

O1.4

Améliorer la thermostabilité de la xylanase d'*Aspergillus niger* par évolution dirigée

Letian Song, Michel Sylvestre

Institut National de la Recherche Scientifique, de l'INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC H7V 1B7, Canada

La xylanase *Aspergillus Niger* (An-Xyn) est une enzyme de la famille GH10 et possède une activité de bio-blanchiment utile pour l'industrie des pâtes et papiers. Cependant, sa faible stabilité thermique entrave son potentiel d'application industrielle. Dans cette étude, deux stratégies complémentaires d'ingénierie des protéines associées à une approche de criblage à haut débit ont été employées pour améliorer la stabilité thermique de l'enzyme. Dans une première étape, une analyse *in silico* de sa structure modélisée a permis d'identifier une région cible pour effectuer une ronde de mutagenèse aléatoire. Parmi une banque de 8092 clones, 21 ont montré une activité résiduelle qui était de 2 à 26 fois plus grande que le parent après une exposition à 58 °C de 15 minutes. Cette première ronde de mutagenèse nous a permis d'identifier cinq résidus susceptibles d'affecter la résistance thermique. Ces résidus ont été mutés par une ronde de mutagenèse saturante itérative (ISM) de quatre cycles pour générer sept banques de mutants. Les six meilleurs clones de chaque banque montraient une augmentation significative de la résistance thermique. Comparé à l'enzyme parent, la température d'activité optimale du mutant la plus résistant (un quintuple mutant) est passée de 45-50 °C à 60-65 °C, et la température de fusion de la protéine a augmenté de 15 °C. De plus, la demi-vie à 60 °C du mutant est 30 fois plus longue que celle du parent et on note une augmentation de 73% par rapport à celle du parent de l'activité spécifique mesurée à sa température optimale. L'analyse cinétique indique que les modifications structurelles de l'enzyme mutant n'ont eu aucune influence sur les propriétés catalytiques. Ces xylanases modifiées génétiquement nous permettent de mieux comprendre la relation structure-fonction des protéines, et fournissent un catalyseur potentiel pour l'industrie papetière.