

Purificação de uma(s) oxidoredutase(s) presente(s) na *Arthrobacter* sp. isolada de sedimento marinho antártico.

Lidiane S. Araújo^{1*} (PG), Edna Kagohara¹ (PQ), Thalita S. Silva¹ (IC), Leandro H. Andrade¹, (PQ).
¹Instituto de Química, Universidade de São Paulo. *E-mail: lidianepiaui@yahoo.com.br

Av. Prof. Lineu Prestes 748, SP 05508-900, São Paulo, Brazil.

Palavras Chave: oxidação, álcool, oxidoredutase, *Arthrobacter* sp.

Introdução

Alcoóis quirais opticamente ativos são importantes blocos de construção na síntese química. As enzimas mais utilizadas para obter esses compostos são as oxidoredutases^{1,2}.

Nesse estudo realizamos a purificação de oxidoredutase a partir da *Arthrobacter* sp que foi isolada de amostra de sedimento marinho antártico, utilizando a técnica de enriquecimento de microorganismos com o composto (*R,S*)-1-(fenil)etanol.

Para alcançar um alto grau de pureza da enzima de interesse, usualmente empregam-se diferentes técnicas de purificação, tais como cromatografia por afinidade, interação hidrofóbica, troca iônica e gel de filtração. No presente trabalho utilizou-se tais técnicas bem como a zimografia que detecta uma grande variedade de oxidoredutases³.

Resultados e Discussão

As células da *Arthrobacter* sp. foram rompidas em ultrassom e as proteínas presentes no extrato proteico foram aplicadas em diferentes colunas de Interação hidrofóbicas (phenyl, butyl, butyl-S, octyl), Troca aniônica (DEAE, QXL, QFF, SP, CM, ANX) e Afinidade (Mimetic Orange@3A6XL, Blue@1P6XL, Red@2A6XL, Green@1 A6XL). Em seguida, testou-se a atividade enzimática, presentes nas frações obtidas, na reação de oxidação do álcool (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol com a adição de NAD⁺ (esquema 1).



Esquema 1. Oxidação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol.

Dentre as colunas testadas, a DEAE foi a que apresentou, inicialmente, um melhor perfil para purificação proteica, em que a enzima foi eluída em 5 passos, com diferentes concentrações de NaCl (15, 18, 26, 50 e 100 %) em TrisHCl 20mmol/L (pH 8,0).

As frações 32-54, obtidas da DEAE, apresentaram boas conversões (10-30%) e seletividade (50-80% e.e.). Estas frações foram aplicadas na coluna ANX com um gradiente crescente de NaCl (1M - 0 M em 20 mMol/L de tampão TrisHCl). A pureza da enzima foi determinada por *native*-PAGE, figura 1A.

37^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

Realizou-se a zimografia com as frações proteicas obtidas com a finalidade de confirmar se a enzima que está sendo purificada é realmente uma oxidoredutase, figura 1B.

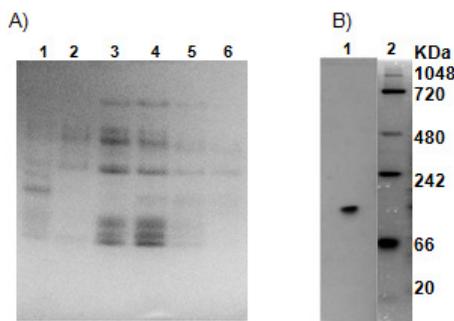


Figura 1: A) *Native*-PAGE linha 1-6: frações 16-21. B) Teste de atividade da oxidoredutase, linha 1: fração proteica; linha 2: BenchMark™ Protein Ladder.

De acordo com o gel *native*-PAGE, figura 1A, percebe-se que a oxidoredutase, presente nas frações 16-21, linhas 1-6, está parcialmente purificada, já que existem poucas bandas, o que significa que existem poucas proteínas.

Observa-se uma banda escura no gel de eletroforese, figura 1B, linha 1, referente ao produto da reação de oxidação, catalisada pela oxidoredutase, em que esta foi detectada com aproximadamente 142 kDa.

Conclusões

Purificou-se parcialmente uma oxidoredutase frio ativa a partir da *Arthrobacter* sp. Esta proteína catalisou a oxidação do (*S*)-enantiômero do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol para a cetona correspondente, que deu boas conversões e seletividade.

Com a zimografia detectou-se que a oxidoredutase é ≈142 kDa. Esta enzima será empregada em reações de oxidação enantiosseletiva de diferentes alcoóis.

Agradecimentos

FAPESP (Biota-Bioprospecta) e CNPq-PROANTAR pelo suporte financeiro.

¹ Jones, J. B.; Beck, J. F. *Techniques of chemistry series*, part I, vol. 10, 1976. John Wiley & Sons, New York, NY. ² Voss, C.V.; Gruber, C.C.; Kroutil, W. *Synlett* 2010, 7, 991-998. ³ Jeng, R.S.; Shiyuan, Y.; Wayman, M. *Canadian Journal of Microbiology*. 1987, 33, 1017-1023.