

EXPERIMENTO 7

PURIFICACION DE LA ENZIMA INVERTASA DE LEVADURA

REQUISITOS

Revisar la participación de la invertasa en los procesos biológicos, su clasificación según E.C, importancia industrial. Consultar la aplicación de la diálisis, precipitación y resinas intercambiadoras de iones en la purificación de proteínas

OBJETIVOS

Purificar por precipitación, diálisis y resinas intercambiadoras la invertasa de levadura y en cada etapa de purificación calcular: actividad específica, actividad total y % de rendimiento enzimático.

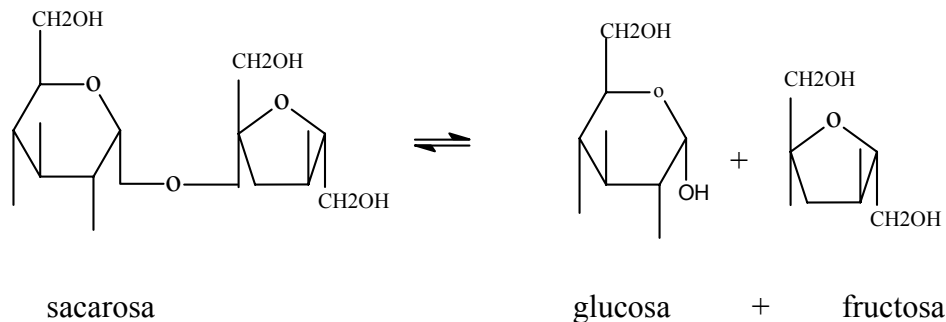
1. FUNDAMENTO

Entre las enzimas más antiguamente conocidas se encuentran los que hidrolizan la sacarosa. En 1860, Bertheelot, que se hallaba trabajando en la purificación de un enzima procedente de la levadura que hidrolizaba la sacarosa, le llamó "**ferment inversif**", en razón de la inversión (de + a -) de la rotación óptica durante la hidrólisis de la sacarosa. Más recientemente se han usado los nombres de invertasa, sucraza, sacarosa y β -fructofuranidasa para denominar la enzima hidrolizante de la sacarosa.

Muchos fructofuranósidos son susceptibles de hidrólisis por esta enzima, pero la sacarosa es el mejor sustrato. La reacción hidrolítica se mide observando el cambio de la rotación óptica o de poder reductor al incubar sacarosa con la enzima.

Este experimento usa el procedimiento de análisis a tiempo fijo que consiste en detener la reacción con álcali y medir a continuación el poder reductor por medio del método Somogyi-Nelson

Figura 1 Reacción de hidrólisis de la sacarosa



En este experimento se rompen las células de levadura desecadas por autólisis y se determina la actividad específica y total del autolisado bruto una vez eliminado el debris celular. La enzima bruta se purifica luego por eliminación del material contaminante (proteínas y otras moléculas) en forma de sus respectivos picratos y fraccionamiento con acetona de la preparación resultante. Finalmente se pasará por una resina intercambiadora aniónica. Se calculará para cada etapa del fraccionamiento la actividad específica, actividad total y % de rendimiento.

2. MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

Levadura desecada

CO₃HNa 0,1M

Baño termostático de agua

Centrífuga

Tampón acetato sódico 0,05M pH 4,7 (haga los cálculos para preparar este (Buffer)).

Sacarosa 0,3M

Solución de ácido pícrico

Acetona EDTA Na₂ al 0,1% pH 7,2

Sal común

Material y dispositivos para diálisis

Tampón tris-HCl 0,05 pH 7,5 (con y sin NaCl a diversas concentraciones).

Reactivos de Somogyi-Nelson (para azúcares reductores)

Reactivos de Lowry (para proteínas).

2.1. Preparación del enzima bruto

2.1.1. Levadura: Mezcle 50 g., de levadura desecada con 150 ml., de CO_2HNa 0,1 M en una fiola de un litro hasta que la solución ablande todos los acumulo. Tápese entonces el frasco con una torunda de algodón y colóquese en un baño de agua manteniendo la temperatura entre 40° a 45°C ; déjese autolisar la preparación durante 24 horas.

2.1.2. Centrifugación: Centrifúguese la mezcla después dela autolisis a 1500 r.p.m. durante 15 minutos a temperatura/ambiente, o por debajo de ella, para sedimentar el debris celular. Decántese el líquido sobrenadante claro y de color ámbar en una probeta; anótese el volumen y viértase la solución sobre un vaso mantenido entre 0° a 2°C en baño de hielo.

2.1.3. Enzima bruto: Esta solución constituye el enzima original bruto, fracción I. Es necesario determinar la actividad específica y total de esta preparación mediante el análisis de determinados diluciones del enzima, la concentración de proteínas y el volumen total. (Guarde para esto un volumen de 2 ml de la Fracción I a 0°C).

2.2. Purificación de la enzima bruta

2.2.1. Homogenización: Todas las operaciones han de efectuarse manteniendo la temperatura entre 0° y 2°C . Añádase el homogeneizado bruto, frío (Fracción I) 0,35 volúmenes de la solución de ácido pícrico, enfriada en hielo, en un vaso también introducido en hielo y agítese suavemente para asegurar una distribución homogénea.

2.2.2. Reposo: Manténgase la mezcla a 0°C durante 1 hora; sepárese entonces el precipitado por centrifugación a 10.000 xg durante 10 minutos a baja temperatura. Descártese el precipitado. Mídase el volumen de la solución amarilla sobrenadante en una probeta enfriada; tómense 4 ml de esta solución (Fracción II) y guárdese a 0°C para posteriores ensayos.

2.2.3. Enfriamiento: Sumérjase un vaso que contenga la fracción II en un baño de hielo y sal, enfriando la solución hasta 0°C . Viértase entonces sobre ella 3 volúmenes de acetona enfriada en congelador (-15°C) a lo largo de 3 minutos, añadiéndola lentamente mientras se agita

suavemente con varilla de vidrio. Añádase más sal al baño de hielo y déjese la mezcla 15 minutos en él. Decántese a continuación lo que se pueda de la solución sobrenadante separándola del precipitado gomoso.

2.2.4. Diálisis: Decántese la solución sobrenadante y redisuélvase el precipitado en una cantidad mínima de solución EDTA-Na₂ al 0,1% pH 7,2 enfriada con hielo. Dialícese esta solución a 0°C contra grandes volúmenes de H₂O fría que debe cambiarse varias veces durante 24 hasta que pierda el color la solución del recipiente de la diálisis. Retírese entonces el enzima (Fracción III) guardándose a 0°C hasta el paso siguiente.

2.3. Preparación de la columna de DEAE-celulosa

2.3.1. Resina: Esta resina tiene la capacidad de asociar aniones en virtud de las cargas positivas que posee, y también tiene la capacidad de intercambiar los aniones fijados según el pH y la fuerza iónica de las especies que compiten por las cargas. En nuestro caso la resina quedará equilibrada a un pH y fuerza iónica tales que la enzima, al ser introducida en la resina, es capaz de fijarse a la misma, pudiendo luego desplazarla con un cambio de pH o de concentración de iones de la columna.

2.3.2. Eluir: Una vez obtenida la fracción III y habiendo separado una alícuota de 1 ml., esta debe quedar disuelta en buffer Tris-HCl 0,05M pH 7,5 (Buffer de la columna), para ser introducido todo el volumen restante en la columna de DEAE celulosa previamente empacada y equilibrada con el mismo Buffer. Deje que la FIII penetre lentamente en la columna, recogiendo el líquido que vaya saliendo. No deje secar la columna en la parte superior.

2.3.4. Tampón Tris-HCl 0,05M: Haga pasar 10 ml de Tapón Tris-HCl 0,05M pH 7,5 recogiendo el líquido que sale en fracciones de 5 ml c/u. (proceso de lavado). El flujo de lavado debe ser menor de 15 gotas por minuto.

2.3.5. Aumento fuerza iónica: Para eluir la invertasa que está fijada por interacciones de carga a la resina, introducimos un Tampón Tris-HCl 0,05M pH 7,5 al cual se le incrementará la fuerza iónica con NaCl, a las siguientes concentraciones:

Tris-HCl 0.05M pH 7,5 (Volumen en ml)	NaCl (Concentración en M)
10	0,025M
10	0,050M
10	0,150M
10	0,200M

El flujo de elusión debe ser igual al flujo de lavado, y se debe recoger el líquido eluyente en tubos de ensayo debidamente marcados, dejando caer 5 ml en cada tubo. Una vez recogidas todas las fracciones, deben guardarse en frío hasta medirle actividad enzimática y cantidad de proteínas.

2.4. Medida de la actividad específica de la enzima

La actividad enzimática de la invertasa además de indicarnos su recuperación puede servir como un índice de la calidad y rendimiento de nuestro trabajo durante el proceso de purificación.

2.4.1. Dilución: Se utilizará el método de análisis a tiempo fijo, para lo cual es necesario determinar la dilución enzimática adecuada a fin de poder cuantificar nuestra actividad por el método de Somogyi-Nelson. Qué concentración de sustrato utilizará para esa medida?

2.4.2. Tampón acetato: Coloque 0,95 ml de tampón acetato 0,05M pH 4,7 en un tubo de ensayo y 0,05 ml., de la muestra cuya actividad enzimática se quiere probar.

2.4.3. Incubar: Déjese equilibrar no menos de dos minutos a 25°C, y añádase entonces 1 ml de sacarosa 0,3M, equilibrada también a 25°C y déjese incubar las muestras durante 5 minutos. Deténgase la incubación añadiendo 1 ml de reactivo cúprico alcalino y agitando el contenido. (No olvide hacer lo mismo con los patrones y el blanco). Luego siga el procedimiento restante para determinación de azúcares reductores con el método Somogyi-Nelson (ver método).

2.5. Determinación de proteínas por el método de Lowry

2.5.1 Prepare las siguientes soluciones:

Solución A: Na₂ CO₃ 2% en NaOH 0,1N

Solución B₁ : CuSO₄ 1% en H₂O

Solución B₂ : Tartrato de sodio-potasio 2% en H₂O

Solución Folin diluida 1:1 con H₂O

Solución C: B₁ + B₂ + A (1:1:100)

Solución de albúmina (patrón) 1 mg/ml.

2.5.2. Cálculos según el método de Lowry: Efectúe los cálculos según el cuadro siguiente.

La actividad enzimática y la cantidad de proteínas debe medirse a las fracciones F1, F2, F3 y los tubos que salen de la columna DEAE-Celulosa (incluyendo el "lavado").

MUESTRA PROBLEMA	H2O	SOL . C	10 min	SOL. FOLIN	30 min	DO600nm
X ml	0,6-Xml	3 ml	*	0,3 ml	**	DO600nm

2.6. Cálculo y tratamiento de datos

Es necesario que se tome nota de todos los resultados obtenidos para luego ser analizados y presentados en el informe de manera organizada. Para simplificar, la actividad enzimática será expresada en unidades de enzima (invertasa).

2.6.1. Definición: Una unidad de invertasa es aquella cantidad de enzima que hidroliza un micromol (1 μmol) de sacarosa por minuto en las condiciones descritas.

Al referirse a la cantidad enzimática de la invertasa, hay que expresarla en unidades de enzima y hacer referencia al volumen de la muestra usada para la medida de esa actividad (nosotros usaremos siempre 0,05 ml de muestra para la mezcla de reacción, pero es mejor expresarla en unidades de enzima por mililitro (U/ml).

2.6.2. Actividad específica: Este parámetro relaciona la actividad enzimática de una fracción (U/ml) con la concentración de proteínas en la misma (mg.prot/ml).

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{U/ml}}{\text{mg/ml}} = \frac{\text{U}}{\text{mg.Prot.}}$$

2.6.3. Rendimiento: Esta medida puede ser usada tanto para la actividad enzimática a las proteínas y nos da una idea del porcentaje de recuperación de la enzima en un paso de purificación dado. Para ello hay que suponer que la fracción 1 tiene el 100% de actividad enzimática y el 100% de proteínas.

2.6.4. Tabla de resultados: Los resultados de la purificación deben ser finalmente introducidos en una tabla que aparece en el informe

3. AUTO-EVALUACION

1. ¿ Por qué todas las operaciones han de efectuarse manteniendo la temperatura entre 0° y 2°C ?.
2. ¿Cómo calcularía Ud., el total de actividad enzimática y el total de proteínas de una fracción dada?
3. ¿ Por qué cree Ud. que se uso ácido pícrico para preparar la fracción II ?.
4. ¿ Por qué en cada fracción la enzima esta mas purificada ?.
5. ¿ Por qué debemos calcular la concentración de proteínas ?.
6. ¿ Por qué calculamos la concentración de glucosa ?.

4. INFORME 7 (INVERTASA)

Apellidos

Grupo de prácticas

Fecha

Calificaciones

Nombres

Nº del mesón

Nº del estudiante

Entrada		Desarrollo		Informe		Definitiva	
---------	--	------------	--	---------	--	-------------------	--

1. Introduzca los resultados de la purificación de la enzima en la siguiente tabla.

Fracción	Volumen Total (ml)	Proteínas Totales (mg)	Totales	U/ml	Proteínas (mg/ml)	A.E	F.P	Rendimiento Actividad proteínas Enzimáticas
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								

2. Anexe sus gráficas en el siguiente espacio.

3. Discuta sus resultados.

Nota: El informe debe ser entregado al finalizar la práctica, sin anexar hojas.