

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 (M)					Tampão (ml)
	0,01 M	0,02 M	0,05 M	0,1 M	0,2 M	
B	0,2					0,5
1	0,2					0,5
2		0,2				0,5
3			0,2			0,5
4				0,2		0,5
5					0,2	0,5

Adicionar 0,3 ml de água destilada no tubo B.

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

Adicionar 0,3 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} .