

Mutagênese sítio-dirigida da xilanase (XynA) de *Orpinomyces* sp. PC-2 para aumento da termoestabilidade

Maria Isabella Petra Souza*, Rafaela Zandonade Ventorim, Larissa Mattos Trevizano, Valéria Monteze Guimarães.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000. Viçosa/MG, Brasil

*e-mail: isabella.petra@gmail.com

Resumo

O presente trabalho consiste na manipulação genética de xilanases derivadas do gene *xynA* de *Orpinomyces* com a finalidade de aprimorar suas características para uso na indústria de papel e celulose. A metodologia de mutagênese sítio-dirigida foi empregada a fim de obter xilanases mutantes com maior estabilidade, mais adequadas aos processos industriais. A partir de enzimas mutantes previamente obtidas por *error-prone* PCR, estudos de modelagem e dinâmica molecular permitiram identificar regiões flexíveis da estrutura e resíduos para serem deletados de forma a aumentar a rigidez e permitir a obtenção de enzimas mais termoestáveis. Os resíduos identificados foram G10, T30, N53, Q109 e G110. A enzima sem deleções, SWT foi utilizada como controle e molde para as deleções. Os mutantes de SWT com as respectivas deleções, SWT T30, SWT N53 e SWT Q109/G110, foram obtidos. Os genes que codificam para as xilanases mutantes foram expressos em *E. coli*/pET24b. Após superexpressão das enzimas, o extrato enzimático intracelular foi testado quanto à concentração de proteína e atividade enzimática, utilizando como substrato xilana Oalt Spelts 1% ressuspensa em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,5. Enquanto a xilanase SWT apresentou atividade específica de 5446,5 U.mg⁻¹, SWT T30, SWT N53 e SWT Q109/G110 apresentaram atividade específica de 4165,4; 759,8 e 3364,2 U.mg⁻¹, respectivamente. Após a caracterização das enzimas mutantes obtidas, espera-se a identificação de enzimas mais termoestáveis que posteriormente serão testadas sob as condições de branqueamento da polpa de celulose na indústria de papel.

Palavras-chave: xilanase, mutagênese sítio-dirigida, termoestabilidade.

Apoio financeiro: CNPq e FAPEMIG