

EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA EPÓXIDO HIDROLASE PUTATIVA DO MICRORGANISMO ENDOFÍTICO STREPTOMYCES SP.

Dayane C. C. M. Coqueiro (IC),^a Luciana G. de Oliveira (PQ)^b

^aFaculdade de Ciências Farmacêuticas, UNICAMP; ^bInstituto de Química, UNICAMP

Resumo

Durante o período da bolsa vigente, a proteína B1 EPH1 contendo cauda de histidina foi obtida pela expressão em *E. coli* BL21(DE3). O gene de interesse foi amplificado e clonado em vetor pET29b(+) deixando portanto uma HisTag C terminal. Posteriormente foi realizada purificação parcial por cromatografia por coluna de afinidade com níquel, o qual interage com a histidina e permite que a proteína de interesse seja isolada com elevada pureza. Em todas etapas, foi realizada eletroforese em gel de agarose-SDS para acompanhar o processo. Após a purificação, foi realizado teste de adrenalina ensaiando-se a enzima frente a diversos epóxidos comerciais. A enzima parcialmente purificada apresentou atividade a partir da concentração de 50 microgramas.mL⁻¹.

Palavras Chave: epóxido-hidrolases, biocatalisadores, teste de adrenalina

Introdução

As epóxido-hidrolases (EH) são enzimas encontradas em todos os tipos de organismos vivos e agem sobre uma grande variedade de epóxidos. As epóxidos-hidrolases do tipo α,β -hidrolases promovem a abertura de epóxidos através de um mecanismo em duas etapas, resultando nos seus respectivos dióis vicinais, os quais podem portar quiralidade (enantioméricos e diastereoisoméricos), mostrando-se uma alternativa atraente frente aos catalisadores químicos assimétricos. No presente projeto, fez-se o estudo da expressão do gene *b1eph1*, que codifica a uma epóxido-hidrolase putativa de *Streptomyces sp.* A enzima resultante foi avaliada na reação de hidrólise de epóxidos.

Resultados e Discussão

* **Análise in silico:** pelos estudos realizados com base nos dados gerados pelo programa ITasser, obteve-se homologia a uma epóxido hidrolase de *Acinetobacter sp* e foi possível deduzir os resíduos do sítio catalítico da B1EPH1; os quais são PHE59, ASP125, LEU126, TYR129, SER171, TYR235, ALA272, VAL273 e HIS299.

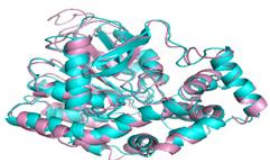


Figura 1: Sobreposição B1EPH1 (rosa) com EH de *Acinetobacter sp.* (azul).

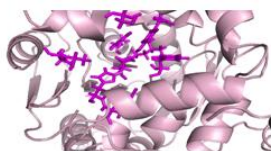


Figura 2: Resíduos do sítio catalítico de B1EPH1

* **Expressão e purificação da proteína:** obteve-se a proteína purificada em concentrações entre 3,20 e 22,35 mg/mL.

* **Teste de adrenalina:** a enzima mostrou atividade, como epóxido-hidrolase, levando à formação do diol vicinal para todos os substratos

testados em alguma extensão. Entretanto, há uma preferência pelos substratos óxido de cicloexeno, (+)-trans-1,2-epóxido-limoneno e trans-2,3-epóxibutano.

Tabela 1. Ordem decrescente de reatividade para os substratos.

Substrato	Estrutura química	Ordem de reatividade
Óxido de cicloexeno		1º
(+)-trans-1,2-epóxido-limoneno		2º
Trans-2,3-epóxido-butano		3º

Conclusões

A epóxido hidrolase B1EPH1, de *Streptomyces sp.*, foi apropriadamente expressa e apresenta atividade de acordo com os resultados do teste de adrenalina. Outros estudos de caracterização química e bioquímica dessa enzima estão em andamento.

Agradecimentos

FAPESP, IQ-UNICAMP, CAPES, PIBIC-CNPq

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

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

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>

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