

Enzimas B relacionadas à limoneno epóxido-hidrolase apresentam elevada aceitação por substratos

Gabriela D. T. González¹ (PG) e Luciana G. de Oliveira¹ (PQ).

¹ Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

gabrielatormet@gmail.com, luciana@iqm.unicamp.br

Palavras chave: limoneno epóxido-hidrolases, *Streptomyces*, biocatalisadores, teste de adrenalina.

Introdução

A enzima limoneno-1,2-epóxido hidrolase (LEH), pertence à classe enzimática das hidrolases, sendo classificada como E.C. 3.3.2.8. Difere das demais epóxido-hidrolases por apresentar uma estrutura bastante distinta e um mecanismo de ação com apenas uma etapa, enquanto as α,β -hidrolases promovem a hidrólise em duas etapas. Além disso, o mecanismo de reação enantioconvergente evidencia o grande interesse da utilização da LEH na síntese industrial.¹ As “enzimas B” de *Streptomyces* apresentam semelhança estrutural à LEH e são frequentemente encontradas como participantes da biossíntese de poliéteres ionóforos, exercendo estereocontrole na formação dos sistemas espirocetálicos e dos diversos anéis do tipo furano e pirano.

Em função da semelhança estrutural às LEH, as atividades das enzimas NigBI, SalBI, SalBII, SalBIII e LasB, participantes dos processo de hidrólise/ciclização da nigericina, salinomicina e lasalocida, respectivamente, foram testadas frente a diversos epóxidos com o intuito de observar a atividade e o escopo de aceitação por substratos. Os ensaios foram realizados utilizando-se o teste de adrenalina.

Resultados e Discussão

NigBI, SalBI, SalBII, SalBIII e LasB foram clonadas em pET28b ou pET29b(+) com HisTag N- ou C-terminal, respectivamente e transformadas em *E.coli* BL21(DE3) para a expressão heterológica. Após purificação por cromatografia por afinidade, a presença das enzimas foi confirmada por SDS-PAGE. Pode-se observar a expressão em todas as construções, entretanto SalBI e SalBII degradaram após 24 horas, impossibilitando a caracterização da atividade enzimática por meio do ensaio de adrenalina.

O ensaio para EH foi realizado para as enzimas NigBI, SAIBIII e LasB inicialmente em concentrações de enzima de 0,1, 1,0, 5,0 e 10,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Epóxidos com diferentes padrões de substituição e impedimento estereo foram selecionados como substrato para estudar a atividade destas enzimas (Tabela nº 1).

As enzimas LasB e NigBI apresentaram atividade de EH a partir de concentrações de 2,5 e 5,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectivamente. Na escala de cinzas foi observado que um aumento na concentração da enzima motiva o aumento diretamente proporcional na atividade frente a todos os substratos ensaiados.

Tabela 1. Substratos ensaiados frente às enzimas B pelo teste de adrenalina

Nº	Substrato	Nº	Substrato
S1	Butil-2,3-epoxipropil éter	S7	Glicidil fenilfenil éter
S2	Oxido de 2-metil-2-propen-1-ol	S8	Ciclo-hexeno óxido
S3	Oxido de 3-buten-1-ol	S9	Estireno óxido
S4	Fosfomicina	S10	exo-2,3-epoxinorbornano
S5	Limoneno epoxido (cis+trans)	S11	trans-2,3-epoxibutano
S6	Ciclopenteno óxido	S12	cis-2,3-epoxibutano

Com os dados obtidos e utilizando-se uma ferramenta computacional os dados obtidos foram convertidos para escala de cinzas estabelecendo para um máximo de atividade a cor preta, um mínimo de atividade a cor branca e para atividades intermediárias, diferentes tons de cinza (Figura 1).



Figura 1. Escala de cinzas para NigBI mostra incremento de atividade em função da concentração de enzima.

O ensaio de adrenalina para SalBIII foi negativo para todos os substratos em diferentes concentrações de enzimas, mostrando que apesar da similaridade estrutural, SalBIII deve apresentar atividade enzimática distinta das EHs.

Conclusões

Observamos que as hidrolases/ciclasas LasB e NigBI apresentaram atividade de EHs com elevado escopo de aceitação por substratos. As enzimas serão avaliadas com relação à enantiosseletividade e enantioconvergência. Trabalhos de expressão e caracterização de mutantes de LasB estão em desenvolvimento para avaliar a influência dos resíduos do sítio ativo da enzima, nas atividades observadas. Estudos de expressão simultânea de SalBI e SalBII também encontram-se em andamento.

Agradecimentos

FAPESP, CAPES, IQ-UNICAMP

¹ Van Der Werf, M. T. J.; Overkamp, K. M.; De Bont, J. A. M.; *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 5052; Arand, M. et al. *The EMBO Journal* **2003**, *22*, 2583.

² Fluxa, V., Wahler, D., Reymond, L. *Nature Protocols* **2008**, *3*, 1270.