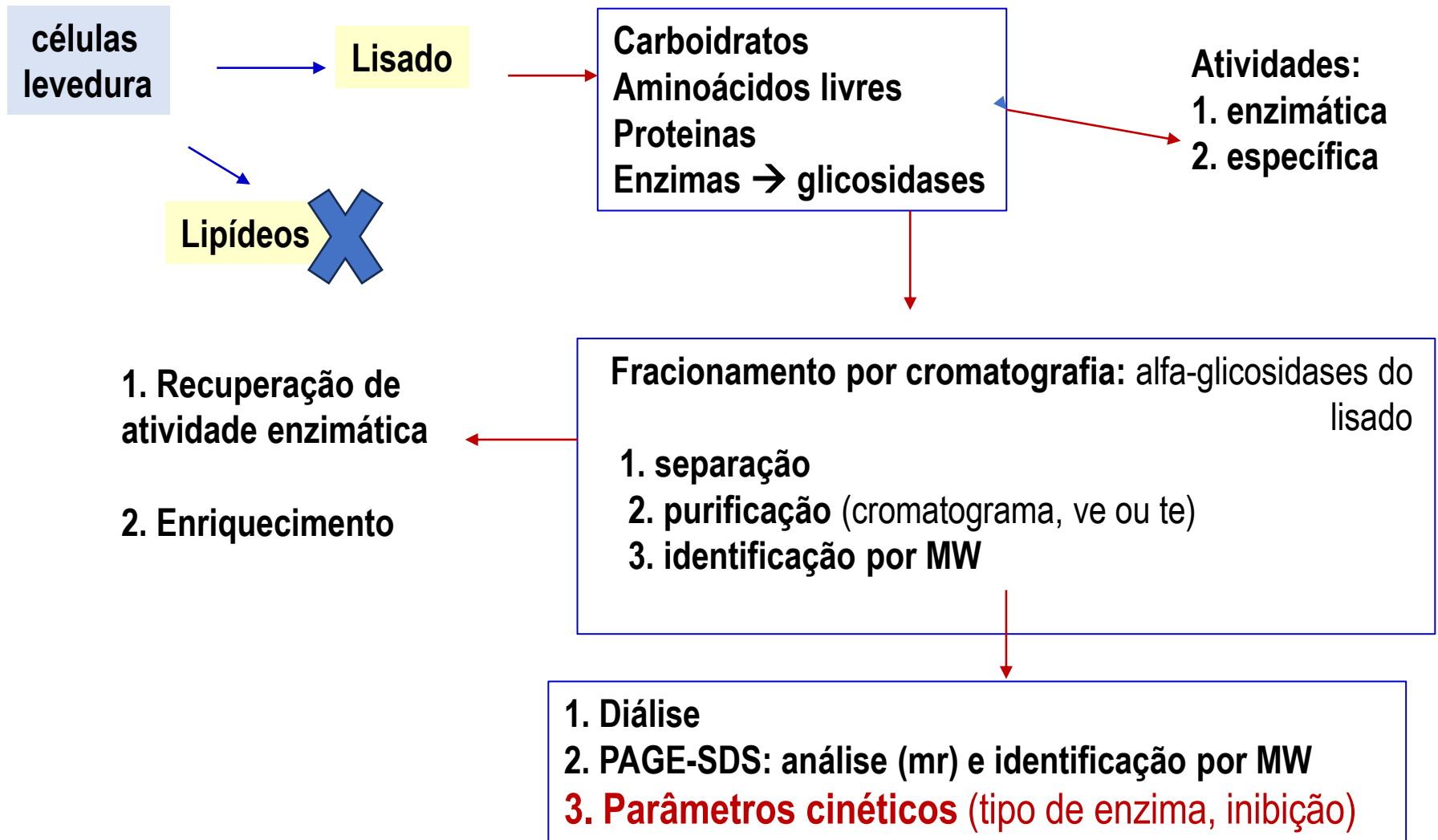
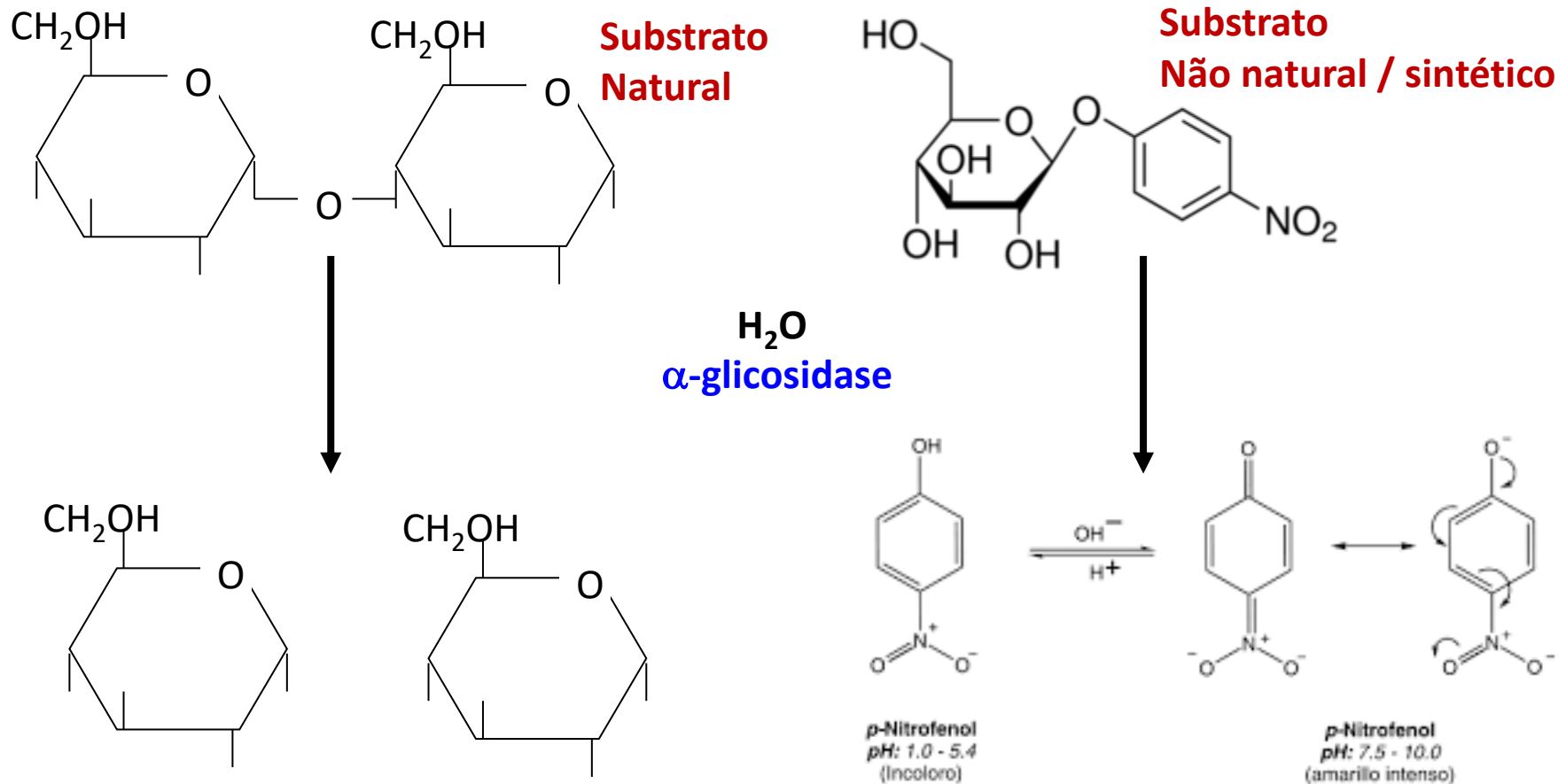




Caracterização da alfa-glicosidase: K_m e V_{max}

Objetivos

Caracterizar a α -glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* através das determinações da afinidade (K_m) da enzima pelo substrato (*p*-nitrofenil- α -glicosídeo) e da velocidade máxima (V_{max}) de hidrólise do substrato.



Prática 9 → determinar tipo de enzima → lisado fresco
(1 dos 3 tubos iniciais)

MTM
20/06/23

Procedimento A = Diluição usada na Prática 3 OU 10x e 100x → em gelo!

Procedimento B = Medida da velocidade de reação de hidrólise usando diferentes [S] → em v_o !

Tabela 1

tubos	NPaGlc 1,0 mM (mL)	NPaGlc 2,0 mM (mL)	NPaGlc 8,0 mM (mL)	tampão fosfato 100 mM pH 7 (mL)	lisado diluído (mL)
1	0,02	-	-	0,28	0,10
2	0,04	-	-	0,26	0,10
3	0,08	-	-	0,22	0,10
4	0,12	-	-	0,18	0,10
5	0,16	-	-	0,14	0,10
6	0,20	-	-	0,10	0,10
7	-	0,16	-	0,14	0,10
8	-	0,20	-	0,10	0,10
9	-	-	0,10	0,20	0,10
10	-	-	0,13	0,17	0,10
11	-	-	0,15	0,15	0,10

1. Preparar em gelo + **agitar com cuidado**
2. Incubar a 30 °C por 40 min, remover os tubos do banho e **tirar uma foto deles**.
3. Adicionar solução carbonato/bicarbonato de sódio
4. Ler Abs em 420 nm após chegar a T amb, usando H₂O como branco. **Tirar foto da placa da placa.**
5. Completar a **Tabela 2** e fazer o gráfico v_o versus [S] → **calcular aquelas nos tubos 1-11**.
6. Determinar $V_{máx}$ e K_m ; **identificar o tipo de enzima** usando tais parâmetros

Tabela 2

tubos	[S] (no tubo de ensaio) (mM)	A420	nmols de produto	Tempo da reação (min)	Velocidade (nmol/min)
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					