

PRÁTICA

AULA 5. DETERMINAÇÕES DA CONSTANTE DE MICHAELIS (KM) E DA VELOCIDADE MÁXIMA (VM) PARA A INVERTASE DE LEVEDURA

1ª ETAPA: A) Ensaio Enzimático e Reação de Dosagem de Açúcares Redutores

Tubo	Água dest. (mL)	Sacarose (mL) (75 mM)	Invertase Diluída		Reat. Somogy (mL)		Reat. Nelson (mL)	Água dest. (mL)	Abs $\lambda=530\text{nm}$	Δ Abs. $\lambda=530\text{nm}$
0	1,00	0,00	0,5	INCUBAR A 37°C POR 10 MIN	1	INCUBAR A 100°C POR 5 MIN	1	4,5	0,046	0
1	0,90	0,10	0,5		1		1	4,5	0,102	Δ abs1 0,056
2	0,80	0,20	0,5		1		1	4,5	0,167	Δ abs2 0,121
3	0,60	0,40	0,5		1		1	4,5	0,208	Δ abs3 0,126
4	0,20	0,80	0,5		1		1	4,5	0,268	Δ abs4 0,222
5	0,00	1,00	0,5		1		1	4,5	0,284	Δ abs5 0,238
6	0,5	1,00	0,0		1		1	4,5	0,102	X 0,056
7	1,5 mL de padrão contendo 60 μg de glicose				1		1	4,5	0,201	0,155

2ª ETAPA: Cálculo do $1/v$ e $1/[S]$

Tubo (Nº)	[S]* mM	*** Δ Abs. corrigida	V (ug AR/10min)	V** (ug AR/h)	$\frac{1}{[S]}$ mM	$\frac{1}{V}$ (ug AR/h)
0	0	-	0	-	-	-
1	5	Δ Abs1 - 0,1X 0,0504	18,323	109,938	0,2	0,0091
2	10	Δ Abs2 - 0,2X 0,1098	42,503	255,018	0,1	0,0039
3	20	Δ Abs3 - 0,4X 0,1036	40,894	245,364	0,05	0,0041
4	40	Δ Abs4 - 0,8X 0,1772	68,59	411,558	0,025	0,00242
5	50	Δ Abs5 - 1,0X 0,179	69,29	415,74	0,02	0,0024

*[S] = Concentração de Substrato (sacarose) no meio de reação enzimática expressa em milimolaridade (mM);

**V = Velocidade de Reação Enzimática expressa em μg (micrograma) de glicose (açúcar redutor) formado por hora.

Cálculos:

O cálculo do Δ abs é feito pela subtração da Abs dos tubos de 1 a 7 pela Abs do tubo 0:

Tubo 1: $0,102 - 0,046 = 0,056$

Tubo 2: $0,167 - 0,046 = 0,121$

Tubo 3: $0,208 - 0,046 = 0,126$

Tubo 4: $0,268 - 0,046 = 0,222$

Tubo 5: $0,284 - 0,046 = 0,238$

$$\text{Tubo 6: } 0,102 - 0,046 = 0,056$$

$$\text{Tubo 7: } 0,201 - 0,046 = 0,155$$

Para realizar o cálculo da concentração final utiliza-se a fórmula: $C_i * V_i = C_f * V_f$.

$$\text{Tubo 1: } 75 * 0,1 = x * 1,5 \rightarrow x = \frac{75 * 0,1}{1,5} = 5$$

$$\text{Tubo 2: } 75 * 0,2 = x * 1,5 \rightarrow x = \frac{75 * 0,2}{1,5} = 10$$

$$\text{Tubo 3: } 75 * 0,4 = x * 1,5 \rightarrow x = \frac{75 * 0,4}{1,5} = 20$$

$$\text{Tubo 4: } 75 * 0,8 = x * 1,5 \rightarrow x = \frac{75 * 0,8}{1,5} = 40$$

$$\text{Tubo 5: } 75 * 1 = x * 1,5 \rightarrow x = \frac{75 * 1}{1,5} = 50$$

V = Velocidade de Reação Enzimática, para calcular precisamos fazer uma regra de 3:

Se em 60ug de açúcar redutor (glicose) encontramos que o Δ_{abs} foi de 0,155 em 10 minutos de reação.

Tem-se: 60ug - 0,155

$$\begin{array}{ccc} & \swarrow & \searrow \\ X & & \Delta_{abs} \text{ (1-5) corrigida} \end{array}$$

Desta forma:

$$\text{Tubo 1 : } x = \frac{60 * 0,0504}{0,155} = 18,323$$

$$\text{Tubo 2 : } x = \frac{60 * 0,1098}{0,155} = 42,503$$

$$\text{Tubo 3 : } x = \frac{60 * 0,1036}{0,155} = 40,894$$

$$\text{Tubo 4 : } x = \frac{60 * 0,1772}{0,155} = 68,593$$

$$\text{Tubo 5 : } x = \frac{60 * 0,179}{0,155} = 69,29$$

Já o V^{**} é o cálculo estimado para 1 hora, assim, se no tubo 1 temos que $V=18,323$ ug/10min, para extrapolar a reação em 1 hora multiplica-se por 6, pois em 1 hora temos 6 tempos de 10 minutos.

$$\text{Tubo 1 : } 18,323 * 6 = 109,938$$

$$\text{Tubo 2 : } 42,503 * 6 = 255,018$$

$$\text{Tubo 3 : } 40,894 * 6 = 245,364$$

$$\text{Tubo 4 : } 68,593 * 6 = 411,558$$

$$\text{Tubo 5 : } 69,29 * 6 = 415,74$$

O inverso da [S] é calculado pela divisão: $\frac{1}{[S] 1 a 5}$, desta forma:

$$\text{Tubo 1 : } \frac{1}{5} = 0,2$$

$$\text{Tubo 2 : } \frac{1}{10} = 0,1$$

Tubo 3 : $\frac{1}{20} = 0,05$

Tubo 4 : $\frac{1}{40} = 0,025$

Tubo 5 : $\frac{1}{50} = 0,02$

O inverso da V^{**} é calculado pela divisão: $\frac{1}{v \cdot 1 a 5}$, desta forma:

Tubo 1 : $\frac{1}{109,938} = 0,0091$

Tubo 2 : $\frac{1}{255,018} = 0,0039$

Tubo 3 : $\frac{1}{245,364} = 0,0041$

Tubo 4 : $\frac{1}{411,558} = 0,00242$

Tubo 5 : $\frac{1}{415,74} = 0,00240$

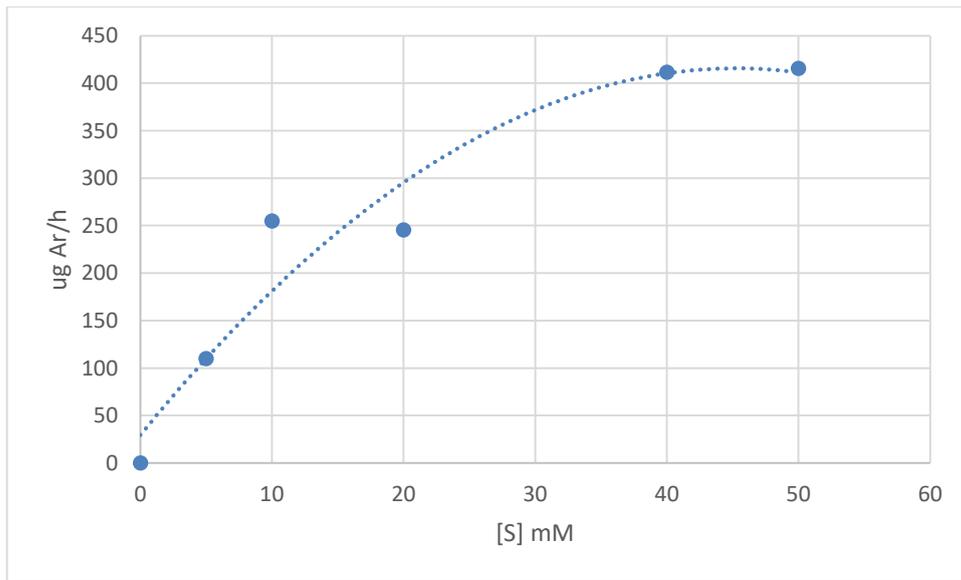


Fig1: Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reação

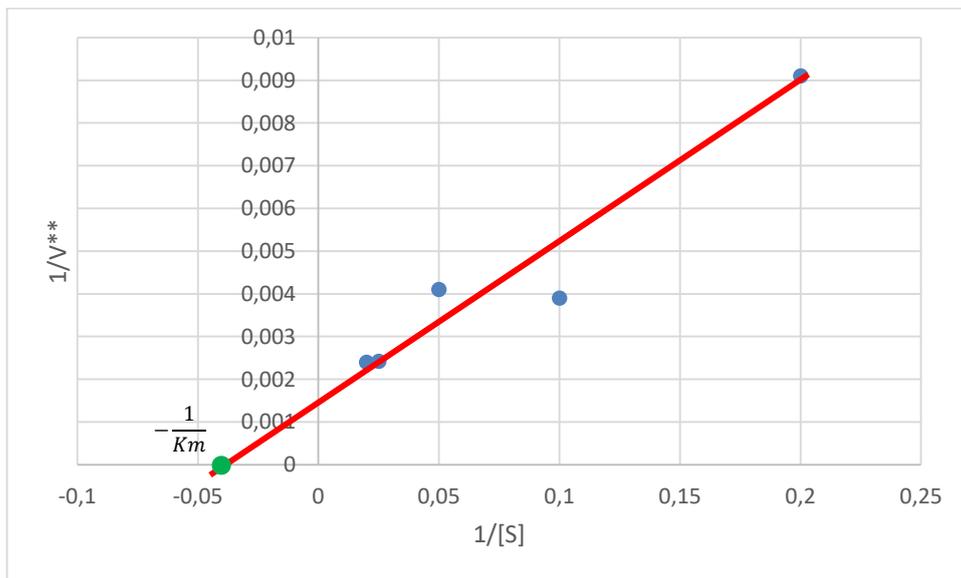


Fig 2: Gráfico representando a recíproca da hipérbole (Lineweaver-Burk)

Para encontrar a inversa negativa do K_m , traçamos uma reta média pelos pontos e onde esta reta cruzar o eixo y e encontrar com o eixo x, teremos nosso valor de $-\frac{1}{K_m}$. Assim $-\frac{1}{K_m} = -0,04$.

O K_m será encontrado pelo seguinte cálculo: $-\frac{1}{K_m} = -0,04 \rightarrow -\frac{1}{K_m} * -1 = -0,04 * -1 \rightarrow \frac{1}{K_m} = 0,04 \rightarrow$
 $K_m = \frac{1}{0,04} \rightarrow K_m = 25$