

AVALIAÇÃO DE UMA REAÇÃO ENZIMÁTICA RÁPIDA - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE LACASES

>>>> Execução experimental > GRUPOS DE 4 ALUNOS <<<<<

OBJETIVOS

- Estudo de determinação da atividade enzimática de lacases que requerem monitoramento do produto de reação na escala de poucos minutos.
- Gerar dados de conversão de substrato com diluições progressivas da enzima
- De posse dos resultados interpretados, determinar a atividade de lacase no preparado comercial original

PROCEDIMENTO - Todos os grupos realizarão o mesmo experimento

As reações serão realizadas dentro da própria cubeta do espectrofotômetro

1. Prepare diluições progressivas do preparado comercial de lacase fornecido no laboratório

As diluições devem ser de:

- A) 1:1.000
- B) 1: 2.000
- C) 1: 4.000
- D) 1: 6.000
- E) 1: 10.000

Calcule as proporções necessárias para realizar as diluições indicadas e as prepare na sua bancada de trabalho. Leve a menor diluição até o espectrofotômetro, juntamente com um pouco de tampão de reação e do substrato. Após o primeiro grupo de análises, repetir o procedimento com as outras diluições.

2. Realize os procedimentos indicados a seguir:

2.1. Branco para zerar o espectrofotômetro

0,25 mL de água

0,65 mL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0

0,1 mL de ABTS 1 mM em água

Preparar a mistura nas duas cubetas e zerar para leitura em 420 nm

2.2. Mistura de reação

0,25 mL de extrato na diluição usada (normalmente 0,25:25 e 0,25:25 novamente, ou seja 1:10.000)

0,65 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0

0,1 mL de ABTS 1 mM >>> Quando adicionar o ABTS, disparar o cronômetro e agitar com a tampa.

Ler o mais rápido possível o primeiro ponto após a adição de ABTS, usualmente 10 ou 15 s após a adição

Ler dados subsequentes a cada 10 s até cerca de 1 min, posteriormente ler a cada 1 min até 5 min

TÓPICOS PARA ESTUDO

Lacases

Cinética de reação catalisada por enzimas

Determinação de atividade enzimática

INFORMAÇÕES SOBRE O RELATÓRIO

Introdução

Aborde sobre Lacases e suas aplicações. Aborde sobre cinética de reação catalisada por enzimas e determinação de atividade enzimática. **NÃO FAÇA CÓPIA DE OUTROS RELATÓRIOS OU DE TEXTOS PRONTOS.** Uma introdução **não deve conter mais do que 5 parágrafos.**

Resultados e Discussão

a) Prepare antes da aula uma tabela para recolher os dados de tempo de reação e absorbância

b) Construa gráficos com os dados obtidos.

c) Calcule a atividade enzimática de cada diluição e as reporte na forma de extrato original

d) De posse dos resultados discuta os critérios necessários para determinar corretamente a atividade enzimática do preparado comercial

Bibliografia

- Industrial Enzymology, Godfrey T. e West S (eds), 1996; - Bioquímica, Lehninger ou Bioquímica, Voet - capítulo sobre enzimas; Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism and data analysis, Copeland, R.A., 2000, Cap. 5; Enzymology Labfax, Engel PE, Hames BD, Rickwood D, 1996, cap. 3

