Enzimas

Propriedades
Obtenção
Purificação

Profa. Sandra H da Cruz

1

1 Introdução

- História da Bioquímica começa com pesquisas sobre enzimas
- Catálise biológica - início séc.XIX
  - estômago - digestão da carne
  - saliva - digestão do amido
- Década de 30
  - 1930 - amilase ou ptialina
  - 1936 - pepsina e tripsina

2

Introdução

- Início do Século XX
  75 enzimas → isoladas e cristalizadas
  – ficou evidenciado caráter proteico
- Atualmente
  - 4000 enzimas conhecidas
  - 200 são de uso comercial

3

Introdução

- Enzimas: aditivos autorizados nos alimentos
- Característica importante que constitui uma vantagem na utilização de enzimas:
  - atividade da enzima pode ser facilmente controlada a partir de um ajuste nas condições da reação, assim como interromper a reação por aquecimento quando necessário.
- Limitação principal:
  - ✓ dificuldades técnicas (organização de sistemas multienzimáticos)
  - ✓ necessidade de proporcionar a energia necessária para realizar possíveis reações sintéticas temodinamicamente desfavoráveis

4

2. CARACTERÍSTICAS DAS ENZIMAS

2.1 Definição

Enzimas como polipeptídeos

- Estrutura proteica
- sequência
- tamanho: maioria 30 a 50 kDa
- Estabilidade térmica

5

Características

ENZIMAS: polipeptídeos que catalisam uma reação com um certo grau de especificidade

As enzimas são catalisadores de todas as reações que ocorrem nos seres vivos

CATALISADOR - acelera a velocidade das reações e não são consumidos

MECANISMO DE AÇÃO: SÍTIOS ATIVOS

E = polipeptídeo / catálise / especificidade

6

2.2 Propriedades das enzimas

- Enzimas – catalizadores biológicos
- Sítios ativos
- Eficiência catalítica
- Especificidade
- Cofatores
- Regulação
- Condições amenas de pH e temperatura

7

- Vantagens da utilização de enzimas na fabricação de produtos:

✓ As enzimas transformam rapidamente seus substratos em temperaturas moderadas e em valores de pH próximos a neutralidade, normalmente com uma alta especificidade.

✓ Esta alta especificidade requer a utilização de uma única enzima. Para isto é necessária uma *purificação* para se obter uma determinada atividade enzimática, eliminando as enzimas contaminantes que existem em um extrato bruto obtido a partir de microrganismos, plantas ou uma fonte animal. Isto aumenta o custo da enzima.

8

Características: propriedades

Enzimas = Catalisadores

- Propriedades
  - Aceleram as reações
  - Não são consumidos na reação
  - Atuam em pequenas concentrações
  - Não alteram o equilíbrio das reações

9

Características: propriedades

E = aceleram reações químicas

Decomposição do H_2O_2

Condições da Reação	Energia livre de Ativação kj/mol	kcal/mol	Velocidade Relativa
Sem catalisador	75,2	18,0	1
Platina (cat químico)	48,9	11,7	$2,77 \times 10^4$
Enzima Catalase	**23,0**	**5,5**	**$6,51 \times 10^8$**

10

Características: propriedades

E = não são consumidas na reação

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} H_2O + O_2$$

$$E + S \xrightarrow{ES} E + P$$

11

Características: propriedades

E = Atuam em pequenas concentrações

1 molécula de Catalase → decompõe 5 000 000 de moléculas de H_2O_2

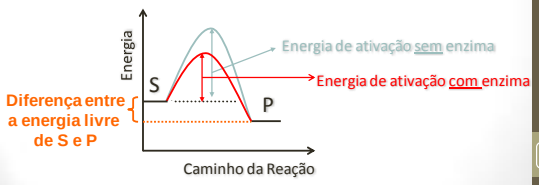
pH = 6,8 em 1 min

12

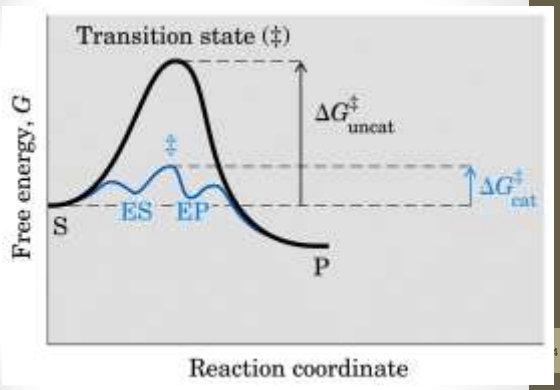
Características: propriedades

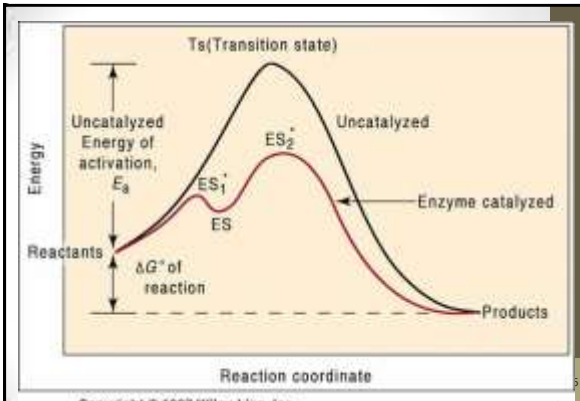
E = Não alteram o estado de equilíbrio

- no nível basal (forma estável), S e/ou P contém uma quantidade característica de energia livre
- o equilíbrio entre S e P reflete a diferença em energia livre dos seus estados basais

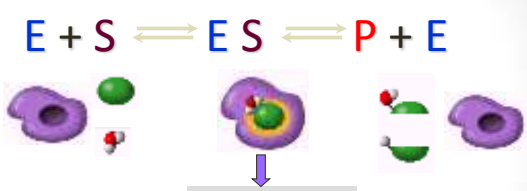


13



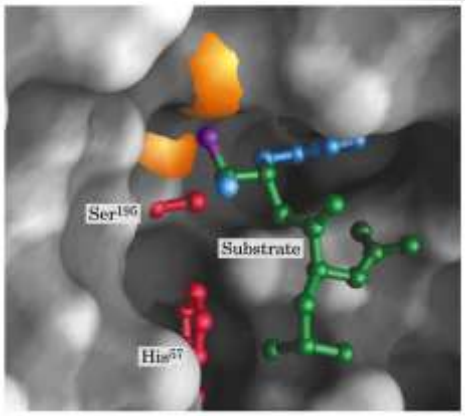


2.3 Modo de ação das enzimas



Substrato se liga ao SÍTIO ATIVO da enzima

16



17

Modo de ação...

$$E + S \rightleftarrows ES \rightleftarrows ES^* \rightleftarrows EP \rightleftarrows E + P$$

Energia livre de ativação

Velocidade de reação

18

Substratos

↓

Complexo ES (Enzima-Substrato)

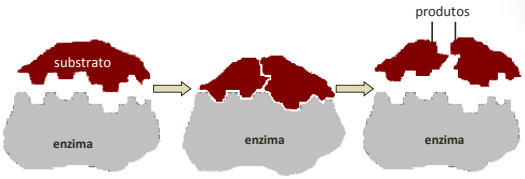
↓

Ligação Sítio Ativo
Chave-fechadura
Incaixe induzido

↓

Liberação do Produto
+
Enzima inalterada

19



20

Formação do Complexo Enzima / Substrato

✔ 2 modelos propostos:

- Chave-Fechadura
- Encaixe Induzido

21

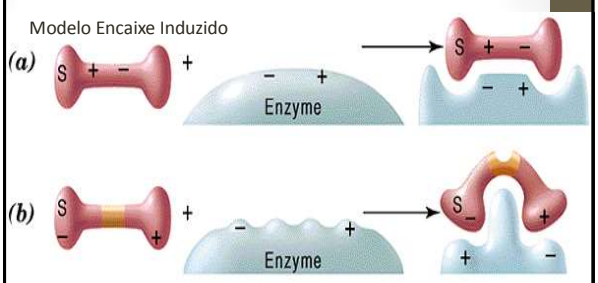
Enzimas
Ligação da enzima ao substrato

Modelo
Chave-Fechadura

22

Modelos de ligação da enzima ao substrato

Modelo Encaixe Induzido



Modelo Encaixe Induzido combinado com a tensão do substrato

Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.

2.4 Nomenclatura

No século XIX - poucas enzimas identificadas

- Adicionava-se sufixo ASE ao nome do substrato
  - enzima que hidrolisam
    - gorduras (lipo - grego) - LIPASE
    - amido (amylon - grego) - AMILASE
    - proteínas - PROTEASE
- Nomes arbitrários
    - Tripsina e pepsina - proteases
    - Catalase - H_2O_2

Nome comum: sufixo ASE

Nome sistemático: União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB)

6 classes

24

International Classification of Enzymes*

No.	Class	Type of reaction catalyzed
1	Oxidoreductases	Transfer of electrons (hydride ions or H atoms)
2	Transferases	Group-transfer reactions
3	Hydrolases	Hydrolysis reactions (transfer of functional groups to water)
4	Lyases	Addition of groups to double bonds, or formation of double bonds by removal of groups
5	Isomerases	Transfer of groups within molecules to yield isomeric forms
6	Ligases	Formation of C—C, C—S, C—O, and C—N bonds by condensation reactions coupled to ATP cleavage

*Most enzymes catalyze the transfer of electrons, atoms, or functional groups. They are therefore classified, given code numbers, and assigned names according to the type of transfer reaction, the group donor, and the group acceptor.

- Sistema Oficial IUB
- Cada enzima - nº de código (E.C.- Enzyme Comission) com 4 dígitos que caracterizam o tipo de reação

1º dígito - classe
2º dígito - subclasse
3º dígito - sub-subclasse
4ºdígito - indica o substrato

Classe da Enzima	Número		Tipo de reação
	Classificadas	Disponíveis	
1.oxidoredutases	650	90	Redução-oxidação: oxigenação de ligações de C-H, C-C, C=C; ou remoção total ou adição de equivalentes de átomos de hidrogênio
2.transferases	720	90	Transferência de grupos: aldeídico, cetônico, acila, açúcar, fosfato ou metila
3.hidrolases	636	150	Hidrólise: formação de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilasanidridos, glicosídeos, organohaletos
4.liases	255	35	Adição-eliminação de pequenas moléculas nas ligações C=C, C=N, C=O
5.isomerases	120	6	Isomerização tais como racemização, epimerização, re-arranjos
6.ligases	80	5	Formação-clivagem de ligações C-O, C-S, C-N, C-C com concomitante clivagem de trifosfato

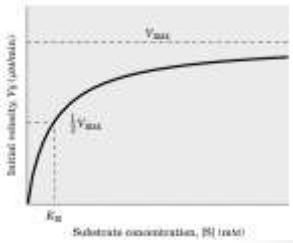
3 Propriedades das enzimas

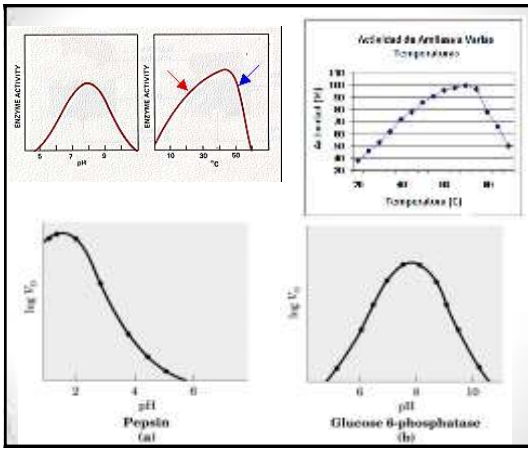
- Catalizador de reação
  - Sítio ativo
- Especificidade

✓ atuam em condições brandas de T e pH
✓ são eficientes em baixas concentrações
✓ Não alteram o equilíbrio das reações

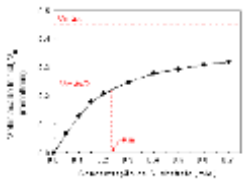
Fatores que afetam a ação das enzimas

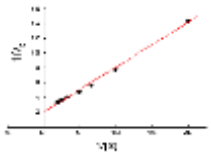
- Concentração do substrato
- Temperatura
- pH





Cinética enzimática





$$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{[S] + Km}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{Km}{V_{max}} \frac{1}{[S]}$$

CINÉTICA ENZIMÁTICA

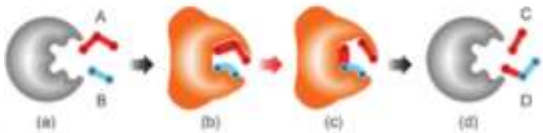
- Victor Henri (1903): E + S ⇔ ES ???????

- 1913
  Leonor Michaelis -Enzimologista
  Maud Menten - Pediatra

$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{K_p} E + P$$

Etapa rápida — Etapa lenta

Formação do complexo transitório



Constante de Michaelis-Menten

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Km – indica a afinidade da enzima pelo substrato,
diferente de substrato para substrato e de enzima para enzima.

Vmáx - velocidade máxima que a reação pode alcançar, na situação virtual em que todos os enzimas se encontram ligados ao substrato.

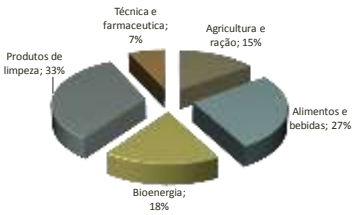
Termos básicos utilizados em cinética enzimática

- **Atividade enzimática**: designa a própria atividade catalítica da enzima, em geral expressa em unidades de velocidade (massa transformada por unidade de tempo – p.e. μmol minuto^{-1})
- **Substrato**: nome dado a substancia que será catalisada pela enzima
- **Produto**: substância resultante da transformação enzimática do substrato

Termos básicos

- **Unidade de Enzima**
  - quantidade de enzima capaz de transformar 1,0 mmol de substrato por minuto em condições definidas de pH, temperatura e forca iônica
- **Atividade específica**:
  - atividade da enzima,
  - geralmente expressa em massa por unidade de tempo, dividida pela quantidade de proteína.
  - Medida do grau de pureza de uma preparação enzimática.

4 Áreas que utilizam enzimas



Distribuição das vendas da Novozymes – Dados de 2015

http://report2015.novozymes.com/the-big-picture/2015-in-brief#map

37

Enzimas utilizadas em alimentos e bebidas

- Amilases
- Peptidases
- Pectinases
- Glicose-isomerase

38

Papaína

- Obtenção: Frutos verdes da *Carica papaya;*

- Facilmente inativada pela oxidação, podendo ser inicialmente revertida pela adição de agentes redutores como sulfeto de hidrogênio, cianeto de hidrogênio, sulfetos e sulfitos;

- Presença de quantidades significativas em outras partes da planta exceto as raízes;

39

Papaína

- pH: 5,0
- Apresenta alta estabilidade, principalmente térmica;
- pH dependente – perde atividade em condições ácidas;
- Ampla atividade hidrolítica – atua tanto em proteínas como em pequenos peptídeos
- Ação hidrolisante em substratos sintéticos, amidas e ésteres;

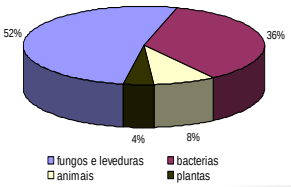
40

Fontes de enzimas

Enzimas biologicamente ativas podem ser extraídas a partir de qualquer organismo vivo.

Uma grande variedade de fontes são utilizadas para produção de enzimas comerciais.

- animais
- vegetais
- microrganismos



41

Enzimas em alimentos

- Papel destacado - Influi na composição, processamento e deterioração dos alimentos
- Podem ser úteis ou indesejáveis
- Detecção da atividade em determinado produto pode servir de indicador da eficiência de uma determinada operação
  - Ex. vegetais branqueados – atividade peroxidasica = indicador do processo térmico empregado

42

Efeito desejáveis

- Modificar matérias-primas e/ou obter produtos específicos
  - ✓ Panificação
  - ✓ Modificação enzimática de materiais amiláceos
  - ✓ Fabricação de sucos de frutas
  - ✓ Modificação de proteínas
  - ✓ Fabricação de bebidas alcoólicas
  - ✓ Fabricação de laticínios

43

Efeito indesejáveis

- ✓ Escurecimento de frutas e vegetais causado pelas polifenoloxidases
- ✓ Rancidez de farinhas causada pela ação de lipases e lipoxigenases
- ✓ Amolecimento de tecidos vegetais provocado pelas enzimas pécticas

44

5 Obtenção de enzimas

- Enzimas de interesse industrial:
  - trituração de vegetais (sementes, polpas e raízes);
  - trituração de tecidos animais (mucosa gástrica, pâncreas, fígado e sangue);
  - através de microrganismos.
- Materiais de partida:
  - Células vegetais
  - Tecidos animais
  - Células microbianas

45

Enzimas de fontes microbianas

- substituem as enzimas de origem vegetal e animal,
- rápido ciclo reprodutivo dos m.o.;
- grande população de células com redução no tempo de produção
- manipulação genética ⇨ cepas de alta produtividade e especificidade
- operações envolvidas na extração de enzimas: simples
  - controle da produção pode ser feito desde a fonte até a comercialização.

46

Obtenção de enzimas microbianas

A Seleção de m.o. (linhagem pura)

a composição exata dos meios varia de acordo com:

- a indústria;
- a linhagem do m.o.
- o sistema enzimático desejado
- o tipo de cultivo usado

Nutrientes empregados na preparação dos meios:
- farelo de trigo,
- extrato de levedura,
- resíduos de destilação,
- polpa de citrus e
- outros

47

B Método de cultivo

- **Cultura líquida submersa**

  Processo de fermentação submersa (FS)

- **Cultivo em superfície ou método do meio semi-sólido**

  Fermentação em estado sólido

  - fermentação semisólida (FSS)
  - sólida (FS)
  - em estado sólido (FES)

48

Fermentação em estado sólido

- maioria das enzimas => mét. Cultura submerso
- várias enzimas fúngicas => mét. Semi-sólido

Neste método:

- ✓ Produção é conduzida em grandes câmaras dotadas de bandejas ou em tambores rotativos horizontais;
- ✓ Lavados com detergente;
- ✓ Desinfetados com hipoclorito de sódio ou formaldeido e
- ✓ Submetidos a vapor entre as sucessivas produções.
- ✓ Combinados de acordo com a necessidade, os nutrientes são adicionados à água e submetidos a vapor sob pressão por 30 a 120 minutos. A massa quente é então resfriada à 25 – 40º C e inoculada.

49

Parâmetros analisados durante o crescimento em tambores ou bandejas:

- temperatura,
- pH
- a espessura da camada,
- a pureza da cultura
- a quantidade da enzima

Final da fermentação ⇨ separação do produto

ponto ótimo - determinado pelas análises laboratoriais

atividade enzimática máxima

50

Método de cultura submersa

Ocorre em fermentadores fechados equipados com:

- agitadores,
- dispositivos de aeração para introdução de ar estéril,
- camisas e serpentinas para controle de temperatura.

Fermentadores

- lavados com soda cáustica ou soluções de detergente e água
- esterilizados com vapor ativo após cada processamento.

Meio líquido - esterilizado em sistema contínuo e à parte

- depois levado ao fermentador (previamente esterilizado) ou
- introduz o substrato no fermentador e esteriliza todo o conjunto, em uma só operação.

A massa estéril é resfriada até 25 – 40º C sob pressão.

Após a esterilização – ajusta-se o pH, se necessário.

51

O meio resfriado do fermentador é inoculado com a cultura pura do microrganismo cultivado em frascos agitados ou em pequenos pré-fermentadores providos de agitação e aeração.

Amostragem periódica para controle:

- temperatura,
- pH
- mistura
- pureza da cultura
- consumo de certos componentes
- a quantidade / produção da enzima

52

C Recuperação da enzima

- ✓ Extração da enzima feita com água contendo agente preservante diretamente sobre o material úmido após o final do processo de crescimento ou após a secagem da cultura.
- ✓ Filtração (separa-se os sólidos insolúveis do filtrado)
- ✓ Clarificação (centrifugação ou filtração)
- ✓ Obtenção do extrato bruto

53

6 PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS

Purificação = meio para obter a enzima pura
Preservar a atividade

54

Vegetal, Animal, Microrganismo

↓ *Maceração*
Centrifugação

Extrato celular (extrato bruto)

↓ *Precipitação com sulfato de amônio*

Extrato clarificado

↓ *Purificação: cromatografia*

enzima

55

Table 1. Protein properties and their effect on development of purification strategies

Sample and target protein properties	Influence on purification strategy
Temperature stability	Need to work rapidly at lowered temperature
pH stability	Selection of buffers for extraction and purification. Selection of conditions for ion exchange, affinity or reversed phase chromatography
Organic solvents stability	Selection of conditions for reversed phase chromatography
Detergent requirement	Consider effects on chromatographic steps and the need for detergent removal. Consider choice of detergent.
Salt (ionic strength)	Selection of conditions for precipitation techniques, ion exchange and hydrophobic interaction chromatography
Co-factors for stability or activity	Selection of additives, pH, salts, buffers
Protease sensitivity	Need for fast removal of proteases or addition of inhibitors
Sensitivity to metal ions	Need to add EDTA or EGTA to buffers
Redox sensitivity	Need to add reducing agents
Molecular weight	Selection of gel filtration media
Charge properties	Selection of ion exchange conditions
Biospecific affinity	Selection of ligand for affinity medium
Post translational modifications	Selection of group-specific affinity medium
Hydrophobicity	Selection of medium for hydrophobic interaction chromatography

Enzima extracelular:
✓ clarificação (as células são removidas por centrifugação ou filtração),
✓ concentração ou precipitação (sulfato de amônio)
✓ cromatografia (troca iônica, afinidade, gel filtração ou interação hidrofóbica)

Enzima intracelular:
✓ o primeiro passo é o rompimento das células;
✓ clarificar (centrifugar ou flocular)
✓ precipitar com sulfato de amônio
✓ cromatografia

Enzimas de membrana (mais difícil):
✓ solubilizar
✓ clarificar
✓ cromatografia (troca iônica ou afinidade)

58

Etapa do processo	Operações unitárias
Clarificação (separação de células e seus fragmentos do meio de cultivo)	Filtração convencional, centrifugação, filtração tangencial, floculação
Rompimento de células	Homogeneização, moagem em moinho de bolas, rompimento químico ou enzimático
Purificação de baixa resolução	Precipitação (*salting out*), ultracentrifugação extração em sistemas de duas fases liquidas
Purificação de alta resolução	Cromatografia de troca iônica, de afinidade, de fase reversa e de exclusão molecular
Tratamentos finais (operações para acondicionamento final do produto)	Cristalização, liofilização, secagem

59

6.1 Extração da amostra e clarificação

A. Obtenção do extrato bruto: rompimento das células

Extração por meios físicos:
- Homogeneização
- Agitação com abrasivos
- Suspensão de células submetidas a diferença de pressão
- Sonicação (freqüências superior a 20 kHz)
- Rompimento por congelamento e descongelamento
- Choque osmótico

Extração por meios químicos:
- Detergentes (aniônico –lauril sulfato de sódio; catiônico – brometo de cetil trimetil amônio; e não iônico – Tweens, Triton, etc)
- Enzimas líticas
- Tratamento com álcali (20 min – pH 11 – 12,5)

60

Table 8. Common sample extraction processes.

Extraction process	Typical conditions	Protein source	Comment
Gentle Cell lysis (osmotic shock)	2 volumes water to 1 volume packed pre-washed cells	erythrocytes, E.coli periplasm, intracellular proteins	lower product yield but reduced protease release
Enzymatic digestion	lysozyme 0.2 mg/ml 37 °C, 15 mins.	bacteria, intracellular proteins	lab scale only, often combined with mechanical disruption
Hand homogenisation	follow equipment instructions	liver tissue	
Mincing (grinding)	"	muscle	
Blender Blade homogeniser	follow equipment instructions	muscle tissue, most animal tissues, plant tissues	
Grinding with abrasive e.g. sand	"	bacteria, plant tissues	
Vigorous Ultrasonication or bead milling	follow equipment instructions	cell suspensions, intracellular proteins in cytoplasm, periplasm, inclusion bodies	small scale, release of nucleic acids may cause viscosity problems, inclusion bodies must be resolubilised
Manton-Gaulin homogeniser	follow equipment instructions	cell suspensions	large scale only
French press	follow equipment instructions	bacteria, plant cells	
Fractional precipitation	see section on fractional precipitation	extracellular secreted recombinant proteins, monoclonal antibodies, cell lysates	precipitates must be resolubilised

B. Clarificação prévia das enzimas

- ❑ Centrifugação
- ❑ Filtração
- ❑ Floculação e coagulação (adição de substâncias que desestabilizam as partículas levando a sua agregação e aglomerados, portanto é um fenômeno que ocorre na superfície das "partículas")

62

6.2 Purificação de baixa resolução (fracionamento)

processo no qual o extrato bruto é submetido a tratamentos que separam a proteina (enzima) em diferentes frações com base em algumas propriedades tais como tamanho e carga.

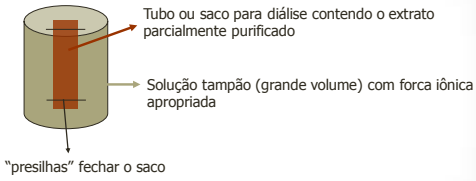
Solubilidade da proteina => geralmente menor em altas [sal]
efeito "salting out"

A adição de um sal em quantidades certas pode seletivamente precipitar algumas proteínas, enquanto outras permanecem em solução.

Sulfato de amônia = usado frequentemente para isto devido a sua alta
$(NH_4)_2SO_4$ solubilidade

63

Diálise: procedimento que separa proteína a partir do solvente pela vantagem do tamanho maior da proteína.



A membrana do "saco" permite as trocas dos sais e tampão mas não da proteína

64

6.3 Purificação de alta resolução (cromatografia)

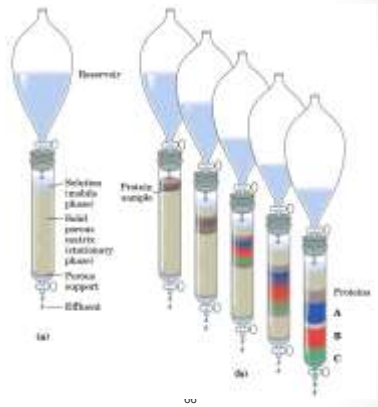
Cromatografia: técnica se separação de substancias que utiliza:
- fase estacionaria
- fase móvel

Fase estacionária: material sólido, poroso com propriedades químicas apropriadas (também chamada de matriz)

Fase móvel: solução tamponada que passa através da coluna (plástico ou vidro)

Procedimento:
1. a solução contendo a proteína (extrato clarificado) é adicionado no topo da coluna
2. A fase móvel é adicionada

65



66

As matrizes podem ser:

1. Celulose (polisacarídeos de β (1-4) glicose
   - Hidrofílica
   - Inerte com proteína
   - Instável com ácidos, álcalis e oxidantes
2. Agarose
   - Alta porosidade
   - Alta hidrofilicidade
   - Baixa adsorção não especifica
3. Dextran (sephadex) (polisacarídeo extracelular produzido por *Leuconostoc mesenteroides*)
   - pH 2 – 12
4. Poliacrilamida
   - Estável
   - Hidrofílica
   - Permeação e troca iônica

67

Table 5 Specifications of Different Types of Sephadex

Sephadex type	Fractionation range for: Peptides and globular proteins	Dextrans
G-10	Up to 700	Up to 700
G-15	Up to 1500	Up to 1500
G-25	1000–5000	100–5000
G-50	1500–30,000	500–10,000
G-75	3000–70,000	1000–50,000
G-100	4000–150,000	1000–100,000
G-150	5000–400,000	1000–150,000
G-200	5000–800,000	1000–200,000

Source: Ref. 26, p. 10, by courtesy of Pharmacia Fine Chemicals, Inc.

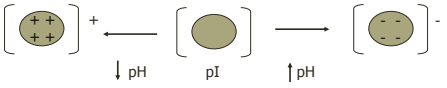
Table 6 Bio-Gel P Gel Filtration Materials

Bio-Gel type	Exclusion limit	Operating range
P-2	1,800	200–1800
P-4	4,000	800–4000
P-6	6,000	1000–6000
P-10	20,000	1500–20,000
P-30	40,000	2500–40,000
P-60	60,000	3000–60,000
P-100	100,000	5000–100,000
P-150	150,000	15,000–150,000
P-200	200,000	30,000–200,000
P-300	400,000	60,000–400,000

Source: Ref. 27, p. 40, by courtesy of Bio-Rad Laboratories.

68

a) Cromatografia de Troca iônica
separação baseada na carga da proteína



pI – pH no qual a somatória de cargas é zero
ocorre agregação e precipitação

69

Colunas catiônicas
Colunas aniônicas

Coluna	Matriz	Proteína		
Aniônica	(+)	(-)	Troca aniônica	pH > pI
Catiônica	(-)	(+)	Troca catiônica	pH < pI

Matrizes mais utilizadas:
- carboximetil (CM) celulose
- dietilaminoetil (DEAE) celulose

70

Cromatografia de troca ionica (coluna cationica)

71

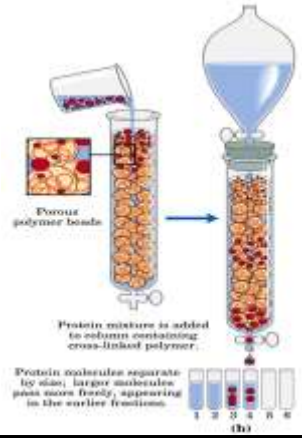
b) Cromatografia por exclusão de tamanho
(também chamada **gel filtração)**
separação baseada no tamanho da proteína

A matriz é um polímero com poros de tamanhos selecionados

Proteínas grandes migram mais rápido que as menores porque elas são muito grandes para entrar nos poros.
As proteínas menores entram nos poros e são conduzidas vagarosamente
Materiais: gel de sephadex são preparados com moléculas de dextrana acrilamida

72

Cromatografia por exclusão de tamanho



73

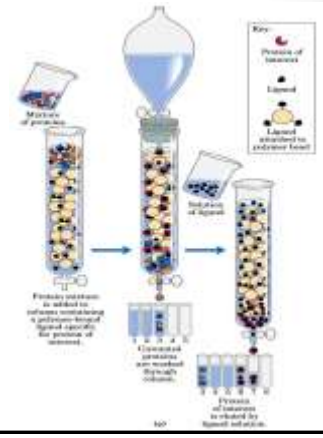
c) Cromatografia de afinidade
separa as proteínas pelas suas especificações de ligação

• as proteínas retidas na coluna são aquelas que se ligam especificamente a um ligante ligado as contas do polímero

• as proteínas que não se ligaram a coluna são eluídas, a proteína de interesse ligada é eluída utilizando –se uma solução contendo ligante livre

74

Cromatografia por afinidade



75

Table 3. Protein properties used during purifications

Protein property	Technique
Charge	Ion exchange (IEX)
Size	Gel filtration (GF)
Hydrophobicity	Hydrophobic interaction (HIC), Reversed phase (RPC)
Biorecognition (ligand specificity)	Affinity (AC)
Charge, ligand specificity or hydrophobicity	Expanded bed adsorption (EBA) follows the principles of AC, IEX or HIC

76

6.4 Acompanhamento das etapas de purificação

a. Ensaios de atividade enzimática

- o sucesso de cada etapa de purificação deve ser acompanhado pela determinação da atividade enzimática
- a quantidade de enzima é expressa em unidades de atividade por mililitro
- a Comissão de Enzimas da International Union Biochemistry recomenda:

Unidade de Atividade = quantidade que catalisa a conversão de 1 micromol de substrato por minuto sob condições definidas

77

Acompanhamento das etapas de purificação

b. Determinação da quantidade de proteína

- diversos métodos
  - Lowry
  - Bradford

- o método escolhido deve ser relativamente preciso, rápido, e se possível não gastar muita amostra

78

Método do Biureto

✓ procedimento mais simples para det. proteínas

✓ reação do Cu^{2+}, em solução alcalina, com o peptídeo da proteína

✓ produz cor avermelhada que pode ser lida espectrofotometricamente a 540nm

✓ o met. requer de 1 a 10 g proteína por análise

✓ Excelente método quando se tem grande quantidade de material

79

Método de Lowry

□ Lowry et al., (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem,* 193, 265-275.

✓ baseia-se na reação do fosfomolibdato em solução alcalina com os resíduos tirosil da proteína. Cu^{2+} é incluído para aumentar a sensibilidade

✓ a cor azul formada pode ser lida espectrofotometricamente a 600nm

✓ o met. requer de 5 a 40 mg proteína por análise

✓ 200 a 1000 vezes mais sensível que o Biureto

80

Método de Bradford

✓ baseia-se na ligação do corante (Comassie Brilliant Blue G-250) com a proteína na presença de acido fosfórico

✓ produzindo uma cor azulada que é lida espectrofotometricamente a 595nm

✓ o met. requer de 5 a 40 μg proteína por análise

✓ curva padrao utiliza BSA (bovine serum albumin)

81

Método Espectrofotométrico

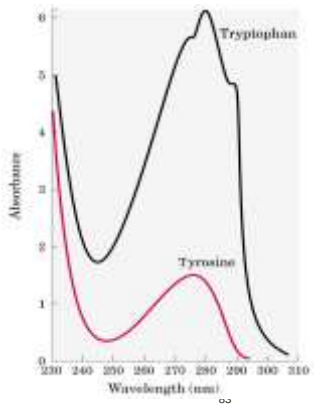
- ✓ todas as proteínas tem pelo menos 2 regiões de absorbância máxima:
  - próximo a 280nm devido aos resíduos aromáticos dos aminoácidos
  - a 180nm devido as ligações peptídicas da proteína
- ✓ outros compostos também absorvem nesta faixa de comprimento de onda e podem interferir com a analise. Inclusive ácidos nucléicos (260nm)
- ✓ sugere-se a seguinte equação para determinar a quantidade de proteína em uma solução contendo ácidos nucleicos:

$$[\text{ proteína }] \text{ (mg/mL)} = 1{,}55\ A_{280} - 0{,}76\ A_{260}$$

Vantagens:

não destrói a proteína, é rápido, razoavelmente sensível

82



83

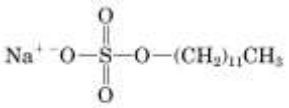
c. Análise das frações proteicas – Critérios de pureza

quando uma proteína/enzima está pura e a etapa posterior é desnecessária?

84

c.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS (sodium dodecyl sulfate)

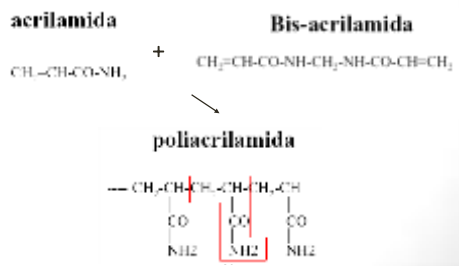
- técnica baseada na migração de proteínas em um campo elétrico
- permite uma estimativa do número de diferentes proteínas em uma mistura ou a pureza da proteína
- separa proteínas por massa molecular, com pequenos peptídeos migrando mais rapidamente
- após a eletroforese as proteínas são visualizadas pela adição de um corante (Comassie blue, prata)



Sodium dodecyl sulfate (SDS)

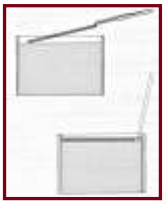
Gel de Poliacrilamida

- Dois polímeros: acrilamida e bisacrilamida

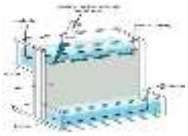


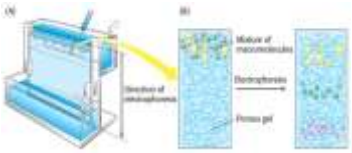
SDS-PAGE-sistema vertical

- **Vantagens:** Possibilidade de uso de equipamento pre-existente no laboratório, permite corridas simultâneas de vários géis dependendo do sistema utilizado

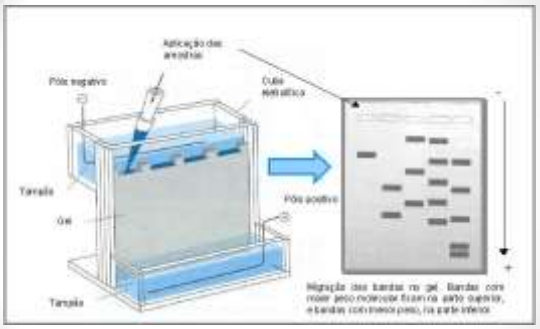


87

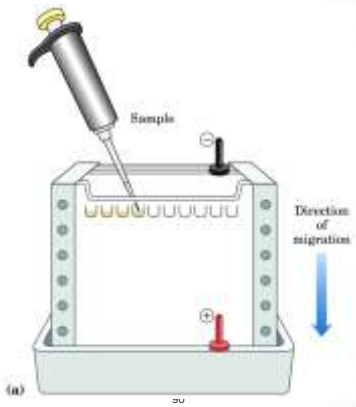




88



89



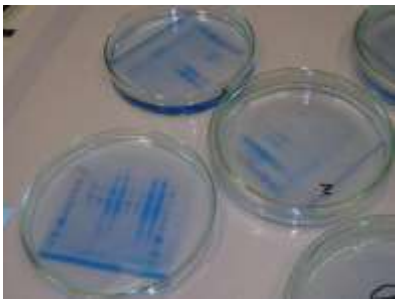
90

91

METODOLOGIA

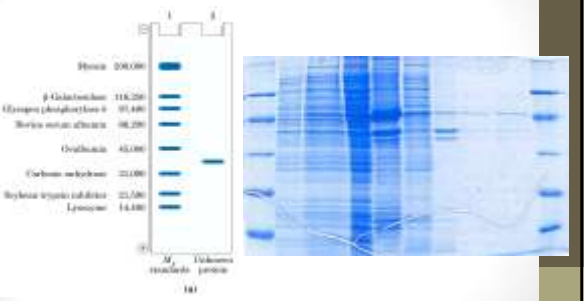
1. Preparo das amostras e processamento
2. Adição de corante (tampão de amostra) nas amostras
3. Determinação de proteína (método do Biureto)
4. Confecção e corrida do gel de poliacrilamida
5. Finalização do gel (coloração)

92

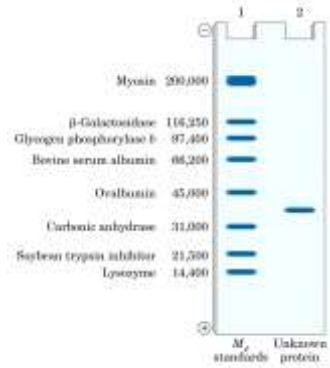


93

Gel poliacrilamida



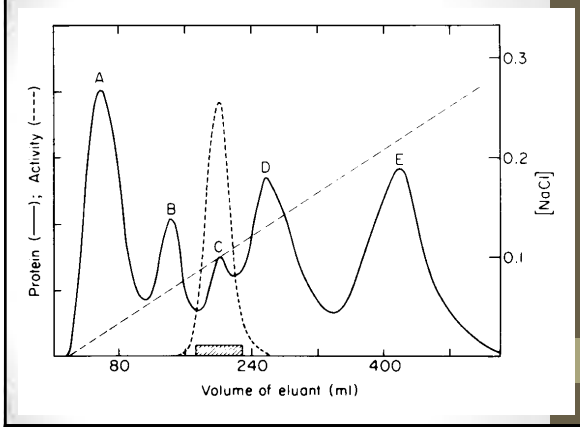
94

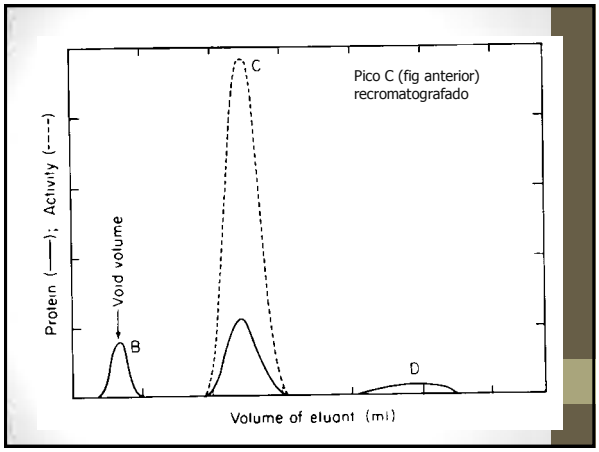


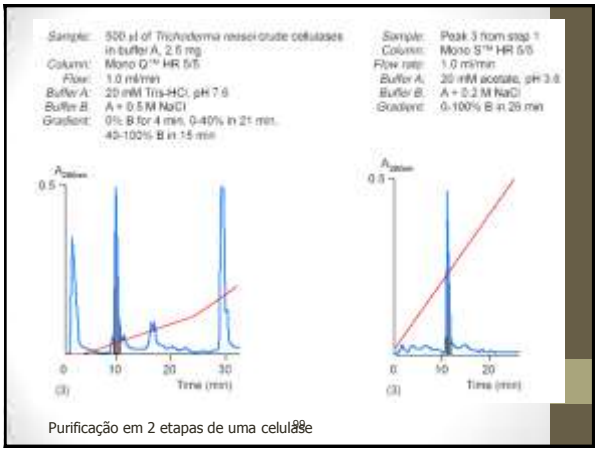
c.2 Comportamento cromatográfico

- informações importantes podem ser obtidas a partir da simetria do pico de eluição e da atividade especifica
- preparação pura = o pico de proteína é assimétrico
- cromatogramas

96







Purificação em 2 etapas de uma celulase

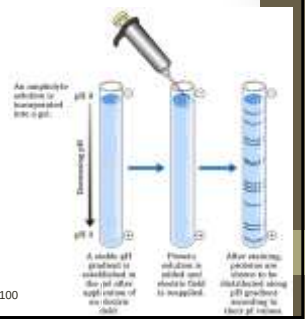
99

c.3 Focalização isoelétrica

- utilizado para determinar o pI da proteína
- gradiente de pH é estabelecido para permitir que uma mistura de ácidos orgânicos de baixo peso molecular e bases se distribuam em um campo gerado através do gel

The Isoelectric Points of Some Proteins

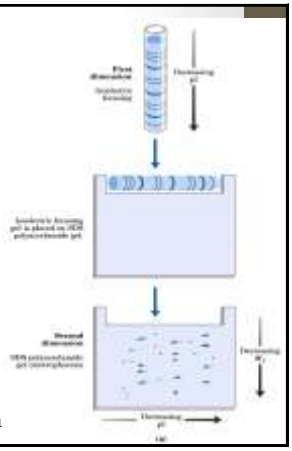
Protein	pI
Pepsin	~1.0
Egg albumin	4.6
Serum albumin	4.9
Urease	5.0
β-Lactoglobulin	5.2
Hemoglobin	6.8
Ribonuclease	7.0
Chymotrypsinogen	9.5
Cytochrome c	10.7
Lysozyme	11.0



100

c.4 Eletroforese bi-dimensional

Focalização isoelétrica com eletroforese em gel de SDS



101

(b)

102

Bon et al., 2008

103

table 5–5

A Purification Table for a Hypothetical Enzyme*

Procedure or step	Fraction volume (ml)	Total protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)
1. Crude cellular extract	1,400	10,000	100,000	10
2. Precipitation with ammonium sulfate	280	3,000	96,000	32
3. Ion-exchange chromatography	90	400	80,000	200
4. Size-exclusion chromatography	80	100	60,000	600
5. Affinity chromatography	6	3	45,000	15,000

*All data represent the status of the sample *after* the designated procedure has been carried out. Activity and specific activity are defined on page 137.

104