

## **EVOLUÇÃO DIRECIONADA DE BETA GLICOSIDASE EM *BACILLUS POLYMYXIA*.**

Amanda Camargo de Freitas<sup>1</sup>, Maria de Lourdes Borba Magalhães<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Medicina Veterinária - CAV– bolsista PIVIC/UDESC.

<sup>2</sup>Orientadora, Departamento de Produção Animal e Alimentos – CAV - maria.magalhaes@udesc.br

Palavras-chave: BGLA. Etanol de segunda geração. Evolução direcionada.

O etanol de primeira geração é o principal processo para produção de bioetanol. Utiliza a sacarose presente na cana de açúcar como matéria-prima para o processo de fermentação. Durante a produção de bioetanol de primeira geração, ocorre a produção de uma quantidade significativa de resíduos lignocelulósicos provenientes do bagaço da cana. A utilização dos resíduos lignocelulósicos como matéria prima para a produção de etanol é um processo conhecido como etanol de segunda geração (RODRIGUES, 2010). A produção do bioetanol de segunda geração é um método de obtenção de etanol deste resíduo lignocelulósico, entretanto, este método é ainda ineficiente e custoso devido à ineficácia das enzimas hidrolíticas envolvidas no processo. Neste contexto, a evolução direcionada de BGLA resistentes à inibição por glicose representaria uma importante contribuição para o processo (SANTOS et al., 2010). Este projeto visa identificar mutantes da enzima BGLA de *Bacillus polymyxa* com maior eficiência catalítica comparada ao tipo selvagem a partir de técnicas de evolução direcionada. Os resíduos que fazem parte do sítio ativo da enzima foram mutados aleatoriamente. Para isso, primers mutagênicos foram adicionados ao plasmídeo de BGLA. Em uma reação de PCR, o DNA plasmidial foi sintetizado a partir dos primeiros mutagênicos inseridos, gerando diversas cópias de fragmento de DNA com mutações inseridas, chamados megaprimers. Os megaprimers passaram então por uma reação de purificação a partir de um kit rápido, em que são filtrados os excessos de primers, enzimas e dntps resultantes da PCR. Em uma reação de megaWHOP, obteve-se cópias de DNA plasmidial com fragmentos de megaprimer, ou seja, com mutações. O DNA resultante foi digerido com DPN1. A confirmação da presença dos megaprimers na amostra foi feita a partir de eletroforese em gel de agarose. As amostras com megaprimers foram então transformadas em células de *E. Coli* Rosetta Gamm eletrocompetentes pelo processo de transformação, em que uma descarga elétrica leva à entrada do DNA na célula. A célula com DNA mutado foi então cultivada em meio LB Ágar para que se multiplicassem com o DNA inserido. Não foi observado o crescimento de células com mutações. O processo foi repetido, visando a identificação do erro em cada um dos métodos, mas novamente, nenhum resultado foi obtido. Foram realizadas outras tentativas em diferentes resíduos do sítio ativo da enzima, buscando-se aprimorar cada um dos passos do processo como quantidade de reagentes e tempo de extensão da reação de PCR. Não se obteve mais resultados, pois no semestre 2016/2 o projeto foi interrompido para a realização de outra pesquisa.