

Triagem de alto desempenho para detecção de hidrolases em biblioteca metagenômica de sedimento contaminado por petróleo.

Simone M. Mantovani¹(PG), Tiago H. N. Simões²(PG), Christiane Roseto¹(IC), Eder Santos²(PG), Valéria O. de Oliveira²(PQ), Maurício R. Dimitrov²(PQ), Gilson Manfio²(PQ), Fabiana F. Garboggini²(PQ), Anita J. Marsaioli^{1*}(PQ). anita@iqm.unicamp.br

¹Universidade estadual de Campinas, Instituto de Química, C. P. 6754, CEP: 13083, Campinas – SP.

²CPQBA – UNICAMP - C. P. 6171- CEP: 13081-970, Campinas – SP

Palavras Chave: biblioteca metagenômica, triagem de alto desempenho, hidrolases.

Introdução

Microrganismos representam uma considerável fonte de enzimas de interesse industrial, porém muitos microrganismos não são cultiváveis em condições laboratoriais¹. Uma estratégia que permite acessar essa biodiversidade muito pouco explorada é a construção de bibliotecas metagenômicas, pela extração e clonagem em *E. coli* de fragmentos do genoma microbiano total de uma determinada fonte ambiental. Dessa maneira, nosso grupo de pesquisa tem aplicado técnicas de triagem de alto desempenho por fluorescência para detecção de hidrolases como, epóxido-hidrolases (EH), lipases (LP) e esterases (ES) nessa biodiversidade ainda inexplorada.

Resultados e Discussão

A biblioteca metagenômica em estudo foi construída a partir de amostras de sedimentos de manguezal contaminados com petróleo, coletadas na Baía de Guanabara-RJ. O procedimento de construção da biblioteca iniciou-se pela extração de DNA de alto peso molecular e clonagem direta de fragmentos (30 – 40 Kb) em vetores de alta capacidade do tipo fosmídeos. Aproximadamente 900 clones foram gerados em células *E. coli* e armazenados por ultra-congelamento.

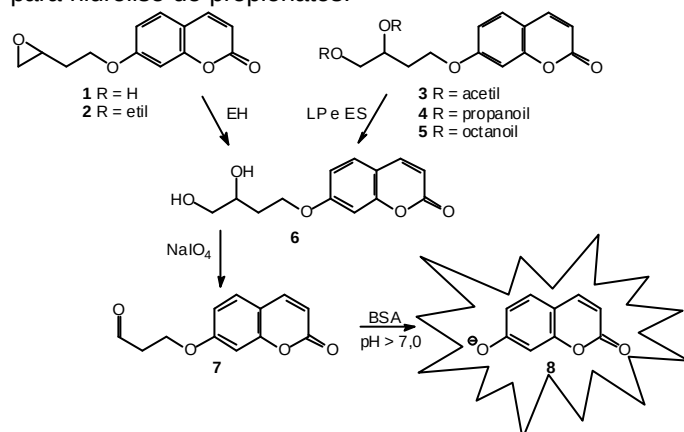
O ensaio baseia-se na formação do diol **6** como produto da reação enzimática, o qual na presença de NaIO₄ e soro albumina bovina (BSA) libera o ânion umbeliferona (**8**) que apresenta emissão máxima de fluorescência à 460 nm em pH > 7,0 (**Esquema 1**).

A otimização dos ensaios de triagem de alto desempenho revelou que o cultivo desses microrganismos em microplacas de 96 poços de 2 mL usando o meio Circlegrow®, e agitação constante por 6h a 37 °C foi a melhor condição.

As concentrações dos reagentes e massa celular também foram otimizadas a fim de obter sinais de fluorescência de boa intensidade. Assim, os ensaios foram conduzidos em microplacas de 96 poços (200 µL) utilizando as sondas **1-5**, e o monitoramento da

atividade enzimática foi feito após 24 h de reação utilizando espectrofotômetro.

Os resultados revelaram 2 clones com potencial atividade hidrolítica de epóxidos terminais (sonda **1**), 2 para hidrólise seletiva de acetatos (sonda **3**) e um para hidrólise de propionatos.



Esquema 1. Ensaio fluorogênico para detecção de hidrolases

Atualmente, nosso grupo está buscando sondas fluorogênicas a fim de detectar fosfatases, Baeyer-Villiger monoxigenases e nitrilases em bibliotecas metagenômicas. Além disso, estudos sobre a enantiosseletividade desses biocatalisadores selecionados serão conduzidos utilizando sondas enantiomericamente enriquecidas².

Conclusões

Dessa maneira, os ensaios permitiram a triagem de forma rápida e simples de 900 clones frente a cinco sondas fluorogênicas, e revelaram 5 microrganismos com potencial para utilização em síntese orgânica. Além disso, essa é a primeira aplicação de triagem enzimática de biblioteca metagenômica com sondas fluorogênicas no Brasil.

Agradecimentos

IQ-Unicamp, CNPQ, Petrobrás, Fapesp.

¹ Chiang, S. –J. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *31*, 99-108.

² Mantovani, S. M.; et. al . *J. Mol. Catal. B: Enzym.* (2008), doi:
10.1016/j.molcatb.2007.12.013