

**LILIAN LUZIA BELOTI**

**“ESTUDO FUNCIONAL DE UMA EPÓXIDO HIDROLASE DE  
*ASPERGILLUS BRASILIENSIS* CCT1435: EXPRESSÃO,  
PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA”**

***“FUNCTIONAL STUDY OF AN EPOXIDE HYDROLASE FROM  
*ASPERGILLUS BRASILIENSIS* CCT1435: EXPRESSION,  
PURIFICATION AND ENZYMATIC CHARACTERIZATION”***

**CAMPINAS  
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**LILIAN LUZIA BELOTI**

**“ESTUDO FUNCIONAL DE UMA EPÓXIDO HIDROLASE DE *Aspergillus  
brasiliensis* CCT1435: E XPRESSION, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
ENZIMÁTICA.”**

**Orientador(a)/Supervisor: Profa. Dra. Anete Pereira de Souza**

**Co-Orientador/Co-Supervisor: Profa. Dra. Valéria Maia Merzel**

**“FUNCTIONAL STUDY OF AN EPOXIDE HYDROLASE FROM *Aspergillus  
brasiliensis* CCT1435: EXPRESSION, PURIFICATION AND ENZYMATIC  
CHARACTERIZATION.”**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de Microrganismos.

Thesis presented to the Institute of Biology for obtaining the Title of Doctor in Genetics and Molecular Biology, in the Genetics of Microorganisms area

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE  
DEFENDIDA PELA LILIAN LUZIA BELOTI  
E ORIENTADA PELA PROFA DRA. ANETE PEREIRA DE SOUZA**

**Assinatura do Orientador**



---

**CAMPINAS,  
2013**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B418e Beloti, Lilian Luzia, 1980-  
Estudo funcional de uma epóxido hidrolase de *Aspergillus brasiliensis*  
CCT1435  
: expressão, purificação e caracterização enzimática / Lilian Luzia Beloti. –  
Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Anete Pereira de Souza.  
Coorientador: Valéria Maia Oliveira.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Epoxido hidrolase. 2. *Aspergillus brasiliensis*. 3. resolução cinética. 4.  
Enzima recombinante. 5. enantioconvergência. I. Souza, Anete Pereira. II.  
Oliveira, Valéria Maia. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de  
Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Functional study of an epoxide hydrolase from *Aspergillus brasiliensis*  
CCT1435: expression, purification and enzymatic characterization

**Palavras-chave em inglês:**

Epoxide hydrolase

*Aspergillus brasiliensis*

Kinetic resolution

Recombinant enzyme

Enantioconvergence

**Área de concentração:** Genética de Microrganismos

**Titulação:** Doutora em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Anete Pereira de Souza [Orientador]

Ljubica Tasic

Caroline da Costa Silva Gonçalves

Márcia Regina Brochetto Braga

Márcia Nitschke

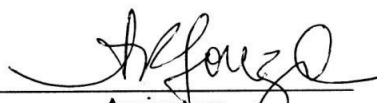
**Data de defesa:** 18-10-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular

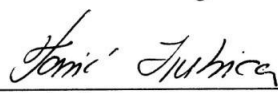
Campinas, 18 de Outubro de 2013

**BANCA EXAMINADORA**

Prof(a). Dr(a). Anete Pereira de Souza (Orientador(a))

  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Ljubica Tasic

  
Assinatura

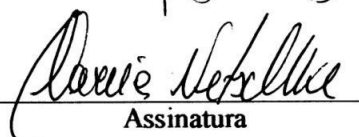
Prof(a). Dr(a). Caroline da Costa Silva Gonçalves

  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Márcia Regina Brochetto Braga

  
Assinatura

Prof(a). Dr(a) Márcia Nitschke

  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Suzan Pantaroto Vasconcellos

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Sindélia Freitas Azzoni

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Everson Alves Miranda

\_\_\_\_\_  
Assinatura



## RESUMO

Neste trabalho, o objetivo principal foi a triagem e estudo de novas enzimas com potencial de aplicação biotecnológica. Uma epóxido hidrolase (AbEH) do fungo *Aspergillus brasiliensis* CCT1435 foi clonada, expressa, purificada, funcionalmente e estruturalmente caracterizada. Análises de filtração em gel e dicroísmo circular indicaram que a AbEH é um dímero em solução e apresenta estrutura secundária típica de  $\alpha/\beta$  hidrolases. A atividade da AbEH foi avaliada com sonda fluorescente O-(3,4-epoxibutil) umbeliferona se mostrando ativa em ampla faixa de pH (6 - 9) e temperatura (25 – 45 °C), com atividade máxima em pH 6,0 a 25 °C. A constante de Michaelis ( $K_m$ ) e a velocidade máxima ( $V_{max}$ ) foram de 495  $\mu M$  e 0,24  $\mu M/s$  respectivamente. A atividade e enantiosseletividade da AbEH foi avaliada com o óxido de estireno racêmico (R/S-SO) apresentando um excesso enantiomérico (ee) > 99% para o S-SO. A atividade da AbEH foi também avaliada com os substratos R/S-SO e cis-3-fenil-2,3-epoxipropanoato de etila em sistemas bifásicos (líquido-líquido/sólido-líquido). Nestes ensaios foi detectado um comportamento enantioconvergente da enzima. Em paralelo, uma biblioteca fosmidial metagenômica de reservatório biodegradado de petróleo (Bacia Potiguar – CE) foi triada para genes que apresentavam atividade lipolítica. Na investigação desses clones a enzima glicosiltransferase foi encontrada. Glicosiltransferases são enzimas importantes que atuam na biossíntese de carboidratos com as mais variadas funções biológicas.



## ABSTRACT

In this work, the main goal was the study and screening of new enzymes with potential biotechnological applications. An epoxide hydrolase (AbEH) from *Aspergillus brasiliensis* CCT1435 was cloned, expressed, purified, functionally and structurally characterized. Analysis of gel filtration and circular dichroism indicated that AbEH is a dimer in solution and has typical secondary structure of  $\alpha/\beta$  hydrolase. The AbEH activity was assessed with the fluorescent probe (3,4-epoxybutyl) umbelliferone showing that this enzyme is active in a wide pH (6 - 9) and temperature (25 – 45°C) range, with maximum rate at pH 6.0 at 25°C. The Michaelis constant ( $K_m$ ) and maximum velocity ( $V_{max}$ ) were 495 mM and 0.24 mM/s respectively. The activity and enantioselectivity of AbEH was evaluated with racemic styrene oxide (R/S-SO) showing an enantiomeric excess (ee) of > 99% for S-SO. The AbEH activity was also evaluated with R/S-SO and cis-3-phenyl-2, 3-ethyl epoxipropanoate in biphasic systems (liquid-liquid/solid-liquid). In these assays, an enantioconvergent behavior of the enzyme was detected. In parallel a metagenomic fosmidial library from biodegraded oil reservoir (Potiguar Basin - CE) was screened for genes that showed lipolytic activity. In the investigation of these clones the glycosyltransferase enzyme was found. Glycosyltransferases are important enzymes involved in the biosynthesis of carbohydrates with varied biological functions.



## SUMÁRIO

|                                                              |              |
|--------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>RESUMO.....</b>                                           | <b>vii</b>   |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                         | <b>ixix</b>  |
| <b>Lista de Figuras.....</b>                                 | <b>xix</b>   |
| <b>Lista de Abreviações .....</b>                            | <b>xxi</b>   |
| <b>PREFÁCIO.....</b>                                         | <b>xxiii</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                   | <b>1</b>     |
| 1.1. Enzimas e sua importância biotecnologica .....          | 1            |
| 1.2 Epóxido Hidrolases.....                                  | 4            |
| 1.2.1 Epóxidos.....                                          | 4            |
| 1.2.2. A importância das Epóxido Hidrolases .....            | 5            |
| 1.3 Glicosiltransferases .....                               | 9            |
| 1.3.1 Papel Biológico dos Polissacarídeos .....              | 9            |
| 1.3.2 Mecanismo e Diversidade das Glicosiltransferases ..... | 10           |
| 1.4. OBJETIVOS .....                                         | 13           |
| 1.4.1. Objetivos Gerais .....                                | 13           |

|                                                                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.4.2. Objetivos Específicos .....                                                                             | 13        |
| <b>CAPÍTULO 1 – ARTIGO .....</b>                                                                               | <b>15</b> |
| <b>CAPÍTULO 2 – PATENTE .....</b>                                                                              | <b>25</b> |
| <b>3. RESULTADOS COMPLEMENTARES .....</b>                                                                      | <b>57</b> |
| 3.1. Biblioteca Metagenômica de Fosmídeos .....                                                                | 57        |
| 3.1.1. Obtenção da sequência da Glicosiltransferase alvo para expressão em <i>E.coli</i><br>.....              | 60        |
| 3.1.2. Expressão e Purificação da Proteína Recombinante .....                                                  | 61        |
| 3.1.3. Alinhamento da estrutura primária de proteínas homólogas Glicosiltransferase<br>metagenômica (GTM)..... | 63        |
| <b>4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>                                                                      | <b>71</b> |
| <b>5. REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                     | <b>75</b> |
| <b>6. ANEXO.....</b>                                                                                           | <b>83</b> |

*O trabalho espanta três males: o vício,  
a pobreza e o tédio.*  
*Voltaire*



## DEDICO

*A minha mãe, grande incentivadora*

*das minhas aspirações e ideais*

*“Deus criou as mães por saber que não poderia estar em todos os lugares  
ao mesmo tempo”*



## AGRADECIMENTOS

*Aos meus pais por terem feito todo o possível para que eu alcançasse meus objetivos, pelo amor incondicional.*

*Aos meus irmãos, por serem minha identidade e exemplos de trabalho e honestidade.*

*Muito obrigada, Profa. Anete P. de Souza, pela valiosa oportunidade de ser sua aluna, pelo conhecimento adquirido, pelo exemplo de persistência.*

*A profa Anita J. Marsaioli por ter me dado a honra de trabalhar a seu lado, por instruir e guiar aqueles, que como eu, ainda são tão imaturos nesta jornada, nunca a esquecerei.*

*A profa Valéria Maia Oliveira pela co-orientação, amizade, solicitude, pela alegria que sempre me recebe.*

*A Suzan P. Vasconcellos pela colaboração e mesmo que raros e breves, agradáveis encontros.*

*A Bruna Z. Costa, grande colaboradora, acima disso, parceira. Sua alegria e competência foram essenciais para a conclusão desse trabalho.*

*Aos adorados amigos do LAGM: Aline, Marianna, M. Augusta, Júlia, André, Juliano, Antônio, Dilaine, Eliane e Raphael. Especialmente ao Marcelo que teve e tem a humildade de ensinar tudo que aprendeu em todos esses anos no LAGM.*

*Ao pessoal do barracão, todos eles, especialmente o Dr. Juverlandi, mas conhecido por Ju, Danilo, Prianda, Guilherme e Carla.*

*A Sandra, Tânia e Gabriela pela amizade, cuidado e competência com tudo que fazem.*

*Aos meus amigos, aqueles que conquistei por onde passei, Franca, Jaboticabal, Piracicaba, Campinas, vocês são luz em minha vida.*

*Ao companheiro de todas as horas, Clelton A. Santos, obrigada.*

*A todos os professores da minha vida, especialmente ao Júlio Cezar Franco de Oliveira por ter me recebido como sua IC, há mais de 10 anos, você é muito especial.*

*A todos aqueles que acreditaram em mim, mas principalmente àqueles que não acreditaram, pois são incentivos a minha busca.*

*A todos do CBMEG/ UNICAMP e à FAPESP pela bolsa de doutorado que me foi concedida, muito obrigada.*

*Espero que ao menos eu possa transferir um pouco do meu conhecimento adquirido em forma de agradecimento por toda educação pública e gratuita que recebi.*

*Muito Obrigada*

## Lista de Figuras

|                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Mecanismo de ação das epóxido hidrolases.....                                                     | 6  |
| <b>Figura 2.</b> Esquema da estrutura secundária de uma EH.....                                                    | 8  |
| <b>Figura 3.</b> Halo de hidrólise em placas de ágar-tributirina.....                                              | 58 |
| <b>Figura 4.</b> Gel de SDS–PAGE 12% da GTM.....                                                                   | 62 |
| <b>Figura 5.</b> Detecção da GTM por <i>western blot</i> anti his-tag.....                                         | 63 |
| <b>Figura 6.</b> Alinhamento sequencial da GTM contra sequencias homólogas depositadas no banco de dados NCBI..... | 65 |
| <b>Figura 7.</b> Domínio conservado de GT-2 apresentado pelo DELTA Blast e o sítio de ligação a metal.....         | 65 |
| <b>Figura 8.</b> Sequência de aminoácidos da GTM com os prováveis domínios DXD/EXD.....                            | 67 |
| <b>Figura 9.</b> Esquema da reação catalisada pela glicosiltransferase usando a sonda fluorescente.....            | 68 |



## Lista de Abreviações

|            |                                                                                                                                            |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| EH         | Epóxido hidrolase                                                                                                                          |
| GT         | Glicosiltransferase                                                                                                                        |
| GTM        | Glicosiltransferase metagenômica                                                                                                           |
| UDP        | Uridina difosfato                                                                                                                          |
| SO         | Óxido de estireno (styrene oxide)                                                                                                          |
| ee         | Excesso enantiomérico                                                                                                                      |
| DMSO       | Dimetilsulfóxido                                                                                                                           |
| DMF        | Dimetilformamida                                                                                                                           |
| kDa        | quilodalton                                                                                                                                |
| pb         | Pares de bases de nucleotídeos                                                                                                             |
| CD         | Dicroísmo circular ( <i>Circular Dichroism</i> )                                                                                           |
| C-terminal | Extremidade carboxi terminal da proteína                                                                                                   |
| $K_m$      | Constante de Michaelis-Menten                                                                                                              |
| N-terminal | Extremidade amino terminal da proteína                                                                                                     |
| OD         | Densidade ótica ( <i>Optical Density</i> )                                                                                                 |
| ORF        | Quadro de leitura aberta ( <i>Open Reading Frame</i> )                                                                                     |
| PMSF       | Fluoreto de fenilmetilsufonila ( <i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i> )                                                                    |
| SDS-PAGE   | Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio<br>( <i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> ) |
| TCEP       | Tris(2-carboxietil) fosfina                                                                                                                |
| DTT        | Dithiothreitol                                                                                                                             |



## PREFÁCIO

Os resultados gerados durante o desenvolvimento do presente trabalho são apresentados em forma de um artigo científico, de uma patente e um capítulo de resultados complementares. O artigo intitulado “***A novel and Enantioselective Epóxide Hydrolase from Aspergillus brasiliensis CCT1435: Purification and Characterization***” encontra-se no capítulo primeiro e descreve a produção heteróloga de uma epóxido hidrolase (AbEH) do fungo *Aspergillus brasiliensis* CCT1435 em *Escherichia coli*, bem como sua caracterização enzimática. No segundo capítulo é apresentada a minuta da patente intitulada “**Enzima Recombinante, Processo de Hidrólise Enzimática de Epóxidos e Dióis Vicinais Assim Obtidos**”, depositada junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI. A patente descreve o emprego da AbEH em sistemas bifásicos com epóxidos racêmicos e o comportamento enantioconvergente da enzima.

Vale ressaltar, que o estudo desta AbEH foi motivado e incentivado pela Profa. Dra. Anita J. Marsaioli (Instituto de Química – Unicamp), cujo grupo de pesquisa detectou a atividade desta epóxido hidrolase nas células do *A. brasiliensis* CCT1435 pela primeira vez. Assim, em colaboração com o grupo da Profa. Marsaioli, vertemos esforços para clonar, expressar e purificar a AbEH recombinante, permitindo desta forma iniciar os estudos de caracterização estrutural e bioquímica da referida proteína, como pode ser acompanhado nos capítulos 1 e 2, desta tese. Na seção que compreende a terceira parte desse trabalho, são apresentados resultados complementares, na qual é descrito resultados referente a uma glicosiltransferase oriunda de biblioteca metagenômica de reservatório biodegradado de petróleo (Bacia

de Potiguar – CE). Os clones metagenômicos foram gentilmente cedidos pelas Profas. Dras. Suzan P. Vasconcellos (Unifesp-Diadema – SP) e Valéria Maia Oliveira (CPQBA-Unicamp).

Por último, são apresentadas as conclusões e perspectivas baseadas nos resultados obtidos durante o presente estudo de doutorado.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Enzimas e sua importância biotecnológica**

A indústria de enzimas como a conhecemos hoje é o resultado de um rápido desenvolvimento visto principalmente ao longo das últimas quatro décadas graças à evolução da biotecnologia moderna [1, 2]. Enzimas encontradas na natureza têm sido usadas desde os tempos antigos para a produção de alimentos como o queijo, fermento, cerveja, vinagre de vinho e na produção de produtos tais como, couro, índigo e linho [3]. Todos esses processos contaram com enzimas produzidas pelo crescimento espontâneo de microrganismos ou enzimas presentes em preparações adicionais, por exemplo, rúmen e mamão [3].

O desenvolvimento dos processos de fermentação no final do século XX, voltado especificamente para a produção de enzimas a partir de microrganismos selecionados, tornou possível a produção de enzimas purificadas, preparações enzimáticas mesmo em larga escala [3,4]. Este desenvolvimento permitiu que as enzimas se tornassem verdadeiros produtos industriais, usados em várias áreas como: produção de detergentes, têxtil e alimentos [3].

A tecnologia do DNA recombinante melhorou o processo de produção de enzimas e permitiu a comercialização de enzimas anteriormente nunca produzidas [3, 4]. Ademais, os mais recentes avanços em Biotecnologia moderna, como a Engenharia de Proteínas e evolução dirigida tem revolucionado o desenvolvimento de enzimas para fins industriais [3, 5]. Sendo hoje possível a produção de enzimas “sob encomenda”, que desempenham novas características catalíticas e adaptadas a condições de processos adversas, ampliando a sua versatilidade [5].

A metagenômica, a Bioinformática e a disponibilidade de dados de sequenciamento de DNA aumentou significativamente o isolamento de um gene de interesse a partir de diferentes microrganismos [5].

A aplicação tanto de enzimas livres quanto de células íntegras como agentes catalisadores oferece excelentes vantagens, como altos índices de pureza, minimização da formação de subprodutos, redução do consumo energético e do impacto ambiental [6, 7].

Assim, a biocatálise tornou-se uma importante ferramenta junto aos diversos ramos industriais, entre eles, medicina analítica, fármacos, alimentos, agroquímicos, detergentes, intermediários químicos, biomateriais, biocombustíveis e mineração [1, 7, 8]. Em biocatálise, o uso de células íntegras têm como vantagens o baixo custo e a presença de coenzimas naturais. Entretanto, como as células são um sistema multienzimático, pode ocorrer reações laterais e problemas de permeabilidade do substrato pela membrana [9]. Já as enzimas isoladas, além do controle do processo reacional, apresentam maior produtividade e tolerância à quantidade e variedade de substratos, características que podem compensar o custo da tecnologia aplicada na purificação [9].

O uso de enzimas purificadas é de grande interesse para indústria farmacêutica quanto a sua aplicação em síntese assimétrica [10]. É sabido que isômeros óticos de fármacos podem apresentar atividades biológicas diferentes, podendo um deles ser tóxico, o que torna impossível o uso terapêutico da mistura racêmica. Por isso a resolução cinética mediada por enzimas é uma importante ferramenta para a síntese de um composto enantioméricamente puro, sendo a recomendação para comercializar um fármaco que apresente pelo menos 98% de excesso enantiomérico [10]. Um exemplo

clássico na literatura médica é o da talidomida, droga usada nos anos 60, como mistura racêmica, um sedativo leve para tratamento de sintomas de náuseas, recomendado a gestantes. O uso desse medicamento por gestantes na época provocou sérias deformidades em recém-nascidos [8]. Após, descobriram que só um dos enantiômeros tinha efeito sedativo, o outro era o responsável pela teratogênese em fetos [11].

Dentre as várias classes de enzimas aplicadas industrialmente, as hidrolases têm uma representatividade de 80%, pois, em geral, são enzimas que não requerem co-fatores e exibem grande diversidade de substratos não naturais, além de alta região-, quimio- e enantioseletividade [12, 13].

Neste trabalho caracterizamos uma epóxido hidrolase do fungo *Aspergillus brasiliensis* CCT 1435, uma enzima de grande importância para a indústria química para a resolução cinética de epóxidos racêmicos e dióis vicinais. Paralelamente, uma biblioteca metagenômica gerada a partir de DNA recuperado de reservatórios de petróleo biodegradado foi triada para genes que apresentassem atividade lipolítica. Entretanto, uma glicosiltransferase foi identificada e clonada. As glicosiltransferases são enzimas que catalisam a transferência de um grupamento de açúcar a partir de moléculas doadoras para moléculasceptoras específicas e assim formam pontes glicosídicas. Essas enzimas estão envolvidas em várias funções biológicas, como a síntese de muitos glicoconjugados de superfície celular.

## 1.2 Epóxido Hidrolases

### 1.2.1 Epóxidos

Um grupo importante de moléculas quirais são os epóxidos. Epóxidos são éteres cíclicos de três membros formados pela oxidação das olefinas. Eles são reagentes úteis em química orgânica e blocos de construção versáteis para a síntese de produtos naturais, por exemplo [14, 15].

Por causa de suas ligações carbono-oxigênio altamente polarizadas e um anel oxirano, epóxidos são nucleófilos muito reativos. Epóxidos reativos são relatados por apresentarem efeito mutagênico, cancerígeno e tóxico após reações com alvos biológicos críticos como DNA e proteínas [14]. Epóxidos produzidos a partir de olefinas endógenas são encontrados em todos os organismos vivos e dentre os epóxidos naturais podemos citar: 1,2 limonene epóxido, 5,6 colesterol epóxido, hormônio juvenil III de insetos, 14,15 ácido eicosatrienóico epóxido, hepoxilina A3, 16(17) óxido androsteno e leucotrieno A4 [14]. Entretanto, esses epóxidos naturais são relativamente estáveis em condições fisiológicas, e, portanto, não apresentam perigo para as células e organismos, mesmo assim eles têm de serem transformados de maneira controlada [16, 17]. Para a maioria dos epóxidos naturais a adição catalítica de água para produzir 1,2 diol é a principal via de metabolismo *in vivo*. Essa reação é catalisada pela enzima epóxido hidrolase (E.C. 3.3.2.3) [18, 19].

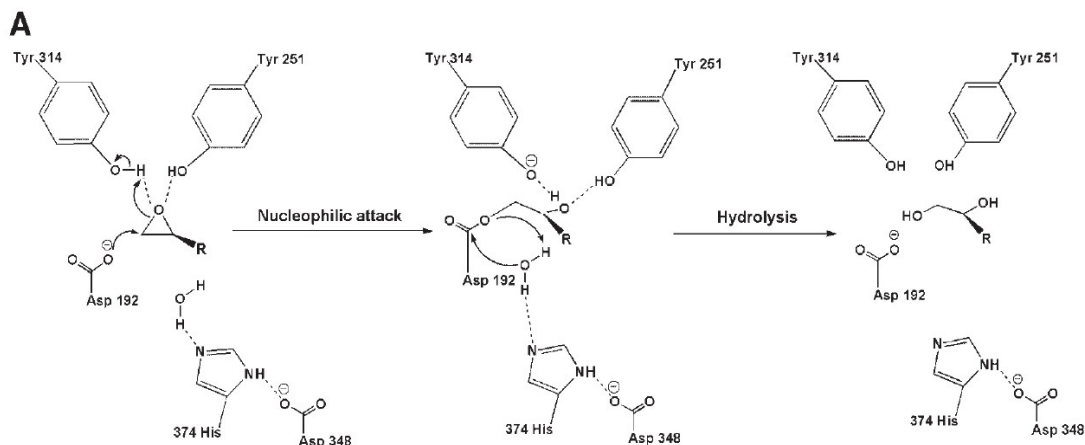
### 1.2.2. A importância das Epóxido Hidrolases

As epóxido hidrolases (E.C. 3.3.2.3) (EHs) catalisam a adição de uma molécula de água ao anel oxirano para formar o correspondente diol [15, 19]. São enzimas independentes de cofatores, estáveis, versáteis com um amplo potencial em aplicações industriais [12]. As EHs são enzimas presentes em todos os seres vivos, de bactérias a mamíferos [20] e têm sido exploradas em sínteses orgânicas e na aplicação em larga escala [21].

A atividade de epóxido hidrolase foi primeiro identificada em 1970 [22], e purificada do fígado de rato em 1975 [23, 24] e de fígado humano em 1979 [25, 26].

Em geral as EHs têm três funções básicas: o catabolismo, a desintoxicação e a regulação de moléculas sinalizadoras [14].

O mecanismo de ação de uma epóxido hidrolase na hidrólise catalítica ocorre da seguinte forma: o epóxido é aberto pela primeira vez por um ataque nucleofílico por um resíduo de aspartato da enzima, o que leva a formação de uma alquila intermediária. Posteriormente este intermediário sofre hidrólise provocada por uma molécula de água que é ativada pelo sistema de substituição de cargas do biocatalisador, com liberação concomitante do 1,2-diol correspondente [27, 28].

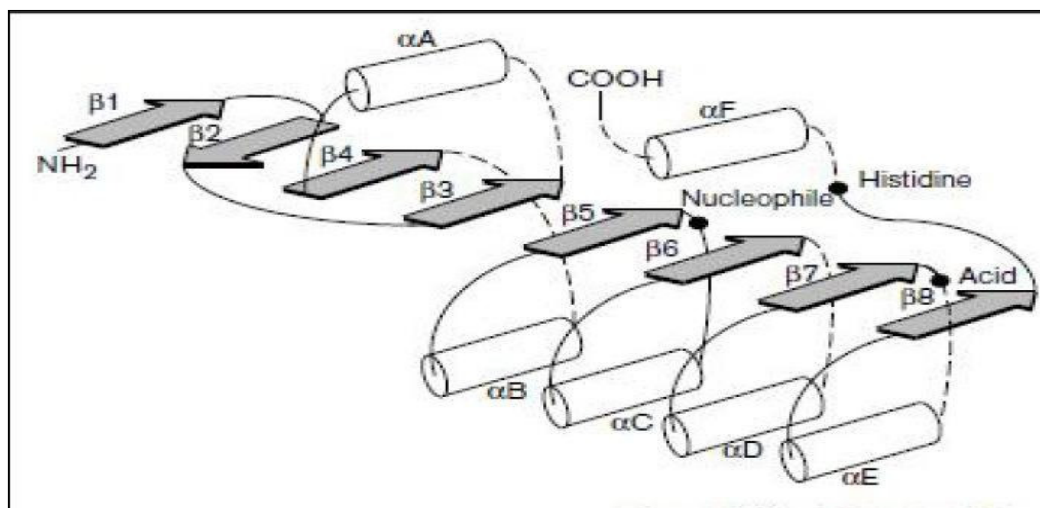


**Figura 1.** Mecanismo de reação das epóxido hidrolase.

Epóxidos e dióis quirais podem ser usados como intermediários sintéticos produzidos por EHs que catalisam a resolução cinética de epóxidos racêmicos [29]. Em uma resolução cinética, o epóxido quiral pode ser obtido com até 50% de rendimento teórico, uma vez que o enantiômero preferido da mistura racêmica é hidrolisado em diol pela EH e, em seguida, removido [26]. Dióis quirais também são materiais sintéticos de partida para síntese de produtos farmacêuticos [26]. Esses dióis quirais podem ser preparados a partir de epóxidos racêmicos usando uma EH que catalisa um processo enantioconvergente com rendimentos superiores a 50% [29, 30]. Processo enantioconvergente é um procedimento de hidrólise desracemizante onde ambos os enantiômeros do epóxido racêmico devem proceder de formas enantio- e regio-complementares para gerar um único produto, o diol enantiomérico [31, 32]. Dois tipos de EHs são muito úteis em síntese orgânica: (i) EH enantiosseletiva que gera epóxidos enantiopuros, que são valiosos blocos de construção quirais para a síntese de vários compostos biologicamente ativos [33]; (ii) EH enantioconvergente que permite a

formação de dióis vicinais enantiopuros; os quais são sintéticos quirais uteis e podem ainda serem transformados para o epóxido correspondente sem nenhuma redução na pureza enantiomérica [34, 35]. Considerando que a EH enantiosseletiva é aplicada em hidrolise de resolução cinética com um rendimento limitado a 50%, uma EH enantioconvergente teoricamente tem 100% de rendimento do diol enantiopuro em um tipo de reação indicada como desracemização [30]. Em contraste as EH enantiosseletivas, as EH enantioconvergentes são menos frequentes, a principal razão é a exigência de uma interação requintada de dois parâmetros de reação: o coeficiente de regioseletividade  $\alpha_S$  e  $\alpha_R$ , que determina a pureza enantiomérica do diol produzido e, assim, o grau de enantioconvergência. Entranto, EH naturalmente enantioconvergente são raras, havendo poucos relatos na literatura [36-39].

Com exceção do limoneno 1,2-epóxido hidrolase, todas as EH conhecidas são da superfamília das  $\alpha/\beta$  hidrolases, consistindo de um domínio central e um domínio externo ("cap") [40]. O domínio central, também conhecido como domínio de dobramento das  $\alpha/\beta$  hidrolases, é composto de uma folha beta central envolta com alternância de alfa hélices em ambos os lados. O domínio externo tem 5-6 alfa hélices posicionadas sobre o domínio central. A âncora de ligação do substrato está localizada no "loop" N e C - terminal conectando o domínio central e o e o externo (figura 2) [40]. A tríade catalítica é formada pelos resíduos de aminoácidos Asp-His-Asp/Glu. O dobramento das  $\alpha/\beta$  hidrolases é encontrado em outras importantes hidrolases como: lipases, acetilcolinesterases, caboxipeptidases, halopectidases, entre outras [40].



**Figura 2.** Esquema da estrutura secundária de uma EH.

A importância das epóxido hidrolases tem incentivado a procura por enzimas inéditas e também a busca de novas características através de mutações sítio dirigidas. Como exemplo, EH de *Aspergillus* que resultou em registro de patentes descrevendo a preparação de dióis monoméricos ou poliméricos, utilizados como lubrificantes aditivos anticorrosivos ou agentes quelantes [41].

### **1.3 Glicosiltransferases**

#### **1.3.1 Papel Biológico dos Polissacarídeos**

Os oligossacarídeos (glicanos) são um dos mais abundantes grupos de produtos naturais e desempenham um papel fundamental em muitos processos biológicos importantes, sendo comumente encontrados na natureza como glicoconjugados (glicoproteínas ou glicolípídeos) [42]. Apenas recentemente tem sido reconhecido que os carboidratos têm papel crucial na sinalização e transferência de informação em sistemas biológicos [43]. Os grupamentos de açúcar de glicoproteínas e glicolípídeos em humanos consistem em uma ou mais cadeias de carboidratos compostas de D-glicose, D-galactose, D-manose, L-fucose, N-acetil-D-glucosamina, e ácido N-acetilneuramínico [44]. Em plantas, muitos componentes naturais como: saponinas, flavonoides e alcalóides contêm açúcares como elementos estruturais importantes, dentre os quais os mais frequentes são a D-glicose, D-galactose, L-fucose, L-rhamnose e D-xilose [45]. Os microrganismos também produzem carboidratos de função biológica específica como araciamicina, granaticina, landomicina A, saquaamicina Z, simociclinona, e urdamicina A, entretanto, esses açúcares são na maioria desoxigenados como a D-olivose, L-rodinose, L-micarose e L-digitoxose. A maioria desses açúcares pertence à família das 6-desoxihexoses, as quais formam parte de um grande número de produtos naturais que tem propriedades farmacológicas [46], sendo a maioria com atividade antibiótica [47]. As enzimas encarregadas da transferência desses açúcares são as glicosiltransferases [48].

### 1.3.2 Mecanismo e Diversidade das Glicosiltransferases

Glicosiltransferases (GTs) são enzimas que catalisam a transferência de um grupamento de açúcar a partir de moléculas doadoras para moléculas aceptoras específicas e assim formam pontes glicosídicas [48]. Essas enzimas são responsáveis *in vivo* pela síntese de muitos glicoconjugados de superfície celular [42, 49]. O substrato aceptor de uma glicosiltransferase pode ser tão simples quanto a um monossacarídeo homólogo ao doador, ou tão complexo como um componente de um heteropolissacarídeo (oligossacarídeo, proteína, ácido nucleico ou lipídeo), contendo centenas de pontes glicosídicas [42].

Glicosiltransferases representam um dos mais diversos grupos de enzimas em sistemas biológicos e sua classificação fornece informações na sua divergência evolutiva [50]. Inicialmente foi proposta a classificação das GTs de acordo com seu mecanismo de ação, com base nisso, todas as GTs podem ser agrupadas como aquelas que fazem “inversão” ou “retenção” da configuração anomérica [51]. GTs também podem ser classificadas baseadas em diferenças no doador glicosil envolvidos na reação [52]. Assim, elas podem tanto pertencer à via de Leloir, em homenagem a Louis Leloir, laureado com o prêmio Nobel de Química em 1970 após a descoberta da UDP D-glicose e biossíntese glicosídica, ou a via não-Leloir [53]. O primeiro exemplo (via de Leloir) compreende aproximadamente 65% de todas as GTs conhecidas, onde doadores podem ser ativados pela adição de um mono- ou difosfo-nucleotídeo. A via de não-Leloir, as GTs utilizam doadores não ativados [53].

As GTs são do ponto de vista funcional, o mais diverso grupo de enzimas em sistemas biológicos [54]. Biopolímeros como os oligossacarídeos, proteínas, lipídeos, e

ácidos nucleicos, os quais são os mais numerosos produtos naturais, são de alguma forma modificados por glicosiltransferases, com os mais variados efeitos [55]. Até o momento as GTs estão agrupadas em 92 famílias com mais de 50.000 *ORFs* (*open reading frame*) provenientes de plantas, mamíferos, fungos e bactérias, e estão todas organizadas no banco de dados *Carbohydrate Active Enzymes* (CAZy) (<http://www.cazy.org/>) [56, 57].

Devido à diversidade estrutural e funcional dos produtos de reações das GTs juntamente com as relações evolutivas distantes entre elas, é comum que as GTs apresentem baixa homologia de sequência [55]. A maioria delas pertence a duas superfamílias estruturais. As superfamílias são chamadas GT-A e GT-B, cada uma consistindo de dois domínios [55]. As GT-A possui dois domínios diferentes: o domínio N-terminal ou domínio de ligação ao NDP-açúcar, que possuem um domínio conservado DXD ou EXD (Asp-X-Asp ou Glu-X-Asp) flaqueado por resíduos não polares [58]. Esse domínio contém várias folhas  $\beta$ , sendo cada uma delas flanqueada por  $\alpha$ -hélices (*Rossmann fold*), o qual reconhece o nucleotídeo doador. O domínio C-terminal consiste em grande parte de folhas  $\beta$  mistas contendo o sítio de ligação do aceptor [59]. Todas as GT-A caracterizadas até o momento, como as  $\alpha$ -manosiltransferases e galactosiltransferases, requerem a presença de um íon metal, preferencialmente  $Mg^{2+}$  e  $Mn^{2+}$  como cofator [42]. A grande maioria das Leloir GT-A residem no aparato de golgi e retículo endoplasmático de mamíferos, bem como em muitas bactérias [53].

GT-B contém dois domínios tipo *Rossmann fold*. O domínio N-terminal tem um sítio de ligação para o aceptor, enquanto o domínio C-terminal é responsável pela ligação do açúcar doador [55]. Em ambos os tipos de dobramento, os domínios são

conectados através de uma região ligante e o sítio ativo que está localizado entre os dois domínios, essas não requerem íon metal como cofator [53]. A superfamília GT-B é bastante diversa e inclui a maioria das enzimas procarióticas responsáveis por glicosilar metabolitos secundários, tais como a biossíntese da parede celular [60]. GT-B também são encontradas em um grande número de insetos e de plantas [58]. Uma terceira família de GTs, nomeada de GT-C, foi recentemente predita com base em pesquisa de sequencia, usando programas como o Blast [61]. A arquitetura predita da estrutura GT-C é de uma grande e hidrofóbica proteína de membrana localizada no retículo endoplasmático ou membrana plasmática, possuindo entre 8 e 13 hélices transmembrana e um sítio ativo localizado em uma região com um longo “loop” [57]. Recentemente a primeira estrutura tridimensional de uma GT-C foi determinada, entretanto, somente o domínio C-terminal solúvel de oligossacariltransferase da arqueobactéria hipertermofílica *Pyrococcus furiosus* foi resolvida [62]. Infelizmente, essa porção da estrutura da enzima não agrega valores para a classificação das GT-C, pois apenas revela a porção da proteína da região transmembrana, que não inclui a região do “loop” predito para conter o sítio ativo.

## 1.4. OBJETIVOS

### 1.4.1. Objetivos Gerais

- Caracterização bioquímica de enzimas de relevância biotecnológica, em particular de uma epóxido hidrolase do fungo *Aspergillus brasiliensis* CCT1435 e lipases/esterases provenientes de material metagenômico de amostras de petróleo biodegradado.

### 1.4.2. Objetivos Específicos

- Clonagem e expressão da epóxido hidrolase do fungo *Aspergillus brasiliensis* (CCT1435);
- Clonagem e expressão de *ORFs* triadas para atividade lipolítica a partir de biblioteca metagenômica de microbiota originada de reservatórios biodegradados de petróleo (Bacia Potiguar – CE);
- Purificação e análise funcional/estrutural das enzimas recombinantes expressas/purificadas.



**CAPÍTULO 1 – ARTIGO**

**“A novel and enantioselective epoxide hydrolase from *Aspergillus brasiliensis* CCT 1435: Purification and characterization”**

**Autores:** Lilian L. Beloti, Bruna Z. Costa, Marcelo A. S. Toledo, Clelton A. Santos, Aline Crucello, Marianna T. P. Fávaro, André S. Santiago, Juliano S. Mendes, Anita J. Marsaioli, Anete P. Souza.

**Publicado na Revista *Protein Expression and Purification***

**Volume 91 (2), páginas 175-185, Outubro 2013**



Contents lists available at ScienceDirect

## Protein Expression and Purification

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yprep](http://www.elsevier.com/locate/yprep)A novel and enantioselective epoxide hydrolase from *Aspergillus brasiliensis* CCT 1435: Purification and characterization

Lilian L. Beloti<sup>a</sup>, Bruna Z. Costa<sup>b</sup>, Marcelo A.S. Toledo<sup>a</sup>, Clelton A. Santos<sup>a</sup>, Aline Crucello<sup>a</sup>,  
Marianna T.P. Fávoro<sup>a</sup>, André S. Santiago<sup>a</sup>, Juliano S. Mendes<sup>a</sup>, Anita J. Marsaioli<sup>b</sup>, Anete P. Souza<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Instituto de Química (IQ), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 13 June 2013

and in revised form 21 July 2013

Available online 21 August 2013

## ABSTRACT

A novel epoxide hydrolase from *Aspergillus brasiliensis* CCT1435 (AbEH) was cloned and overexpressed in *Escherichia coli* cells with a 6xHis-tag and purified by nickel affinity chromatography. Gel filtration analysis and circular dichroism measurements indicated that this novel AbEH is a homodimer in aqueous solution and contains the typical secondary structure of an  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. The activity of AbEH was initially assessed using the fluorogenic probe O-(3,4-epoxybutyl) umbelliferone and was active in a broad range of pH (6–9) and temperature (25–45 °C); showing optimum performance at pH 6.0 and 30 °C. The Michaelis constant ( $K_M$ ) and maximum rate ( $V_{max}$ ) values were 495  $\mu$ M and 0.24  $\mu$ M/s, respectively. Racemic styrene oxide (SO) was used as a substrate to assess the AbEH activity and enantioselectivity, and 66% of the SO was hydrolyzed after only 5 min of reaction, with the remaining (S)-SO ee exceeding 99% in a typical kinetic resolution behavior. The AbEH-catalyzed hydrolysis of SO was also evaluated in a biphasic system of water:isooctane; (R)-diol in 84% ee and unreacted (S)-SO in 36% ee were produced, with 43% conversion in 24 h, indicating a discrete enantioconvergent behavior for AbEH. This novel epoxide hydrolase has biotechnological potential for the preparation of enantiopure epoxides or vicinal diols.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

Epoxide hydrolases (EHs)<sup>1</sup> catalyze the hydrolytic ring opening of racemic epoxides to yield enantiopure epoxides and vicinal diols [1,2]. EHs are enzymes that do not utilize cofactors and are ubiquitously found in all living organisms. Several EH genes have been sequenced and described (more than 100 EH genes), including EHs from *Aspergillus niger* [3], *Solanum tuberosum* [4], humans [5], and *Agrobacterium radiobacter* [6], providing useful information that assists and encourages further research.

EHs (EH; EC.3.3.2.3) belong to the  $\alpha/\beta$  hydrolase fold family [7,8] and have a structurally conserved catalytic triad (Asp-His-Asp/Glu) exhibiting similar epoxide-opening biocatalytic mechanisms [2,3,6,9,10].

Epoxides and vicinal diols are valuable chiral intermediates for the preparation of biologically active molecules, such as agrochemicals, drugs, and other pharmaceutical compounds [11,12]. Therefore, the stereoselective syntheses of epoxides and vicinal diols

are of commercial interest. Chiral epoxides and vicinal diols can be prepared by several chemical procedures (most of which are based on transition-metal catalysis); however, these processes have several limitations, including low substrate-to-catalyst ratios, low efficiency, and waste generation [13,14]. Indeed, such environmental issues are important to the fine chemical industry, which is facing severe regulatory constraints, and these facts have encouraged the search for mild and cleaner synthetic processes, such as the application of epoxide hydrolase, to produce chiral epoxides and vicinal diols [13,14].

Due to the potential application of EHs, it is important to search for novel enzymes in addition to the application of protein engineering to improve the performance of existing EHs. Thus, microbial EHs have attracted great interest due to their easy manipulation and numerous potential applications in the asymmetric hydrolysis of epoxides on a preparative scale [15,16].

The present work addresses a full-length epoxide hydrolase-encoding EH cDNA from *Aspergillus brasiliensis* CCT1435. The cDNA encoding the EH was cloned into the pET28a vector and heterologously overexpressed in *E. coli* BL21(DE3) Rosetta cells. The catalytic performance of this new EH, named AbEH, was further characterized using a fluorogenic probe and styrene oxide (SO) as a substrate.

\* Corresponding author. Address: Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas, CP 6010, 13083-875 Campinas, São Paulo, Brazil. Fax: +55 19 3521 1089.

E-mail address: [anete@unicamp.br](mailto:anete@unicamp.br) (A.P. Souza).

<sup>1</sup> Abbreviation used: EHs, epoxide hydrolases.

## Materials and methods

### Materials

The *E. coli* DH10B strain was used as the host strain, whereas *E. coli* BL21(DE3) Rosetta (Novagen, USA) was used for heterologous protein expression. The oligonucleotide primers were synthesized at Sinapse Technologies (Brazil). The pET28a(+) expression vector was obtained from Novagen (USA), and the *Nde*I and *Xho*I restriction enzymes were purchased from Fermentas (USA). The protease inhibitor phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF),  $\beta$ -mercaptoethanol, Tween-20, and lysozyme were obtained from Sigma Chemical (USA). The Ni-NTA affinity resin was obtained from Qiagen (Germany). The molecular mass standard (low molecular weight (LMW) and high molecular weight (HMW)) for the gel filtration calibration kit and Superdex 200 10/300 GL chromatography column were purchased from GE Healthcare (Sweden). The total protein concentration was determined using a micro BCA™ protein assay kit (Thermo Scientific, USA). Fluorogenic probe 1 and product 2 were readily synthesized by our group [17]. Racemic SO (4) and enantiopure (R)- and (S)-SO were purchased from Sigma Aldrich.

### Blast search and sequence analysis of *Aspergillus* epoxide hydrolases

The EH sequences of *Aspergillus* were used to search the microbial database at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The DNA sequence of the *A. niger* LCP521 epoxide hydrolase (AnEH LCP531), which has previously been described (PDB IN: 1QO7\_A), was used as the model for the analysis of other homologs. Based on these data, primers were screened and used to amplify the complete EH gene from *A. brasiliensis* (AbEH CCT1435).

### Alignment of AbEH CCT1435 with AnEH LCP521

The amino acid sequence of epoxide hydrolase from *A. niger* LCP521 (GenBank accession number: AJ238460) was obtained from the NCBI databank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The AbEH CCT1435 sequence presented in this work was aligned with the AnEH LCP521 sequence using ClustalW software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>); the editing of the alignment was performed using GENEDOC software [18].

### Isolation of nucleic acids from *A. brasiliensis*

*A. brasiliensis* (strain CCT1435), deposited at the Coleção de Culturas Tropical Fundação André Tosello-Brazil, was grown in malt extract medium (ME) at a concentration of 20 g/L of culture. The culture medium (300 mL) at 28 °C was inoculated with *A. brasiliensis* spores and incubated for 72 h in a shaking flask. The mycelium was harvested by filtration through Miracloth (Millipore, Germany) and stored at –80 °C. RNA isolation was performed as described by Jones [19]. The EH-cDNA was synthesized using the SuperScript II kit (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions.

### cDNA amplification and cloning

The EH cDNA of *A. brasiliensis* was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The forward and reverse AbEH primers (forward, 5'-ATACATATGATGCTCTCCGTCGGC-3'; and reverse, 5'-ATACTCGAGCTACTTCTGCCACCTGCTC-3') contained *Nde*I and *Xho*I restriction sites (underlined), respectively. The PCR amplification product and pET28a(+) plasmid (Novagen, USA) were both digested with *Nde*I and *Xho*I and ligated using T4 DNA ligase

(Invitrogen, USA). The constructed plasmid was transformed by electroporation into *E. coli* BL21(DE3) Rosetta cells, and the inserted sequences were confirmed by DNA sequencing.

### Heterologous overexpression of AbEH in *E. coli*

AbEH was overexpressed in the *E. coli* BL21(DE3) Rosetta strain. The cells were grown at 37 °C and 300 rpm in 1 L of LB broth containing kanamycin (30  $\mu$ g/mL) and chloramphenicol (34  $\mu$ g/mL). When the cells reached an optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) of 0.6–0.8, IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) was added to a final concentration of 0.4 mM to initiate the overexpression of the EH protein. The cells were then incubated at 25 °C and 200 rpm for 16 h. The cells were harvested by centrifugation (3000g for 10 min at 4 °C). The cell pellets were resuspended in 50 mL of buffer A (50 mM phosphate buffer, pH 7.2) supplemented with 0.2% Tween-20, 12 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 mg/mL lysozyme, and 1 mM PMSF and subsequently incubated on ice for 30 min. The cells were disrupted by sonication (Ultrasonic Homogenizer 4710; the output control was set to six, and the duty cycle was set to 70%), and the soluble fraction was collected by centrifugation (27,000g for 50 min at 4 °C). The soluble fraction was loaded to an Ni-NTA chromatography column (Qiagen, Germany) equilibrated with buffer B (50 mM phosphate buffer and 250 mM NaCl, pH 7.2). The EH protein was purified with an imidazole gradient (20, 50, 75, 250, and 500 mM). The purified EH protein was eluted with five column volumes of buffer B containing 250 mM imidazole and then dialyzed against buffer C (50 mM phosphate buffer, 1 mM dithiothreitol (DTT), and 0.2% Tween-20, pH 7.2). The purity of the protein was determined by SDS–PAGE under denaturing conditions, as described by Laemmli [20]. The protein concentration was measured with a micro BCA™ protein assay kit using bovine serum albumin as the standard.

### Analytical size-exclusion chromatography

The molecular mass of the purified AbEH<sub>His-tag</sub> was determined under native conditions by size-exclusion chromatography using a Superdex 200 10/300 GL column. The column was equilibrated with buffer B. The protein samples (250  $\mu$ L) were injected at a flow rate of 0.5 mL/min. HMW and LMW gel-filtration calibration kits (GE Healthcare) were used as the calibration standards. Ferritin (440 kDa), aldolase (158 kDa), conalbumin (75 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), ribonuclease A (13.7 kDa), aprotinin (6.5 kDa), and blue dextran 2000 (2000 kDa) were used as the standards.

### Circular dichroism measurements

The circular dichroism (CD) spectra of the purified AbEH<sub>His-tag</sub> protein were obtained using a Jasco J-810 spectropolarimeter dichrograph (Japan Spectroscopic, Tokyo, Japan). The far-UV CD spectra were generated at 25 °C using 6  $\mu$ M of AbEH protein under two conditions: 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) and 10 mM sodium phosphate buffer plus 1 mM of TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) as a reducing agent. The assays were performed using a quartz cuvette with a path length of 2 mm. Ten accumulations within the 270- to 190-nm range at a rate of 50 nm/min were recorded. The deconvolution and statistical analyses of the CD spectra were performed using the DichroWeb server [21,22].

### EH fluorescence-based assay

The substrate O-(3,4-epoxybutyl)umbelliferone (1) was used as a fluorogenic probe for the detection of AbEH hydrolytic activity. The assays were performed in flat-bottom polypropylene 96-well

microtiter plates and incubated at 30 °C in a plate reader spectrophotometer (FlashScan 530, Analytik Jena, Germany). The fluorescence intensities were measured every 5 min for 90 min using 390 and 460 nm as the excitation and emission wavelengths, respectively. The enzymatic reaction conversions (in percentages) were obtained by comparing the fluorescence intensities of the enzymatic assays with the positive (100% conversion) and negative (0% conversion) controls according to the following equation:

$$\text{Conversion (\%)} = \left\{ \frac{[F(A) - F(NC)]}{F(PC)} \right\} 100$$

where  $F(A)$ ,  $F(NC)$ , and  $F(PC)$  are the fluorescence intensities of the enzymatic assay, negative control, and positive control, respectively.

The reaction conditions were as follows:

- **Enzymatic assay:** 1 (5  $\mu$ L of a 2 mM solution in acetonitrile:water [1:1]), NaIO<sub>4</sub> (5  $\mu$ L of a 2 mM solution in deionized water), BSA (40  $\mu$ L of a 5 mg/mL solution in buffer D [50 mM sodium phosphate, 1 mM DTT, pH 7.2, and 0.1% Tween-20]), and AbEH (5  $\mu$ L of a 1 mg/mL solution in buffer D with 1 mM DTT).
- **Positive control:** 2 (5  $\mu$ L of a 2 mM solution in acetonitrile:water [1:1]), NaIO<sub>4</sub> (5  $\mu$ L of a 2 mM solution in deionized water), BSA (40  $\mu$ L of a 5 mg/mL solution in buffer D), and AbEH (5  $\mu$ L of a 1 mg/mL solution in buffer D with 1 mM DTT).
- **Negative control:** 1 (5  $\mu$ L of a 2 mM solution in acetonitrile:water [1:1]), NaIO<sub>4</sub> (5  $\mu$ L of a 2 mM solution in deionized water), and BSA (40  $\mu$ L of a 5 mg/mL solution in buffer D).

#### pH, temperature, and Tween-20 concentration dependence of EH activity

The effects of pH, temperature, and Tween-20 concentration on EH activity were determined using the fluorogenic assay described above by varying the pH from 4 to 10 (pH 4–5, acetate buffer; pH 6–8, sodium phosphate buffer; pH 9–10, glycine-NaOH buffer; each at 50 mM and 0.1% Tween-20), temperature from 25 to 45 °C, and Tween-20 concentration from 0.1% to 5%.

#### Kinetic parameters

The enzyme kinetic parameters were also determined using the above fluorogenic assays by varying the substrate (1) concentration from 10 to 1500  $\mu$ M and reaction time from 0 to 90 min. The apparent kinetic parameters, Michaelis constant ( $K_M$ ) and maximum rate ( $V_{max}$ ), were estimated from the initial reaction rates at each substrate concentration and the subsequent non-linear regression of the Michaelis-Menten equation using Origin (OriginLab, Northampton, MA). The catalytic constants, turnover number ( $k_{cat} = V_{max}/[E]$ ) and specificity constant ( $\epsilon = k_{cat}/K_M$ ), were calculated taking 0.22  $\mu$ M as the enzyme concentration.

#### AbEH hydrolysis of styrene oxide

Hydrolysis of racemic SO (*R/S*-SO, 4) by AbEH was assayed by monitoring the epoxide consumption and diol formation. The enzymatic reaction conditions were as follows. AbEH (2 mL of a 1 mg/mL solution in buffer D with 1 mM DTT) was added to buffer E (7.5 mL of sodium phosphate buffer at 50 mM [pH 6.0] and 0.1% Tween-20), and the mixture was preincubated at 30 °C for 5 min. SO (0.5 mL of a 160 mM solution in DMSO) was added to obtain a final concentration of 8 mM in a total reaction volume of 10 mL. During the incubation, samples were periodically collected (every 5 min for 40 min), saturated with NaCl, and extracted with ethyl acetate (1  $\times$  1 mL), adding benzophenone as an internal

standard at a final concentration of 0.05 mg/mL. All samples were analyzed by GC-MS and chiral GC-FID to evaluate the conversions and enantiomeric excesses, respectively.

The SO conversion (%) into diol was calculated by comparing the peak areas of reagents, products, and benzophenone in the chromatogram considering the calibration curves. SO spontaneous hydrolysis under the reaction conditions was evaluated in the absence of EH.

The enantiomeric ratio of (*R/S*)-SO hydrolysis by AbEH was calculated based on the enantiomeric excess (ee) of the remaining epoxide and the conversion of racemic SO according to Sih's equation [23], as follows:

$$E = \frac{\ln[(1 - C)(1 - ee)]}{\ln[(1 - C)(1 + ee)]}$$

where  $c = (A + B)/(A_0 + B_0)$ ,  $A$  and  $B$  are the concentration of fast- and slow-reacting enantiomers, and  $A_0$  and  $B_0$  are the initial concentrations.

The reaction enantioselectivity was further evaluated using the same reaction conditions described above with enantiomeric pure SO (*R*-SO or *S*-SO). In this case, the enantiomeric ratio ( $E$ ) was estimated based on the initial reaction rate of each SO enantiomer according to the equation:

$$E = \frac{v_0(\text{fast enantiomer})}{v_0(\text{slow enantiomer})}$$

#### AbEH hydrolysis of styrene oxide in liquid-liquid biphasic systems

Reactions in liquid-liquid biphasic systems were performed in closed vials (10 mL) containing buffer D (0.5 mL, 50 mM sodium phosphate buffer [pH 7.2] and 0.1% Tween-20), AbEH (0.5 mL of a 1 mg/mL solution in buffer D), a water-immiscible organic solvent (3 mL), and (*R/S*)-SO (10  $\mu$ L, final concentration of 22 mM). The reaction mixtures were incubated at 30 °C, with stirring (200 rpm), for 24 h.

The best organic solvent among heptane, iso-octane, toluene, ethyl acetate, and iso-amyl alcohol was selected.

The remaining epoxide in the organic phase of the reaction was analyzed by GC-MS. The diol was recovered from the aqueous phase by saturation with NaCl, followed by extraction with ethyl acetate (2  $\times$  1 mL) by mixing in a vortex and centrifugation at 2000 rpm for 5 min. The organic layers were combined, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and filtered for further GC-MS and GC-FID analyses.

Control experiments without AbEH were performed in tandem with the enzymatic reactions to monitor the spontaneous hydrolysis of (*R/S*)-SO. The conversions (%), enantiomeric excesses, and enantiomeric ratios were assessed as previously described.

#### Chromatographic analyses

The enzymatic reaction conversions were monitored by GC-MS using an Agilent 7890 gas chromatograph coupled to a Hewlett Packard 5975C-MSD (70 eV) spectrometer equipped with a fused silica capillary column (HP-5MS, 30 m  $\times$  0.25 mm i.d.  $\times$  0.25  $\mu$ m film thickness). The GC-MS analyses were conducted using a helium flow of 1 mL/min, the splitless mode, and the following temperature program: initial temperature of 80 °C (3 min) increasing to 200 °C at 10 °C/min and to 300 °C at 20 °C/min, holding for 5 min.

The enantiomeric discriminations were performed using an Agilent 6850 gas chromatograph coupled to a flame ionization detector (GC-FID) using a Chirasil-Dex CB  $\beta$ -cyclodextrin chiral column (Chrompack, 25 m  $\times$  0.25 mm i.d.  $\times$  0.25  $\mu$ m film thickness). The

GC–FID analyses were conducted using 1 mL/min H<sub>2</sub> flow, the split mode (10:1), and the following temperature program: initial temperature of 50 °C increasing to 100 °C at 10 °C/min and to 180 °C at 5 °C/min, holding for 5 min.

## Results and discussion

### Blast search and EH identification

Progress in the area of bioinformatics and cloning techniques plays an important role in the identification of novel EHs and other enzymes from metagenomic and genomic databases [5,11,24]. Thus, nucleotide sequence of AnEH LCP521 and other EHs deposited in NCBI GenBank were used as templates for the screening of primers. Although most of the known EHs have low sequence identity with each other, the EHs from the genus *Aspergillus* have high identity (45–99%), which allows for the design and screening of primers for gene amplification and characterization. After the amplification of the EH cDNA by PCR, the gene was cloned and sequenced and the identity of the gene was confirmed by sequencing (data not shown).

### Alignment of AbEH with *A. niger* LCP 521 EH

The alignment of the amino acid sequence of *A. brasiliensis* EH strain CCT1453 with that of *A. niger* EH strain LCP521 indicated a high degree of conservation, with 89% identity. The alignment of the EH sequence cloned in this study with those of other strains deposited in the NCBI GenBank database revealed the presence of the conserved motifs that are characteristic of these enzymes (data not shown) [3,8]. A catalytic triad, Asp124–Asp260–His289, found in the EH from *A. niger* LCP 521 [2,3] was also present at the same positions in EH from *A. brasiliensis* CCT1435 (Fig. 1). The two active-site tyrosines (Tyr251 and Tyr314) that function as proton donors to the epoxide ring oxygen and aid in the ring-opening reaction are also present in AbEH [6].

Despite the high identity between these sequences, the EH enzymatic enantio- and regioselectivity can change, as recently described for the mutations of one or few amino acids and thereby motivating the present study [2,25,26].

### Expression and purification of recombinant AbEH<sub>6His-tag</sub> in *E. coli*

The full-length AbEH cDNA was cloned into the pET28a(+) vector and expressed in *E. coli* BL21(DE3) Rosetta cells. High levels of

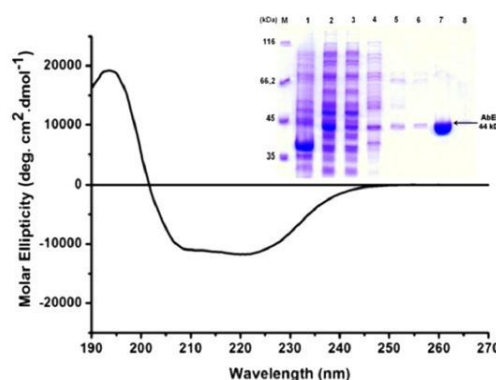


Fig. 2. Circular dichroism curve obtained for the purified AbEH<sub>6His-tag</sub> protein in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2). SDS–PAGE (12%) results: M, Fermentas unstained protein molecular weight marker; 1, insoluble fraction; 2, soluble fraction; 3, flow-through; 4–8: elution steps with 20, 50, 75, 250 and 500 mM imidazole respectively. Predicted weight of AbEH<sub>6His-tag</sub> protein = 44 kDa.

expression were reached after the cells were incubated in the presence of 0.4 mM IPTG at 25 °C and 200 rpm for 16 h. The purification of the recombinant AbEH was performed by nickel affinity chromatography according to the described methodology. The elution gradient (20–500 mM imidazole) resulted in the optimal elution of AbEH from the resin in a buffer with 250 mM imidazole. The SDS–PAGE analyses indicated a single protein band of approximately 44 kDa (Fig. 2). Recombinant AbEH<sub>6His-tag</sub> was obtained at a satisfactory purity level and concentration (0.8 mg/mL). Analysis by mass spectrometry confirmed the identity of the recombinant protein (data not shown).

### Preliminary structural characterization of AbEH

The secondary structure of purified AbEH was assessed by CD measurements, and a typical signal of a protein composed of  $\alpha$  helices and  $\beta$  sheets was obtained (Fig. 2). This analysis indicated that the enzyme has a secondary structure that is consistent with that predicted for proteins with an  $\alpha/\beta$  hydrolase fold [3,8].

The CD analysis of the purified protein was performed under oxidizing and reducing conditions. The reducing agent TCEP was



Fig. 1. ClustalW alignment of the amino acid sequences of EHs from *Aspergillus brasiliensis* CCT1435 and *Aspergillus niger* LCP 521 (PDB ID: 1Q07\_A). The regions that are conserved in the two sequences (black) are highlighted. A high similarity between the two sequences can be observed (89% identity). The catalytic triad formed by Asp192–His374–Asp348 is highlighted in red in both sequences. The Tyr251 and Tyr314 residues, which act as proton donors for the epoxide ring oxygen, are highlighted in yellow.

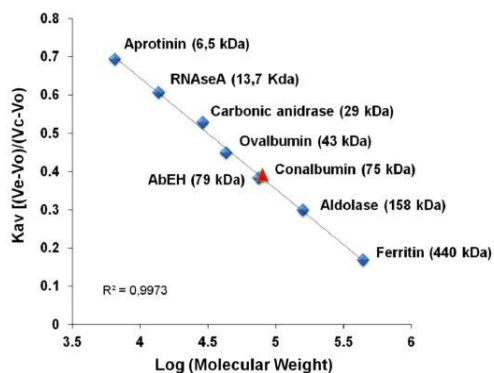


Fig. 3. Size exclusion chromatography calibration curve for AbEH<sub>6His-tag</sub>. The estimated molecular mass of AbEH<sub>6His-tag</sub> is indicated in the trend line as a red square. Estimated molecular weight of the AbEH<sub>6His-tag</sub> dimer = 79 kDa. Monomer molecular weight = 44 kDa. Expected dimer molecular weight = 88 kDa.

used at a final concentration of 1 mM. However, no differences in the secondary structure were observed (data not shown). The oxy-red protein was examined because we observed that AbEH exhibits a low catalytic performance when its cysteines are oxidized (data not shown). Indeed, certain proteins tend to aggregate

under oxidizing conditions, and the EH studied exhibited a low activity under these conditions [27].

The oligomeric state of the purified AbEH was examined by analytical gel filtration, which indicated that the protein is a homodimer in solution. The predicted molecular weight of the recombinant protein is 44 kDa, and we obtained an elution peak corresponding to a protein with an apparent molecular weight of 79 kDa, which is close to the expected molecular weight of the dimer (Fig. 3). These data agree with the data obtained for the EH of *A. niger* reported by Zou et al. [3].

#### Characterization of EH activity

The activity of AbEH was assessed with the fluorogenic probe O-(3,4-epoxybutyl)umbelliferone (1, Fig. 4a), which involves a cascade of chemo-enzymatic reactions in which diol 2, formed by the EH hydrolysis of epoxide 1, releases the umbelliferyl anion (3) in the presence of NaO<sub>4</sub> and BSA, producing a fluorescent signal that is measured at 460 nm after excitation at 390 nm [28].

Under the initial conditions applied (pH 7.2, 30 °C, and 0.1% Tween-20), compound 1 was 90% hydrolyzed by AbEH in 30 min (Fig. 4b). This observation indicated that AbEH has a specific activity of 0.17 U mg<sup>-1</sup>, where 1 U is defined as the amount of enzyme that catalyzes the conversion of 1 μmol of 1 per minute, at the applied reaction conditions. The determined AbEH specific activity is approximately five times greater than that of an EH from *A. niger* evaluated by Reymond and co-workers using the same fluorogenic probe [28].

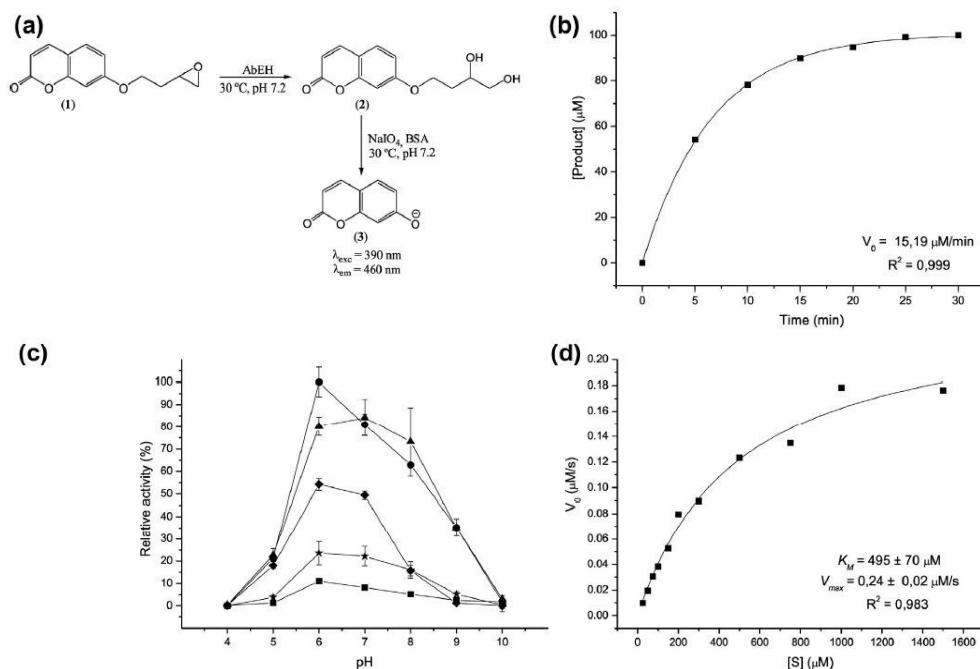


Fig. 4. (a) Fluorescence-based assay used to detect EH hydrolytic activity. The chemo-enzymatic cascade reaction releases umbelliferyl anion, which could be measured at  $\lambda_{em} = 460 \pm 20$  nm using  $\lambda_{exc} = 380 \pm 20$  nm. (b) Time course of AbEH hydrolysis of 1. The initial reaction rate was obtained by non-linear regression of the first-order kinetic equation based on the product formation:  $[P] = [P]_{max}[1 - \exp(-kt)]$ , where  $[P]$  is the product concentration,  $t$  is the reaction time, and  $k$  is the kinetic constant; thus, the initial reaction rate was obtained using  $V_0 = [P]_{max}k$ . (c) pH activity profile of AbEH hydrolysis of probe 1 at different temperatures: 25 °C (■), 30 °C (●), 35 °C (▲), 40 °C (◆), 45 °C (★). The enzymatic activities were determined after 30 min by a pH increase using 1 M buffer at pH 10 and were expressed relative to the greatest activity. (d) Michaelis-Menten plot of AbEH hydrolysis of 1. The initial reaction rates were obtained by time course plots at different concentrations of 1 (from 10 to 1500 μM).

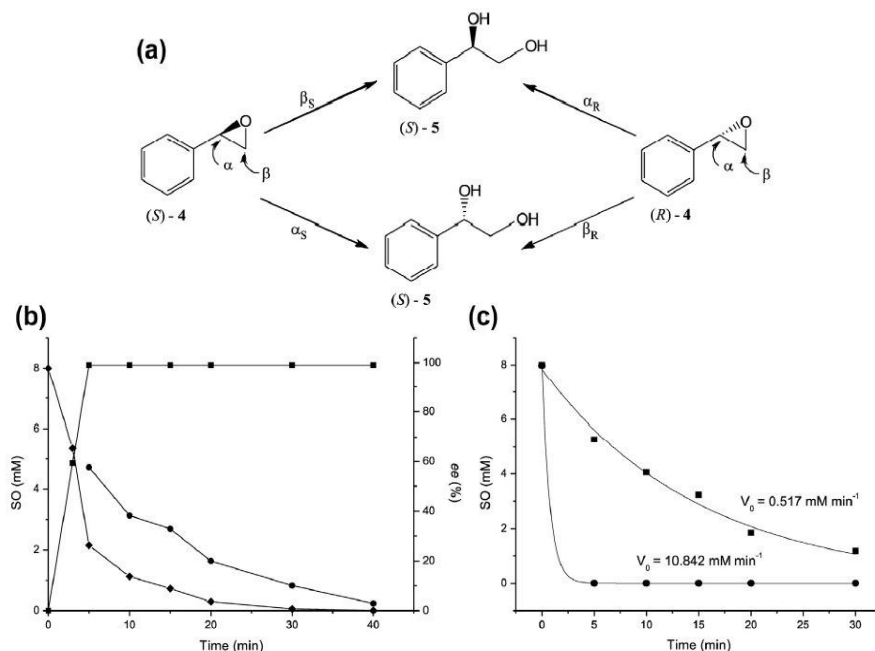


Fig. 5. (a) EH-catalyzed hydrolysis of (R/S)-SO. Attack at C<sub>β</sub> or C<sub>α</sub> of only one enantiomer results in the retention or inversion of the formed diol configuration, respectively. However, water attack at the C<sub>β</sub> of one enantiomer and C<sub>α</sub> of the other leads to an enantioconvergent process, with the production of an enantiomer-enriched 1,2-diol. (b) Time course of racemic SO hydrolysis by AbEH. The consumption of racemic SO (◆), remaining epoxide ee (■), and formed diol ee (●). (c) Time course of enantiopure (R)-SO (●) and (S)-SO (■) hydrolysis by AbEH. The initial reaction rates (V<sub>0</sub>) were obtained by non-linear regression of the first-order kinetic equation based on substrate consumption: [S] = [S]<sub>0</sub> exp(−kt), where [S] is the substrate concentration, t is the reaction time, and k is the kinetic constant; thus, V<sub>0</sub> = [S]<sub>0</sub>k. General reaction conditions: 8 mM of SO, 5% DMSO, 50 mM phosphate buffer (pH 6.0), and 0.1% Tween-20 at 30 °C.

It is well known that the protein ionization state is important for efficient enzyme catalysis, as is the temperature of an enzymatic reaction [29]. Within this context, the AbEH activity dependence on pH and temperature was investigated from pH 4.0 to 10.0 and a temperature range from 25 to 45 °C using probe 1 (Fig. 4c). The best AbEH catalytic performance was achieved at pH 6.0 and 30 °C. AbEH hydrolyzed probe 1 over a wide pH range between 5.0 and 10.0, maintaining at least 40% of its relative activity up to pH 9.0 at the optimum temperature; however, a pronounced decrease in activity was observed below pH 6.0 and above pH 9.0. AbEH was also active at all of the evaluated temperatures, though the relative activity did decrease to 11% at 25 °C and pH 6.0. This broad pH and temperature activity is reported among EHs from *Aspergillus* genera [30–33] and is a beneficial property for their chemical application.

The influence of surfactants on enzymatic activity is well known [34,35]; thus, AbEH activity was measured in the presence of Tween-20 (from 0.1% to 5.0% v/v). Although increased activity was observed with the addition of 0.1% of Tween-20, further increases in the Tween-20 concentration did not significantly improve AbEH activity (data not shown).

To further evaluate AbEH, the Michaelis–Menten kinetic parameters of 1 hydrolysis were determined. The plot of the initial reaction rates versus substrate concentration indicated a clear plateau within the investigated range (Fig. 4d). The non-linear regression fitting of the data to the Michaelis–Menten model produced Michaelis constant (K<sub>M</sub>) and maximum rate (V<sub>max</sub>) values of 495 μM and 0.24 μM/s, respectively, with a good regression coefficient of 0.983. From these data, the turnover number (k<sub>cat</sub>) and

catalytic efficiency (ε) of AbEH were also obtained, with values of 1.1 s<sup>−1</sup> and 2.3·10<sup>3</sup> M<sup>−1</sup> s<sup>−1</sup>, respectively. These results indicated that AbEH exhibits a Michaelis–Menten kinetic behavior and a moderate affinity for 1 under the applied conditions.

#### AbEH hydrolysis of racemic styrene oxide

Enantiopure epoxides and vicinal diols are versatile building blocks in the synthesis of various biologically active compounds and are therefore chemical intermediates of high value for the chemical and pharmaceutical industries [12]. Accordingly, there are well-established synthetic strategies to obtain these compounds, such as Sharpless asymmetric epoxidation [36] and AD-mix α- or β-mediated dihydroxylation of olefins [37]. However, the use of an EH allows for the direct preparation of enantiomerically pure epoxides and diols from the kinetic resolution of racemic epoxides in particularly mild conditions without using toxic reagents, which are principles of Green Chemistry [38].

Within this context, styrene oxide (SO) was used to assess the AbEH performance and selectivity (Fig. 5a).

The time course of the AbEH enantioselective epoxide hydrolysis was investigated using 8 mM (R/S)-SO and DMSO (5%) as the co-solvent under the determined optimal conditions (pH 6.0, 30 °C, and 0.1% Tween-20). Fig. 5b presents the AbEH conversion profile of SO and the enantiomeric excesses of the formed diol and remaining epoxide. After only 5 min of reaction, 66% of the SO was hydrolyzed, and the remaining epoxide ee exceeded 99% when (R)-SO was entirely consumed, leaving 34% of enantiopure (S)-SO; these results indicate a typical kinetic resolution behavior. Based

**Table 1**  
Styrene oxide kinetic resolution with known epoxide hydrolases.

| Epoxide hydrolase          | Ref.    | Cat. Form | (±) SO mM | Temp. (°C) | pH  | Time (min)        | (S)-SO ee (%) | Yield (%) | E <sup>b</sup>  |
|----------------------------|---------|-----------|-----------|------------|-----|-------------------|---------------|-----------|-----------------|
| AbEH CCT1435 <sup>a</sup>  |         | Enzyme    | 8         | 30         | 6.0 | 5                 | 99            | 34        | 9               |
| <i>A. niger</i> LCP521     | [42,43] | Cells     | 8         | 27         | 8.0 | 120               | 99            | 28        | 10              |
| <i>A. niger</i> isolate    | [44]    | Cells     | 10        | 30         | 8.0 | 360               | 100           | 32        | 13 <sup>c</sup> |
| <i>A. radiobacter</i> AD1  | [45]    | Enzyme    | 5         | 30         | 9.0 | 48                | 99            | 33        | 16              |
| <i>R. glutinis</i> CIMW147 | [46]    | Cells     | 10        | 35         | 7.5 | 48                | 98            | 18        | 6               |
| Rabbit liver mEH           | [47]    | Enzyme    | 5         | 37         | 7.4 | n.i. <sup>d</sup> | 98            | 22        | 7               |

<sup>a</sup> From *A. brasiliensis* CCT1435 analyzed in this research.

<sup>b</sup> Enantiomeric ratio (E) was calculated according to Sih's equation.

<sup>c</sup> Calculated with an ee of 99%.

<sup>d</sup> No information.

**Table 2**  
Summary of the AbEH-catalyzed hydrolysis of racemic SO in monophasic and biphasic liquid reaction systems.

| Medium                   | AbEH reaction system         |                              |                                 |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
|                          | Monophasic                   |                              | Biphasic                        |
|                          | Buffer <sup>a</sup> (pH 6.0) | Buffer <sup>b</sup> :Heptane | Buffer <sup>b</sup> :Iso-octane |
| SO concentration (mM)    | 8.0                          | 22.0                         | 22.0                            |
| AbEH concentration (μM)  | 4.3                          | 11 <sup>c</sup>              | 11 <sup>c</sup>                 |
| Reaction time            | 5 min                        | 24 h                         | 24 h                            |
| Conversion (%)           | 66                           | 25                           | 43                              |
| SO ee (%) / Abs. conf.   | >99/(S)                      | 30/(S)                       | 36 (S)                          |
| Diol ee (%) / Abs. conf. | 58/(R)                       | 66/(R)                       | 84/(R)                          |
| E <sup>d</sup>           | 9.0                          | 26.0                         | 4.0                             |

<sup>a</sup> Phosphate buffer, 50 mM (pH 6.0) and 0.1% Tween-20.

<sup>b</sup> Phosphate buffer, 50 mM (pH 7.2) and 0.1% Tween-20.

<sup>c</sup> AbEH concentration in the aqueous phase.

<sup>d</sup> Calculated based on Sih's equation.

on Sih's equation, the estimated *E* for this kinetic resolution of (*R*)-SO was 9. The fast kinetic resolution of SO outweighed this relatively low *E* value, which allows promising future applications of AbEH. Additionally, as shown in Table 1, AbEH exhibits more rapid enzyme kinetics than the listed EHs (up to 72-fold faster than the *A. niger* isolate) as well as a higher yield.

SO can be hydrolyzed via water molecule attack at both carbons of the epoxide ring, resulting in three possible enantioselective ring openings (Fig. 5a). When the attack occurs at C<sub>β</sub> or C<sub>α</sub> of only one enantiomer, the configuration of the formed diol is retained or inverted, respectively, leading to the kinetic resolution of the racemic epoxide. However, water attack at the C<sub>β</sub> of one enantiomer and C<sub>α</sub> of the other leads to an enantioconvergent process, with the production of an enantioenriched 1,2-diol [39].

The AbEH enantioselective hydrolyses were further evaluated with enantiopure (*S*)-SO and (*R*)-SO. The results indicated that configuration inversion and enantioconvergent processes were not present in the (*R*)- or (*S*)-SO hydrolyses, as the produced diol configurations in both reactions were consistent with that of the parent epoxide, i.e., for both enantiomers, the attack occurred preferentially at C<sub>β</sub>. To our knowledge, most of the previously described EHs from *Aspergillus* have the same enantioselectivity for SO derivatives [40].

Fig. 5c presents the time course reactions of the individual enantiomers by AbEH. As observed in the previous assays using racemic SO, the hydrolysis of (*R*)-SO was faster than (*S*)-SO. The consumption initial rates for (*R*)- and (*S*)-SO were estimated to be 10.842 and 0.517 mM/min, respectively, yielding an apparent *E* of 21.

The latter difference of twice the *E* value between the calculated by Sih's equation and by this methodology was attributed to the absence of enantiomeric competition for the same enzyme active site [41].

#### AbEH hydrolysis of racemic styrene oxide in liquid–liquid biphasic systems

The EH-catalyzed hydrolysis of racemic epoxides is typically performed in an aqueous medium, as described above. However, in these systems small amounts of epoxides can be dissolved and spontaneous hydrolysis can occur. To overcome these disadvantages, biphasic systems involving an organic and aqueous layer to perform the enzymatic reactions have been applied with the additional benefit of the facile substrate and product recovery at the end of the reaction [48,49].

Consequently, liquid–liquid biphasic systems for the hydrolysis of racemic SO by AbEH were evaluated using five different water-immiscible organic solvents (heptane, iso-octane, toluene, ethyl acetate, and iso-amyl alcohol) and a phosphate buffer as the aqueous phase.

The enzymatic hydrolysis of (*R/S*)-SO was only observed in the presence of heptane or iso-octane as the organic solvent, indicating the preferential hydrolysis of (*R*)-SO to produce (*R*)-1-phenyl-1,2-ethanediol. When using heptane as the organic solvent, the diol ee was 66% and that of the remaining epoxide was 30%, with 25% conversion after 24 h. However, the diol ee reached 84% in iso-octane, whereas that of the remaining epoxide (*S*)-SO was 36%, with a reaction conversion of 43% after 24 h.

Although discrete, the results obtained for the water:iso-octane system indicated a slight enantioconvergent behavior of AbEH-catalyzed hydrolysis of SO, particularly when considering the low ee observed for the remaining epoxide, which is not compatible with the reaction conversion and observed diol ee.

Additionally, the evaluated biphasic systems efficiently prevented the spontaneous hydrolysis of SO for days. This phenomenon was credited to the reduced contact time of the epoxide with the aqueous phase.

The use of biphasic systems in enzymatic reactions also simplifies the purification steps, an appreciated feature in industrial applications. In this case, the substrate (epoxide, less polar) has a greater affinity for the organic phase and the product (diol, more polar) for the aqueous phase [40]. This partitioning provides *in situ* purification of the reaction components; therefore, the substrate and product were recovered through the simple separation of the organic and aqueous phases.

Table 2 summarizes the results of SO hydrolysis by AbEH in all of the evaluated systems. It is clear that the aqueous systems using only DMSO as the co-solvent to assist in epoxide solubilization is more efficient and productive, allowing for the kinetic resolution of racemic SO by AbEH in only 5 min. However, these biphasic systems illustrated a possible new enantioconvergent action for the recombinant wild-type EH from *A. brasiliensis* CCT1435. Further studies are being performed to understand and confirm this behavior and to apply this novel EH to epoxides of industrial interest.

## Conclusion

Our results demonstrate that the new AbEH was successfully expressed in *E. coli* and purified. AbEH has an optimum enzymatic performance at 30 °C and pH 6.0 and exhibits an increased activity with the addition of Tween-20 (0.1% v/v). This study demonstrated that recombinant AbEH has an (*R*)-preferential enantioselectivity in an aqueous system, leading to the complete kinetic resolution of 8 mM racemic SO within 5 min. AbEH also presents a potential enantioconvergent performance in a water:iso-octane biphasic system; however, further studies will be performed to confirm this behavior. Therefore, this novel AbEH has suitable catalytic properties, enhancing its potential for use in the preparation of enantiopure epoxides and vicinal diols.

## Acknowledgments

The authors are grateful for the financial support from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Agência Nacional do Petróleo (ANP-PETROBRAS). Lilian L. Beloti and Bruna Z. Costa received a scholarship from FAPESP (application 09/51756-2 and 11/10378-5, respectively). We gratefully acknowledge Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS; Campinas, Brazil).

## References

- [1] S. Pedragosa-Moreau, C. Morisseau, J. Zylber, A. Archelas, J. Baratti, R. Furstoss, Microbiological transformations. 33. Fungal epoxide hydrolases applied to the synthesis of enantiopure para-substituted styrene oxides. A mechanistic approach, *J. Org. Chem.* 61 (1996) 7402–7407.
- [2] M. Arand, H. Hemmer, H. Durk, J. Baratti, A. Archelas, R. Furstoss, F. Oesch, Cloning and molecular characterization of a soluble epoxide hydrolase from *Aspergillus niger* that is related to mammalian microsomal epoxide hydrolase, *Biochem. J.* 344 (Pt 1) (1999) 273–280.
- [3] J. Zou, B.M. Hallberg, T. Bergfors, F. Oesch, M. Arand, S.L. Mowbray, T.A. Jones, Structure of *Aspergillus niger* epoxide hydrolase at 1.8 Å resolution: implications for the structure and function of the mammalian microsomal class of epoxide hydrolases, *Structure* 8 (2000) 111–122.
- [4] A. Steinreiber, K. Faber, Microbial epoxide hydrolases for preparative biotransformations, *Curr. Opin. Biotechnol.* 12 (2001) 552–558.
- [5] B. van Loo, J. Kingma, M. Arand, M.G. Wubbolts, D.B. Janssen, Diversity and biocatalytic potential of epoxide hydrolases identified by genome analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006) 2905–2917.
- [6] R. Rink, J. Kingma, J.H. Luttje Spelberg, D.B. Janssen, Tyrosine residues serve as proton donor in the catalytic mechanism of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter*, *Biochemistry* 39 (2000) 5600–5613.
- [7] M. Nardini, B.W. Dijkstra, Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9 (1999) 732–737.
- [8] D.L. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S.M. Franken, M. Harel, S.J. Remington, I. Silman, J. Schrag, et al., The alpha/beta hydrolase fold, *Protein Eng.* 5 (1992) 197–211.
- [9] M. Arand, F. Muller, A. Mecky, W. Hinz, P. Urban, D. Pompon, R. Kellner, F. Oesch, Catalytic triad of microsomal epoxide hydrolase: replacement of Glu404 with Asp leads to a strongly increased turnover rate, *Biochem. J.* 337 (Pt 1) (1999) 37–43.
- [10] R. Kumar, S.I. Wani, N.S. Chauhan, R. Sharma, D. Sareen, Cloning and characterization of an epoxide hydrolase from *Cupriavidus metallidurans*-CH34, *Protein Expr. Purif.* 79 (2011) 49–59.
- [11] A. Archelas, R. Furstoss, Synthetic applications of epoxide hydrolases, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 112–119.
- [12] Y. Genzel, A. Archelas, Q.B. Broxterman, B. Schulze, R. Furstoss, Microbiological transformations. 50: selection of epoxide hydrolases for enzymatic resolution of 2-, 3- or 4-pyridyloxirane, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 16 (2002) 217–222.
- [13] L.P. Nielsen, C.P. Stevenson, D.G. Blackmond, E.N. Jacobsen, Mechanistic investigation leads to a synthetic improvement in the hydrolytic kinetic resolution of terminal epoxides, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 1360–1362.
- [14] E.N. Jacobsen, Asymmetric catalysis of epoxide ring-opening reactions, *Acc. Chem. Res.* 33 (2000) 421–431.
- [15] L. Rui, L. Cao, W. Chen, K.F. Reardon, T.K. Wood, Protein engineering of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 for enhanced activity and enantioselective production of (*R*)-1-phenylethane-1,2-diol, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 3995–4003.
- [16] M.I. Monderer, M. Lombard, A. Archelas, A. Cronin, M. Arand, R. Furstoss, Enzymatic transformations. Part 58: Enantioconvergent biotransformation of styrene oxide derivatives catalysed by the *Solanum tuberosum* epoxide hydrolase, *Tetrahedron Asymmetry* 15 (2004) 5–5.
- [17] B. Bicalho, L.S. Chen, J. Grogan, J.-L. Reymond, A.J. Marsaioli, Studies on whole cell fluorescence-based screening for epoxide hydrolases and Baeyer–Villiger monooxygenases, *J. Braz. Chem. Soc.* 15 (2004) 911–916.
- [18] H.B. Nicholas, K.B. Nicholas, D.W. Deerfield, Genedoc: analysis and visualization of genetic variation, *EMBNETnews* 4 (1997) 4.
- [19] J.D. Jones, P. Dunsmuir, J. Bedbrook, High level expression of introduced chimeric genes in regenerated transformed plants, *EMBO J.* 4 (1985) 2411–2418.
- [20] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [21] L. Whitmore, B.A. Wallace, DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) W668–W673.
- [22] L. Whitmore, B.A. Wallace, Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases, *Biopolymers* 89 (2008) 392–400.
- [23] C.S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C.J. Sih, Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 7294–7299.
- [24] M. Kotik, V. Štěpánek, M. Grulich, P. Kyslík, A. Archelas, Access to enantiopure aromatic epoxides and diols using epoxide hydrolases derived from total biofilter DNA, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 65 (2010) 41–48.
- [25] M. Kotik, A. Archelas, V. Famerová, P. Oubrechtová, V. Kren, Laboratory evolution of an epoxide hydrolase-towards an enantioconvergent biocatalyst, *J. Biotechnol.* 156 (2011) 1–10.
- [26] M.T. Reetz, Directed evolution of enantioselective enzymes: an unconventional approach to asymmetric catalysis in organic chemistry, *J. Org. Chem.* 74 (2009) 5767–5778.
- [27] E. Shacter, Quantification and significance of protein oxidation in biological samples, *Drug Metab. Rev.* 32 (2000) 307–326.
- [28] F. Badalassi, D. Wahler, G. Klein, P. Crotti, J.-L. Reymond, A versatile periodate-coupled fluorogenic assay for hydrolytic enzymes, *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 4067–4070.
- [29] R.A. Copeland, *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*, second ed., Wiley-VCH, New York, 2000.
- [30] M. Kotik, P. Kylik, Purification and characterization of a novel enantioselective epoxide hydrolase from *Aspergillus niger* M200, *Biochim. Biophys. Acta* 1760 (2006) 245–252.
- [31] H. Nellaiah, C. Morisseau, A. Archelas, R. Furstoss, J. Baratti, Enantioselective hydrolysis of p-nitrostyrene oxide by an epoxide hydrolase preparation from *Aspergillus niger*, *Biotechnol. Bioeng.* 49 (1996) 70–77.
- [32] S. Karboune, L. Amourache, H. Nellaiah, C. Morisseau, J. Baratti, Immobilization of the epoxide hydrolase from *Aspergillus niger*, *Biotechnol. Lett.* 23 (2001) 1633–1639.
- [33] D. Yildirim, S.S. Tükel, D. Alagöz, Ö. Alptekin, Preparative-scale kinetic resolution of racemic styrene oxide by immobilized epoxide hydrolase, *Enzyme Microb. Technol.* 49 (2011) 555–559.
- [34] N.A. Kronenbarga, J.A. de Bont, Effects of detergents on specific activity and enantioselectivity of the epoxide hydrolase from *Rhodotorula glutinis*, *Enzyme Microb. Technol.* 28 (2001) 210–217.
- [35] Z.-Q. Liu, L.-P. Zhang, F. Cheng, L.-T. Ruan, Z.-C. Hu, Y.-G. Zheng, Y.-C. Shen, Characterization of a newly synthesized epoxide hydrolase and its application in racemic resolution of (*R,S*)-epichlorohydrin, *Catal. Commun.* 16 (2011) 133–139.
- [36] T. Katsuki, K.B. Sharpless, The first practical method for asymmetric epoxidation, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 5974–5976.
- [37] E.N. Jacobsen, I. Marko, W.S. Mungall, G. Schroeder, K.B. Sharpless, Asymmetric dihydroxylation via ligand-accelerated catalysis, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 1968–1970.

- [38] C.M. Clouthier, J.N. Pelletier, Expanding the organic toolbox: a guide to integrating biocatalysis in synthesis, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 1585–1605.
- [39] N. Bala, S.S. Chinni, Recent developments in the asymmetric hydrolytic ring opening of epoxides catalysed by microbial epoxide hydrolase, *Tetrahedron: Asymmetry* 21 (2010) 2879–2898.
- [40] M. Kotik, A. Archelas, R. Wohlgenuth, Epoxide hydrolases and their application in organic synthesis, *Curr. Org. Chem.* 16 (2012) 31.
- [41] S.M. Mantovani, L.G. de Oliveira, A.J. Marsaioli, Whole cell quick E for epoxide hydrolase screening using fluorogenic probes, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 52–52 (2008) 173–177.
- [42] S. Pedragosa-Moreau, A. Archelas, R. Furstoss, Microbiological transformations. 28. Enantiocomplementary epoxide hydrolyses as a preparative access to both enantiomers of styrene oxide, *J. Org. Chem.* 58 (1993) 5533–5536.
- [43] S. Pedragosa-Moreau, A. Archelas, R. Furstoss, Microbiological transformations-XXIX. Enantioselective hydrolysis of epoxides using microorganisms: a mechanistic study, *Bioorg. Med. Chem.* 2 (1994) 609–616.
- [44] W. Choi, E. Huh, H. Park, E. Lee, C. Choi, Kinetic resolution for optically active epoxides by microbial enantioselective hydrolysis, *Biotechnol. Tech.* 12 (1998) 225–228.
- [45] J.H.L. Spelberg, R. Rink, R.M. Kellogg, D.B. Janssen, Enantioselectivity of a recombinant epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter*, *Tetrahedron: Asymmetry* 9 (1998) 459–466.
- [46] C.A.G.M. Weijers, Enantioselective hydrolysis of aryl, alicyclic and aliphatic epoxides by *Rhodotorula glutinis*, *Tetrahedron: Asymmetry* 8 (1997) 639–647.
- [47] G. Bellucci, C. Chiappe, A. Cordoni, F. Marioni, Substrate enantioselectivity in the rabbit liver microsomal epoxide hydrolase catalyzed hydrolysis of trans and cis 1-phenylpropene oxides. a comparison with styrene oxide, *Tetrahedron: Asymmetry* 4 (1993) 1153–1160.
- [48] M. Cleij, A. Archelas, R. Furtoss, Microbial transformations. Part 42: a two-liquid-phase preparative scale process for an epoxide hydrolase catalysed resolution of para-bromo- $\alpha$ -methyl styrene oxide. occurrence of a surprising enantioselectivity enhancement, *Tetrahedron: Asymmetry* 9 (1998) 4.
- [49] N. Doukyu, H. Ogino, Organic solvent-tolerant enzymes, *Biochem. Eng. J.* 48 (2010) 270–282.

## **CAPÍTULO 2 – PATENTE**

**Patente depositada junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI,**

**Intitulada de:**

### **“Enzima Recombinante, Processo De Hidrólise Enzimática De Epóxidos E Dióis Vicinais Assim Obtidos”**

**Número de depósito: BR1020130040320**

**Depositantes:** Profa. Dra. Anete Pereira de Souza e Profa. Dra. Anita J. Marsaioli,

**Universidade Estadual de Campinas – Campinas – SP**

**Inventores:** Anete Pereira de Souza – CBMEG – Unicamp - SP

Anita J. Marsaioli- Instituto de Química – IQ – Unicamp - SP

Lilian Luzia Beloti – CBMEG – Unicamp - SP

Bruna Zucoloto Costa - Instituto de Química – IQ – Unicamp - SP

Dávila Zampieri - Instituto de Química – IQ – Unicamp - SP

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| < Uso exclusivo do INPI >                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                          |
| <div style="text-align: center;">  <p><b>INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL</b><br/>PROTOCOLO GERAL</p> <p>matenreg<br/>21/02/2013 018130005486<br/>15:16 DESP</p>  <p>BR 10 2013 004032 0</p> </div> | <div style="border: 1px solid black; height: 100px; width: 100%;"></div> |
| Espaço                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Espaço para etiqueta                                                     |

## DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

### Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

#### 1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
- 1.2 Qualificação:
- 1.3 CNPJ/CPF: 46068425/0001-33
- 1.4 Endereço Completo:
- 1.5 CEP: 13083-970      1.6 Telefone: 19 3521-5015      1.7 Fax: 19 3521-5210
- 1.8 E-mail: patentes@inova.unicamp.br

☒ continua em folha anexa

2. Natureza:      ☒ Invenção      ☐ Modelo de Utilidade      ☐ Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: INVENÇÃO

#### 3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

ENZIMA RECOMBINANTE, PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE EPÓXIDOS E DIÓIS VICINAIS ASSIM OBTIDOS

☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido N°      Data de Depósito:

5. Prioridade:      ☐ interna      ☐ unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

**7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:**

☐ 7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

☐ em anexo

**8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial:** (Período de Graça):  
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

☐ em anexo

**9. Procurador (74)**

9.1 Nome: FERNANDA LAVRAS COSTALLAT SILVADO

9.2 CNPJ/CPF: 295.166.068-57

9.3 API/OAB: 210.899

9.4 Endereço completo: Procuradoria Geral da UNICAMP, em Campinas - SP

9.5 CEP: 13083-970

9.6 Telefone: 19 3521-4771

9.7 Fax: 19 3289-4245

9.8 E-Mail: patentes@inova.unicamp.br

**10. Listagem de sequências Biológicas** (documentos anexados) (se houver):

☒ Listagem de sequências em arquivo eletrônico: 2 nº de CDs ou DVDs (original e cópia).

☒ Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: 2 fl.

☒ Listagem de sequências em formato impresso: 4 fls.

☒ Declaração de acordo com o artigo 8º da Resolução INPI nº 228/09: 1 fls.

**11. Documentos anexados** (assinale e indique também o número de folhas):  
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

|                                     |                                                                           |        |                                     |                           |         |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|--------|-------------------------------------|---------------------------|---------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | 11.1 Guia de Recolhimento                                                 | 1 fls. | <input checked="" type="checkbox"/> | 11.5 Relatório descritivo | 19 fls. |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 11.2 Procuração                                                           | 1 fls. | <input checked="" type="checkbox"/> | 11.6 Reivindicações       | 2 fls.  |
| <input type="checkbox"/>            | 11.3 Documentos de Prioridade                                             | fls.   | <input checked="" type="checkbox"/> | 11.7 Desenhos             | 5 fls.  |
| <input type="checkbox"/>            | 11.4 Doc. de contrato de trabalho                                         | fls.   | <input checked="" type="checkbox"/> | 11.8 Resumo               | 1 fls.  |
| <input type="checkbox"/>            | 11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar)<br>ANEXOS |        |                                     |                           | 1 fls.  |

**12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11):** 37 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Campinas, SP, em 18.02.2013

Local e Data



Assinatura e Carimbo

Fernanda Lauras Costallat Silveira  
Procuradora de Universidade Subchefe  
Matricula nº 28.574-2  
OAB/SP nº 110.899



Formulário 1.01 – Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição (folha 2/2 )

## Minuta da Patente

### ENZIMA RECOMBINANTE, PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE EPÓXIDOS E DIÓIS VICINAIS ASSIM OBTIDOS

#### Campo da invenção

A presente invenção refere-se a uma enzima recombinante do fungo *Aspergillus brasiliensis* CCT1435 e um processo de hidrólise enzimática de epóxidos.

Mais especificamente, a presente invenção trata de um processo de obtenção de dióis vicinais enantiomericamente puros a partir de epóxidos racêmicos empregando uma epóxido hidrolase recombinante.

O processo enzimático para produção régio e enantiosseletiva de dióis vicinais de grande interesse em rotas sintéticas ocorre em sistemas bifásicos, eliminando a etapa de purificação.

#### Fundamentos da invenção

Os enantiômeros têm propriedades físicas idênticas e diferem somente na sua rotação óptica, entretanto, suas atividades biológicas podem diferir consideravelmente. A característica enantiomérica das moléculas é de grande importância para a indústria farmacêutica, pois as enzimas humanas e os receptores de superfície celular também são quirais. Os enantiômeros de drogas racêmicas podem ser absorvidos, ativados, ou degradados em diferentes níveis, além de poderem apresentar diferentes tipos de atividade farmacológica. Devido a essa particularidade dos enantiômeros, é de suma importância que tanto fármacos, como outros produtos industriais contenham em suas fórmulas compostos enantiomericamente puros.

Um grupo importante de moléculas quirais é constituído pelos epóxidos. Em química orgânica, um epóxido é um grupamento funcional reativo (éter cíclico) formado por um átomo de oxigênio unido a dois átomos de carbono, que por sua vez estão unidos por uma ligação covalente. Os epóxidos podem ser convertidos em dióis vicinais pela abertura do anel, em um processo de hidrólise. Nesse contexto, a biocatálise reúne as vantagens da química orgânica sintética e seletividade das reações

catalisadas por enzimas, permitindo o uso de condições brandas, o que a torna uma ferramenta valiosa no âmbito da Química Verde.

As epóxido hidrolases (EHs) se destacam como biocatalisadores versáteis. Estas enzimas pertencem à família das  $\alpha/\beta$  hidrolases, e catalisam a adição de uma molécula de água a um anel oxirano levando à formação do respectivo diol vicinal, sem necessidade de cofatores. O estado da técnica apresenta diferentes processos empregando epóxido hidrolases para a conversão de epóxidos em seus respectivos dióis vicinais.

O trabalho de Cao, Lee, Chen e Wood (2006) descreve a síntese de (*R*)-fenil-1,2-etanodiol com epóxido hidrolases de batata e *Agrobacterium radiobacter*, em um processo realizado em solução tampão atingindo 100% de conversão e 98% de excesso enantiomérico (ee), com velocidade de  $4,7 \pm 0,7 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  e uma taxa de hidrólise espontânea de 4,4% com 45 min de reação. Diferentemente, a presente invenção emprega uma única EH recombinante de *Aspergillus brasiliensis* para a conversão régio e enantiosseletiva de epóxidos aos seus respectivos dióis vicinais, o que facilita todo o processo, não havendo necessidade de expressão de duas enzimas. Ainda, o presente invento é vantajosamente operado em sistemas bifásicos sólido-líquido ou líquido-líquido, o que reduz a exposição do epóxido ao meio aquoso, reduzindo, portanto, sua taxa de hidrólise espontânea. Tal fato, ainda, permite a supressão de uma etapa de purificação do produto uma vez que o epóxido (reagente) e o diol (produto) se alocam em fases distintas, o que não é descrito no trabalho acima.

Já o trabalho de Monterde, Lombard, Archelas, Cronin, Arand e Frutoss (2004) apresenta a hidrólise de quatro epóxidos diferentes (óxidos de *orto*, *meta* e *para*-cloroestireno) por uma EH de *Solanum tuberosum* (batata). A reação se dá em meio “salt free” (água, sem o tampão), utilizando DMSO ou DMF como co-solvente para auxiliar a solubilização dos substratos. O presente invento, no entanto, não utiliza DMSO e DMF como co-solventes, os quais apesar de facilitarem o acesso da enzima ao substrato, são de difícil remoção ao final do processo e não evitam a hidrólise espontânea do epóxido, que pode não ser negligenciável em reações mais lentas. Etapas de extração com solventes orgânicos comuns, como acetato de etila, são ineficientes visto que carregam, junto com os produtos reacionais, os co-solventes.

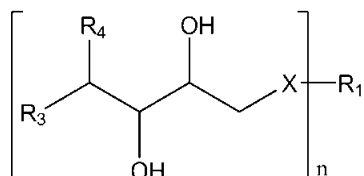
Além disso, possuem temperaturas de ebulição elevadas dificultando também o processo de evaporação para isolamento dos produtos. Ademais, a presente invenção é aplicável tanto para epóxidos terminais, como os do trabalho citado, quanto para epóxidos não terminais.

5                   No trabalho de Yildirim, Tükel, Alagöz e Alptekin (2011), foi empregada uma EH de *Aspergillus niger*, imobilizada em suporte sólido (Eupergit C 250 modificado com etilenodiamina e glutaraldeído) por formação de uma base de Schiff, na hidrólise do óxido de estireno. A reação ocorre, portanto, em um meio bifásico sólido-líquido e emprega DMSO como co-solvente. Após a reação ser completada, a EH imobilizada é recuperada por filtração e o meio reacional é extraído com acetato de etila. Os produtos reacionais são, então, purificados por cromatografia em coluna. A temperatura ótima de reação determinada e utilizada no trabalho foi de 40 °C. O presente invento, ao contrário do processo descrito no trabalho, evita o contato constante do epóxido com a água por imobilização do epóxido e não da enzima, impedindo elevadas taxas de hidrólise espontânea do mesmo. Nas condições de temperatura adotada no trabalho, a hidrólise espontânea no meio é ainda mais acentuada. Ainda, o presente invento opera tanto sobre epóxidos terminais quanto sobre epóxidos não terminais sem o emprego de co-solventes e dispensando etapas de purificação pós-reação.

20                   O trabalho de Karboune, Archelas e Baratti (2009) apresenta o emprego de uma EH de *A. niger* imobilizada nas resinas Accurel EP 100 e DEAE-cellulose para hidrólise do óxido de *p*-cloro-estireno. Neste trabalho foram empregados os solventes orgânicos heptano ou heptano:dioxano em diversas proporções, o que evita a hidrólise espontânea do epóxido no meio reacional. Nada foi relatado sobre a atuação desta EH sobre outros esqueletos de epóxidos. O presente invento, conforme já discutido, pode atuar em epóxidos terminais e não terminais. Além disso, a EH descrita no trabalho não é enantioconvergente: a conversão reacional não deve, portanto, ultrapassar 50%. Diferentemente, o presente invento envolve uma catálise de epóxidos de maneira régio e enantiosseletiva, levando à produção de dióis vicinais com razoável pureza enantiomérica e podendo alcançar conversões de até 100%. Ademais, o presente invento, por empregar meios bifásicos, contorna a etapa de purificação necessária no

trabalho exposto, dado que, no processo descrito no mesmo, o substrato e o produto permanecem na mesma fase reacional.

O documento WO2006108771, depositado em 03/04/2006, apresenta um processo para obtenção de polióis a partir de epóxidos usando EH de diversas fontes microbianas, com especial atenção para a EH recombinante e comercial de *Aspergillus niger* (Fluka 71832). O processo se dá em meio líquido (tampão e octanol) ou com o epóxido polimerizado. A principal aplicação desta patente é a obtenção final de polímeros funcionais do tipo polioliol, protegendo substratos contendo como o substituinte divalente X um grupo éter, éster, amino ou amido, grupos reativos polimerizáveis como R<sub>1</sub>, e H ou grupamentos C1-C4 alquil nos radicais R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub>, conforme indicado na fórmula abaixo.



No entanto, os autores não protegem sequências primárias ou produção de novas EHs, mas somente a aplicação de EHs já conhecidas. Na presente invenção, entretanto, protegemos a sequência primária de uma nova EH de *Aspergillus brasiliensis* CCT 1435, recombinante e expressa em *E. coli*, assim como a sua aplicação na obtenção de dióis vicinais a partir de diversos epóxidos, os quais tem como principal finalidade a produção de intermediários sintéticos chaves de compostos com atividade biológica. Além disso, no documento WO2006108771 não é reivindicado a obtenção de dióis com elevada pureza enantiomérica, mas somente racêmicos. Na presente invenção, entretanto, tem-se como principal aplicação a produção de dióis enantiomericamente puros ou enriquecidos. Ainda, a invenção citada não utiliza sistemas bifásicos sólido-líquido, onde o epóxido está adsorvido em na resina sólida, ou sistemas líquido-líquido, onde o epóxido encontra-se alocado em uma fase orgânica, como é feito no presente invento. O processo do documento de patente consiste somente na hidrólise de um epóxido com posterior polimerização do diol formado ou polimerização do epóxido com posterior hidrólise do polímero sólido funcionalizado.

O documento WO200706907, depositado em 14/04/06, protege o processo de obtenção de um epóxido interno ou um diol interno opticamente ativo por meio de epóxido hidrolase em que, o epóxido interno pode ser *cis*-2,3-dissubstituído, os substituintes do epóxido podem ser um aril, um aril-alquil ou um acil e a reação se passa em meio líquido (podendo conter um solvente orgânico). Esta patente somente protege a obtenção de epóxidos e dióis internos enantiomericamente enriquecidos. O presente invento, todavia, permite a obtenção de dióis internos e externos com elevada pureza enantiomérica em um processo régio e enantiosseletivo, utilizando uma única EH recombinante. Ainda, destaca-se que o documento de patente protege a utilização de sistemas bifásicos líquido-líquido onde uma das fases é um solvente orgânico imiscível com a fase aquosa. O presente invento, no entanto, além disto permite a utilização de sistemas bifásicos sólido-líquido, onde o substrato encontra-se adsorvido em uma resina sólida, o que também reduz a taxa de hidrólise espontânea e suprime a etapa de purificação do produto uma vez que o epóxido (reagente) e o diol (produto) se alocam em fases distintas, o que não é descrito no trabalho acima.

Diante do exposto, a presente invenção apresenta vantagens sob vários aspectos. Primeiro porque propõe uma epóxido hidrolase recombinante de *Aspergillus brasiliensis* que atua em faixa de pH (6-9) e temperatura (30-40°C) adequadas para o processo. Esta enzima possui estrutura primária inédita e é a primeira EH recombinante produzida no Brasil. Além disso, o presente invento descreve um processo de obtenção de dióis vicinais a partir de epóxidos racêmicos internos e externos com elevada pureza enantiomérica, em um processo enantioconvergente que emprega uma epóxido hidrolase recombinante. Outro ponto crucial é que as reações da presente invenção ocorrem em sistemas bifásicos o que evita a hidrólise espontânea dos epóxidos no meio reacional pela diminuição do contato do epóxido com a fase aquosa. Outra vantagem da utilização de sistemas bifásicos em reações com EHs é a possibilidade de evitar a etapa de purificação do produto. Finalmente, o presente invento é versátil, convertendo diversos esqueletos de substratos a seus respectivos dióis vicinais

Com destaque para os produtos obtidos na presente invenção, tais dióis vicinais foram obtidos com pureza superior a 95% e conversões de até 100%. Dentre as aplicações dos dióis vicinais, a principal delas está relacionada com seu emprego como

intermediário sintético chave na produção de fármacos, os quais são utilizados, por exemplo, no tratamento de doenças cardiovasculares, como hipertensão e arritmia, e no combate a tumores.

### Breve descrição da invenção

5           A presente invenção se refere a uma enzima epóxido hidrolase recombinante do fungo *Aspergillus brasiliensis* CCT1435 caracterizada por ser a SEQ ID nº 1. É objeto adicional um processo de hidrólise enzimática de epóxidos racêmicos, empregando a enzima epóxido hidrolase recombinante, em sistemas bifásicos. Além disso, a presente invenção refere-se também aos dióis vicinais obtidos pelo processo  
10           descrito, com pureza superior a 95% e conversões de até 100%, e seus usos.

          A invenção descreve um processo de hidrólise que compreende o emprego da enzima epóxido hidrolase recombinante em um sistema bifásico, sólido:líquido ou líquido:líquido. O substrato empregado no processo pode ser um epóxido de fórmula geral (I) onde  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  e  $R_4$  podem ter substituintes do tipo  
15           hidrogênio, alquil, alquenil, alquinil, cicloalquil, cicloalquenil, héterociclos, aril, arilalquil, alcóxido, arilóxido, acil, alcóxicarbonil, derivados de acila (ésteres, amidas, haletos, ácidos), entre outros. O número de substituintes no epóxido pode ser um ou mais, e os substituintes podem ser iguais ou diferentes. Todas estes radicais podem conter substituintes, como grupos hidróxi, amino, halo, carbóxi, sulfeto, entre outros.  
20           Opcionalmente,  $R_1$  e  $R_3$  ou  $R_2$  e  $R_4$  juntos podem formar um carbociclo ou heterociclo. Nas reações em sistema bifásico sólido:líquido o substrato está adsorvido em um suporte e para as reações em sistema líquido:líquido o substrato é adicionado em um solvente orgânico. Para ambas as condições, a mistura reacional é mantida sob agitação e aquecimento e os produtos extraídos com solventes orgânicos no final do  
25           processo.

### Breve descrição das figuras

          A estrutura e operação da presente invenção, juntamente com vantagens adicionais da mesma podem ser mais bem entendidas mediante referência às figuras em anexo e à seguinte descrição:

30           A Figura 1 mostra a curva de calibração da cromatografia de gel filtração utilizada para determinação da massa molecular da EH AbCCT1435. A massa

molecular estimada está indicada na linha de tendência como um quadrado maior, sendo 79 kDa para o dímero. A massa molecular do monômero desta proteína é de 44,3 kDa, logo a massa molecular esperada para o dímero seria 88,6 kDa.

5 A Figura 2 mostra um esquema do ensaio fluorogênico, baseado na liberação do ânion umbeliferila (**3**), utilizado para detecção da atividade de EHs.

A Figura 3 apresenta as curvas de otimização das condições reacionais, destacando o pH e a temperatura ótimos de atuação catalítica da EH AbCCT1435 para a hidrólise do substrato **1**.

10 A Figura 4 mostra o gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk com ajuste linear e curva de Michaelis-Menten com ajuste não-linear utilizados para obtenção dos parâmetros cinéticos da hidrólise do substrato **1** pela EH AbCCT1435.

A Figura 5 apresenta os substratos (epóxidos) avaliados nos exemplos citados nesta invenção. Após ação catalítica da EH AbCCT1435 os epóxidos são convertidos aos seus respectivos dióis vicinais.

15 A Figura 6 mostra os cromatogramas de CG-DIC de: A) óxido de estireno racêmico (*R/S*-**4**, comercial); B) 1-fenil-1,2-etanodiol racêmico (*R/S*-**4a**, sintético); C) 1-fenil-1,2-etanodiol obtido na presença da EH AbCCT1435 em sistema reacional bifásico sólido-líquido.

20 A Figura 7 apresenta o esquema da hidrólise enantioconvergente do óxido de estireno racêmico (*S/R*-**4**). A EH catalisa a adição nucleofílica regioseletiva de uma molécula de água na posição  $\beta$  do enantiômero (*R*)-**4** e na posição  $\alpha$  do enantiômero (*S*)-**4**. No primeiro caso observa-se a retenção e no segundo caso a inversão de configuração do diol formado, ambos levando a formação de (*R*)-**4a**.

25 A Figura 8 mostra os cromatogramas de CG-DIC de: A) *cis*-3-fenil-2,3-epóxiopropanoato de etila racêmico (*R/S*-**5**, comercial); B) *cis*-3-fenil-2,3-diidroxiopropanoato de etila racêmico (*R/S*-**5a**, sintético); C) *cis*-3-fenil-2,3-epóxiopropanoato de etila recuperado da reação na presença da EH AbCCT1435 em sistema reacional bifásico sólido-líquido D) *cis*-3-fenil-2,3-diidroxiopropanoato de etila obtido na presença da EH AbCCT1435 em sistema reacional bifásico sólido-líquido.

30 A Figura 9 apresenta os cromatogramas de CG-DIC de: A) óxido de estireno (**4**) recuperado da reação na presença da EH AbCCT1435 em sistema

reacional bifásico líquido-líquido com heptano como fase orgânica reacional; *B*) (*R*)-1-fenil-1,2-etanodiol (**4a**) obtido a partir da hidrólise do (*R/S*)-óxido de estireno (**4**) pela EH AbCCT1435 em sistema reacional bifásico líquido-líquido com heptano como fase orgânica reacional; *C*) óxido de estireno (**4**) recuperado da reação na presença da EH AbCCT1435 em sistema reacional bifásico líquido-líquido com iso-octano como fase orgânica reacional; *D*) (*R*)-1-fenil-1,2-etanodiol (**4a**) obtido a partir da hidrólise do (*R/S*)-óxido de estireno pela EH AbCCT1435 em sistema reacional bifásico líquido-líquido com iso-octano como fase orgânica reacional.

A Figura 10 apresenta os cromatogramas de CG-DIC do (*R*)-1,2-octanodiol (**6a**) obtido a partir da hidrólise do (*R/S*)-1,2-epóxi octano (**6**) pela EH AbCCT1435 em sistema reacional bifásico líquido-líquido com A) heptano e B) iso-octano como fase orgânica reacional;

A Figura 11 mostra os cromatogramas de CG-EM da reação de hidrólise do óxido de estireno em meio bifásico líquido-líquido pela EH AbCCT1435. A) Fase aquosa extraída com acetato de etila; B) Fase orgânica da reação.

### Breve Descrição dos Anexos

- O Anexo 1 apresenta o gel de SDS-PAGE 12% relativo a purificação da EH AbCCT1435, onde **M** é o marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas); **1** é a fração insolúvel; **2** é a fração solúvel; **3** corresponde ao fluxo inicial (*flow-through*); **4, 5, 6, 7 e 8** são eluições com 20 mM, 50 mM, 75 mM, 250 mM e 500 mM de imidazol respectivamente.

- O Anexo 2 apresenta o espectro de dicroísmo circular obtido para a EH AbCCT1435 purificada em tampão fosfato (10 mM, pH 7,2) na condição oxidada (linha preta) e reduzida com TCEP (linha vermelha).

### Descrição detalhada da invenção

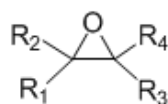
A presente invenção descreve um processo enzimático de hidrólise de epóxidos racêmicos para a obtenção de dióis vicinais enantiomericamente puros ou enriquecidos, empregando uma enzima recombinante do fungo *Aspergillus brasiliensis* CCT1435 em um sistema bifásico.

A enzima epóxido hidrolase (EH AbCCT1435) recombinante objeto de proteção do presente invento é caracterizada por ser a SEQ ID nº 1, apresentando uma

adição de 20 aminoácidos, sendo que 6 são Histidinas e 14 são aminoácidos codificados pelas bases que compõem os múltiplos sítios de clonagem, ambos adicionados ao N-Terminal da proteína. A EH AbCCT1435 recombinante é empregada no processo descrito abaixo.

É objeto da presente invenção um processo de hidrólise enzimática de epóxidos que compreende o emprego da enzima EH AbCCT1435 recombinante em um sistema bifásico, sólido:líquido ou líquido:líquido.

O substrato empregado no processo pode ser um epóxido de fórmula geral (I)



(I)

onde:

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub> podem ser substituintes do tipo hidrogênio, alquil, alquenil, alquinil, cicloalquil, cicloalquenil, héterociclos, aril, arilalquil, alcóxido, arilóxido, acil, alcóxicarbonil, derivados de acila (ésteres, amidas, haletos, ácidos, entre outros), entre outros. O número de substituintes no epóxido pode ser um ou mais, e os substituintes podem ser iguais ou diferentes. Todas estes radicais podem conter substituintes, como grupos hidróxi, amino, halo, carbóxi, sulfeto, entre outros. Opcionalmente, R<sub>1</sub> e R<sub>3</sub> ou R<sub>2</sub> e R<sub>4</sub> juntos podem formar um carbociclo ou heterociclo.

Para as reações em sistema bifásico sólido:líquido são adicionados 5 a 50 mg, preferencialmente 20 mg de substrato, que está adsorvido em 50 a 500 mg, preferencialmente 200 mg, de um suporte selecionado dentre resina sólidas poliméricas apolares ou moderadamente polares, com momento de dipolo entre 0,3 e 1,8; área superficial entre 330 a 900 m<sup>2</sup>/g; e diâmetro de poro entre 40 e 300 Å, preferencialmente uma resina de éster acrílico ou poliaromática hidrofóbica, em 0,5 a 10 mL de tampão fosfato contendo 0,05 a 1 mg/mL, preferencialmente 0,3 mg/mL de EH AbCCT1435.

Para as reações em sistema líquido:líquido são adicionados 1 a 100 mg, preferencialmente 10 mg de substrato, 0,5 a 50 mL, preferencialmente 3 mL de solvente orgânico, selecionado dentre solventes imiscíveis com água e com índices de

polaridade entre 1 e 5, preferencialmente os alcanos acíclicos com índices de polaridade próximo a 0, e 0,1 a 10 mL, preferencialmente 1 mL, de solução de EH AbCCT1435 a 0,1 a 1 mg/mL, preferencialmente 1 mg/mL, em tampão fosfato.

Para ambas as condições, a mistura reacional é mantida sob agitação entre 100 e 300 rpm, preferencialmente 250 rpm, e 30 a 40 °C, preferencialmente 35°C, por 0,5 a 48 h, preferencialmente 24 h.

Após este período, as fases reacionais são extraídas com solventes orgânicos de polaridade entre 1 e 5, preferencialmente acetato de etila, e analisadas por CG-EM e CG-DIC com coluna quiral a base de  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina,  $\gamma$ -ciclodextrina e/ou derivados, para avaliação da conversão e enantiosseletividade, respectivamente.

#### Exemplo 1: Expressão da EH AbCCT1435 recombinante em *E. coli*

Oligonucleotídeos moldes (*primers*) foram desenhados a partir das sequências de outras EHs do gênero *Aspergillus* depositadas em banco de dados (GenBank, nº acesso: DQ458230; AJ238459.1; DQ443737.1).

*Primer direto:* 5' ATA.CATATG.ATGTCTGCTCCGTTCCGGC 3';

*Primer reverso:* 5'ATA.CTCGAG.CTACTTCTGCCACACCTGCTC 3'.

A amplificação da sequência alvo foi feita por PCR e os produtos amplificados foram purificados utilizando o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). Os fragmentos amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*, e quantificados a 260 nm.

A clonagem da EH AbCCT1435 foi realizada em vetor plasmidial pET28a (*Novagen*) digerido com as mesmas enzimas de restrição (*NdeI* e *XhoI*). A ligação do inserto ao vetor pET28a foi feita com a enzima T4 DNA ligase (*Invitrogen*). Posteriormente, realizou-se a transformação em *Escherichia coli* DH10B. A verificação do plasmídeo recombinante foi realizada através de amplificação por PCR de colônias transformadas, utilizando *primers* flaqueadores do gene no vetor: T7 *Promoter* (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') e T7 *Terminator* (5'-GCTAGTTATTGCT-CAGCGG-3'). A sequência completa de nucleotídeos da EH AbCCT1435 foi obtida em sequenciador ABI 3500 (Applied Biosystems).

A linhagem competente de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta foi transformada com o vetor de um clone positivo em DH10B. Os clones de expressão foram armazenados à -70°C em meio 2YT+HMFM (36 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 13,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,4 mM citrato de sódio, 0,4 mM MgSO<sub>4</sub>, 6,8 mM(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4,4% v/v de glicerol),  
5 suplementado com 30 µg/mL de canamicina e 34 µg/mL de cloranfenicol.

A indução da expressão da EH AbCCT1435 se deu através da adição de IPTG (0,4 mM, β-D-1-tiogalactopiranosídeo de isopropila) ao meio de cultivo (LB acrescido de 30 µg/mL de canamicina, 34 µg/mL de cloranfenicol à 37°C e 300 rpm), após o inóculo atingir a fase exponencial de crescimento (DO<sub>600nm</sub> ~ 0,8). A indução da  
10 expressão gênica se deu por 16h a 25 °C e 200 rpm.

#### Exemplo 2. Purificação da EH AbCCT1435 recombinante em *E. coli*

As células cuja expressão proteica foi induzida por IPTG foram coletadas por centrifugação, e a ruptura celular foi realizada por sonicação em tampão (tampão A: 50 mM de fosfato de sódio, pH 7,2), 2 mM de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila),  
15 15 mM de β-mercaptoetanol, 0,1% (v/v) de Tween-20 e 1 mg/mL de lisozima. A remoção dos restos celulares foi feita por centrifugação (20000g, 4°C, 50 min). A purificação proteica foi realizada por cromatografia de afinidade ao níquel (resina Ni-NTA-Qiagen) em tampão (tampão B: 50 mM de fosfato de sódio: 250 mM NaCl, pH 7,2) com gradiente crescente de imidazol (20 50, 75, 250 e 500 mM).

20 A expressão da EH AbCCT1435 recombinante foi avaliada por SDS-PAGE com posterior coloração em “*Coomassie Blue*” (Anexo 1); e a concentração foi obtida por absorbância a 280 nm, tendo-se como base o coeficiente de extinção molar teórico da proteína (*ProtParam*, *ExpASy Proteomics Server* ), apresentando uma massa de aproximadamente 44 kDa .

25 Exemplo 3. Cromatografia por gel filtração da EH AbCCT1435 recombinante em *E. coli* purificada.

A cromatografia por gel filtração foi realizada em coluna Superdex 200 10/300 GL (*GE Healthcare*), equilibrada com 2 volumes de coluna (48mL) com o tampão fosfato de sódio (50 mM de fosfato de sódio: 250 mM NaCl, pH 7,2). Um volume  
30 de 250 µL de amostra foi injetada a fluxo de 0,5 mL/min. Os padrões de calibração foram: HMW (*High Molecular Weight*) e LMW (*Low Molecular Weight*) *Gel Filtration*

*Calibration Kit* (GE *Healthcare*), contendo as proteínas: Ferritina (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Conalbumina (75 kDa), Ovalbumina (43 kDa), Anidrase Carbônica (29 kDa), Ribonuclease A (13,7 kDa), Aprotinina (6,5 kDa) e Blue Dextran 2000.

5 A cromatografia por gel filtração mostrou que a EH AbCCT1435 se encontra monodispersa em solução (Figura 1) como um homodímero de 79 kDa, com cada monômero apresentando aproximadamente 44 kDa.

Exemplo 4. Dicroísmo circular da EH AbCCT1435 recombinante em *E. coli* purificada.

A técnica de dicroísmo circular foi utilizada para estimar e verificar a presença de estrutura secundária da EH AbCCT1435. Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados no Laboratório de Espectrometria e Calorimetria (LEC) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, utilizando o espectropolarímetro Jasco J-180. As medidas foram feitas de 190 a 260 nm, em cubetas de 1 mm de caminho óptico.. A EH AbCCT1435 foi analisada em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,2 na concentração de 4  $\mu$ M na ausência e presença do agente redutor TCEP (1 mM, *tris*-(2-carboxietil)fosfina).

Os experimentos de dicroísmo circular indicaram que a EH AbCCT1435 apresenta estrutura secundária bem definida, havendo predomínio de  $\alpha$ -hélices (Anexo 2).

Exemplo 5. Alinhamento da estrutura primária de proteínas homólogas a EH AbCCT1435.

A sequência de aminoácidos da proteína EH AbCCT1435 foi comparada com a sequência de outras proteínas homólogas disponíveis no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O múltiplo alinhamento foi realizado utilizando o servidor ClustalW2, com edição posterior feito pelo programa GeneDoc.

25 Exemplo 6: Atividade catalítica da EH AbCCT1435 frente a substratos fluorogênicos

O composto *O*-(3,4-epóxibutil)umbeliferona (**1**) foi utilizado como substrato fluorogênico para a detecção da atividade da EH AbCCT1435 (Figura 2), e para otimização dos parâmetros reacionais, como pH e temperatura. Os ensaios foram realizados em placas de polipropileno de 96 poços, incubadas a 30 °C em leitor de placas *FlashScan 530 Analytic Jena* e as leituras de fluorescência foram realizadas a cada 5 min por 90 min, utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de

390 nm e 460 nm, respectivamente. Os resultados foram comparados a reações controles positivas (100% de conversão) e negativas com (0% de conversão). As condições de reação foram:

*Ensaio:* 100  $\mu$ M de **1**, 2 mM de NaIO<sub>4</sub>, 2 mg/mL de BSA e 0,05 mg/mL de EH AbCCT1435, em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,2, 0,1% v/v de Tween-20).

*Controle Positivo:* 100  $\mu$ M de **2**, 2 mM de NaIO<sub>4</sub>, 2 mg/mL de BSA e 0,05 mg/mL de EH AbCCT1435, em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,2, 0,1% v/v de Tween-20).

*Controle negativo:* 100  $\mu$ M de **1**, 2 mM de NaIO<sub>4</sub> e 2 mg/mL de BSA, em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,2, 0,1% v/v de Tween-20).

As condições ótimas de ação enzimática foram determinadas variando-se a temperatura de 25 a 45 °C, e o pH de 4 a 10 (pH 4-5: tampão acetato, pH 6-8: tampão fosfato de sódio, pH 9-10: tampão glicina-NaOH, todos a 50 mM e 0,1% v/v de Tween-20).

Os parâmetros da cinética enzimática foram determinados variando-se a concentração do substrato **1** entre 10 e 1500  $\mu$ M e o tempo reacional de 0 a 90 min. Os valores de  $K_M$ ,  $V_{m\acute{a}x}$ ,  $k_{cat}$  e  $\epsilon$  foram obtidos a partir das velocidades iniciais de cada condição e posterior ajuste linear do gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk ou ajuste não-linear da curva de Michaelis-Menten.

A EH AbCCT1435 hidrolisou 100% do substrato **1** em 30 min nas condições reacionais gerais utilizadas. A atuação catalítica ótima desta enzima ocorre na faixa de pH 6-9, preferencialmente 7,2, e de temperatura 30-40, preferencialmente 35 °C (Figura 3).

Os parâmetros da cinética enzimática foram:  $K_M = 495 \mu$ M,  $V_{m\acute{a}x} = 0,24 \mu$ M/s,  $k_{cat} = 1,1 \text{ s}^{-1}$ ,  $\epsilon = 2,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Figura 4), demonstrando que esta enzima apresenta uma afinidade moderada pelo substrato **1**.

### Exemplo 3: Atividade da EH AbCCT1435 em sistemas bifásicos sólido-líquido

As reações em sistema sólido-líquido foram realizadas em frascos Erlenmeyer (25 mL) contendo tampão fosfato de sódio (2 mL, 50 mM, pH 7,2; 0,1% v/v de Tween-20), EH AbCCT1435 (1mL, 1 mg/mL em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,2; 0,1% v/v de Tween-20) e o substrato (20mg) adsorvido na resina acrílica Amberlite XAD-7 HP( 200 mg).

Todas as reações foram comparadas ao seu respectivo controle negativo [substrato (20 mg) adsorvido na resina acrílica Amberlite XAD-7 HP (200 mg) em tampão fosfato de sódio (3 mL, 50 mM, pH 7,2; 0,1% v/v de Tween-20)] de forma a monitorar a hidrólise espontânea do epóxido no meio reacional.

5            Para adsorção do substrato na resina, dilui-se o epóxido (100 mg) em de acetato de etila (100 mL). Em seguida, adiciona-se a resina (1,0 g) e a mistura é mantida sob repouso por 12 h à temperatura ambiente. Após este período o solvente é evaporado e o epóxido suportado é utilizado nas reações.

10           Para ativação e limpeza da resina utilizam-se lavagens exaustivas com água destilada e acetona (nesta sequência), seguido de secagem sob pressão reduzida.

Para avaliar a atividade da EH AbCCT1435 neste sistema bifásico sólido-líquido foram utilizados os substratos: óxido de estireno (**4**) e 3-fenil-2,3-epóxiopropanoato de etila (**5**) (Figura 5).

15    *a) Óxido de estireno*

A hidrólise do óxido de estireno (**4**) na presença da EH AbCCT1435 no sistema sólido:líquido em questão, levou à formação do (*R*)-1-fenil-1,2-etanodiol com 86% de excesso enantiomérico em 24h. Observou-se também que o epóxido remanescente permaneceu racêmico durante todo o curso reacional (Figura 6).

20           Tais resultados indicam que a EH AbCCT1435 catalisa esta reação de maneira régio e enantiosseletiva. Logo, este processo pode ser descrito como enantioconvergente, se diferenciando dos processos de resolução cinética por permitir a obtenção do respectivo diol com elevada pureza enantiomérica e conversões superiores a 50% (Figura 7).

25           Vale ressaltar que não foi observada hidrólise espontânea do óxido de estireno no meio reacional utilizado.

*b) 3-fenil-2,3-epóxiopropanoato de etila*

A partir da hidrólise do *cis*-3-fenil-2,3-epóxiopropanoato de etila (**5**) na presença da EH AbCCT1435 no sistema sólido:líquido em questão foi obtido o 3-fenil-2,3-diidróxiopropanoato de etila com 96% de excesso enantiomérico. O epóxido

30

remanescente, assim como no caso do óxido de estireno, permaneceu racêmico (Figura 8).

Os resultados obtidos também indicam que a EH AbCCT1435 catalisa a hidrólise enantioconvergente do *cis*-3-fenil-2,3-epóxiopropanoato.

5 Não foi observada hidrólise espontânea do *cis*-3-fenil-2,3-epóxiopropanoato de etila no meio reacional.

#### Exemplo 4: Atividade da EH AbCCT1435 em sistemas bifásicos líquido-líquido

As reações em sistema líquido-líquido foram realizadas em frascos vedados de penicilina (10 mL) contendo solução tampão fosfato de sódio (0,5 mL, 50 mM, pH 7,2; 0,1% v/v de Tween-20), solução da EH AbCCT1435 (0,5 mL à 1 mg/mL em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,2; 0,1% v/v de Tween-20), solvente orgânico imiscível com água (3 mL) e o substrato (10 µL).

A hidrólise espontânea do epóxido no meio reacional foi monitorada através de controles negativos [substrato (10 µL) em solução tampão fosfato de sódio (1 mL, 50 mM, pH 7,2; 0,1% v/v de Tween-20) e 3 mL de solvente orgânico imiscível com água].

Foram testados os seguintes solventes orgânicos: heptano, iso-octano, tolueno, acetato de etila e álcool iso-amílico.

Para avaliar a atividade da EH AbCCT1435 nos sistemas bifásicos líquido-líquido foram utilizados os substratos: óxido de estireno (**4**) e 1,2-epóxiocetano (**6**) (Figura 5).

##### a) *Óxido de estireno*

As reações em sistema bifásico líquido-líquido foram efetivas na hidrólise enzimática do óxido de estireno (**4**) quando utilizados heptano ou iso-octano como fase orgânica reacional. Para estes casos, foi observada a formação do (*R*)-1-fenil-1,2-etanodiol na presença da EH AbCCT1435. Os excessos enantioméricos foram de 66% e 84%, respectivamente. Para o epóxido remanescente foram obtidos excessos enantioméricos de 30% e 36% (Figura 9).

Estes resultados, apesar de discretos, novamente apresentam indícios da possível atuação enantioconvergente da EH AbCCT1435 na hidrólise do óxido de estireno.

b) *1,2-epóxiocetano*

A hidrólise enzimática do 1,2-epóxiocetano (**6**) foi realizada com sucesso nos sistemas bifásicos líquido:líquido envolvendo heptano ou iso-octano como fase orgânica reacional. Observou-se a formação do (*R*)-1,2-octanodiol na presença da EH AbCCT1435, com excessos enantioméricos de 48% e 58%, respectivamente (Figura 10).

Exemplo 5: Extração dos dióis formados e recuperação do epóxido remanescente do meio reacional

a) *Sistemas bifásico sólido-líquido*

As resinas aplicadas a estes sistemas tendem a adsorver com maior eficiência compostos orgânicos com polaridades medianas a baixas. Os dióis formados nas reações destacadas nesta invenção possuem polaridade superior ao dos seus respectivos epóxidos de origem, tendendo a se deslocar da fase sólida (resina) para a fase líquida (solução tampão).

Logo, para extração dos produtos (dióis), a mistura reacional foi filtrada, e a fase líquida foi saturada com NaCl e extraída com acetato de etila (2 x 2 mL). Para maior eficiência extrativa, após adição de NaCl e de acetato de etila, a mistura foi agitada em vórtex e centrifugada a 2000 rpm por 5 min para quebra da emulsão formada. As fases orgânicas obtidas foram combinadas, secas sob MgSO<sub>4</sub> anidro e filtradas para posterior análises cromatográficas.

A recuperação do epóxido remanescente foi realizada através da extração da fase sólida, previamente filtrada, com acetato de etila (2 x 2 mL, repouso por 30 min), e posterior filtração.

b) *Sistemas líquido-líquido*

Neste tipo de sistema bifásico os compostos orgânicos com polaridades medianas a baixas tendem a se alocar na fase orgânica, neste caso os epóxidos. Já os dióis formados, devido as suas polaridades superiores tendem a se deslocarem da fase orgânica para a fase aquosa (solução tampão) reacional.

Assim, para extração dos produtos (dióis) e recuperação dos reagentes (epóxidos) foi realizada, inicialmente a separação das fases reacionais.

Os dióis foram removidos da fase aquosa através de saturação com NaCl, seguido de extração com acetato de etila (2 x 1 mL). Assim, como no procedimento anterior, após adição de NaCl e de acetato de etila, a mistura foi agitada em vórtex e centrifugada a 2000 rpm por 5 min para quebra da emulsão formada. Por fim, as fases orgânicas foram combinadas, secas sob MgSO<sub>4</sub> anidro e filtradas para posteriores análises cromatográficas.

O epóxido remanescente foi recuperado diretamente da fase orgânica, uma vez que os solventes heptano e iso-octano são compatíveis com cromatógrafos gasosos e facilmente removidos por evaporação.

A Figura 11 mostra como este sistema é eficiente para a separação *in situ* dos componentes reacionais, o que evita as etapas de purificação indesejáveis aos processos industriais.

Exemplo 6: Técnicas cromatográficas utilizadas para determinação de conversões e excessos enantioméricos

a) *Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)*

As análises de CG-EM foram realizadas em cromatógrafo Agilent 6890 acoplado a detector seletivo de massas HP 5973, operando por impacto de elétrons (EI) com energia de ionização de 70 eV, na faixa de *m/z* 50-500. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) com 5% de fenilmetilsiloxano para a separação dos compostos analisados. As análises foram realizadas em fluxo constante de He (1 mL/min), com injetor a 250 °C e detector a 250 °C, e injeções em modo “split” 20:1, utilizando 1,0 µL da solução a ser analisada. As condições de análise (rampas de aquecimento) foram: 80 °C por 3 min, 80 - 290 °C a 20 °C/min, onde permaneceu constante por 5 min.

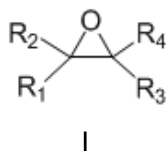
b) *Cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama (CG-DIC)*

A discriminação dos enantiômeros foi realizada em cromatógrafo Agilent 6850, acoplado com detector de ionização de chama (CG-DIC), equipado com injetor automático e coluna capilar de sílica fundida Chrompak®, de fase quiral Chirasil β-ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As análises foram realizadas a pressão constante de 10 psi, com injetor a 180 °C e detector a 250 °C, sendo as injeções feitas no modo com divisor (1:10) utilizando 1 µL da solução a ser analisada. As condições de

análise (rampas de aquecimento) foram: 40 ° C/ 15 min, 40 - 180 ° C a 10 ° C/min, onde permaneceu constante por 5 min.

## REIVINDICAÇÕES

1. Enzima recombinante **caracterizada por** ser a SEQ ID nº 1.
2. Processo de hidrólise enzimática de epóxidos **caracterizado por** empregar a enzima recombinante descrita na reivindicação 1 em um sistema bifásico, sólido:líquido ou líquido:líquido.
3. Processo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** fato do substrato empregado no processo poder ser um epóxido de fórmula geral(I)



onde  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  e  $R_4$  são, independentemente, hidrogênio, alquil, alquenil, alquinil, cicloalquil, cicloalquenil, héterociclos, aril, arilalquil, alcóxido, arilóxido, acil, alcóxicarbonil, derivados de acila, tais como ésteres, amidas, haletos, ácidos, entre outros;

onde  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  e  $R_4$  são os mesmos ou diferentes;

onde  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  e  $R_4$  podem estar opcionalmente substituída com grupos hidróxi, amino, halo, carbóxi, sulfeto, entre outros;

onde  $R_1$  e  $R_3$  ou  $R_2$  e  $R_4$  podem formar opcionalmente um carbociclo ou heterociclo.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelas** reações em sistema bifásico sólido:líquido ocorrer com adição de 5 a 50 mg, preferencialmente 20 mg de substrato adsorvido em 50 a 500 mg, preferencialmente 200 mg, de um suporte, em 0,5 a 10 mL de tampão fosfato contendo de 0,05 a 1 mg/mL, preferencialmente 0,3 mg/mL da enzima recombinante descrita na reivindicação 1.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** fato do suporte ser selecionado dentre resina sólidas poliméricas apolares ou moderadamente polares, com momento de dipolo entre 0,3 e 1,8; área superficial entre 330 a 900 m<sup>2</sup>/g; e diâmetro de poro entre 40 e 300 Å, preferencialmente uma resina de éster acrílico ou poliaromática hidrofóbica.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelas** reações em sistema líquido:líquido ocorrer com adição de 1 a 100 mg, preferencialmente 10 mg de substrato, 0,5 a 50 mL, preferencialmente 3 mL de solvente orgânico e 0,1 a 10 mL, preferencialmente 1 mL, de tampão fosfato contendo de 0,1 a 1 mg/mL, preferencialmente 1 mg/mL da enzima recombinante descrita na reivindicação 1.
7. Processo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** fato do solvente orgânico ser selecionado dentre solventes imiscíveis com água e com índices de polaridade entre 1 e 5, preferencialmente os alcanos acíclicos com índices de polaridade próximo a 0.
8. Processo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pela** mistura reacional obtida nas reivindicações 4 e 6 ser mantida sob agitação entre 100 e 300 rpm, preferencialmente 250 rpm, com temperatura variando entre 30 e 40°C, preferencialmente 35°C, por 0,5 a 48 h, preferencialmente 24 h.
9. Processo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelas** fases reacionais serem extraídas com solventes orgânicos de polaridade entre 1 e 5, preferencialmente acetato de etila.
10. Dióis vicinais **caracterizado por** serem obtidos de acordo com as etapas descritas nas reivindicações de 1 a 9.
11. Dióis vicinais, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado por** serem obtidos com pureza superior a 95% e conversões de até 100%.
12. Uso dos dióis vicinais conforme descritos na reivindicação 10 **caracterizado por** ser empregado como intermediário sintético chave na produção de fármacos, utilizados no tratamento de doenças cardiovasculares, como hipertensão e arritmia, e no combate a tumores.
13. Uso da enzima definida pela SEQ ID nº 1 **caracterizado por** ser empregada em processos de hidrólise de epóxidos.

## **RESUMO**

### **ENZIMA RECOMBINANTE, PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE EPÓXIDOS E DIÓIS VICINAIS ASSIM OBTIDOS**

5           A presente invenção trata de uma enzima recombinante de *Aspergillus  
brasiliensis* associada ao processo de hidrólise enzimática de epóxidos. O emprego  
dessa enzima recombinante garante a obtenção de dióis vicinais quirais, a partir de  
epóxidos racêmicos, de forma régio e enantiosseletiva. Os dióis vicinais  
enantiomericamente puros obtidos são de grande interesse em rotas sintéticas como  
10 intermediário chave na produção de fármacos, os quais são utilizados, por exemplo, no  
tratamento de doenças cardiovasculares, como hipertensão e arritmia, e no combate a  
tumores.

15

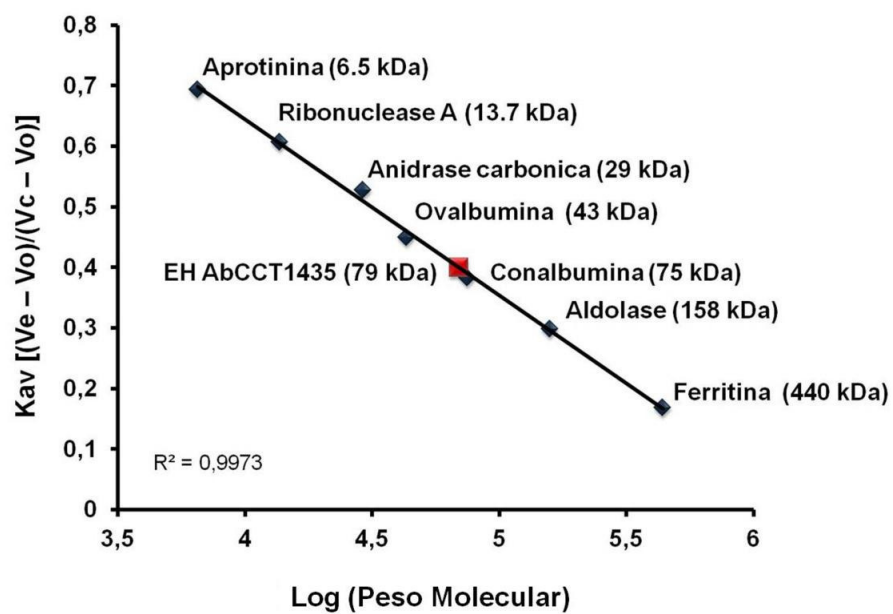


Figura 1

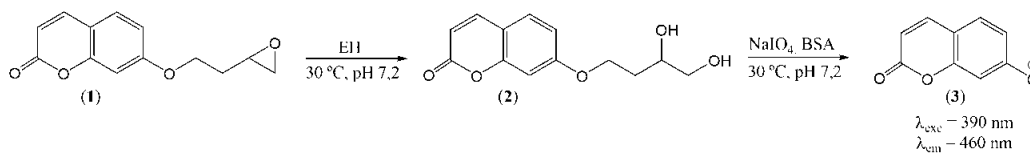


Figura 2

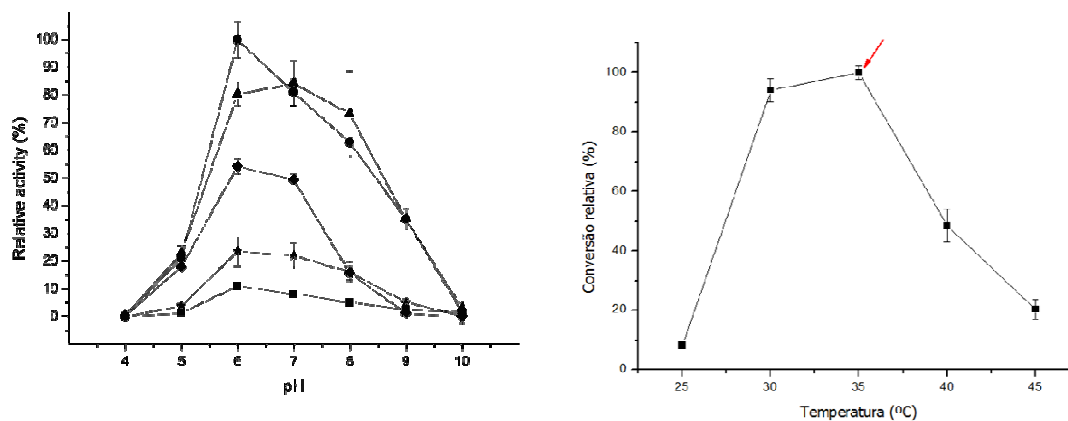
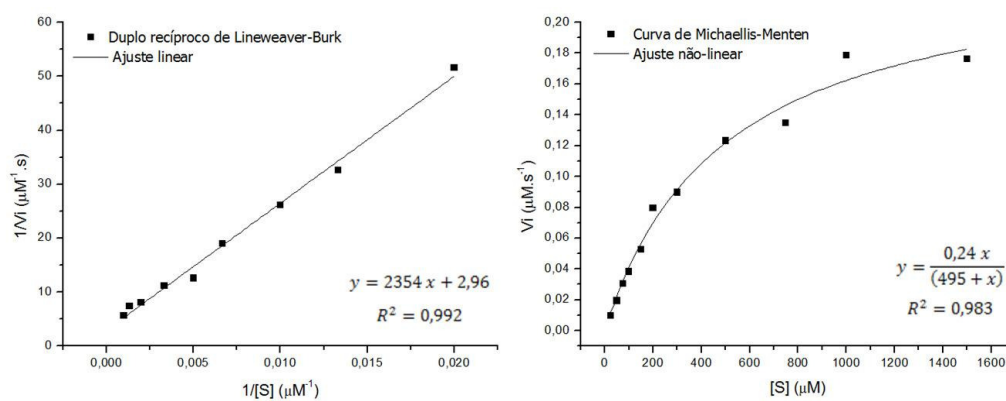


Figura 3



| Parâmetros da Cinética Enzimática |            |                         |                                             |                                      |                                                  |
|-----------------------------------|------------|-------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Substrato                         | Ajuste     | $K_M$ ( $\mu\text{M}$ ) | $V_{\text{máx}}$ ( $\mu\text{M}/\text{s}$ ) | $k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) | $\epsilon$ ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) |
| 3                                 | Linear     | 794                     | 0,34                                        | 1,6                                  | $2,0 \cdot 10^3$                                 |
|                                   | Não-linear | 495                     | 0,24                                        | 1,1                                  | $2,3 \cdot 10^3$                                 |

Figura 4

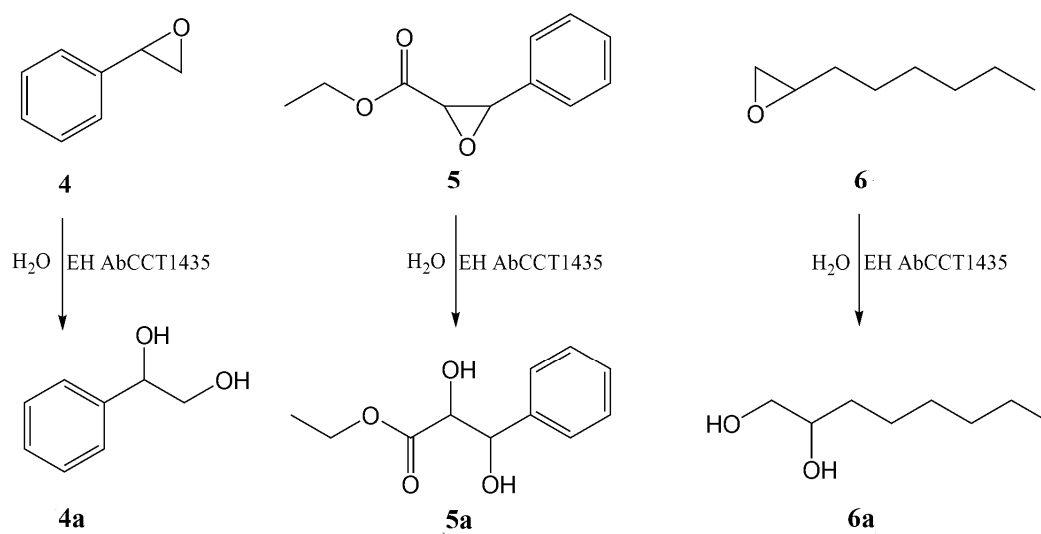


Figura 5

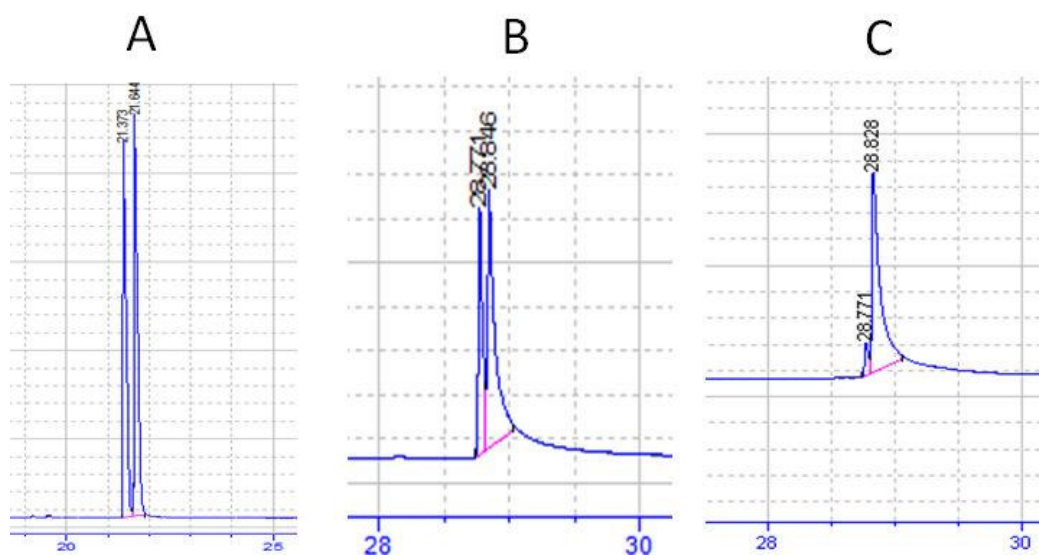


Figura 6

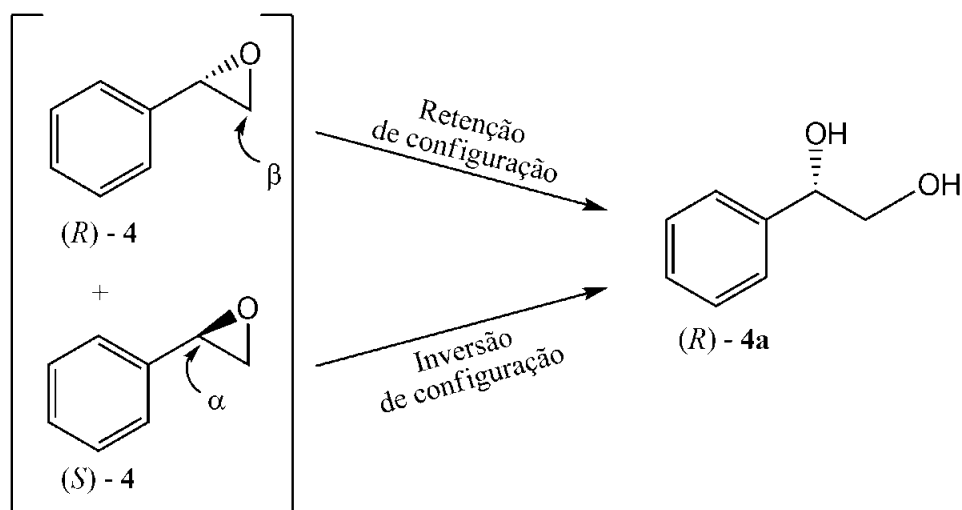


Figura 7

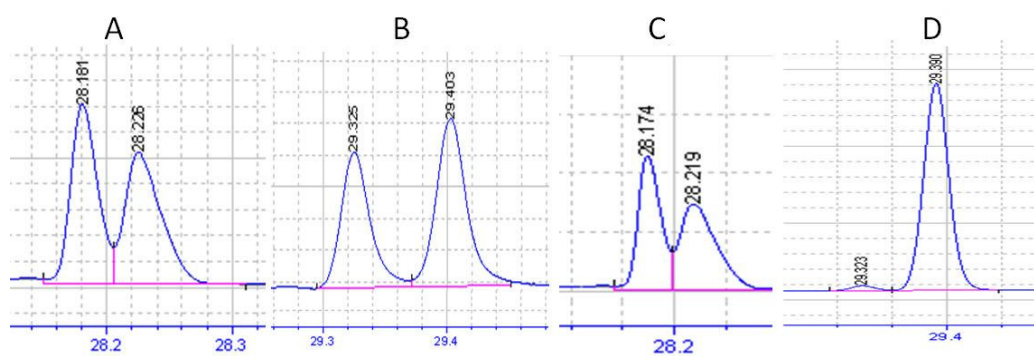


Figura 8

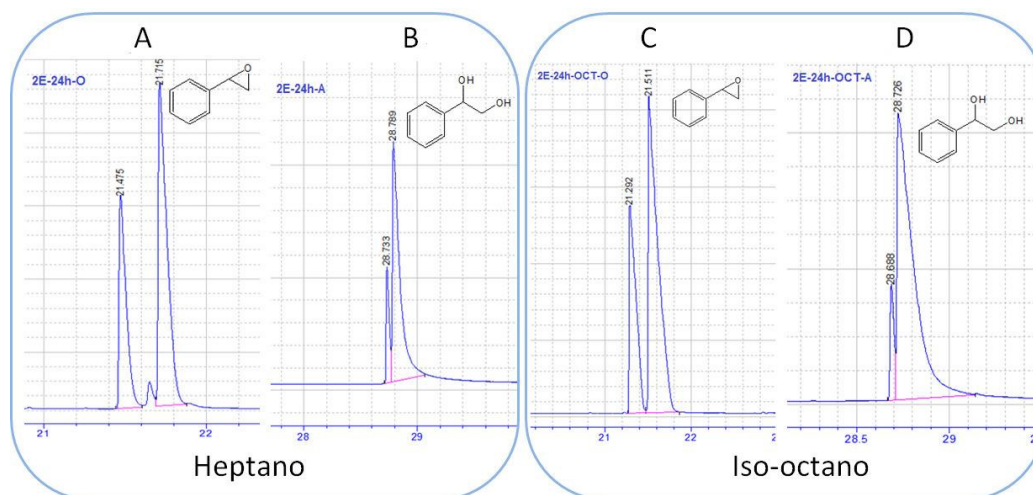


Figura 9

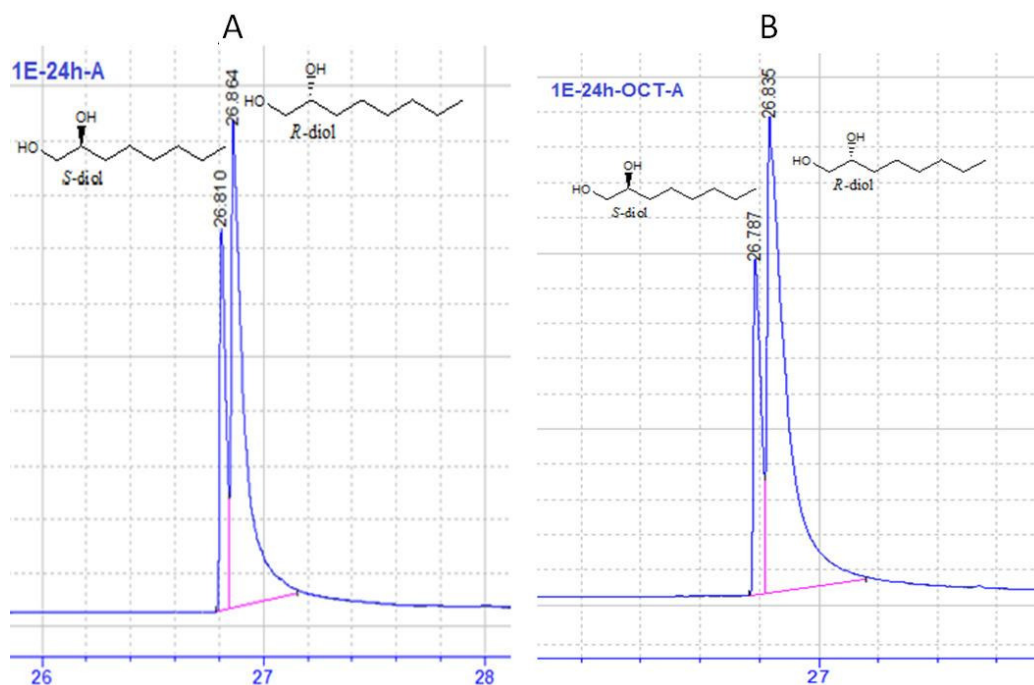
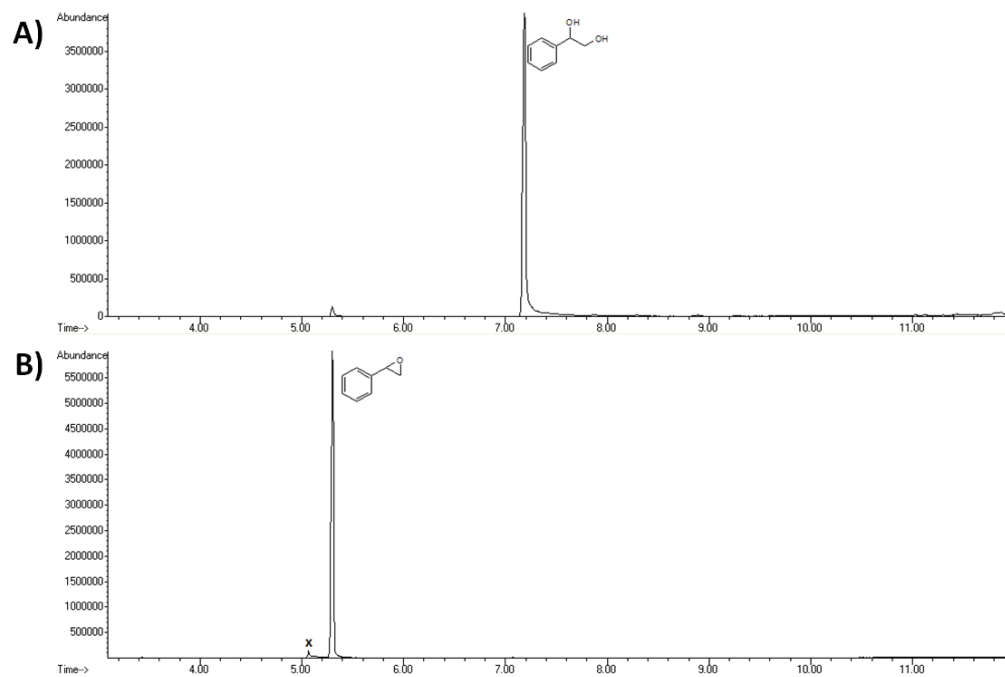


Figura 10



**Figura 11**



### 3. RESULTADOS COMPLEMENTARES

#### 3.1. Biblioteca Metagenômica de Fosmideos

A biblioteca metagenômica foi construída pela Profa. Dra. Suzan P. Vasconcellos (Unifesp-Diadema) em colaboração com a Profa. Dra. Valéria Maia Oliveira (CPQBA - Unicamp) a partir de DNA total de microbiota recuperada de reservatórios biodegradados de petróleo (Bacia Potiguar – CE). O DNA ambiental de alto peso recuperado (~40 kb) foi clonado em vetores fosmidiais. A Dra. Suzan realizou triagem de alto desempenho (*HTS-high-throughput screening*) na biblioteca metagenômica em busca de enzimas para diversos substratos e os clones positivos foram ainda analisados por métodos de biocatálise convencional. Três clones fosmidiais positivos para atividade lipolítica foram gentilmente cedidos pela Dra. Suzan e a Dra. Valéria.

A fim de isolar o(s) genes(s) de lipase/esterase-supostamente presentes nesses fosmideos procedemos como descrito a seguir.

Os clones fosmidiais foram fragmentados por sonicação e fragmentos de tamanho entre 3000 pb e 1500 pb foram selecionados diretamente de gel de agarose (0,8%) e purificados. Após, esses fragmentos foram reparados e clonados em vetor plasmidial pBlueScript SK (-) e transformados em células de *E. coli* DH10B. Cada clone fosmidial gerou uma biblioteca de aproximadamente 3.500 subclones (mais de 10.000 subclones no total).

Esses subclones foram triados em placas de petri com ágar-tributirina. Os subclones positivos foram triados também em placas de ágar-trioleína. No primeiro teste, foram encontrados quatro *hits* positivos e apenas 1 formou halo em ágar-trioléina (Fig 3).



**Figura 3.** Halo de hidrólise em placas de ágar-tributirina.

Os subclones positivos foram nomeados de acordo com sua posição nas placas de triagem, assim temos: A4, B9, D2 e F12.

Esses subclones foram sequenciados e o resultado do sequenciamento pode ser acompanhado na tabela a seguir (tabela 1).

**Tabela 1.** Resultado do sequenciamento dos subclones

| CLONE | FUNÇÃO PREDITA                                                                                                                            | IDENTIDADE |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| A4    | Tri-shuttle cloning vector MiniTn-Puro-JCVI-1.7                                                                                           | 100%       |
| B9    | glycosyltransferase, group 2 family protein<br>[ <i>Acidithiobacillus</i> sp. GGI-221]                                                    | 40%        |
| D2    | hypothetical protein /Uncultured bacterium<br>pRSB107 plasmid                                                                             | 91%        |
| F12   | hypothetical protein [ <i>Escherichia coli</i> UMNK88]/<br>haloacid dehalogenase-like hydrolase<br>[ <i>Escherichia coli</i> ETEC H10407] | 99%        |

Como pode ser observado na tabela 1 todos os clones eram falsos positivos. Na literatura, está documentado o grande número de falsos positivos gerados em triagem em placas de ágar-tributirina (para lipases) e ágar-leite (para proteases), pois outros metabólitos da célula ou certos genes como as  $\beta$ -glicosidades,  $\beta$ -galactosidades e glicosiltransferases podem gerar um halo de degradação através da produção de ácido [63]. Característica essa mais uma vez atestada pela presença de uma glicosiltransferase presente em um dos subclones, o B9, o qual formou halo de degradação de maior diâmetro e em curto período de tempo (~12h), tanto em placas de agar-tributirina e trioleína

Apesar do resultado inesperado, as glicosiltransferases são enzimas muito importantes, de grande valor biotecnológico. Por isso, decidimos tentar caracterizar essa nova proteína, nomeada de GTM (glicosiltransferase metagenômica). Ainda que a *ORF* identificada tenha sido clonada corretamente (confirmada por sequenciamento), infelizmente, não obtivemos êxito nas etapas de expressão/purificação da proteína recombinante. De acordo com preditores de proteínas quanto à presença de região transmembrana (DAS transmembrane <http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>) e de localização celular (PSORT <http://psort.hgc.jp/form.html>), a GTM é uma proteína transmembrana, portanto, muito hidrofóbica, o que torna seu isolamento laborioso. Além disso, a sequência de nucleotídeos da GTM apresenta 18% de códons raros, não utilizados em *E.coli*, sendo necessária a complementação desses códons com linhagens específicas. Por isso, esse gene foi clonado de três tamanhos diferentes com o intuito de aumentar a solubilidade da proteína com a retirada de partes e de toda região C-terminal transmembranar. Além dessas construções, também foi usado dois

vetores que adicionam a cauda de fusão 6xHis-tag em posições N- e C terminal (pET28a e pET29a respectivamente) e células de *E.coli* como a Rosetta(DE3) e a C43(DE3). A Rosetta(DE3) possui um plasmideo (pRARE) que contem genes para tRNA (RNA transportador) para 7 codons raros em *E. coli* (**AGG/AGA/CGG**(arginina), **AUA**(isoleucina), **CUA** (leucina), **CCC** (prolina) e **GGA** (glicina). E a C43(DE3) é uma linhagem mutante descrita por suportar a alta expressão de proteínas tóxicas e de membrana [64].

Uma vez que a tentativa de expressão e a purificação da GTM nessas duas linhagens não obteve sucesso, foi feita a extração do plasmideo pRARE da Rosetta(DE3) e co-transformado em C43(DE3) com o plasmideo pET+ gene GTM (para as três construções). Esses transformantes então co-expressam os tRNA para códons raros em *E. coli* e a proteína GTM em uma linhagem mais preparada para proteínas de membrana, a C43(DE3). A seguir está descrito resumidamente os métodos usados.

### **3.1.1. Obtenção da sequência da Glicosiltransferase alvo para expressão em *E. coli***

A sequência alvo foi amplificada por PCR do subclone que apresentou halo de degradação de ácidos graxos em placas por meio dos primers flaqueadores do vetor pBlueScript SK(+) (Stratagene) T7 promoter (5'TAATACGACTCACTATAGGG3') e M13 Reverse (5'CAGGAAACAGCTATGAC 3'). O produto de PCR de aproximadamente 1200 pb foi sequenciado e a sequência resultante foi analisada utilizando-se o banco de dados de sequências de DNA do NCBI. Em posse da sequência de nucleotídeos,

primers específicos para clonagem em vetor de expressão foram desenhados. Três construções do gene foram feitas com as mudanças apenas na porção C-terminal da GTM (porção transmembrana) a fim de diminuir a região hidrofóbica mergulhada na membrana plasmática. Assim temos: (i) GTM1 construção com toda, ou praticamente toda porção hidrofóbica transmembrana; (ii) GTM2 construção com parte da região transmembrana; (iii) GTM3 construção com a retirada de toda região transmembrana. A tabela 2 lista os primers usados em cada construção.

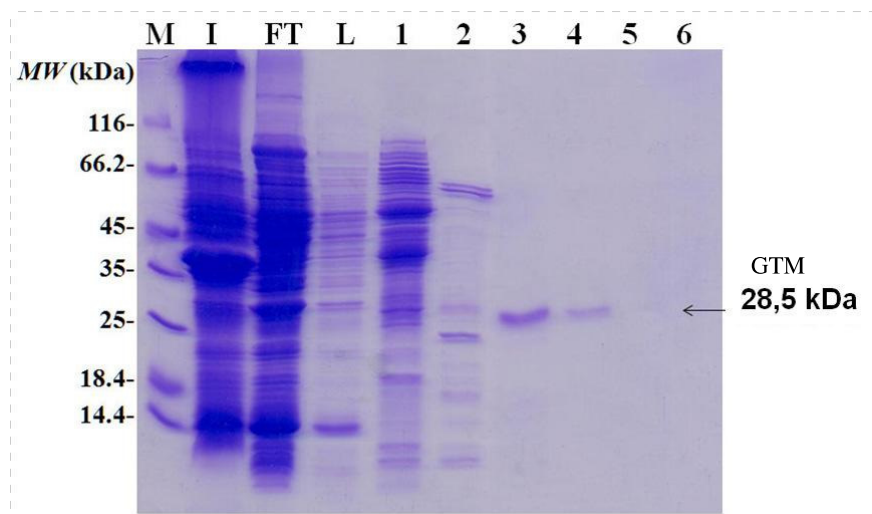
**Tabela 2.** Sequencias dos primers usados para clonagem da GTM.

| Construção  | Frag. (pb) | MW (kDa) | Primer direto ( <i>NdeI</i> )   | Primer Reverso ( <i>XhoI</i> )          |
|-------------|------------|----------|---------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>GTM1</b> | 849        | 32,5     | 5'ATACATATGATGC<br>GCGACGACGA3' | 5'AATACTCGAGCTACG<br>AGTGTGTGCATTTGT 3' |
| <b>GTM2</b> | 750        | 28,6     | 5'ATACATATGATGC<br>GCGACGACGA3' | 5'AAGCTCGAGGGGGA<br>CACAACC 3'          |
| <b>GTM3</b> | 654        | 25       | 5'ATACATATGATGC<br>GCGACGACGA3' | 5'AAACTCGAGGACCG<br>GGGGCATGGT 3'       |

### 3.1.2 Expressão e Purificação da Proteína Recombinante

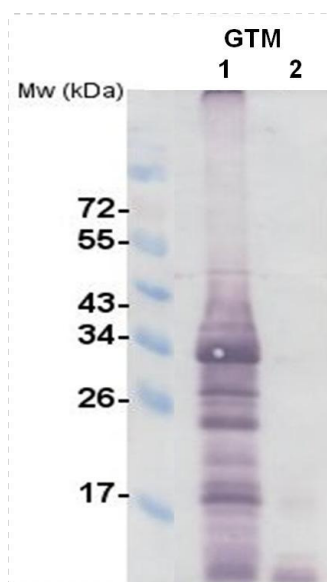
Foi feita a expressão das três construções da GTM conforme especificado na tabela 2. Todas as construções em pET28a e pET29a nas seguintes células de *E.coli*: C43(DE3), Rosetta(DE3) e C43(DE3) em co-expressão com o plasmídeo pRARE foram analisadas. Apenas a GTM2 em C43(DE3)pRARE apresentou-se parcialmente solúvel, em pouca quantidade e extremamente instável, mesmo na presença de detergentes

como o octil  $\beta$ -D-glucopiranosídeo e surfactantes como triton X100 e tween 20 (fig 4). Nas construções GTM 1 e GTM3 não foi detectada expressão na fração solúvel.



**Figura 4.** Gel de SDS-PAGE 12%. M: marcador Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas); I: fração insolúvel; F: flow-through; L: lavagem; 1, 2, 3, 4, 5 e 6: eluição com 20 mM, 50mM, 75mM, 100mM, 200mM e 500mM de imidazol respectivamente.

A expressão da GTM1 (maior porção transmembrana) foi detectada exclusivamente, na fração insolúvel por *western blot*, com anticorpo anti-histag (Fig 5). Além disso, é possível supor que a proteína recombinante apresenta alta instabilidade, sendo degradada rapidamente durante a extração e/ou apresenta expressão truncada. Quanto a GTM3 (sem porção transmembrana) níveis de expressão detectáveis não foram identificados.



**Figura 5.** MW: marcador Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas); 1: Fração insolúvel GTM1; 2: Fração solúvel.

### 3.1.3. Alinhamento da estrutura primária de proteínas homólogas Glicosiltransferase metagenômica (GTM).

O alinhamento feito pela ferramenta DELTA Blastp (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST) mostrou que a GTM possui identidade de sequência, em maioria, com genes de glicosiltransferases de microrganismos extremófilos. A bactéria *Paenibacillus* sp. Oral táxon 786 str D14 já foi descrita na literatura, por obter identidade com proteínas do tipo glicosil hidrolase encontradas em bibliotecas metagenômicas [65]. O microrganismo *Choroflexus aggregans* é descrito como uma bactéria fototrófica e encontrada em ambientes pouco explorados como em fontes termais do Ártico [66]. *Methylobaculum album* BG8 é uma bactéria metanotrófica, ou seja, capaz de utilizar

metano como única fonte de carbono e energia e são comumente encontradas em ambientes marinhos, terrestres e de água doce [67]. *Methylacidiphilum infernorum* é também uma bactéria metanotrófica, extremamente acidofílica e termofílica. Essa bactéria foi isolada de uma amostra de solo no Portão do Inferno (Tikitere), um campo de metano que emite energia geotérmica na Ilha Norte da Nova Zelândia, a qual teve seu genoma sequenciado em 2008 [68]. De acordo com o alinhamento da sequência de aminoácido das proteínas feitas pelo DELTA Blastp a identidade entre a GT metagenômica (GTM) e as apresentadas acima foram: *Methylacidiphilum infernorum* (80/251 = 32%); *Choroflexus aggregans* (75/241 = 31%); *Paenibacillus* sp. Oral táxon 786 str D14 (67/228 = 29%) e *Methylobacterium album* BG8 (71/247 = 29%), considerada alta pela grande diversidade entre as GTs.

Com base no alinhamento apresentado não é possível demarcar com segurança o(s) sítio(s) ativo(s) da enzima estudada. De acordo com a literatura, pouco ainda é conhecido sobre a estrutura, especificidade e mecanismo da maioria dessas enzimas e com base apenas na sequência de aminoácidos as GTs estão classificadas em mais de 50 famílias [56]. Entretanto, o domínio e o sítio de ligação a metal estão presentes e estão ilustrados na Fig.4.

```

          *          20          *          40          *          60
GT_RGT|Pae : -----MDLSILIVNNYNTROLTLDCIRSYDSETVYSYEVIVVDNASRDGSAEATRABYFEVVIIAN : 61
pGT|M.albu : MNDKTPLPVSVIIVSWNARDYLKKCLKSLAGMCSYPMELIIVVDNASSDGSAAECVAAEFPHVRLIRN : 68
GT2|C.aggr : --MTWSVPEASIIIVNNNTROLLDCLAAIPAAAGIETEVVVVDNGSRDGSVAAVAATFPDVFIIIAN : 66
GTs|Metage : -----MRDDD-----HLVVVDNGSTDDSLIVLAREFFPTVTVIAN : 34
GTs|M.infe : -----MNANLSITIVSNTQLLLEKAINSTIEKSGDPFKKLLIVFDNGSKDGTQEMIKKKFFWVVYIRS : 63

          *          80          *          100          *          120          *
GT_RGT|Pae : QENTGFAKANNQGMIAIACGRYVLLNLSDTVVQPDTFQIMVSYMDEHFEELGASGCKVILEDGSIDKACR : 129
pGT|M.albu : ADNLGFAKANNIGVVASRCQYLAISNSDVEVLPCITRLVDYVEAHEVGMAGPFIIIGDGRMORSCR : 136
GT2|C.aggr : PDNRGFFAANNQAIRASSGRYVFLNLSDTIAQEAASITRLVHFIDTHEEVGVVGFQLRNADGSLQPSWA : 134
GTs|Metage : GCNAGYARACNQGLNTPMSDYVLEHLNNDACITPPNATDRFAEDFVRDEALALICACLVADGSLORSFA : 102
GTs|M.infe : ETNLGFSKAVNRAAHQACQDYILLNLSNDAILOEDSTQKAEWMEQNERCAVCAQLINEDGTLNSIA : 131

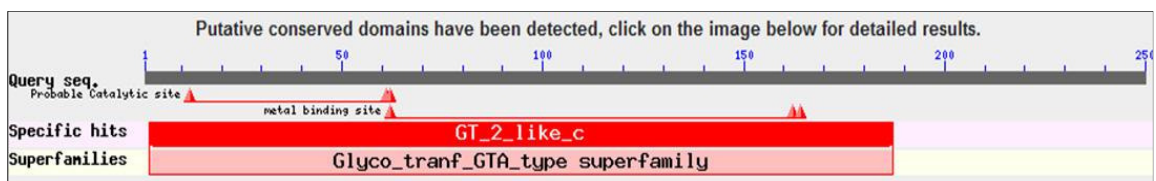
          140          *          160          *          180          *          200
GT_RGT|Pae : RGFPTPEASFYAAGFSKLEPDNPRFNQYQLGYMDPNETYSVDCGLVGAFLVRQETIRQVGGIDETFF : 197
pGT|M.albu : -GFPGVWNNFCRALALDTLFRSVRLFSGYSMAYWSQDSLRPVDILSGCFWLVRPALDRVGLIDEAFF : 203
GT2|C.aggr : MFPNLITETITGKKIRWRRRYATN-----DGSPAYETDWLDGAMLVRRVVKCVGLIDESYF : 191
GTs|Metage : PAPTWHSEIG-----LRRRKRVPT-----PDTNGLLPETIVGACIAARRTAIDAVGEMDPDFF : 157
GTs|M.infe : NFPTLLLELANKSLRRLFPKKFPGKE-----YQSGRPQAVESVIGAFELIRKTIWDELGGFDERYF : 193

          *          220          *          240          *          260          *
GT_RGT|Pae : MYGEDVQWCYRIKQAGWGHYHFPATYIVHYKGAASSRRKPFKIIYEFHSAWVVFHKKHYLRNYSWVTNA : 265
pGT|M.albu : IYGEDMDWCKRFWKHGWKVVEYFEAKAIHYGCASSNAPVRFYTERQADLCYWRKHHSP-PAVAAYT : 270
GT2|C.aggr : MYTEEVQWCYRIKRVGWRTCYLPTSSIIHFGCQSSQAATRMKAELYFSKLRFFAKHYGQTAAWLLRI : 259
GTs|Metage : EYFEETBWCVRMRRHGWKIALDFVVSVTHRKGHSTQAVRTEAQIEALSRLLLYYRKTMPPLLAATVTI : 225
GTs|M.infe : BFEETDFCLRATQRGYLVYMLEQVKVWHGQCKTAKTLLSEARTEYWKSRYYRYFETHPLYKYLLIRI : 261

          280          *          300          *          320          *
GT_RGT|Pae : AYYCGISLKFLLSLAKNRLPVGTRTPSGANQPESAIEVKVEVRS----- : 309
pGT|M.albu : LISCLHMALRLAGYACVMLLDPATQSGKYMKRSWACLKWIVSGKAEHA----- : 319
GT2|C.aggr : GQIIFFGKATLG-SILMVAGGGHHPTGKQFVRDGGLLWVAIRRRGRQPLTPERF----- : 313
GTs|Metage : NRVVRVINTLGLTLFAVTLGCV----- : 250
GTs|M.infe : GLIRLFLSLFLESLLYLVTFGKSPTRRLKTAYKIALWHLKGMFDMGLSSHQEIACKKD : 321

```

**Figura 6.** Alinhamento sequencial da proteína GTM (4ª linha) contra sequências homólogas depositadas no banco de dados NCBI. 1ª linha: GT de *Paenobacillus* sp. oral taxon 786 str D14 (ZP04853286); 2ª linha: GT de *Methylobacillus album* BG8 (ZP09862208); 3ª linha: GT de *Choroflexus aggregans* DSM9485 (YP002462161); 4ª linha: GT metagenômica em estudo; 5ª linha: GT de *Methylobacillus inferorum* (YP00193900).



**Figura 7.** Domínio conservado de GT-2 apresentado pelo DELTA Blastp e o sítio de ligação a metal.

Esse domínio é conservado entre as glicosiltransferases da família 2, GT-2 (GTA estruturalmente) que é um dos grupos de GTs mais estudados. A família GT-2 tem mais de 950 membros, cujas funções são bem generalizadas, desde a síntese de biomassa como a celulose e quitina até a estrutura fina de lipopolissacarídeo de superfície celular [56]. Membros da família GT-2 utiliza uma gama diversa de nucleotídeos doadores, predominantemente açúcares UDP, mas também dTPD e GDP. As GTs possuem sítio de ligação a metal, cátion divalente, sendo os melhores cofatores analisados o manganês ( $Mn^{2+}$ ) e o magnésio ( $Mg^{2+}$ ), sendo o manganês tido como o melhor cofator [42, 56, 69]. Na família GT-2, a sequência do domínio C-terminal dos mais de 950 membros é extremamente diverso. O domínio N-terminal, entretanto, exibe um grau muito maior de semelhança uma vez que eles se ligam a um grupamento comum de nucleotídeo, geralmente UDP, embora açúcares como a GDP manose e dTDP ramnose são utilizadas pelas enzimas GT-2 [56]. Outra característica dessas GTs é o domínio conservado DXD/XDD [49, 69]. Deve ser ressaltado que mais de 70% das *ORFs* contem a tríade DXD, entretanto nem todas são glicosiltransferases. Algumas glicosiltransferases que possuem apenas um único sítio ativo contem mais de um domínio DXD. Em contraste, o número de domínios DXD dentro de uma *ORF* não é necessariamente o reflexo de vários centros catalíticos.[56].

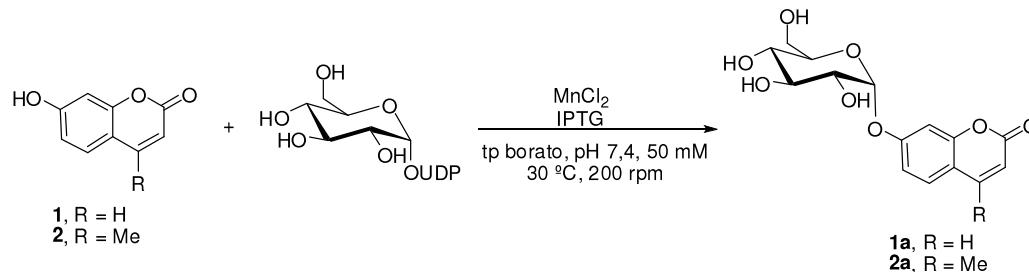
A sequência de aminoácidos da GTM (250aa) pode ser visualizada na figura 8, bem como os prováveis domínios DXD/XDD.

MRDDDHLVVDNGSTDSLIVLAREFPTVTVIANGCNAGYARACNQGLNTPSDYVLFLNDA  
 QLPPNALDRFAEDFVRDPALALIGAQLVAPDGSLSQSFAPPTWHSELGLRRRKRVTPPTDNG  
 LLPVETIVGACIAARRTAIDAVGPMDPDFFFYFEETEWCVRMRRHGWKIALDPVVSVTHRKGHS  
 TQAVRTEAQIEALRSRLYYRKTMPPLAATVTINRVVRVVLNTLGQLTLFAVTLGCVP

**Figura 8.** Sequencia de aminoácidos da GTM com os possíveis domínios DXD destacados em negrito e sublinhados.

### 3.1.4 Análise funcional da GTM usando sondas fluorescentes

Esta reação está fundamentada na ação catalítica de glicosiltransferases (GT) do tipo Leloir, que utilizam derivados de nucleotídeos como doadores de grupo glicosil. Neste caso, utilizou-se a UDP-Glc (uridina difosfato glicose) (Sigma) como doador e o composto 7-hidróxicumarina (umbeliferona) ou 7-hidróxi-4-metilcumarina como aceptores. Estes aceptores apresentam fluorescência na sua forma aniônica (pH > 6,5), no entanto quando a GT catalisa a transferência do grupo glicosil levando a formação dos produtos 1a ou 2a (Fig. 9), com consequente diminuição da fluorescência do meio reacional. Logo, os cálculos de conversão são baseados na diminuição da intensidade de fluorescência que corresponde à quantidade de substrato consumido, a qual quando dividido pela intensidade de fluorescência inicial representa a fração de produto formado.



**Figura 9.** Esquema da reação catalisada pela glicosiltransferase

Os clones submetidos aos ensaios foram cultivados em meio LB, suplementado de antibiótico apropriado (30  $\mu\text{g/mL}$  de canamicina, ou 34  $\mu\text{g/mL}$  de cloranfenicol ou 100  $\mu\text{g/mL}$  de ampicilina) a 37°C sob agitação por aproximadamente 16 h. Uma fração de 1% v/v de cultura foi adicionado a um novo inoculo, 37°C, sob agitação até atingir a fase exponencial de crescimento (OD 0,8 a 1,0). Quando a cultura atingiu OD próximo de 1 (0,8 - 1,0) a indução da expressão gênica foi iniciada com a adição de 0,5 mM de IPTG, a 25°C, sob agitação por 16 h.

Para o teste, foram utilizados todas as construções para o gene GTM listadas na tabela 2, bem como os controles de cada clone que são as células com os vetores sem o inserto. O subclone plasmidial denominado B9, no qual foi identificado um halo de degradação em placas de ágar-tributirina também foi analisado.

Após o período de indução, 1 mL dos meios de cultivos de cada clone foram transferidos para tubos estéreis, sendo os mesmos centrifugados por 5 min à 10000 g. Os sobrenadantes foram separados das células, e estas pesadas e ressuspensas em tampão borato (pH 7,4 50 mmol/L), e posteriormente diluídas para uma concentração final de 0,2 mg/mL.

As reações foram realizadas em placas de polipropileno de 96 poços, sendo os ensaios realizados em quadruplicatas e os controles em duplicata, segundo as condições abaixo:

Ensaio (E): solução de sonda fluorescente 1 ou 2 (5 µL, 2 mmol/L); solução de UDP-glicose (5 µL, 8 mmol/L); solução de MnCl<sub>2</sub> (5 µL, 20 mmol/L); solução de IPTG (5 µL, 8 mmol/L); solução tampão borato (80 µL, 50 mmol/L, pH 7,4) e suspensão celular (100 µL, 0,2 mg/mL).

Controle (C): solução de UDP-glicose (5 µL, 8 mmol/L); solução de MnCl<sub>2</sub> (5 µL, 20 mmol/L); solução de IPTG (5 µL, 8 mmol/L); solução tampão borato (85 µL, 50 mmol/L, pH 7,4) e suspensão celular (100 µL, 0,2 mg/mL).

As reações foram mantidas à 30°C, 200 rpm e as leituras de fluorescência foram realizadas a cada 24 h por até 72 h. As leituras de fluorescência foram realizadas em leitor de placas Enspire (Perkin-Elmer) utilizando comprimentos de onda de excitação de 370 nm e de emissão de 460 e 440 nm para os substratos 1 e 2, respectivamente.

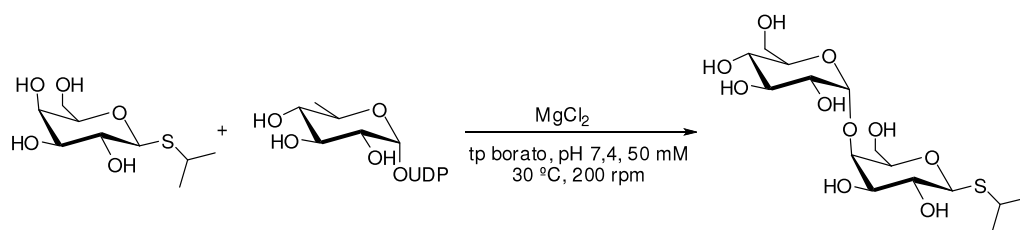
Para os cálculos das porcentagens de conversão da sonda fluorescente no produto glicosilado (% *P*), considera-se as intensidades de fluorescência da reação no tempo 0 e no tempo *t*. Logo, as intensidades de fluorescência obtidas nos ensaios no tempo 0 (*FE*<sub>0</sub>) são diminuídas das respectivas intensidades no tempo *t* (*FE*<sub>*t*</sub>), sendo a diferença dividida intensidade final, segundo a equação abaixo:

$$\% P = \left[ \frac{(FE_0 - FE_t)}{FE_0} \right] \times 100$$

Não foi observada atividade catalítica dos clones avaliados na presença de ambos os substratos (aceptores) avaliados. No entanto, a adição de IPTG, com o intuito

de manter a indução da expressão da enzima também nos ensaios, pode ter acarretado a transferência do grupo glicosil da UDP-Glc para o IPTG (ver esquema abaixo), uma vez que este último é um monossacarídeo modificado derivado da galactose, e possivelmente pode ser mais bem aceito pela GTM do que os aceptores derivados de cumarina avaliados neste experimento. Este teste será repetido na ausência de IPTG.

Esquema 2. Possível transferência da UDP-Glc para o IPTG.



#### 4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste estudo, uma nova epóxido hidrolase (AbEH) foi caracterizada, utilizando-se de ferramentas de biologia molecular e bioquímica para a caracterização de proteínas. A AbEH, mostrou potencial para aplicação na preparação de epóxidos quirais e dióis viciais.

A parte, uma glicosiltransferase foi encontrada em material metagenômico. Embora, apesar dos esforços, ainda não foi possível sua caracterização funcional.

- Dentre os resultados obtidos para a AbEH ressalta-se:

- i) A AbEH recombinante foi caracterizada, quanto a composição da sua estrutura secundária, por dicroísmo circular, e como resultado tivemos uma composição típica de  $\alpha/\beta$  hidrolases. O estado oligomérico da AbEH analisada por filtração em gel foi determinada como um dímero em solução de aproximadamente 79 kDa, resultados esperados para epóxidos hidrolases.
- ii) Os parâmetros cinéticos da AbEH foram determinados com a sonda fluorescente O-(3,4-epoxibutil)umbeliferona, a qual foi 100% hidrolisada em 30 minutos em pH 6 a 30°C, inferindo-se as condições ideais para a atividade da enzima.
- iii) A AbEH em sistema aquoso com 8 mM de SO (óxido de estireno) racêmico foi capaz de hidrolisar 100% do R-SO em apenas 5 minutos de reação. Para este substrato em concentrações próximas, nenhuma outra EH obteve a mesma eficiência.
- iv) As reações em sistema sólido-líquido da AbEH com os substratos SO e cis-3-fenil-2,3-epoxipropanoato de etila racêmicos apontou um comportamento

enantioconvergente da enzima. Os dióis foram obtidos com alto excesso enantiomérico e os epóxidos remanescentes permaneceram racêmicos no meio reacional. O sistema sólido-líquido foi muito eficiente para evitar a hidrólise espontânea dos epóxidos, um problema recorrente desses substratos.

**v)** As reações em sistema bifásico líquido-líquido da AbEH usando como solventes orgânicos o heptano e iso-octano foram efetivos para a hidrólise de SO e do 1,2 epoxioctano racêmicos, aplicação na qual a AbEH apresentou, embora discreto, comportamento enantioconvergente. Neste sistema os produtos da reação (diol e epóxido) puderam ser analisados sem necessidade de separação, o diol é recuperado diretamente da fase aquosa e o epóxido da fase orgânica. Neste caso também não foi detectada hidrólise espontânea dos epóxidos.

O emprego desta AbEH garante a obtenção de dióis vicinais quirais a partir de epóxidos racêmicos de forma régio- e enantiosseletiva, sendo também efetiva na resolução cinética de epóxidos como o R/S- SO, em solução aquosa obtendo-se o S-SO enantiopuro.

Essa nova AbEH ainda tem muito a ser explorada quanto a sua performance catalítica, bem como o inédito comportamento enantioconvergente. Há uma miríade de substratos de importância biológica a serem testados, assim como a tolerância da AbEH com altas concentrações de substratos. Em adição, mutações sítio dirigidas pode melhor e /ou gerar características ainda melhores para a atividade e eficiência enzimática. São inúmeras as possibilidades em biologia molecular e biocatálise para explorar uma enzima tão versátil.

- Dentre os resultados obtidos quanto à biblioteca metagenômica e a glicosiltransferase GTM encontrada, podemos concluir:

- i. A metagenômica é uma importante ferramenta na busca por novas enzimas/proteínas, pois possibilita o acesso a um *pool* de material genético inédito de uma grande diversidade de organismos. Entretanto, as ferramentas de triagem ainda precisam melhorar muito quanto à acurácia e precisão, pois geram muitos falsos positivos. Esse problema ocasiona em um atraso na pesquisa, tornando dispendioso todo o percurso de trabalho.
- ii. O gene que codifica a GTM foi clonado em três construções diferentes, em várias linhagens de *E. coli* e dois vetores. Apesar da expressão da proteína ter sido detectada, a purificação/solubilidade foi muito baixa impossibilitando análises subsequentes como: análise de estrutura secundária, estado oligomérico e atividade enzimática. Ensaio enzimático com células íntegras usando sonda fluorescente também não detectou atividade.

Apesar das dificuldades encontradas ainda há opções para tentar solubilizar a GTM. A co-expressão da GTM com uma chaperona pode aumentar a quantidade da proteína na fração solúvel. Ainda, a recuperação da proteína dos corpos de inclusão com desnaturação e *refolding*, ou a clonagem do gene com uma proteína de fusão Trx, NusA, MBP, podem ser ferramentas úteis para recuperar a GTM solúvel.



## 5.REFERÊNCIAS

- [1] A.S. Bommarius, B.R. Riebel, Introduction to biocatalysis. In Biocatalysis. Fundamentals and Applications. Wiley-VCH (2004) 18.
- [2] R.E. Parales, N.C. Bruce, A. Schmid, L.P. Wackett, Biodegradation, biotransformation, and biocatalysis (b3). Appl Environ Microbiol 68 (2002) 4699-4709.
- [3] O. Kirk, T.V. Borchert, C.C. Fuglsang, Industrial enzyme applications. Curr Opin Biotechnol 13 (2002) 345-351.
- [4] J. Ogawa, S. Shimizu, Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. Trends Biotechnol 17 (1999) 13-21.
- [5] P. Lorenz, J. Eck, Metagenomics and industrial applications. Nat Rev Microbiol 3 (2005) 510-516.
- [6] R.J.S. Jacques, F.t.M. Bento, Z.I.s. Antonioli, F.v.A.c.d.O. Camargo, Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Ciência Rural 37 (2007) 1192-1201.
- [7] A.S. Bommarius, B.R. Riebel, Application of enzymes as catalysts: basic chemicals, fine chemicals, food, crop protection, bulk pharmaceuticals. In Biocatalysis. Fundamentals and Applications. Wiley-VCH (2004) 49.
- [8] A. Schmid, J.S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, Industrial biocatalysis today and tomorrow. Nature 409 (2001) 258-268.
- [9] J.E. Leresche, H.-P. Meyer, Chemocatalysis and Biocatalysis (Biotransformation): Some Thoughts of a Chemist and of a Biotechnologist. Organic Process Research & Development 10 (2006) 572-580.
- [10] D.J. Pollard, J.M. Woodley, Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. Trends Biotechnol 25 (2007) 66-73.

- [11] W. Lenz, A short history of thalidomide embryopathy. *Teratology* 38 (1988) 203-215.
- [12] G. Carrea, S. Riva, Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents. *Angew Chem Int Ed Engl* 39 (2000) 2226-2254.]
- [13] S. Hari Krishna, Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. *Biotechnology Advances* 20 (2002) 239-267.
- [14] C. Morisseau, Role of epoxide hydrolases in lipid metabolism. *Biochimie* 95 (2012) 91-95.
- [15] C. Morisseau, B.D. Hammock, Epoxide hydrolases: mechanisms, inhibitor designs, and biological roles. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45 (2005) 311-333.
- [16] J.W. Newman, B.D. Hammock, Optimized thiol derivatizing reagent for the mass spectral analysis of disubstituted epoxy fatty acids. *Journal of Chromatography A* 925 (2001) 223-240.
- [17] M.R. Paillasse, N. Saffon, H. Gornitzka, S. Silvente-Poirot, M. Poirot, P. de Medina, Surprising unreactivity of cholesterol-5,6-epoxides towards nucleophiles. *J Lipid Res* 53 (2012) 718-725.
- [18] C. Morisseau, B.D. Hammock, Gerry Brooks and epoxide hydrolases: four decades to a pharmaceutical. *Pest Management Science* 64 (2008) 594-609.
- [19] J.W. Newman, C. Morisseau, B.D. Hammock, Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. *Prog Lipid Res* 44 (2005) 1-51.
- [20] N.S. Finney, Enantioselective epoxide hydrolysis: catalysis involving microbes, mammals and metals. *Chem Biol* 5 (1998) R73-79.
- [21] H.S. Kim, O.K. Lee, S.J. Lee, S.H. Hwang, S.J. Kim, S.H. Yang, S. Park, E.Y. Lee, Enantioselective epoxide hydrolase activity of a newly isolated microorganism,

Sphingomonas echinoides EH-983, from seawater. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 41 (2006) 130-135.

[22] T. Watabe, S. Kanehira, Solubilization of epoxide hydrolase from liver microsomes. Chem Pharm Bull (Tokyo) 18 (1970) 1295-1296.

[23] P. Bentley, F. Oesch, Purification of rat liver epoxide hydratase to apparent homogeneity. FEBS Lett 59 (1975) 291-295.

[24] A.Y. Lu, D. Ryan, D.M. Jerina, J.W. Daly, W. Levin, Liver microsomal epoxide hydrolase. Solubilization, purification, and characterization. J Biol Chem 250 (1975) 8283-8288.

[25] F.P. Guengerich, P. Wang, P.S. Mason, M.B. Mitchell, Rat and human microsomal epoxide hydratase. Immunological characterization of various forms of the enzyme. J Biol Chem 254 (1979) 12255-12259.

[26] A.Y. Lu, P.E. Thomas, D. Ryan, D.M. Jerina, W. Levin, Purification of human liver microsomal epoxide hydrolase. Differences in the properties of the human and rat enzymes. J Biol Chem 254 (1979) 5878-5881.

[27] R.N. Armstrong, Kinetic and chemical mechanism of epoxide hydrolase. Drug Metab Rev 31 (1999) 71-86.

[28] R.N. Armstrong, C.S. Cassidy, New structural and chemical insight into the catalytic mechanism of epoxide hydrolases. Drug Metab Rev 32 (2000) 327-338.

[29] J.Y. Min, E.Y. Lee, Biosynthesis of (R)-1,2-phenylethanediol and (R)-4-chloro-1,2-phenylethanediol by using two recombinant cells expressing enantiocomplementary epoxide hydrolases. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 18 (2012) 160-164.

[30] E.Y. Lee, M.L. Shuler, Molecular engineering of epoxide hydrolase and its application to asymmetric and enantioconvergent hydrolysis. Biotechnol Bioeng 98 (2007) 318-327.

- [31] E.Y. Lee, Epoxide hydrolase-mediated enantioconvergent bioconversions to prepare chiral epoxides and alcohols. *Biotechnol Lett* 30 (2008) 1509-1514.
- [32] K. Faber, W. Kroutil, Stereoselectivity in biocatalytic enantioconvergent reactions and a computer program for its determination. *Tetrahedron: Asymmetry* 13 (2002) 377-382.
- [33] A. Archelas, R. Furstoss, Synthesis of enantiopure epoxides through biocatalytic approaches. *Annu Rev Microbiol* 51 (1997) 491-525.
- [34] K. Hattori, M. Nagano, T. Kato, I. Nakanishi, K. Imai, T. Kinoshita, K. Sakane, Asymmetric Synthesis of FR165914: A Novel  $\beta$ -Adrenergic Agonist with a Benzocycloheptene Structure. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 5 (1995) 2821-2824.
- [35] M. Kotik, A. Archelas, V. Famerova, P. Oubrechtova, V. Kren, Laboratory evolution of an epoxide hydrolase - towards an enantioconvergent biocatalyst. *J Biotechnol* 156 (2011) 1-10.
- [36] S. Pedragosa-Moreau, C. Morisseau, J. Zylber, A. Archelas, J. Baratti, R. Furstoss, Microbiological Transformations. 33. Fungal Epoxide Hydrolases Applied to the Synthesis of Enantiopure Para-Substituted Styrene Oxides. A Mechanistic Approach. *J Org Chem* 61 (1996) 7402-7407.
- [37] M.I. Monterde, M. Lombard, A. Archelas, A. Cronin, M. Arand, R. Furstoss, Enzymatic transformations. Part 58: Enantioconvergent biohydrolysis of styrene oxide derivatives catalysed by the *Solanum tuberosum* epoxide hydrolase. *Tetrahedron: Asymmetry* 15 (2004) 2801-2805.
- [38] S. Hwang, C.Y. Choi, E.Y. Lee, Enantioconvergent bioconversion of p-chlorostyrene oxide to (R)-p-chlorophenyl-1,2-ethandiol by the bacterial epoxide hydrolase of *Caulobacter crescentus*. *Biotechnol Lett* 30 (2008) 1219-1225.

- [39] M. Kotik, V. Stepanek, M. Grulich, P. Kyslik, A. Archelas, Access to enantiopure aromatic epoxides and diols using epoxide hydrolases derived from total biofilter DNA. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 65 (2010) 41-48.
- [40] D. Sareen, R. Kumar, Prospecting for efficient enantioselective epoxide hydrolases. *Indian Journal of Biotechnology* 10 (2011) 17.
- [41] H. Yamaguchi, N. Shirasaka, M. Ikenaka, Microorganism expressing epoxidehydrolase originated from *Bacillus subtilis*, and method for producing epoxide hydrolase by using the same. Patente JP2004349377 (2006).
- [42] C.A. Weijers, M.C. Franssen, G.M. Visser, Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnol Adv* 26 (2008) 436-456.
- [43] A. Erb, H. Weiss, J. Harle, A. Bechthold, A bacterial glycosyltransferase gene toolbox: generation and applications. *Phytochemistry* 70 (2009) 1812-1821.
- [44] E.L. Decker, R. Reski, Moss bioreactors producing improved biopharmaceuticals. *Curr Opin Biotechnol* 18 (2007) 393-398.
- [45] A. Luzhetskyy, A. Bechthold, Features and applications of bacterial glycosyltransferases: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 80 (2008) 945-952.
- [46] G. Blanco, E.P. Patallo, A.F. Brana, A. Trefzer, A. Bechthold, J. Rohr, C. Mendez, J.A. Salas, Identification of a sugar flexible glycosyltransferase from *Streptomyces olivaceus*, the producer of the antitumor polyketide elloramycin. *Chem Biol* 8 (2001) 253-263.
- [47] K. Raty, A. Hautala, S. Torkkell, J. Kantola, P. Mantsala, J. Hakala, K. Ylihonko, Characterization of mutations in aclacinomycin A-non-producing *Streptomyces galilaeus* strains with altered glycosylation patterns. *Microbiology* 148 (2002) 3375-3384.

- [48] A. Trefzer, C. Fischer, S. Stockert, L. Westrich, E. Kunzel, U. Girreser, J. Rohr, A. Bechthold, Elucidation of the function of two glycosyltransferase genes (lanGT1 and lanGT4) involved in landomycin biosynthesis and generation of new oligosaccharide antibiotics. *Chem Biol* 8 (2001) 1239-1252.
- [49] A. Erb, C. Krauth, A. Luzhetskyy, A. Bechthold, Differences in the substrate specificity of glycosyltransferases involved in landomycins A and E biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* 83 (2009) 1067-1076.
- [50] S. Strahl-Bolsinger, T. Immervoll, R. Deutzmann, W. Tanner, PMT1, the gene for a key enzyme of protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 8164-8168.
- [51] M. Takahashi, N. Inoue, K. Ohishi, Y. Maeda, N. Nakamura, Y. Endo, T. Fujita, J. Takeda, T. Kinoshita, PIG-B, a membrane protein of the endoplasmic reticulum with a large luminal domain, is involved in transferring the third mannose of the GPI anchor. *EMBO J* 15 (1996) 4254-4261.
- [52] Y. Maeda, R. Watanabe, C.L. Harris, Y. Hong, K. Ohishi, K. Kinoshita, T. Kinoshita, PIG-M transfers the first mannose to glycosylphosphatidylinositol on the luminal side of the ER. *EMBO J* 20 (2001) 250-261.
- [53] J. Seibel, H. Hellmuth, B. Hofer, A.M. Kicinska, B. Schmalbruch, Identification of new acceptor specificities of glycosyltransferase R with the aid of substrate microarrays. *Chembiochem* 7 (2006) 310-320.
- [54] S.A. Osmani, S. Bak, B.L. Moller, Substrate specificity of plant UDP-dependent glycosyltransferases predicted from crystal structures and homology modeling. *Phytochemistry* 70 (2009) 325-347.
- [55] L.L. Lairson, B. Henrissat, G.J. Davies, S.G. Withers, Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu Rev Biochem* 77 (2008) 521-555.

- [56] N. Tarbouriech, S.J. Charnock, G.J. Davies, Three-dimensional structures of the Mn and Mg dTDP complexes of the family GT-2 glycosyltransferase SpsA: a comparison with related NDP-sugar glycosyltransferases. *J Mol Biol* 314 (2001) 655-661.
- [57] E. Andres, N. Martinez, A. Planas, Expression and characterization of a *Mycoplasma genitalium* glycosyltransferase in membrane glycolipid biosynthesis: potential target against mycoplasma infections. *J Biol Chem* 286 (2011) 35367-35379.
- [58] G. Holzl, P. Dormann, Structure and function of glycoglycerolipids in plants and bacteria. *Prog Lipid Res* 46 (2007) 225-243.
- [59] A. Grundling, O. Schneewind, Synthesis of glycerol phosphate lipoteichoic acid in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 8478-8483.
- [60] J.I. Glass, N. Assad-Garcia, N. Alperovich, S. Yooseph, M.R. Lewis, M. Maruf, C.A. Hutchison, 3rd, H.O. Smith, J.C. Venter, Essential genes of a minimal bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 425-430.
- [61] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25 (1997) 3389-3402.
- [62] M. Igura, N. Maita, T. Obita, J. Kamishikiryo, K. Maenaka, D. Kohda, Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the soluble domain of the oligosaccharyltransferase STT3 subunit from the thermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 63 (2007) 798-801.
- [63] B.V. Jones, F. Sun, J.R. Marchesi, Using skimmed milk agar to functionally screen a gut metagenomic library for proteases may lead to false positives. *Lett Appl Microbiol* 45 (2007) 418-420.
- [64] B. Miroux, J.E. Walker, Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* 260 (1996) 289-298.

- [65] K. Wang, G. Li, S. Yu, C. Zhang, Y. Liu, A novel metagenome-derived  $\beta$ -galactosidase: gene cloning, overexpression, purification and characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88 (2010) 155-165.
- [66] G. Roeselers, T.B. Norris, R.W. Castenholz, S. Rysgaard, R.N. Glud, M. Kuhl, G. Muyzer, Diversity of phototrophic bacteria in microbial mats from Arctic hot springs (Greenland). *Environ Microbiol* 9 (2007) 26-38.
- [67] J.I. Han, J.D. Semrau, Chloromethane stimulates growth of *Methylomicrobium album* BG8 on methanol. *FEMS Microbiol Lett* 187 (2000) 77-81.
- [68] S. Hou, K.S. Makarova, J.H. Saw, P. Senin, B.V. Ly, Z. Zhou, Y. Ren, J. Wang, M.Y. Galperin, M.V. Omelchenko, Y.I. Wolf, N. Yutin, E.V. Koonin, M.B. Stott, B.W. Mountain, M.A. Crowe, A.V. Smirnova, P.F. Dunfield, L. Feng, L. Wang, M. Alam, Complete genome sequence of the extremely acidophilic methanotroph isolate V4, *Methylacidiphilum infernorum*, a representative of the bacterial phylum Verrucomicrobia. *Biol Direct* 3 (2008) 26.
- [69] C. Breton, A. Imberty, Structure/function studies of glycosyltransferases. *Curr Opin Struct Biol* 9 (1999) 563-571.

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada :

**Estudo Funcional de uma Epóxido Hidrolase de *Aspergillus brasiliensis* CCT1435:**

**Expressão, Purificação e Caracterização Enzimática.**

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

( X ) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. **15/2003**, Instituição: Universidade Estadual de Campinas.

( ) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. \_\_\_\_\_, Instituição: \_\_\_\_\_

( ) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. \_\_\_\_\_, Instituição: \_\_\_\_\_

*\* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

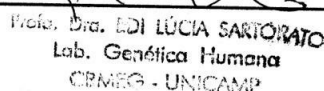
  
Aluna: Lilian Luzia Belotti

  
Orientador(a): Profa. Dra. Anete Pereira de Souza  
Profa. Dra. Anete P. de Souza  
Centro de Biologia Molecular e  
Engenharia Genética UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

  
Profa. Dra. EDILÚCIA SANTORO  
Lab. Genética Humana  
CBMEG - UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

( ) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura