

EVOLUÇÃO DIRECIONADA DE BETA GLICOSIDASE DE *BACILLUS POLYMYXIA*.

Crislauana Garcia¹, Luiz Claudio Miletto², Maria de Lourdes Borba Magalhaes³

¹ Acadêmica do curso de Medicina Veterinária – CAV – bolsista PIVIC/UDESC.

² Professor participante do Departamento de Produção Animal e Alimentos – CAV.

³ Orientadora, professora do Departamento de Produção Animal e Alimentos – CAV – maria.magalhaes@udesc.br

Palavras-chave: Bioetanol. Biomassa. BGLA.

O etanol provindo da cana de açúcar é a segunda fonte de energia mais utilizada pela indústria automotiva. No Brasil a matéria prima utilizada é a cana de açúcar, sendo o segundo maior produtor, gerando 15 milhões de litros de álcool. O bagaço da cana de açúcar que anteriormente não tinha uso, agora é utilizado para a produção do bioetanol, conhecido como etanol de segunda geração. Este subproduto que utiliza a biomassa lignocelulósica para obter o álcool está ganhando espaço no mercado, mas ainda necessita de estudos, pois sua produção ainda é ineficiente e onerosa. A identificação de uma enzima beta-glicosidase (BGLA) (envolvida no processo de hidrólise de celulose) com alta eficiência catalítica para uso no processo de produção de etanol de segunda geração seria um importante avanço. O projeto tem como objetivo geral a identificação de mutantes da enzima BGLA com eficiência catalítica superior ao tipo selvagem através de técnicas de evolução direcionada. Primeiramente, realizamos a construção do Mega Primer que consiste na amplificação do gene BGLA, por reação de PCR, utilizando os primers mutagênicos que introduzem mutações nos resíduos W406 e Q20 do sítio ativo da enzima. O mega primer foi construído com sucesso e o passo seguinte foi a construção de uma fita que estende-se por todo o plasmídeo contendo o gene da enzima BGLA utilizando o megainiciador e a técnica de megawhop. Realizamos testes para avaliar duas variáveis, a quantidade de mega primer a ser utilizado e a quantidade de ciclos de PCR a serem feitos. Foram realizadas várias tentativas, todas falhas, onde não observávamos a construção do plasmídeo mutagenizado a partir da técnica de megawhop. Depois de alongar o plasmídeo inteiro utilizando o mega-iniciador, a mistura resultante será incubada com uma enzima de restrição específica para DNA metilado, DPN1, para remoção específica do plasmídeo molde. A mistura tratada com DPN1 será transformada em células de *E. coli* e submetida a ciclos de seleção da enzima de interesse. A linhagem celular escolhida será aquela que tiver a maior produção de enzima BGLA na forma solúvel e ativa. Estas células foram semeadas em placas. Após o crescimento das colônias transformantes, as colônias com coloração amarela mais intensa serão selecionadas e submetidas ao sequenciamento. Após o sequenciamento as enzimas serão testadas quanto sua atividade beta glicosídica. As que apresentarem uma atividade superior à da BGLA selvagem irão passar pelo processo de expressão e purificação. A identificação de enzimas BGLA com alta eficiência catalítica em temperaturas moderadas, é de extrema importância para o melhoramento do processo de produção de etanol de segunda geração. O melhoramento da eficiência catalítica de BGLA significa um grande avanço, reduzindo

possivelmente os custos de produção industrial, além de favorecer o consumo total da biomassa, tornando o processo mais ecologicamente viável.

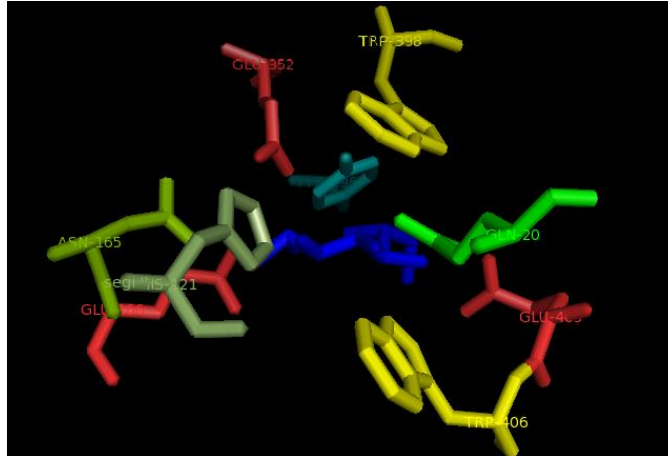


Fig. 1 Resíduos no sítio ativo da enzima BGLA de *B. polymyxa* que serão inicialmente mutados para a construção da biblioteca genômica. Em azul está representada a molécula de gluconato. Os resíduos Q20, H121, N165, Y296, W398, E405 e W406 que fazem contato com o inibidor e serão mutados na biblioteca são ilustrados na figura.