

EXERCICIO PRATICO SOBRE A DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E PROTEÍNAS

OBJETIVOS:

1. Reconhecer o tempo de incubação como um dos fatores que podem influir na atividade das enzimas
2. Identificar a relação linear (velocidade inicial) que corresponde ao tempo ideal para medir a atividade das enzimas

REAGENTES:

Suspensão de enzimas (luminase)

Tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 8

Solução de substrato (1%) – xilana oat spelts

Reativo do ácido 3,5 – dinitrosalicílico

TÉCNICA:

CURVA PADRAO:

1) xilose:

- Preparar uma curva padrão colocando 1 ml de soluções de xilose (Merck) nas concentrações de 2, 2,5, 3,33, 7,5 e 10 $\mu\text{mol/mL}$.
 - Adicionar 1,5 mL de DNS e os tubos de ensaio serão fervidos a 100 °C em banho-maria, por 5 min.
 - Após o resfriamento, realizar-se leitura da absorbância a 540 nm.
- Construir o gráfico Abs x concentração de xilose (microles)

ENSAIO XILANASE

Foram adicionados 0,9 mL de xilana 1 %, preparada em tampão fosfato 50mM, pH 8,0 e 0,1 mL de solução enzimática em tubo de ensaio que foi incubado a 50 °C por 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS e o tubo de ensaio foi colocado em banho com água fervente, por 5 minutos. Após o resfriamento, realizou-se a leitura da absorbância da reação a 540 nm, para determinação dos açúcares redutores presentes (Espectrofotômetro U-2900 - Hitachi) (MILLER, et al. 1969).

Foi feito um controle para cada amostra, adicionando o reagente de DNS antes da adição da enzima, para descontar os açúcares redutores presentes. A curva padrão foi construída com soluções de xilose (Merck). Uma unidade de atividade enzimática corresponde a formação de 1 μmol de açúcar por minuto, expresso em xilose.

Proteínas Totais O teor de proteínas será determinado em tubos de microcentrifuga com tampa rosqueada e com anel de vedação foram adicionados 100 microlitros de amostra e 300 microlitros de solução de HCl 9,0 mol/L. Os tubos foram fechados, agitados em vortex e mantidos em banho a 100 °C por 24 h para que as proteínas fossem hidrolisadas. Após esse tempo, os tubos foram resfriados e centrifugados a 5000 rpm por 1 minuto. Em seguida 100 microlitros da amostra hidrolisada foi adicionado a tubos de centrifuga de 1,5 ml do tipo eppendorf contendo 100 microlitros de NaOH 5 mol/L. A mistura foi agitada em vortex seguido da adição de 100 microlitros de ninidrina 2% e uma nova agitação em vortex foi realizada. A mistura foi incubada a 100 °C por 10 min e centrifugada a 5000 rpm por 1 min. Em seguida foram adicionados 500 microlitros de solução de etanol 50% (v/v). Após agitação em vortex a absorbância foi lida a 560 nm. Os valores foram convertidos em concentração de proteínas utilizando uma curva de calibração de albumina (BSA) nas concentrações de 0 a 800 microgramas/ml.

Todos os dados foram registrados em tabelas para vocês procederem aos cálculos recomendados:

1) Curva padrão de xilose

[xilose] (micromol/ml)	Abs 540 nm	Abs 540 nm	Abs 540 nm	média	Desvio padrao
0					
2	0,001	0,009	0,002		
2,5	0,025	0,03	0,02		
3,33	0,132	0,12	0,116		
5	0,279	0,327	0,303		
7,5	0,524	0,496	0,494		
10	0,799	0,809	0,782		

Fazer o gráfico Abs 540 x [xilose]

2) Proteínas (ninhidrina)

1) Curva padrão de BSA

[BSA] (micrograma/ml)	Abs 560 nm
0	
100	
200	
500	
400	
600	
800	

Fazer o gráfico Abs 560 x [BSA]

0,1 ml da enzima diluída (1:1000) foi submetida ao método da ninhidrina e resultou em uma absorbância Abs 560 nm= 0,6. Amostra da enzima diluída 1:20000 foram adicionadas em tubos na presença de 0,9 mL de xilana 1 %, preparada em tampão fosfato 50mM, pH 8,0 e deixadas por 5 min a 50 oC.

3) Reação enzimática

Amostras

a) Solução enzima --> b) Diluição 0,1ml /100 ml--> c) 0,5 ml /10- ml (diluição 2)

b) o aparelho foi zerado com o branco do substrato

Amostra diluida	A540 nm	[E] micromol/ml	Atividade (UI/ml)		
1	0,35				
2	0,308				
3	0,326				
Branco da enzima	0,09				

a) Calcular a velocidade de hidrólise do substrato;

b) Calcular a atividade específica;

Explicar os resultados obtidos