**Laboratório de Engenharia Bioquímica LOT 2047**

Professores Rita de Cássia L. Brambilla Rodrígues e Júlio C. Santos

**Roteiro Experimental no 5**

**PRODUÇÃO DE INVERTASE POR *Saccharomyces cereviseae*, RECUPERAÇÃO DA ENZIMA A PARTIR DO MEIO FERMENTADO E DETERMINAÇÃO DE SUA ATIVIDADE**

OBJETIVOS

Estudo de invertase de origem microbiana. Verificação experimental do processo de produção, recuperação e determinação de atividade.

MATERIAIS

Erlenmeyer de 500 mL e boca larga, béquer de 250-500 mL (1 por grupo), funil de vidro (1 por grupo), papel de filtro cortado em círculo (um pacote, cerca de 15 unidades para todo o experimento) ou centrífuga de tubos, suporte universal com garra circular (1 por grupo), tubos com tampa de borracha (10 por grupo), pipeta volumétrica de 1, 2, 5 e 10 mL (uma de cada tipo por grupo), balão volumétrico de 10, 25 e 50 mL (um de cada tipo por grupo), pipeta volumétrica de 1 mL, tubos de ensaio e grade para tubos de ensaio (20 tubos por grupo). Câmara de fluxo laminar, Agitador/incubador a 30ºC, faca e pinça esterilizadas, bico de bunsen/tripé/tela/panela grande para banho em ebulição.

REAGENTES

Meio preparado e esterilizado contendo 1g/L de glicose e 0,5 g/L de extrato de levedura. Solução reagente de DNS (ácido dinitro-salicílico), tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,5, solução de sacarose 5%.

PROCEDIMENTO

**Produção da invertase**

1. No interior de uma câmara de fluxo laminar, adicione cerca de 3,75 g de *Saccharomyces cereviseae* (1/4 de um tablete de 15 g) a um Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de meio previamente esterilizado. Coloque o frasco em agitação de 120 rpm a 30ºC por cerca de 18h.

2. Filtre ou centrifugue o conteúdo do Erlenmeyer e recolha a solução em um béquer.

3. Dilua o filtrado nas proporções 1:2 (uma parte da solução mãe para um volume final de 2 partes), 1:5, 1:10 e 1:20 usando pipetas e balões volumétricos.

4. Guarde as soluções diluídas em fracos com tampa de borracha.

**Medidas de atividade da invertase**

1. Em tubos de ensaio adicione: 0,5 mL de solução de sacarose 5%, 0,5 mL de tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,5, 0,4 mL de água e finalmente 0,1 mL de solução diluída contendo a enzima. Agite o tubo e imediatamente dispare um cronômetro.

2. Prepare um tubo para cada tempo de reação a ser estudado. Faça reações por tempos de 2, 5, 8 e 15 minutos.

3. Cada reação deverá ser interrompida pela adição de 3 mL de reagente de DNS diretamente no interior do tubo de reação.

4. Após terminar as reações enzimáticas, coloque os tubos de ensaio, já com o reagente de DNS, em um banho em ebulição por 5 minutos.

5. Prepare soluções para "zerar" o espectrofotômetro sem a presença de açúcares redutores. Para isso, misture 0,5 mL de tampão citrato 50 mM pH 5,5, 1 mL de água e 3 mL de reagente de DNS. Coloque o tubo de ensaio, já com o reagente de DNS, em um banho em ebulição por 5 minutos. Reserve esta solução para “zerar” o espectrofotômetro.

6. Prepare também uma solução "controle" para determinar a concentração de açúcares redutores eventualmente presentes na solução inicial de sacarose e algum açúcar redutor residual presente no extrato enzimático. Para isso misture 0,5 mL da solução de sacarose 5%, 0,5 mL de tampão citrato 50 mM pH 5,5, 0,4 mL de água e, invertendo a sequência tradicional de reagentes, deverá ser adicionado 3 mL de reagente DNS. Em seguida adicione 0,1 mL da solução de enzima com a maior concentração (menor diluição) e leve à ebulição por 5 min.

6. Resfrie os tubos e se dirija ao espectrofotômetro para realizar as leituras.

7. Se o equipamento estava desligado, ligue o equipamento, selecione o comprimento de onda em 540 nm e acione a tecla “zero”, sem nenhuma solução ou cubeta no interior do compartimento de amostras. Certifique-se que a leitura de absorbância está indicando o valor de 0,00. Adicione a solução destinada a “zerar” o espectrofotômetro em duas cubetas e coloque no equipamento, previamente ajustado para leitura em 540 nm e acione a tecla “zero” novamente. Certifique-se que a leitura de absorbância está indicando o valor de 0,00.

8. Remova uma das cubetas (se o equipamento for de duplo feixe, remova a cubeda do feixe de leitura) e adicione a amostra cuja absorbância deve ser determinada. Volte a cubeta com a amostra no espectrofotômetro e anote o valor de absorbância lido. Lave a cubeta de amostras e a inverta sobre um papel higiênico para remover o excesso de água. Realize as leituras das soluções com menor intensidade de cor primeiro e vá aumentando progressivamente a intensidade de cor das amostras a serem analisadas. Isso minimiza erros devido a mistura de resíduos da cubeta de uma leitura com a leitura subsequente.

9. Analise imediatamente seus resultados (ainda em unidades de absorbância) e verifique que há condições de determinar a velocidade inicial em pelo menos uma das diluições ensaiadas.

10. Com os dados de calibração (fornecido no laboratório) para a concentração de açúcares redutores versus absorbância em 540 nm, calcule as concentrações de açúcares redutores gerados em cada amostra e calcule a atividade enzimática presente em cada diluição expresso em UI/mL de extrato original da fermentação.

**Medidas de atividade da invertase em amostras teste geradas nos experimentos anteriores do curso**

1. Dilua as amostras teste inicialmente na proporção de 1:10 usando pipetas e balões volumétricos.

2. proceda como nos itens descritos anteriormente, gerando dados cinéticos entre 2 e 15 minutos

3. Analise imediatamente seus dados com o uso de um papel milimetrado e verifique se foi possível detectar a velocidade máxima de reação. Com base na sua interpretação de dados, decida se é ou não necessário ensaiar outras diluições das amostras “problema”

TÓPICOS PARA ESTUDO

Extração de enzimas de origem microbiana

Determinação de atividade enzimática

Invertases

TÓPICOS PARA ELABORAÇÃO DO RELATÓRIO

a) Com seus dados experimentais construa gráficos que relacionam a concentração de açúcares redutores gerados em função do tempo de reação. Construa um gráfico para cada diluição do extrato enzimático

b) Determine as atividades enzimáticas em cada diluição e faça a correção para a diluição correspondente.

c) Verifique se foi possível determinar a atividade do extrato enzimático corretamente. Lembre que o objetivo é determinar a velocidade máxima de reação e para isso deve haver excesso de substrato. Nossos experimentos utilizaram diluições progressivas da enzima e uma quantidade fixa de substrato, dessa forma a proporção de substrato/enzima foi maior a cada diluição da enzima.

d) Discuta os resultados, com foco principal nos aspectos cinéticos relacionados com a determinação da atividade enzimática

BIBLIOGRAFIA

- Biotecnologia Industrial, Almeida Lima et al. 2001, vol 3; Cap. 16 e 17;

- Industrial Enzimology, Godfrey T. e West S (eds), 1996, Cap. sobre fermentação alcoólica.

- Bioquímica, Lehninger et al., 1976, vol 1, Cap 8 e/ou;

- Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism and data analysis, Copeland, R.A., 2000, Cap. 5