

Enzimologia - PBI 5206

Início 6/03/2017 término: 21/06/2017

Aulas : quarta-feira 8:00h – 9:40 h

Sexta-feira 9:00h – 12:00 h

Calendário :

aulas teóricas – Março (8, 15, 22, 29)

aulas práticas – Março (10, 17, 24, 31)

7/04- apresentação e discussão resultados das aulas práticas

aulas teóricas – Abril (5, 12, 19, 26, 28)

Prova 1- 10/05

aulas práticas - Maio (12, 19, 26)

aulas teóricas – Maio (17, 24, 31)

2/06 - apresentação e discussão resultados das aulas práticas

aulas teóricas – Junho (7, 9, 14)

Prova 2 - 21/06

Seminários individuais: cada aluno apresentará um artigo de sua escolha sobre temas da disciplina (caracterização físico-química e cinética de enzimas), com duração de 15 a 20 min cada.

Avaliação da disciplina: 50% para os dois relatórios de prática – 50 % seminário individual.

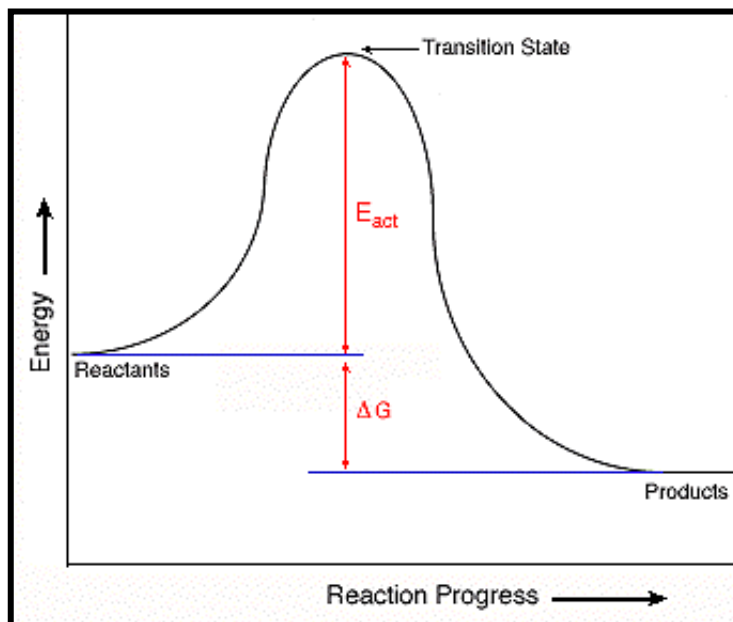


velocidade

equilíbrio

$$v = k[A] \times [B]$$

$$K_{eq} = \frac{[C] \times [D]}{[A] \times [B]}$$



K – cte Boltzman
h – cte Planck

$$k = \frac{K \times T}{h} e^{\left(\frac{-E_{act}}{RT}\right)}$$

v relaciona-se com E_{act}

$$\Delta G = -RT \ln K_{eq}$$

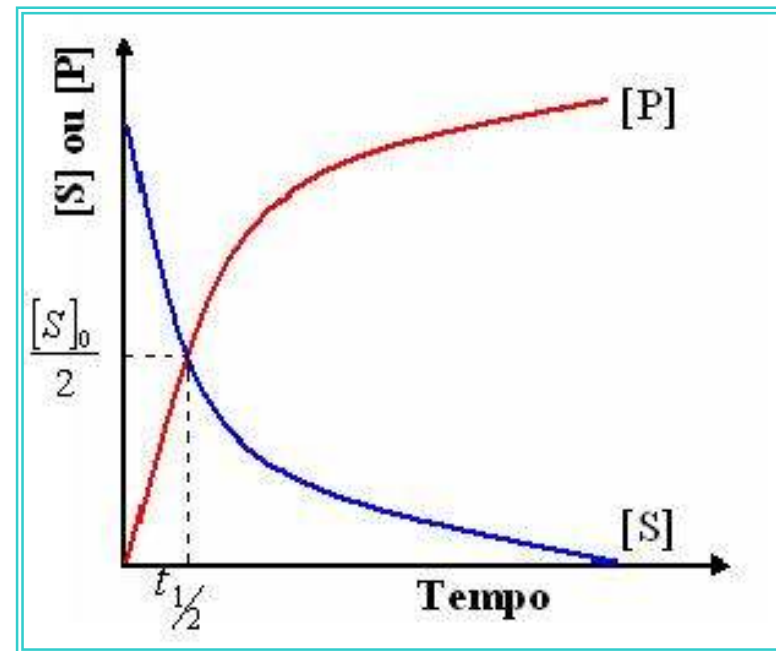
K_{eq} relaciona-se com ΔG

Atividade Enzimática

Reação de 1ª Ordem



↪ Determinar **S** utilizado ou **P** formado durante qualquer intervalo de tempo → Equação integrada de 1ª ordem.



O aparecimento de P e o desaparecimento de S não são lineares com o tempo

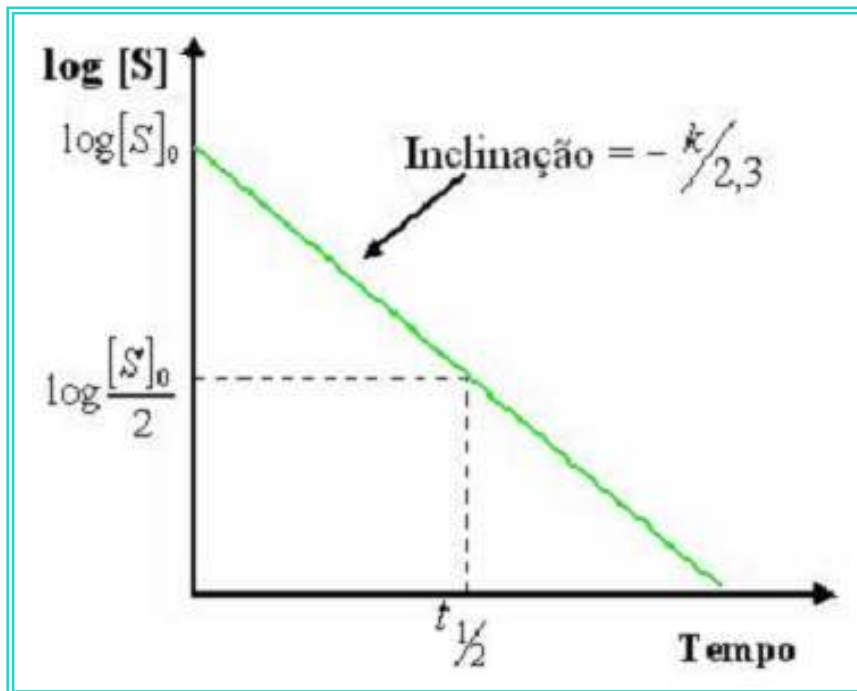
$$\frac{-dS}{dt} = kS$$

$k=1$ (100% do substrato presente no tempo zero seria utilizado em 1 min a V cte.

$$k = -\frac{d[S]}{[S]} \cdot \frac{1}{dt}$$

$$2,3 \cdot \log \frac{[S]_0}{[S]} = k(t - t_0)$$

Reação de 1ª Ordem



↳ $t_{1/2}$ = tempo de “meia vida”
→ tempo necessário para converter em **P** metade do **S** presente.

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k}$$

Ex. Se o tempo médio de uma reação de primeira ordem é 0,3s, qual será sua constante de velocidade k ? Quanto tempo levará para 95% do substrato desaparecer?

$$\ln 20 = 2,99$$

Ex. Seja a reação $A \xrightarrow{K} P$. Sabendo-se que os $t_{1/2}$ para a reação efetuada em pH 5 e 6 são respectivamente 0,099 min e 0,347 min. Calcular o valor de K em cada um dos pH. Você acha que a reação seria mais rápida para pHs altos? Por que?

$$k = -\frac{d[S]}{[S]} \cdot \frac{1}{dt}$$

$$t_{1/2} \text{ S} = S/2$$

$$dS/S = k dt$$

$$\int dS/S = k \int dt$$

S varia de S_0 a $S/2$ e t varia de 0 a $t_{1/2}$

Unidade de Atividade Enzimática

- Segundo a ***Enzyme Comission***, uma Unidade de Atividade (U) corresponde à transformação de um micromol de substrato, ou a formação de um micromol de produto por minuto pela enzima, nas estabelecidas condições do ensaio(temperatura, pH, concentração de substrato).
- A atividade específica é expressa em termos de atividade por mg de proteína (U/mg)

Aspectos práticos de determinação de atividades enzimáticas

Ex. Beta-glucosidase

1. *É necessário conhecer que tipo de reação que a enzima catalisa*
2. *É necessário verificar que método analítico poderia ser aplicado para a determinação do substrato ou do produto de reação*
3. *Definido um método analítico é necessário conhecer ou determinar qual é a relação resposta (sinal) x concentração desse produto de reação -
calibração*
A = absortividade x caminho ótico x concentração
4. *Com o método analítico e a calibração em mãos é necessário ensaiar o extrato e medir sua atividade enzimática*
5. *De posse dos resultados é necessário calcular a atividade enzimática*

Atividade de Beta-glucosidase

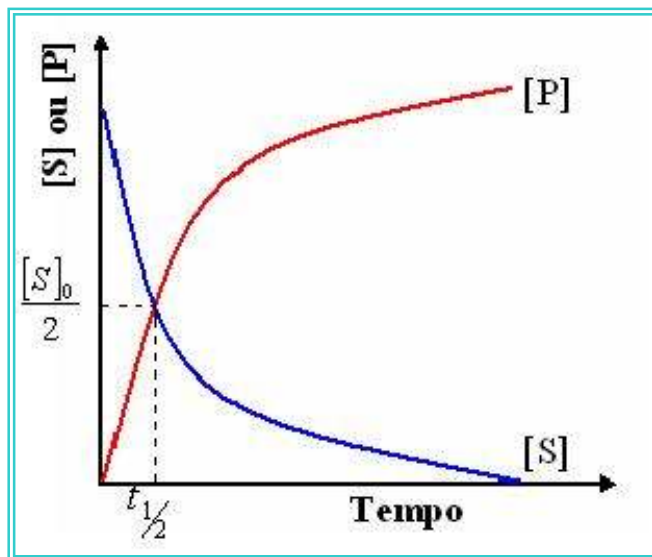
Vamos supor que a reação foi realizada com a seguinte mistura:

- 0,1 ml de uma solução 10 mM de para-nitrofenil-glicose
- 1,8 ml de tampão em pH apropriado para a ação de beta-glicosidase
- 0,1 ml de extrato

- Quanto de p-nitrofenol foi formado em 1 min?

A formação do produto p-nitrofenol foi monitorado a 410 nm

A absorvidade molar do p-nitrofenol é $1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$



- Da reta com os dados de velocidade inicial $\text{Abs/seg} = 0,0053/\text{seg}$ ou $0,318 \text{ abs/min}$

- Utilizando a lei de Lambert-Beer temos:

$$-\text{Abs} = 1 (\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times C (\text{mM})$$

$$-0,318/1.1 = C$$

$$-C = 0,318 \text{ mM}$$

$$\begin{array}{rcl} 0,318 \text{ milimoles} & \text{-----} & 1000 \text{ ml} \\ x & \text{-----} & 2 \text{ ml (volume total da reação)} \end{array}$$

$X = 0,000636$ milimoles de p-nitrofenol em 1 min ou 0,636 micromoles

Portanto, dentro da cubeta haviam 0,636 UI de beta-glicosidase. Como essa quantidade vinha de 0,1 ml de extrato, havia 6,36 UI/ml de extrato.

Como esse extrato estava diluido 1:5, no extrato original haviam 31,8 UI/ml extrato

Exercício de aplicação:

Ex. 1 - Um extrato contém 20 mg/ml. Dez microlitros desse extrato num volume de reação de 0,5 ml catalisaram a formação de 30 nmoles de produto em 1 min sob condições ótimas de ensaio. A) exprima v em termos de nmoles/volume de ensaio; b) micromoles/ml/min c) Qual seria V se os mesmos 10 microlitros fossem ensaiados num volume de 1 ml? d) Qual a concentração da enzima no extrato (U/ml) e) Qual a atividade específica da reação?

Exercício de aplicação:

2) A partir dos dados fornecidos abaixo calcular a atividade (Unidades/mg proteína) da maltase e da trealase presentes em um homogeneizado de tubo digestivo de um inseto. Uma unidade de enzima é a quantidade de enzima que catalisa a hidrólise de 1 micromol de substrato por min em condições definidas

Curva padrão de proteína método de Lowry

Tubo	Albumina 0,25 mg/ml (ml)	H ₂ O (ml)	Reagente C (ml)	Reagente de Folin (ml)	A _{750 x B}
1	0,02	0,18	1	0,1	0,05
2	0,04	0,16	1	0,1	0,07
3	0,06	0,14	1	0,1	0,133
4	0,08	0,12	1	0,1	0,155
5	0,10	0,10	1	0,1	0,23
6	0,16	0,04	1	0,1	0,345
7	0,20	-	1	0,1	0,427
8	-	0,20	1	0,1	-

Curva padrão de glicose método da Glicose oxidase (TGO)

Tubo	Glicose 0,5 mg/ml (ml)	H ₂ O (ml)	Reativo (TGO)	A _{420 x B}
1	0,01	0,49	3	0,061
2	0,02	0,48	3	0,125
3	0,05	0,45	3	0,3
4	0,10	0,40	3	0,661
5	0,15	0,35	3	1,0
6	0,20	0,30	3	1,32
B		0,50	3	-

0,1 ml do homogeneizado de tubo digestivo foi submetido ao método de Lowry et al. E resultou em uma absorbancia $A_{750} = 0,300$. Amostras do mesmo homogeneizado acima foram adicionadas em tubos, como descrito abaixo, na presença de maltose 14 mM ou trealose 14 mM em tampão citrato fosfato 50 mM pH 6,0 e deixadas a 30 °C pelos tempos indicados. Após os tempos as amostras foram fervidas e depois de esfriar o reagente de TGO foi adicionado e glicose determinada.

Ensaio de trealase

Tubo	Homogeneiza do (ml)	Trealose em tampão (ml)	Tempo (min)	TGO (ml)	A ₄₂₀ x B
1	0,25	0,25	30	3	0,08
2	0,25	0,25	60	3	0,17
3	0,25	0,25	90	3	0,27
4	0,25	0,25	120	3	0,365
B	-		-	3	-

Significado das expressões cofator, grupo prostético e coenzima

Cofator - substâncias que, não sendo reagentes nem produtos da reação, são indispensáveis à atividade da enzima que catalisa a reação em análise. Ex. ATP-Mg²⁺

Coenzimas são substâncias que podem estar em dois estados (ou formas) interconvertíveis durante o metabolismo celular: NAD⁺/NADH; NADP⁺/NADPH; a coenzima A: acetil-CoA; succinil-CoA ou acil-CoA.

Grupo prostético - componentes de uma proteína que não são constituídas por resíduos aminoacídicos mas que estão permanentemente ligados (em muitos casos por uma ligação covalente) à(s) cadeia(s) aminoacídica(s).

Os nomes das enzimas descrevem as suas atividades catalíticas

Quando a uma mesma atividade enzimática correspondem várias proteínas que são produtos de genes distintos que coexistem numa mesma espécie diz-se que estas proteínas são **isoenzimas** e são denominadas com o mesmo nome.

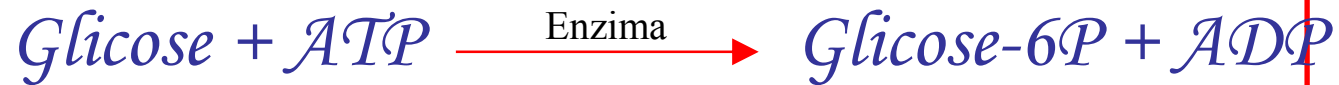
NOMECLATURA

Classificação das enzimas em relação à reação catalisada (ENZYME COMMISSION)

Classes de enzimas	Numero de subclasses	Tipo de reação
1. Oxidorredutases	20	Envolve o movimento de eletrons de uma molécula a outra. Em sistemas biológicos nós vemos a remoção de hidrogênio do substrato e as enzimas são chamadas desidrogenases.
2. Transferases	9	Envolve a transferência de grupos de átomos de uma molécula a outra
3. Hidrolases	12	Catalisa reações entre um substrato e a água. Moléculas grandes são quebradas em pequenas unidades.
4. Liases	7	Catalisam a adição de grupos a duplas ligações ou a formação de duplas ligações através da remoção de grupos.
5. Isomerases	6	Catalisam a transferência de grupos de uma posição a outra na mesma molécula.
6. Ligases	5	Ligam moléculas através de ligações covalentes..

O que significam os números do tipo “EC 2.7.1.1”?

Utilizando-se uma classificação proposta pela Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular.



Nome trivial: Hexoquinase

Nome Sistemático: ATP:glicose fosfotransferase (EC 2.7.1.1)

2: Transferase

7: Fosfotransferase

1: Fosfotransferase com grupo OH comoceptor

1: Fosfotransferase com grupo OH da glicose comoceptor

Enzimas usadas em processos industriais

Classe	Enzimas Industriais
1.Oxidoredutases	Peroxidases Catalases Glucose oxidases Lacases
2.Transferases	Frutosil-transferases Glucosil-transferases
3.Hidrolases	Amilases Celulases Lipases Pectinases Proteases Pululanases
4.Liases	Pectato liases Alfa-acetolactase descarboxilases
5.Isomerases	Glucose isomerase
6.Ligases	No momento ainda não são usadas

TIPO DE ENZIMA	CÓDIGO EC	SINÓNIMO	MECANISMO
Endo-1,4-β-D-glucano-4-glucanohidrolase	EC 3.2.1.4	Endoglucanase Endocelulase	$- G - G - G - G - G - G - G - G^* -$  quebras de ligações internas ao acaso
Exo- 1,4-β-D-glucan-4-celobiohidrolase	EC 3.2.1.91	Celobiohidrolase Exoglucanase Exocelulase (CBH I y II de <i>T.reesei</i>)	$- G - G - G - G - G - G - G - G^* -$  liberação de celobiose a partir do extremo redutor* ou não-redutor
Exo- 1,4-β-D-glucan-4-glucohidrolase	EC 3.2.1.74	Exoglucanase Exocelulase	$- G - G - G - G - G - G - G - G^* -$  liberação de glucose a partir do extremo não-redutor
1,4- β-D-Glucosidase	EC 3.2.1.21	Celobiase	$G - G, \quad G - G - G - G$  liberação de glucose a partir de celobiose ou de celodextrinas pequenas
Celobiose-desidrogenase	EC 1.1.9.18	CDH	Oxidação do extremo redutor de celobiose
LPMO (GH61)	EC 3.2.1.4		?

Carbohydrate-Active enZymes Database

CAZy database descreve as familias de carboidrato hidrolases e CBD

Online desde 1998, CAZy é uma base dedicada a analise de genoma, estrutural e informação bioquímica de Carbohydrate-Active Enzymes (CAZymes).

Classes de enzimas cobertas

Glycoside Hydrolases (GHs) : hydrolysis and/or rearrangement of glycosidic bonds (see CAZypedia [definition](#))

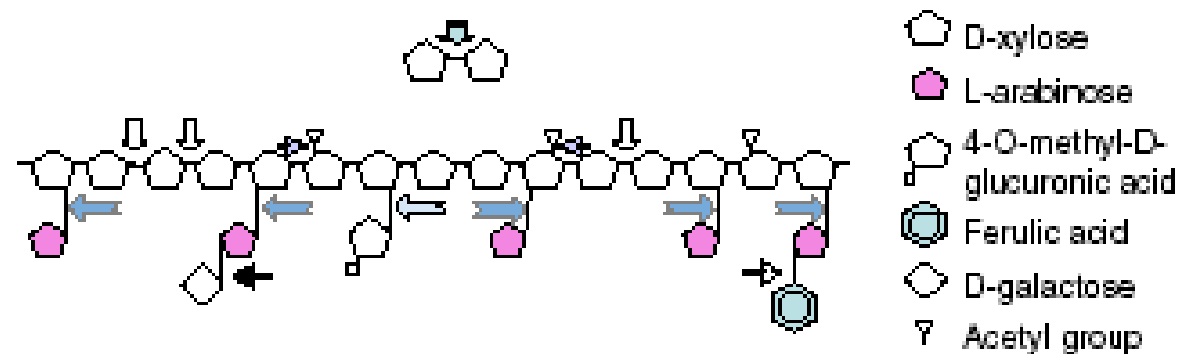
GlycosylTransferases (GTs) : formation of glycosidic bonds (see [definition](#))

Polysaccharide Lyases (PLs) : non-hydrolytic cleavage of glycosidic bonds

Carbohydrate Esterases (CEs) : hydrolysis of carbohydrate esters

Carbohydrate-Binding Modules (CBMs) : adhesion to carbohydrates

Esquema de ação do complexo hemicelulolítico



SYMBOL	ENZYME	EC-NUMBER	LINKAGE HYDROLYSED
↓	Endo-1,4-β-xylanase	3.2.1.8	β-1,4
⬇	β-D-xyllosidase	3.2.1.37	β-1,4
→	α-L-arabinofuranosidase Arabinoxylan arabinofuranohydrolases	3.2.1.55	α-L-1,2; α-L-1,3 and α-L-1,5
→	α-D-glucuronidase	3.2.1	α-1,2
→	feruloyl esterase	3.2.1	ester bond
→	α-D-galactosidase	3.2.1.22	α-1,6
→	acetoxylan esterase	3.1.1.6	ester bond

Fonte: Aro et al, 2005.

Famílias: glicosil hidrolases e carboidrato esterases

The hemicellulolytic enzymes, their classification into GH and CE families and the current crystallographic state.				
Enzyme ^a	Substrates	EC	Family	Structure status and PDB entries ^b
Endo- β -1,4-xylanase	β -1,4-xylan	3.2.1.8	GH 5	Cryst. (1BQC)
			8	Cryst. (1IS9)
			10	1FH7, 1CLX, 1XYZ, 1HIZ...
			11	1H4G, 1BCX, 1IGO, 1FSJ...
			43	(1GYD)
Exo- β -1,4-xylosidase	β -1,4-xylooligomers xylobiose	3.2.1.37	GH 3	Cryst. (1EX1)
			39	Cryst.
			43	(1GYD)
			52	–
			54	–
α -L-Arabinofuranosidase	α -Arabinofuranosyl (1 $\rightarrow$ 2) or (1 $\rightarrow$ 3) xylooligomers α -1,5-arabinan	3.2.1.55	GH 3	(1EX1)
			43	(1GYD)
			51	Cryst.
			54	–
			62	Cryst.
Endo- α -1,5-arabinanase	α -1,5-arabinan	3.2.1.99	GH 43	1GYD
α -Glucuronidase	4-O-methyl- α -glucuronic acid (1 $\rightarrow$ 2) xylooligomers	3.2.1.139	GH 67	1K9D, 1GQI
Endo- β -1,4-mannanase	β -1,4-mannan	3.2.1.78	GH 5	1BQC, 1QNO
			26	1GVY, 1GW1, 1J9Y
Exo- β -1,4-mannosidase	β -1,4-mannooligomers mannobiose	3.2.1.25	GH 1	(1QOX)
			2	(1BGL)
			5	(1COD)
α -galactosidase	α -galactopyranose (1 $\rightarrow$ 6) mannooligomers	3.2.1.22	GH 4	–
			27	Cryst. (1KTB)
			36	–
			57	(1K1W)
β -glucosidase	β -glucopyranose (1 $\rightarrow$ 4) mannopyranose	3.2.1.21	GH 1	1BGA, 1GNX, 1QOX
			3	(1EX1)
Endo-galactanase	β -1,4-galactan	3.2.1.89	GH 53	1FHL, 1FOB
Acetyl xylan esterase	2- or 3-O-acetyl xylan	3.1.1.72	CE 1	(1JJF)
			2	–
			3	–
			4	–
			5	1QOZ, 1G66
			6	–
			7	Cryst.
Acetyl mannan esterase	2- or 3-O-acetyl mannan	3.1.1.6		
Ferulic and <i>p</i> -cumaric acid esterases		3.1.1.73	CE 1	1JJF, 1GKK

Diversidade de hemicelulases

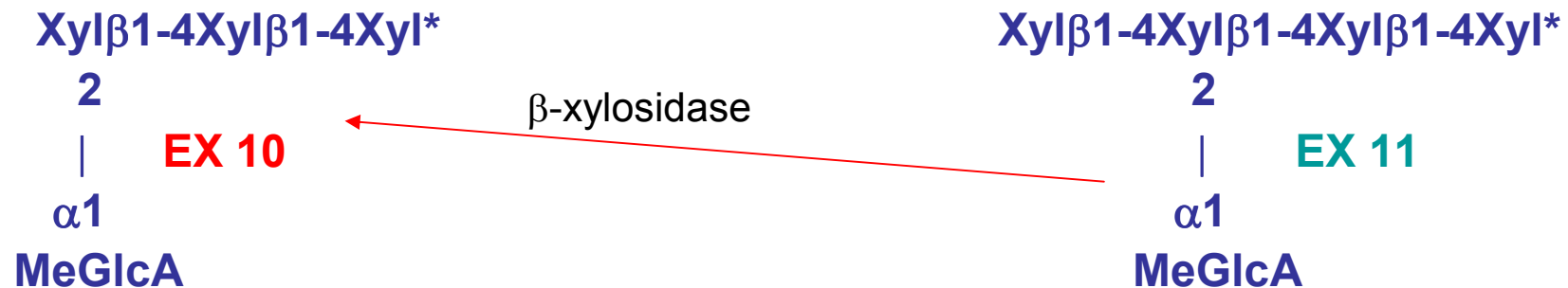
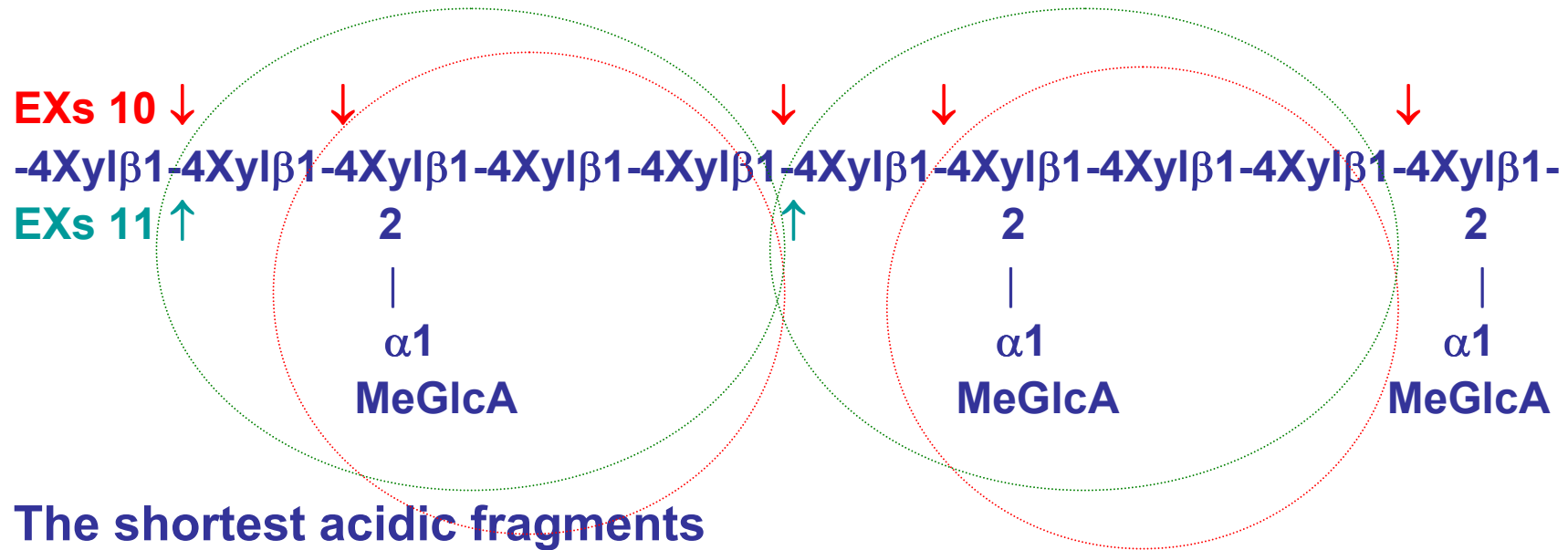
The occurrence of the main hemicellulase genes in representative microorganisms (compiled from the CAZy server)																			
Organism	Total hemi- cellulases	Xylanase GH family			Xylosidase GH family			Arabinofuranosidase/ arabinanase GH family				α -Glucuronidase GH family	Mannanase GH family		Mannosidase GH family	Acetyl xylan esterase CE family			
		10	11	43	3	39	43	52	43	51	54	62	67	5	26	2	1	2	4
Bacteria (complete genome)																			
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	4	1							1										
<i>Bacillus halodurans</i> C-125	9	1	1			1		1		2			1		2				2
<i>Bacillus subtilis</i> 168	7		1	1		1		2	2										
<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705	13			2				6	5										
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	8	2				1	2			1			1					1	
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	14	2		1		1	3		1	1				4			1		
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	11	2				1		3	2		1								
<i>Thermotoga maritima</i>	6	2								1			1		1		1		
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Citri</i> str. 306	12	3				1	6			1			1						
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC 33913	11	2	2			1	6			1			1						
Bacteria																			
<i>Cellulomonas fimi</i>	5	2	1											1		1			
<i>Cellvibrio japonicus</i>	11	4	2					1	1		1	1		1					
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> T-6	8	2				1		1		2			1					1	
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 21	4	2					2												
Fungi																			
<i>Aspergillus niger</i>	12		4		1			1	1	2	1				1		1		
<i>Trichoderma reesei</i>	8	1	2		1					1		1		1					1

Diversidade de hemicelulases: *Penicillium*

Enzymatic activity	Source	Gene	Glycosyl hydrolase family	Reference
Endoxylanase	<i>P. funiculosum</i>	<i>xynA</i>	7	Alcocer et al. (2003)
		<i>xynB</i>	11	Alcocer et al. (2003)
		<i>xynC</i>	11	Furniss et al. (2002)
		<i>xynD</i>	10	Furniss et al. (2005)
	<i>P. purpurogenum</i>	<i>xynA</i>	10	Chávez et al. (2001a)
		<i>xynB</i>	11	Díaz et al. (1997)
	<i>P. chrysogenum</i>	<i>xylP</i>	10	Hass et al. (1993)
	<i>P. canescens</i>	<i>xylA</i>	10	Serebryanyi et al. (2002)
	<i>P. simplicissimum</i>	<i>xynA</i>	10	Schmidt et al. (1998)
	<i>Penicillium</i> sp. 40	<i>xynA</i>	11	Kimura et al. (2000)
β -xylosidase	<i>P. herquei</i>	<i>s2</i>	43	Ito et al. (2003)
	<i>P. purpurogenum</i> ^a	–	43	Ito et al. (2003)
Arabinofuranosidase	<i>P. purpurogenum</i>	<i>abfl</i>	54	Carvallo et al. (2003)
Enzymatic activity	Source	Gene	Carbohydrate esterase family	Reference
Acetyl xylan esterase	<i>P. purpurogenum</i>	<i>axell</i>	5	Gutiérrez et al. (1998)
		<i>axel</i>	1	Gordillo (unpublished)
Feruloyl esterase	<i>P. funiculosum</i>	<i>faeA</i>	1	GenBank AJ312296
		<i>faeB</i>	1	Kroon et al. (2000)

Fonte: Chávez et al, 2006.

Modo de ação de EXs 10/11 em glucuronoxilana



MeGlcA substituents do not serve as recognition determinants

Ação de GH10 EX em ácidos aldouronicos

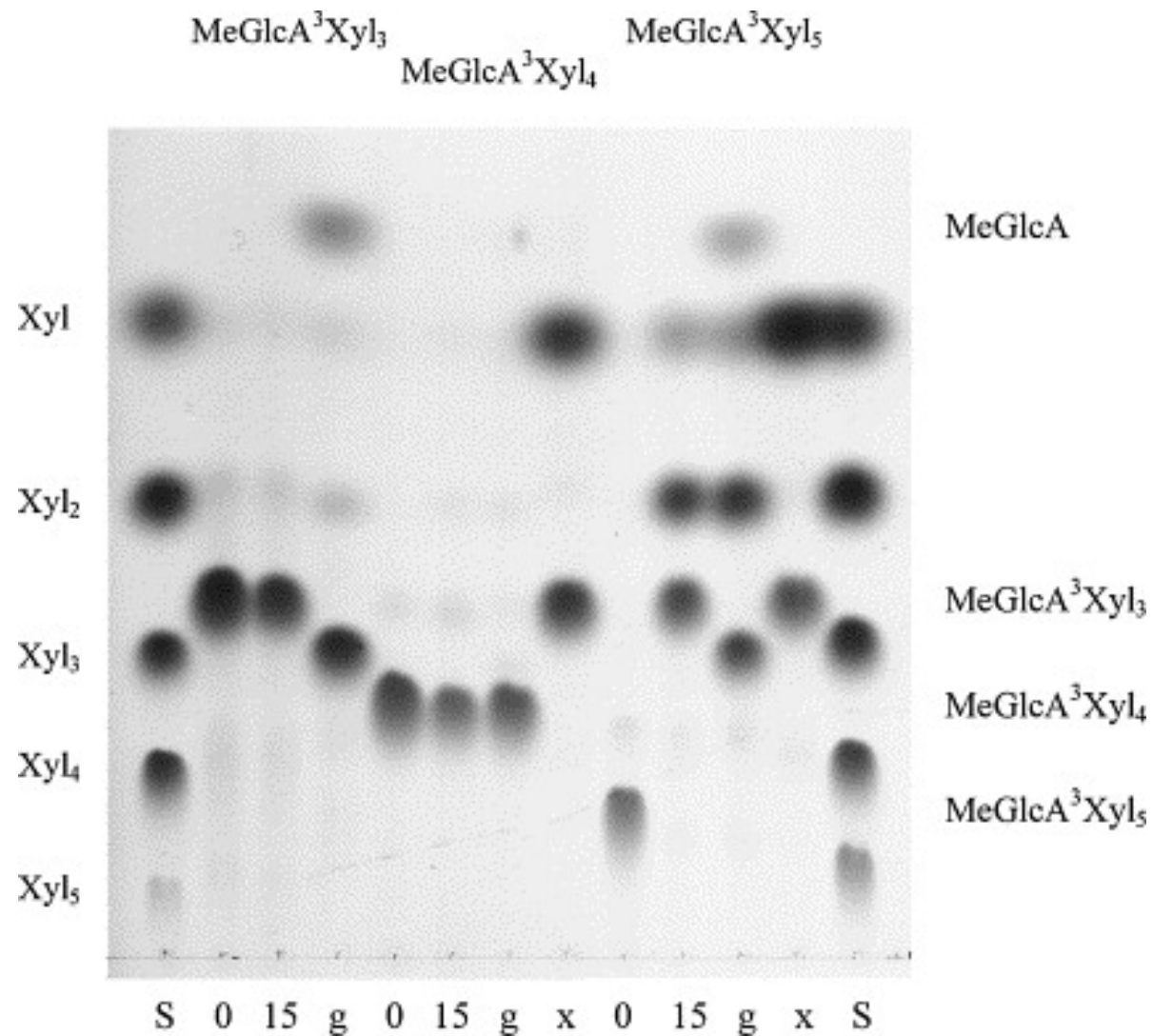


Diagram illustrating the structure of the *Araf* gene and its expression patterns. The gene structure shows exons (EXs) 10 and 11, with introns (I) indicated by arrows. The expression patterns are shown for various tissues: *Araf* (blue), *α1* (green), and *β1* (red). The diagram shows that *Araf* is expressed in all tissues, while *α1* and *β1* are expressed in specific tissues (e.g., *α1* in brain, *β1* in liver).

$(\text{Xyl}\beta 1-4)\text{Xyl}\beta 1-4\text{Xyl}^*$
 3
 |
 $\alpha 1$
Araf

EX 10

$\text{Xyl}\beta 1-4\text{Xyl}\beta 1-4\text{Xyl}\beta 1-4\text{Xyl}^*$
 3
 |
 $\alpha 1$
Araf

EX 11

Mode of action seems to be influenced by L-Araf substituents in EXs of GH10

