

Datas: 17 e 24/11/2020
Enzimas modificadas e não naturais
Evolução dirigida de Enzimas

A enzima é um catalisador efficientíssimo, altamente específico e verde!

(menos resíduos tóxicos e biodegradável)

Enorme revelância:

- ✓ Ciência
- ✓ Indústria
- ✓ Conservação do planeta

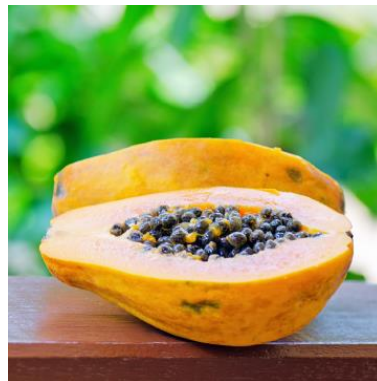
Enzimas naturais + pontos importantes sobre elas →
Enzimas modificadas e não naturais

Enzimas naturais e suas fontes



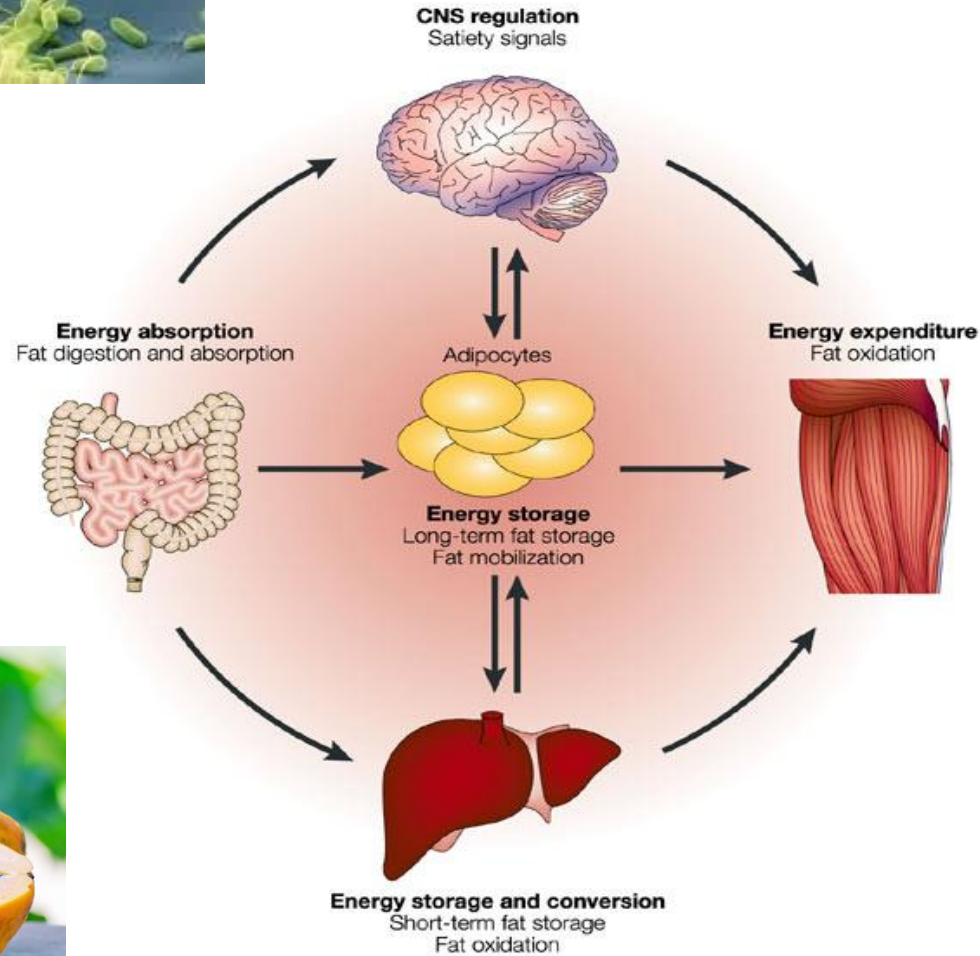
Actinoplanes sp. SE50/110

Bactéria de solo G+: tb. produz **acarbose**
(reduz de glicemia/diabetes melitus tipo II
Inibidor de α -glicosidase)



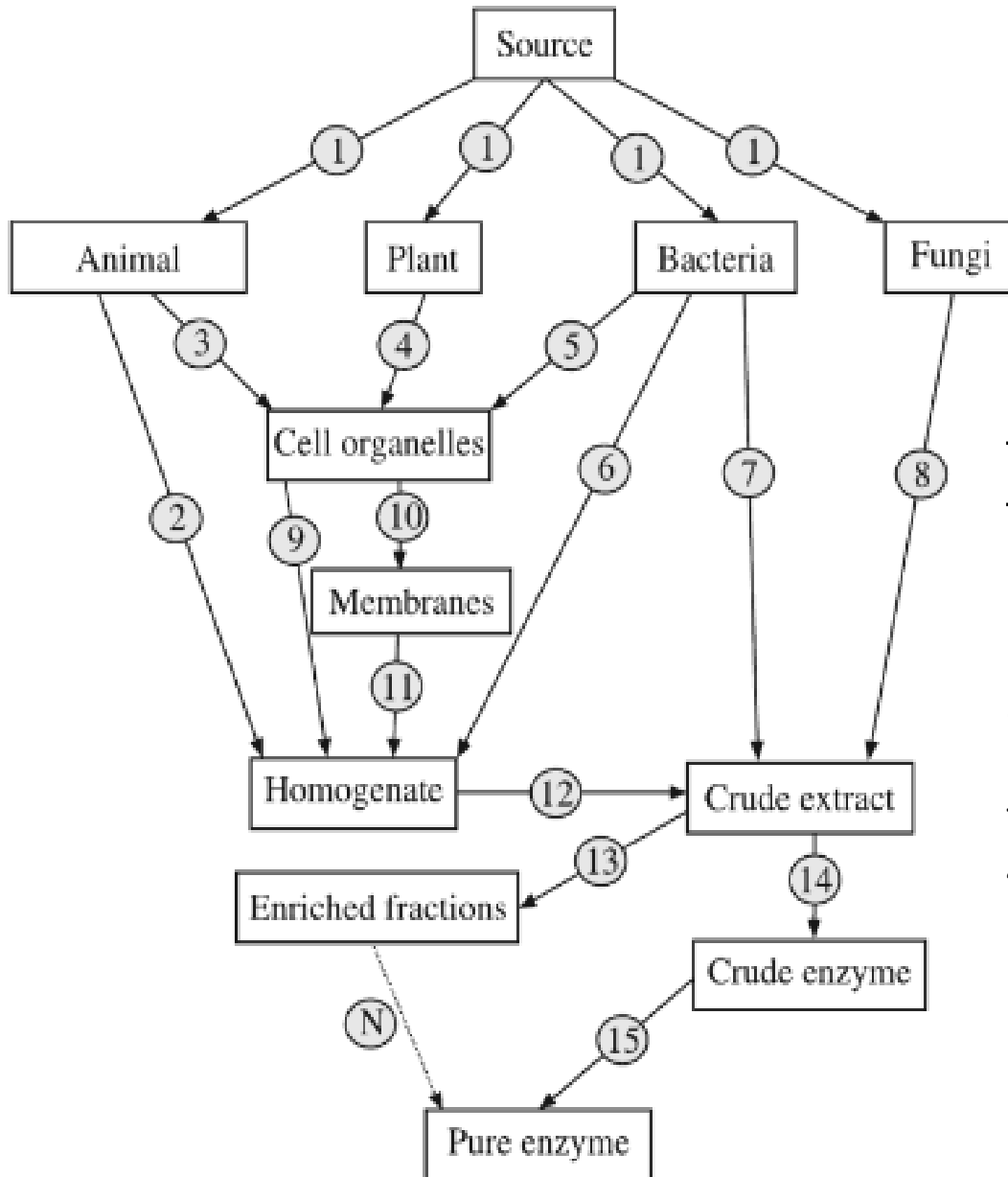
Zymomonas mobilis

Bactéria G-, facultativa, anaeróbica,
isolada de bebidas (*cerveja*)



Enzimas naturais e suas fontes

PRINCIPLES OF ENZYME TECHNOLOGY
Por KHAN, M. Y., KHAN, FARHA, 2015



Rotina experimental p/ isolamento e purificação:

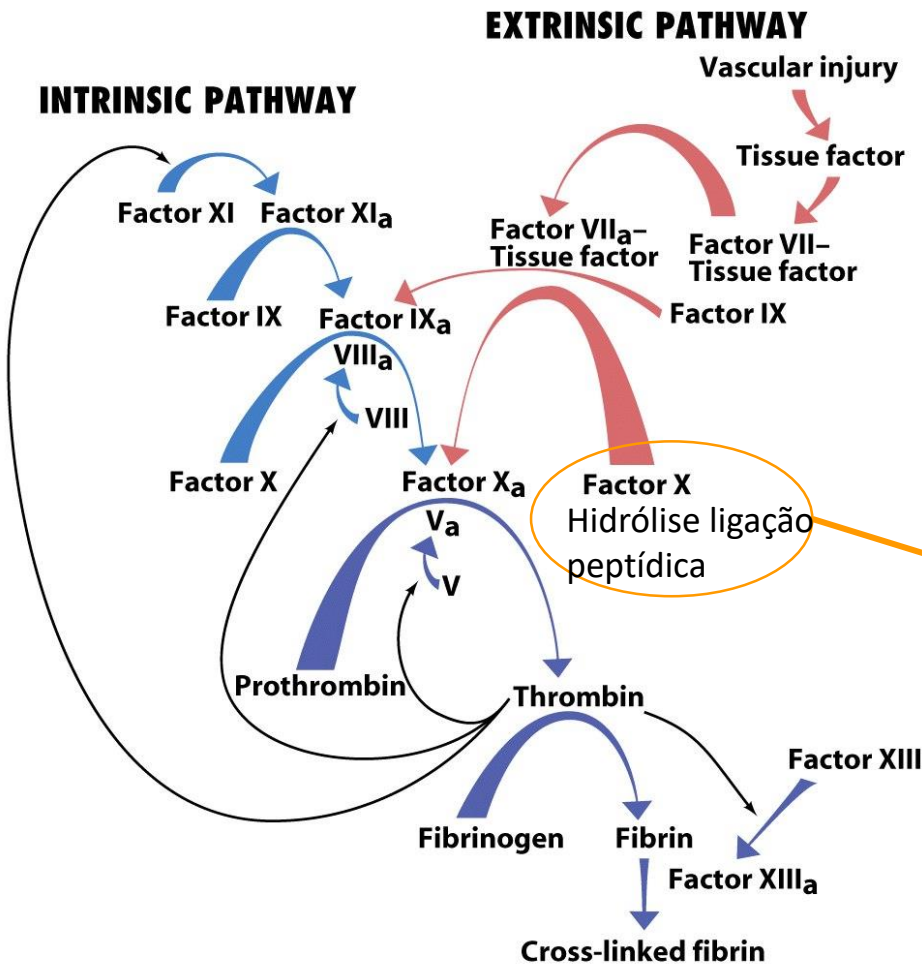
- 1- homogeneização de tecidos-fonte
- 2- separação de organelas celulares/
ultracentrifugação
- 3- rompimento de parede celular
(moagem, congelamento/aquecimento,
tratamento enzimático)
- 4-

**Complexidade da rotina
depende do grau de pureza
desejado!**

O que mais é preciso saber para estudo, comercialização e usos de enzimas naturais?

Ex: Enzimas da cascata de coagulação sanguínea humana

Ex: Enzima fúngica (*C. albicans*)



Enolase →
metabolismo de carboidratos

- Determinar:
- % pureza química
 - Massa molar ou peso molecular
 - U/mL (concentração de *atividade enzimática*)
 - U/mg proteína? (*atividade específica*)

Box 11-4 figure 2 Fundamentals of Biochemistry, 2/e © 2006 John Wiley & Sons

Como se mede as atividades citadas?

Reagente(s) específicos ENZIMA → Produto(s) específicos
dependência: condições reacionais (T, pH, [E], [S], t, aditivos)
cinética característica

H. Bisswanger, Enzyme Assays, Perspectives in Science (2014) 1, 41–55

A enzima está ativa?

Sim/Não

absorção de luz em λ específico
emissão ou apagamento de fluorescência
cromatografia (HPLC)
radioatividade
geração de luz
redução/oxidação de acceptor eletrônico
geração de calor
alteração de pH
consumo de O₂
precipitação

Métodos
espectrofotométricos
cromatográficos
eletrométricos
polarimétricos
manométricos

Quantificação:

No. mol/tempo
No. U/mg prot.

Métodos contínuos:

detecção/medida feitas durante a reação catalisada

Métodos descontínuos: detecção/medida feitas após a reação ter ocorrido / sido interrompida

Enzimas naturais devidamente caracterizadas → podem ser modificadas

Alterações de cadeias laterais de aminoácidos → fontes das enzimas modificadas
re-desenho da atividade enzimática e/ou das propriedades da enzima

Propósitos?

- ✓ aumento de estabilidade em meios variados
- ✓ diminuição/aumento de afinidade/especificidade pelo substrato
- ✓ entendimento do mecanismo de ação
- ✓ busca de inibidores

Como se escolhe o(s) aminoácido(s) a ser(em) modificado(s)?

Com base em:

1. Similaridade de sequência primária
2. Modelagem molecular [*interação com o(s) Substrato(s)*]
3. Mutagênese randômica
4. “protein design” (*desenho racional de novas proteínas que se enovelam em estrutura-alvo, visando novas funções ou propriedades: mutagênese sitio-dirigida, síntese peptídica*)
5. Combinação de todos

Enzimas naturais → modificadas (*≠ das naturais*)?

Mutagênese + oligonucleotídeos mutados/tecnologia do DNA recombinante:
mutantes com **alterações limitadas**

- *Sítio-dirigida ou específica (única ou múltipla)*
 - *Randômica*
-

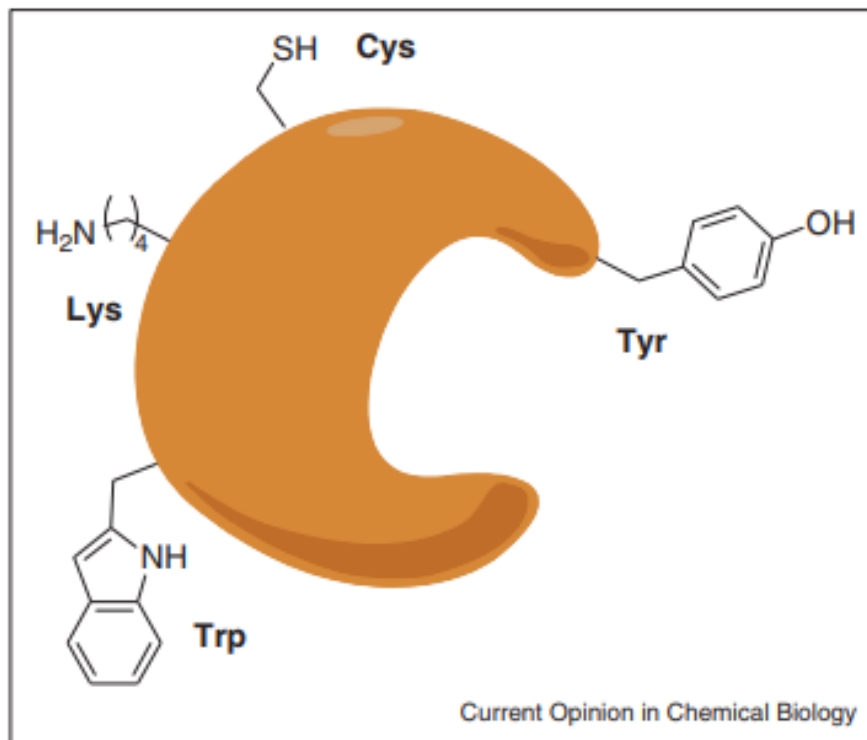
Modificação química da enzima: em princípio as **alterações ilimitadas**

Não específica: explora grupos reativos de mesmo tipo

Sítio-específica: explora diferentes reatividades de grupos do mesmo tipo vindos de diferentes “ambientes” da proteína

Sítio-seletiva: combinação de mutagênese sítio-dirigida + modificação química

Scheme 4



Diaz-Rodriguez & Davis, Current Opinion in Chemical Biology 2011, 15:211–219

Common proteinogenic amino acid targets for site-selective enzyme modification.

Enzimas Modificadas podem:

- 1) ser produzidas também: pequena, média e larga escala
- 2) devem ser purificadas e devidamente caracterizadas

Vá para o Video #2