

PROBLEMAS DE ENZIMOLOGIA

- 1) A actividade da enzima que catalisa a reacção



foi determinada a diferentes concentrações de substrato e nos tempos abaixo indicados:

Concentração inicial de sacarose (mM)	Glucose formada (μg) em:					
	30 seg	1 min	2 min	5 min	10 min	15 min
10	180,2	360,3	600,0	1079,9	1410,2	1501,1
20	270,3	540,5	959,8	2039,8	3000,4	3481,5
40	360,3	720,6	1351,2	3240,1	6181,7	8520,9
60	405,4	810,7	1440,3	3451,5	6699,6	9600,1
80	432,4	864,8	1591,1	3749,8	7300,0	10801,2
100	450,4	900,8	1801,7	4504,1	9008,2	13512,0

Determine as velocidades iniciais v_0 , para cada uma das concentrações de sacarose.

Utilizando estas velocidades faça a representação gráfica de v_0 em função da concentração de substrato.

- 2) As velocidades iniciais de uma reacção enzimática do tipo



foram determinadas para diferentes concentrações de substrato, tendo sido obtidos os resultados indicados na tabela seguinte:

Concentração de S (M)	Velocidade inicial ($\mu\text{moles/min.}$)
$1,00 \times 10^{-2}$	75,00
$1,00 \times 10^{-3}$	75,00
$1,00 \times 10^{-4}$	60,00
$7,50 \times 10^{-5}$	56,25
$6,25 \times 10^{-6}$	15,00

- a) Determine o K_m e a velocidade máxima que pode ser obtida com a quantidade de enzima utilizada.

- b) Qual será a velocidade inicial para uma concentração de substrato igual a $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$?
- c) Qual será a velocidade inicial quando $[S] = 10^{-4}$ e se for duplicada a concentração de enzima ?
- d) Se $[S] = 0,04 \text{ M}$ qual será a concentração do produto ao fim de 3 minutos ?
- 3) A partir da equação de Michaelis-Menten calcule as concentrações de substrato (expressas em múltiplos de K_m) necessárias para obter as seguintes velocidades iniciais: $0,5 V_{max}$, $0,9 V_{max}$, $0,95 V_{max}$ e $1 V_{max}$.
- 4) Determine a actividade molecular (taxa absoluta de catálise ou "turnover number") da enzima catalase, que catalisa a reacção:



sabendo que um extracto da enzima, com o grau de pureza de 85%, forneceu os seguintes dados experimentais:

- a) 2,95 mg de proteína por litro;
- b) produção, na presença de um excesso de água oxigenada, durante um período de 10 minutos, de 340 μl de oxigénio (a 20°C e a uma atmosfera de pressão) por cada 0,1 ml de extracto;
- c) peso molecular da enzima próximo de 225.000.
- 5) As velocidades iniciais de uma dada reacção enzimática ($S \longrightarrow P$) foram determinadas a várias concentrações de substrato, tendo sido obtidos os resultados seguintes:

[S] (M)	v ($\mu\text{moles/min.}$)
$8,35 \times 10^{-6}$	13,8
$1,00 \times 10^{-5}$	16,0
$1,25 \times 10^{-5}$	19,1
$1,67 \times 10^{-5}$	23,8
$2,00 \times 10^{-5}$	26,7
$2,50 \times 10^{-5}$	30,8
$3,30 \times 10^{-5}$	36,2
$5,00 \times 10^{-5}$	44,5
$1,00 \times 10^{-4}$	57,2
$2,00 \times 10^{-4}$	66,7

Determine K_m e V_{max} pelo método gráfico do LINEWEAVER-BURK

- 6) A actividade da 6-fosfogluconato desidrogenase (descarboxilante), que catalisa a reacção:



foi estudada a pH 7,6 e 9,0, tendo-se obtido os seguintes resultados:

Concentração de gluconato-6-P (10^{-4} M)	Acréscimo de absorvância a 340 nm durante os cinco minutos iniciais	
	pH 7,6	pH 9,0
0,174	0,074	0,034
0,267	0,085	0,047
0,526	0,098	0,075
1,666	0,114	0,128
4,000	—	0,167

Determine a que valor de pH é maior a afinidade da enzima para o gluconato-6-P.

- 7) Estudou-se a taxa de hidrólise do L-carbobenzoxi-glicil-D-fenilalanina sob a acção da enzima carboxipeptidase (na presença e na ausência de inibidores) para o que se recorreu à reacção colorimétrica da ninidrina. A partir dos resultados expressos no quadro (em unidades arbitrárias de actividade) determine o tipo de cada um dos inibidores.

Concentração inicial do substrato (mM)	Inibidor			
	0	Hidrocinaurato 2 mM	Fenilbutirato 2 mM	Benzoato 50 mM
100,0	—	16,0	—	40,8
71,3	166,0	—	—	—
58,1	142,6	—	—	—
55,0	—	—	90,9	—
50,0	—	11,1	—	38,4
40,0	—	7,6	57,1	—
38,4	111,8	—	—	—
28,5	111,0	—	—	—
25,0	—	5,6	50,0	33,3
17,5	—	—	—	30,3
12,5	66,0	—	28,5	—

① $360,3$ $540,5$ $720,6$ $810,7$ $864,8$
 $900,8$ μg glucose formada / min

② a) $K_m = 2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ $V_{max} = 75 \mu\text{mol} / \text{min}$
 b) $v_0 = V_{max} / 2 = 37,5 \mu\text{mol} / \text{min}$
 c) $v_0 = 60 \mu\text{mol} / \text{min}$ e $v_0 = 120 \mu\text{mol} / \text{min}$
 d) $3 \times 75 \mu\text{mol} / \text{min} = 225 \mu\text{mol} / \text{min}$

③ $S = 1 \text{ Km}, 9 \text{ Km}, 19 \text{ Km}, \infty (*)$
 (*) escreva-se 1: a equação de 'M.-M. na forma
 $S = v_0 K_m / (V_{max} - v_0)$, depois substitua-se v_0 por V_{max}

④ $2.725.000$ moléculas de H_2O_2 consumidas por molécula, de enzima por minuto

⑤ $K_m = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$ $V_{max} = 8,3 \times 10^{-5} \text{ mol} / \text{min}$

⑥ Fase 1: $v = f[S]$
 Poderia depois fazer-se a representação gráfica de V_{max}/v versus $1/v$ e calcular o valor da K_m para cada valor de pH, mas a observação directa do gráfico de $v = f[S]$ mostra que a afinidade de E para S é maior a pH 7,6 do que a pH 9,0.

⑦ Hidrocinamato : I competitivo ($K_m \uparrow, V_{max} =$)
 Fenilbutirato : I não-competitivo ($K_m =, V_{max} \downarrow$)
 Benzoato : I incompetitivo ($K_m \downarrow, V_{max} \downarrow$).