

## **Obtenção da sequência do gene que codifica uma peptidase visando a imobilização orientada em suportes de baixo custo**

kamyla dornelles cruz<sup>1</sup>, José Vinícius Gonçalves<sup>1</sup>, Nubya Machado Borges<sup>1</sup>, Giandra Volpato<sup>1\*</sup>

\*Orientador(a)

<sup>1</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS) - *Campus* Porto Alegre. Porto Alegre, RS

As peptidases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas de proteínas gerando peptídeos. Esses peptídeos podem apresentar propriedades bioativas, podendo ser aplicados na obtenção de produtos voltados à saúde. Entretanto, a aplicação de enzimas em bioprocessos ainda representa um alto custo e baixa recuperação. Desta forma, surge a necessidade de buscar alternativas visando o melhoramento das características enzimáticas e redução de custos da biocatálise industrial. Entre elas estão a produção de enzimas recombinantes e sua imobilização orientada. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi desenhar o gene da peptidase para ser sintetizado contendo caudas de afinidade que permitam a imobilização da enzima de forma orientada. Para selecionar a origem da sequência da peptidase a ser sintetizada, foram realizadas buscas nas bases Scopus, Scielo e Web of Science, utilizando como palavras-chave peptidase, peptídeo, microrganismo, protease e aplicações. Foi definido o gênero do microrganismo produtor da peptidase e realizada a busca avançada das sequências no banco de dados de nucleotídeos (GenBank) do National Center for Biotechnology Information, preenchendo. As sequências encontradas foram investigadas quanto data de publicação, características e aplicações da enzima. Em seguida foi desenhada a sequência adicionando sítios de restrição para clonagem em vetor contendo caudas de afinidade por histidina e celulose. Foram encontrados como principais produtores de proteases os microrganismos *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus licheniformis*. As proteases de *Bacillus* foram selecionadas, devido a sua ampla utilização industrial, atuação em pH neutro e consideradas seguras para utilização em alimentos. A partir disso, foram encontradas 20 sequências relacionadas a proteases de *Bacillus*, sendo uma de *B. amyloliquefaciens*, cinco de *B. licheniformis* e 14 de *B. subtilis*. Considerando as informações previamente descritas, seis sequências foram excluídas em função da falta de documentos relacionados, sete sequências estavam relacionadas a um mesmo artigo (exclusão por similaridade) e uma sequência foi excluída por estar relacionada a enzimas lipolíticas (exclusão por dispersão da proteína alvo). Após, foi realizada a leitura na íntegra dos artigos incluídos, evidenciando a atividade proteolítica e as características tecnológicas da enzima. Nesta etapa dois artigos foram excluídos pela especificidade dos peptídeos gerados e por desvio de estudo. As quatro sequências proteicas selecionadas foram alinhadas a fim de avaliar as similaridades dos seus genes. À sequência da protease com relato de possuir maior atividade proteolítica foram adicionados os sítios de restrição e três mutações reconhecidas por aumentar a atividade e estabilidade da enzima. Em seguida, a sequência que codifica o gene da protease de *Bacillus subtilis* foi enviada para síntese. Considerando-se o aumento do emprego de enzimas recombinantes nas áreas alimentícia e farmacêutica, se torna fundamental o desenvolvimento de tecnologias inovadoras, que busquem a obtenção de produtos com potencial aplicação no mercado nacional de enzimas.

Palavras-chaves: biotecnologia; biologia molecular; clonagem.