**Laboratório de Engenharia Bioquímica LOT 2047**

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

**Roteiro Experimental no 7**

**SEPARAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE INVERTASES POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO**

OBJETIVOS

Estudo de procedimentos de separação e recuperação de enzimas de origem microbiana. Verificação experimental da massa molar de uma enzima e identificação de uma enzima de interesse entre outras proteínas desconhecidas.

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.

Cromatógrafo e colunas de exclusão molecular, coletor de frações e tubos de ensaio para coleta das frações

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.

**Cromatografia em coluna de exclusão por tamanho**

1. Filtre cerca de 5 mL do filtrado do cultivo de levedura, agora com um filtro com poro de 0,45 micrometros. Reserve a amostra filtrada.

2. em um cromatógrafo pré-ajustado para o estudo cromatográfico pretendido, injete 1 mL de extrato.

3. Colete frações de 2 mL cada fração em tubos de ensaio previamente inseridos no coletor de frações

4. Obtenha os dados de absorbância em 280 nm gerado pelo sofware do cromatógrafo

5. Proceda à determinação de atividade relativa de invertases nas frações coletadas conforme descrito a seguir

**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 e finalmente 0,5 mL de amostra coletada em cada tubo de ensaio do item anterior. Agite o tubo e imediatamente dispare um cronômetro.

2. Mantenha a reação à temperatura ambiente por 15 minutos.

3. A 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. 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.

TÓPICOS PARA ESTUDO

Purificação de enzimas

Cromatografia de exclusão por tamanho

Determinação de atividade enzimática

Invertases

TÓPICOS PARA ELABORAÇÃO DO RELATÓRIO

a) Com seus dados experimentais construa cromatogramas a partir da absorção em 280 nm para identificar a totalidade das enzimas eluídas.

b) Determine as atividades enzimáticas relativas nas frações coletadas e grafique os dados no mesmo cromatograma do item anterior.

c) Identifique qual das proteínas eluídas é a invertse de interesse.

d) Com base na curva de calibração da coluna cromatográfica oferecida pelos técnicos, calcule a massa molar da invertase de interesse. Calcule também a massa molar das proteínas contaminantes.

e) Discuta seus dados com base na eficiência de separação e nas características da invertase purificada

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