de degradação de amido bruto de mandioca para a produção de etanol durante 6 dias de cultivo. Embora o trabalho de Apiwatanapiwat et al. (2011) relate o uso de leveduras recombinantes para fermentar diretamente a polpa de mandioca para produção de etanol nenhum trabalho faz alusão a produção de etanol a partir de amido bruto por parte das glicoamilases recombinantes. Zyl, Bloom, Viktor (2012) fizeram uma revisão sobre leveduras modificadas para a produção de etanol e neste trabalho não existe referência a nenhum trabalho que uma *S. cerevisiae*, haploide, recombinante foi capaz de produzir etanol a partir de amido bruto insolúvel. Todos os trabalhos descritos fazem menção a produção de etanol usando amido solúvel. Portanto os resultados do nosso trabalho mostra o potencial inovador uma vez que o amido bruto é um substrato de baixo custo e que as vezes é um rejeito agroindustrial.

A atividade de glicoamilase da levedura recombinante foi correlacionada com uma única banda proteica de massa molecular aparente de 75 kDa (Figura 3A, Poço 1). O resultado do zimograma mostrou uma única banda com atividade de glicoamilase em torno de 75 kDa. Após a deglicosilação, a GA recombinante mostrou uma massa molecular aparente de 65 kDa (Figura 3A, poço 2). Estes resultados indicam que a GA recombinante possui cerca de 10% de carboidrato na sua estrutura.

FIGURA 3 SDS-PAGE e Zimograma da GA A) Ensaio de N-deglicosilação. M, marcador de massa molecular; 1, amostra não tratada e 2, tratada com a enzima PNGase F. B) Ensaio de atividade no gel (Zimograma) da glicoamilase recombinante.



Hata et al. (1991) mostraram que a glicoamilase de *A. niger* expressa em *S. cerevisiae* possui uma massa molecular de 65,5 kDa deduzida a partir da sequência de aminoácidos. Heimo Palmu, Suominen (1997) expressando a GA na levedura *Pichia pastoris*, também relataram a massa molecular de 75 kDa, tendo um conteúdo de carboidrato de aproximadamente 23%. Por outro lado, Goto, Ekino, Furukawa. (1997) relataram a massa molecular de 120 kDa com conteúdo de carboidrato de 34,2% para uma glicoamilase de *A. awamori* var. *Kawachi* rica em domínios Serina-Treonina.

A glicosilação de proteínas é muito importante para a estabilidade estrutural. Entretanto a hiperglicosilação de proteína pode ser indesejável quando está é usada para fins terapêuticos, pois a porção carboidrato pode ser imunogênica. Embora a levedura *S. cerevisiae* seja reconhecida por hiperglicosilar proteínas, os resultados do presente trabalho mostraram

que o conteúdo de carboidratos da GA recombinante de acordo com aqueles publicados na literatura e não apresentou hiperglicosilação.

CONCLUSÃO

A levedura recombinante, expressando a glicoamilase de *Aspergillus awamori* foi capaz de degradar o amido bruto de mandioca sem a necessidade de pré-tratamento do substrato. Dados preliminares mostraram que a levedura alcançou a produção máxima de biomassa em 72 horas de fermentação quando praticamente todo o substrato foi degradado, entretanto a maior quantidade de glicose liberada no meio ocorreu em 24 horas de cultivo. Durante 96 horas de cultivo a levedura produziu cerca de 4,22 g/L a partir de 20 g/L de substrato. Como a literatura não menciona a capacidade de degradação de um substrato industrial, sem haver um pré-tratamento do substrato, os resultados deste trabalho demonstram o potencial desta levedura para produção de etanol a partir do amido bruto de mandioca.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo projeto de pesquisa aprovado nessa temática (APQ-4513/10) e pela bolsa de Iniciação Científica da aluna Deisielly Ribeiro Marques. Ao conselho de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela bolsa de produtividade em Desenvolvimento Tecnológico e Extensão Inovadora (DT) do professor Alexandro Sobreira Galdino. A Universidade Federal de São João Del-Rei (UFSJ) pelo apoio.

REFERÊNCIAS

- APIWATANAPIWAT, W; MURATA, Y; KOSUGI, A; YAMADA, R; KONDO, A; ARAI, T; RUGTHAWORN, P; MORI, Y. Direct ethanol production from cassava pulp using a surface-engineered yeast strain co-displaying two amylases, two cellulases, and β -glucosidase. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 90, n.1, p.377-384, 2011.
- ASHIKARI, T; KUNISAKI, S; MATSUMOTO, N; AMACHI, T; YOSHIZUMI, H. Direct fermentation of raw corn to ethanol by yeast transformants containing a modified *Rhizopus glucoamylase* gene. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.32, n.1, p.129–133, 1989.
- CHEN, D. C.; YANG, B. C.; KUO, T. T. One-Step transformation of yeast in stationary phase. **Current Genetics**, v. 21, n. 1, p. 83-84, 1992.
- FAVARO, L; BASAGLIA, M; SAAYMAN, M; ROSE, S.F.T; VAN, Z.Y.L, CASELLA, S. Engineering amylolytic yeasts for industrial bioethanol production. **Chemical Engineering Transaction**, v.20, n.1, p.97–102, 2010.
- FLOR, P.Q; HAYASHIDA, S. Production and characteristics of raw starch-digesting glucoamylase O from a protease-negative, glycosidase-negative *Aspergillus awamori* var. *Kawachi* Mutant. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, n.3, p.905-912, 1983.
- FUJIO, Y; SUYANADONA, P; ATTASAMPUNNA, P; UEDA, S. Alcoholic fermentation of raw cassava starch by *Rhizopus koji* without cooking. **Biotechnology Bioengineering**, v.26, n.4, p.315-319. 1984
- FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **Journal of Biochemistry**, v.41, n.1, p.583-603, 1954.
- GALDINO, A.S. **Clonagem e expressão de uma alfa-amilase de *Cryptococcus flavus* e sua aplicação na degradação do amido**. Brasília, 2008, 100 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas- Biologia Molecular), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília (UNB).
- GOTO, M; EKINO, K; FURUKAWA, K. Expression and functional analysis of a hyperglycosylated glucoamylase in a parental host, *Aspergillus awamori* var. *Kawachi*. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, n.7, p.2940-2943, 1997.
- HATA, Y; KITAMOTO, K; GOMI, K; KUMAGAI, C; TAMURA, G; HARA, S. The glucoamylase cDNA from *Aspergillus oryzae*: its cloning, nucleotide sequence, and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.55, n.4, p.941- 949, 1991.
- HEIMO, H; PALMU K; SUOMINEN, I. Expression in *Pichia pastoris* and Purification of *Aspergillus awamori* glucoamylase catalytic domain. **Protein Expression and Purification**, v.10, n.1, p.70-79, 1997.
- HISADA, H; SANO, M; ISHIDA, H; HATA, Y; MACHIDA, M. Identification of regulatory elements in the glucoamylase-encoding gene (GlaB) promoter from *Aspergillus oryzae*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 97, n.11, p.4951-4956, 2013.
- INLOW, D; McRAE, J; BEN-BASSAT, A. Fermentation of corn starch to ethanol with genetically engineered yeast. **Biotechnology Bioengineering**, v.32, n.2, p.227-234, 1988.
- KOTAKA, A; SAHARA, H; HATA, Y; ABE, Y; KONDO, A; KATO-MURAI, M; KURODA, K; UEDA, M. Efficient and direct fermentation of starch to ethanol by sake yeast strains displaying fungal glucoamylases. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.72, n.5, p.1376–1379, 2008.
- KUMAR, S.S; VENKATESWARA, R.M; DAS, D. Studies on glucoamylase produced from *Aspergillus awamori* (NRRL-3112) and their effect on saccharification of potato starch. **Indian Journal Experimental Biology**, v.33, n.12, p.957-961, 1995.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LALUCE, C.;SCHENBERG,A.C;GALLARDO,J.C;CORADELLO,L.F;POMBEIRO-SPONCHIADO,S.R. Advances and developments in strategies to improve strains of *Saccharomyces cerevisiae* and processes to obtain the lignocellulosic ethanol –a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.166,n.8,p.1908-1926. 2012
- LIN, L.L; MA, Y.J; CHIEN, H.R; HSU, W.H. Construction of an amylolytic yeast by multiple integration of the *Aspergillus awamori* glucoamylase gene into a *Saccharomyces cerevisiae* chromosome. **Enzyme Microbiology Technology**, v.23, n.1,p.360–365,1998.
- LIN, H.J; XIAN, L; ZHANG, Q.J; LUO, X.M; XU, Q.S; YANG, Q; DUAN, C.J; LIU, J.L; TANG, J.L; FENG, J.X. Production of raw cassava starch-degrading enzyme by *Penicillium* and its use in conversion of raw cassava flour to ethanol. **Journal Indian Microbiology and Biotechnology**, v.38, n.6, p.733-742, 2011.

MERTERS, J.A.;SKORY,C.D. Isolation and characterization of a second glucoamylase gene without a starch binding domain from *Rhizopus oryzae*. **Enzyme Microbiology Technology**, v.54, n.6, p.462-466. 2007

MORAES, L. M. P.; ASTOLFI-FILHO, S.; OLIVER, S. G. Development of yeast strains for the efficient utilization os starch: evaluation of constructs that express α -amylase and glucoamylase separately or as bifuntional fusion proteins. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 43, n. 6, p. 1067-1076, 1995.

SAVILLE, B.A; HUANG, C;YACYSHYN, V; DESBARATS, A. Properties and performance of glucoamylase for fuel etanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129, n.132, p. 180-194, 2006.

SHARMA, A; SATYANARAYANA, T, Production of acid-stable and high-maltose forming α -amylase of *Bacillus acidicola* by solid-state fermentation and immobilized cells and its applicability in baking. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.168, n.5, p.1025-1034. 2012

STEYN, A. J. C.; PRETORIUS, I. S. Expression and secretion of amylolytic enzymes by *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Varia**, n. 5, p. 76-126, 1990.

YANG, S; JIA, N; WANG, J. Heterologous expression and efficient ethanol production of a *Rhizopus glucoamylase* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology Reports**, v.38, n.1, p.59-64. 2011

ZYL, W.M; BLOOM, M; VIKTOR, M.J. Engineering yeasts for raw starch conversion. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 95, p.1377-1388. 2012

RECEIVED 12 SEP 2013
ACCEPTED 26 MAR 2014