

Enzimas – Determinação das constantes cinéticas: K_M e V_{max}

Objetivo:

- 1) Verificar a influência do fator concentração de substrato sobre a velocidade inicial de uma reação enzimática
- 2) Calcular graficamente K_M e V_{max} (Usar métodos de linearização)

Materiais:

Sacarose 0,01M; 0,02 M; 0,05 M; 0,1 M, 0,2 M;

Invertase em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,7;

Tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,7;

Reagente 3,5 dinitro salicílico (DNS) em meio alcalino;

Espectrofotômetro.

Procedimento:

Tubos	Sacarose					Tampão	Água destilada
	0,01 M	0,02 M	0,05 M	0,1 M	0,2M		
B	0,5 mL					1 mL	1 mL
1	0,5 mL					1 mL	0,8 mL
2		0,5 mL				1 mL	0,8 mL
3			0,5 mL			1 mL	0,8 mL
4				0,5 mL		1 mL	0,8 mL
5					0,5 mL	1 mL	0,8 mL

Levar os tubos para o banho Maria e deixar por 2 minutos.

Adicionar 0,2 ml de enzima nos tubos 1, 2, 3, 4, 5.

Anotar a hora de adição e incubar 5 minutos.

Adicionar 1 ml de DNS e aquecer em banho maria a 100 C por 5 min.

Fazer a leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

Resultados e discussão:

- 1) Anotar os resultados de Abs em uma tabela e calcular as atividades de invertase correspondentes.
- 2) Determinar os parâmetros cinéticos K_M e V_{max} .