

Expressão e atividade de duas epóxido-hidrolases putativas de *Streptomyces* sp.

Gabriela D. Tormet, Dayane C. C. M. Coqueiro, Luciana G. de Oliveira
Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil (luciana@iqm.unicamp.br)

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

Introdução

As epóxido-hidrolases (EH) pertencem a um amplo grupo de enzimas hidrolíticas, as quais não necessitam de co-fatores para atuarem. Estas enzimas são encontradas em todos os tipos de organismos vivos^{1,2} e agem sobre uma grande variedade de epóxidos, através da adição *anti* de moléculas de água resultando em seus respectivos dióis vicinais. As EH são de grande interesse de aplicação biotecnológica uma vez que pode levar à formação de dióis quirais (enantioméricos e diastereoisoméricos) como uma alternativa a aplicação dos catalisadores químicos assimétricos. Após sequenciamento e anotação da linhagem de *Streptomyces* sp, identificamos duas epóxido hidrolases putativas da classe das α/β -hidrolases B1EPH1 e B1EPH2.

A atividade das enzimas expressas foi avaliada com o ensaio colorimétrico de adrenalina³ frente a 12 diferentes epóxidos com diferentes padrões de substituição química.

Resultados e Discussão

Os genes para as duas EH de *Streptomyces* B1 foram amplificados (Figura 1), clonados em pET29b(+) entre os sítios NdeI e EcoRI, contendo uma calda de histidina C-terminal. Suas sequências foram confirmadas e os experimentos de expressão em *E. coli* BL21(DE3) indicou a presença de enzimas expressas com os tamanhos esperados (B1-EPH1: 37.960 kDa e B1-EPH2: 37.814 kDa).

Previsão *in silico* pelo servidor I-Tasser identificou que as enzimas estudadas apresentam elevada similaridade às EHs de *Pseudomonas aeruginosa*. Os modelos revelam elevados conteúdo de α -hélices e folhas beta, conforme as α/β -hidrolases convencionais. As estruturas foram previstas como epóxido-hidrolases solúveis (3.3.2.10). As duas enzimas apresentam 27% de identidade. Um alinhamento gerado pelo programa Geneious³ mostra a correspondência entre os resíduos de sítio ativo representado pela tríade Asp, Asp e His além de identidade em outros resíduos (20%).

A confirmação da atividade foi realizada por meio de teste triagem frente a diferentes epóxidos utilizando-se o ensaio de adrenalina (triplicata). As enzimas foram ensaiadas nas concentrações de 2,5, 5,0 e 10,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Os substratos testados estão apresentados na Tabela 1.

Os dados da medição da absorbância foram convertidos a uma escala de cinzas⁴ a partir da qual se pode visualizar o nível de atividade da enzima sendo que o aumento na concentração da enzima motiva um aumento direto na atividade frente a todos os substratos ensaiados.

A enzima B1EPH1 apresentou atividade a partir de concentrações de 5,0 $\mu\text{g /ml}$, enquanto a enzima B1EPH2 apresentou atividade em concentrações maiores a 2,5 $\mu\text{g /ml}$.

Tabela 1. Substratos ensaiados frente às enzimas B1EPH1 e 2 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

Apesar de hidrolisar a todos os substratos testados mesmo que em pequena extensão, tanto B1EPH1 quanto B1EPH2 apresentaram maior atividade frente aos substratos S2 e S4 que são epóxidos dissubstituídos. Estudos relacionados a enantiosseletividade e possível enantioconvergência estão em andamento.

Conclusões

As epóxido hidrolases de *Streptomyces* sp foram apropriadamente expressas e apresentaram atividade de acordo com os resultados do teste de adrenalina. Outros estudos de caracterização química e bioquímica dessas enzimas estão em andamento.

Agradecimentos

FAPESP, CAPES, PIBIC-CNPQ, IQ-UNICAMP

¹ Weijers, C. A. G. M.; Bont, J. A. M. *J. Mol. Catal. Enz. B* **1999**, 6, 199.

² Smit, M. S.; Labuschagne, M. *Curr. Org. Chem.* **2006**, 10, 1145.

³ Drummond, A. J.; Ashton, B.; Buxton, S.; Cheung, M.; Cooper, A.; Duran, C.; Field, M.; Heled, J.; Kearse, M.; Markowitz, S.; Moir, R.; Stones-Havas, S.; Sturrock, S.; Thierer, T.; Wilson, A. (2012) *Geneious* v5.6. Disponível em <http://www.geneious.com>

⁴ <http://metis.pucp.edu.pe/~pfonseca/gt/gt2.html>