

Le proprietà generali degli enzimi

Concetti chiave

- Un catalizzatore è una molecola in grado di abbassare l'energia di attivazione di una reazione. Gli enzimi sono proteine con attività catalitica.
- Gli enzimi si differenziano dai catalizzatori chimici di uso comune per velocità, condizioni, specificità e controllo della reazione.
- Le proprietà fisiche e chimiche uniche del sito attivo limitano l'attività degli enzimi a substrati e reazioni specifiche.
- Gli enzimi vengono classificati in 6 famiglie principali in relazione alla reazione che catalizzano (Commissione per gli Enzimi, EC).

L'energia che si libera nella formazione del **complesso ES** è la fonte principale di energia libera usata dall'enzima per abbassare l'energia di attivazione.

ENZIMI

Secreti gastrici

Carne → Carne digerita

amido → Mono- e di-saccaridi

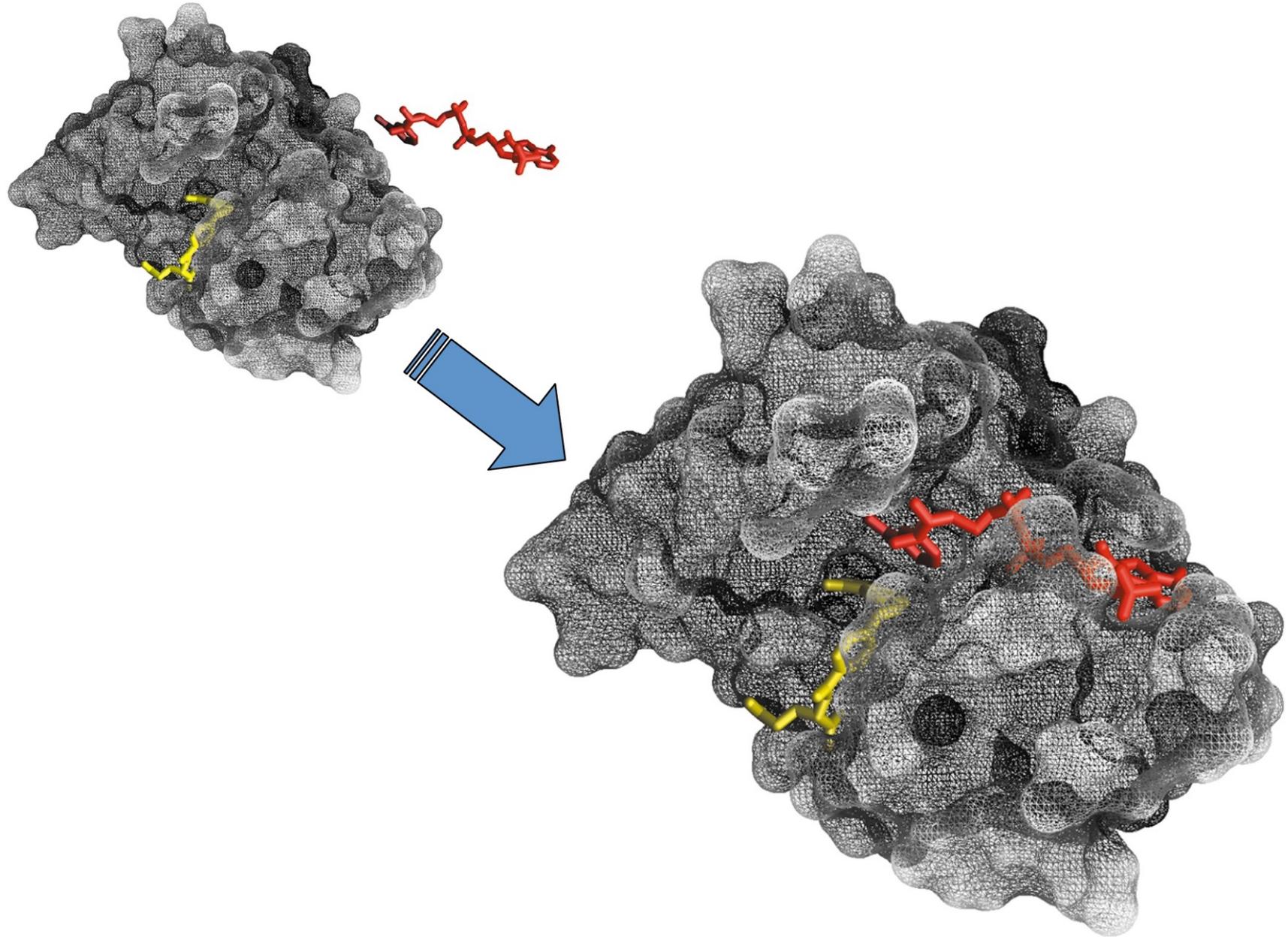
Colture di lievito (fermenti)

Mono- e di-saccaridi → etanolo

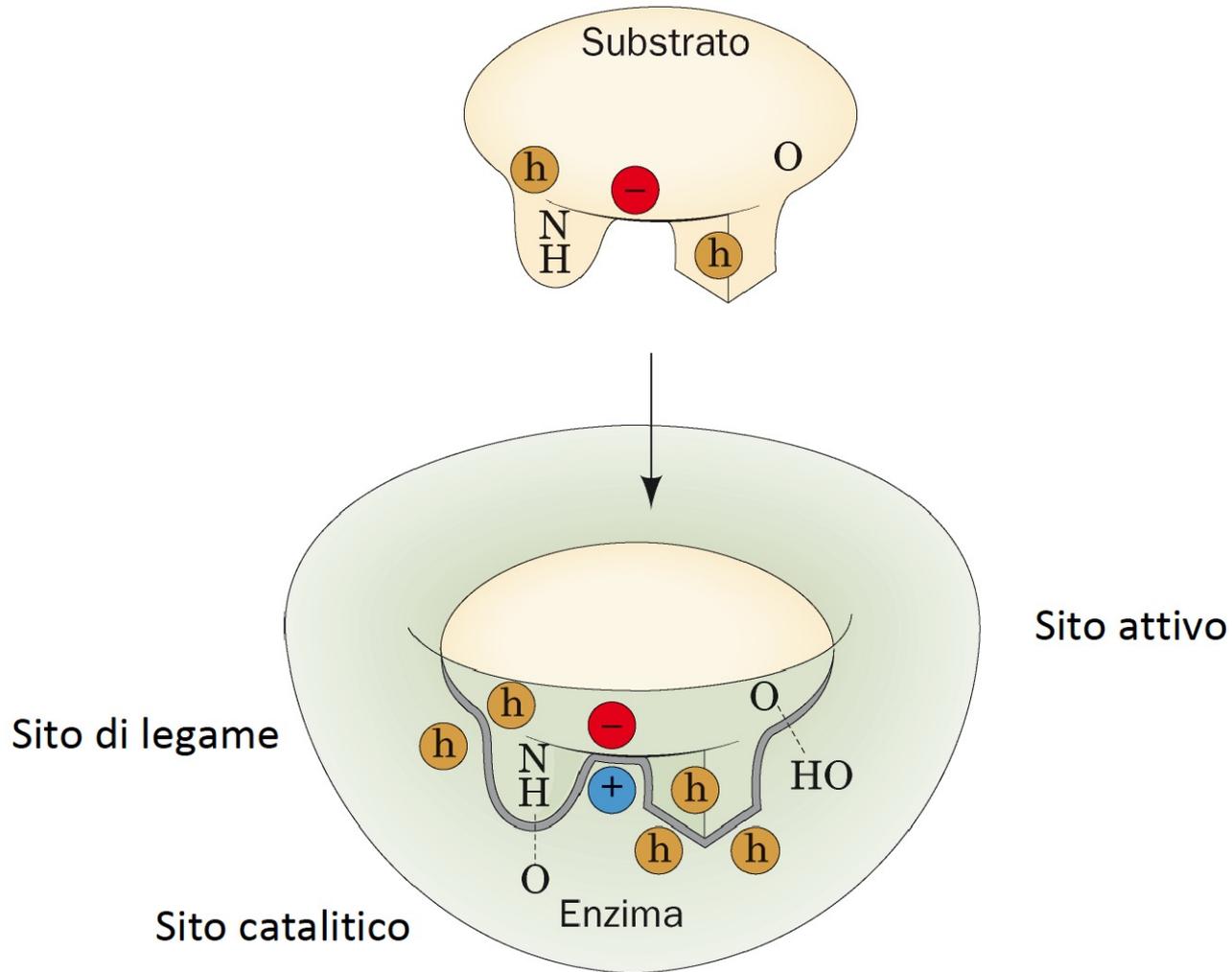
1850: Pasteur studiando la fermentazione dello zucchero, definisce il concetto di *fermento* inseparabile dalla cellula

1897: Buchner dimostra che anche estratti di lievito, ovvero proteine estratte dalle cellule, mantengono l'attività enzimatica.

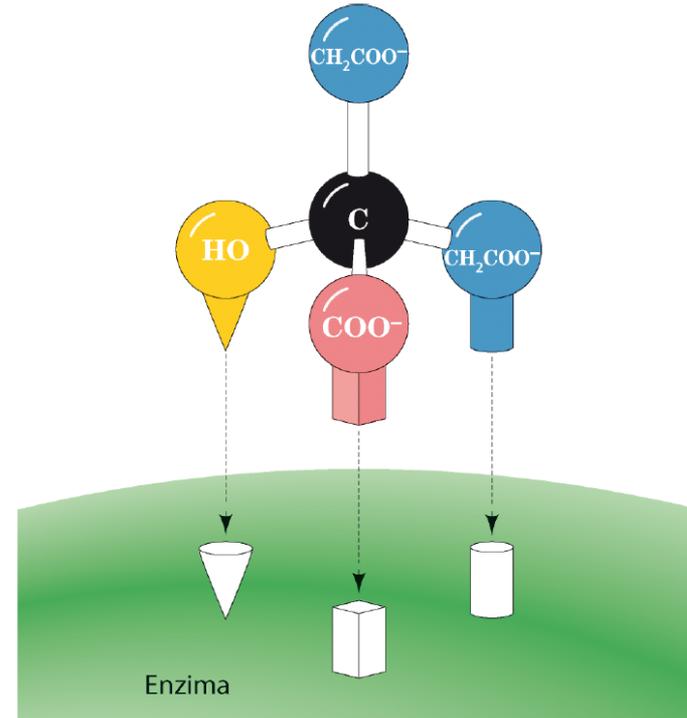
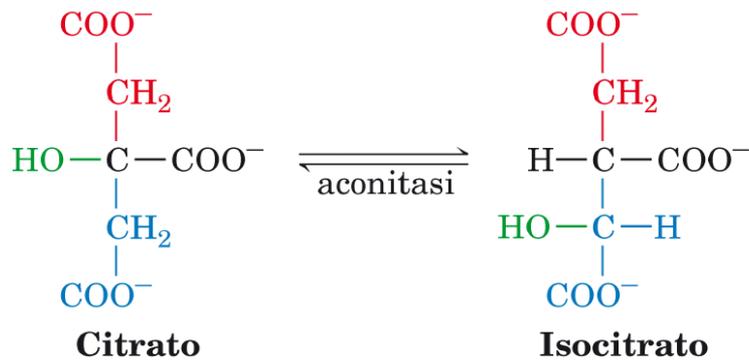
Gli enzimi sono macchine molecolari



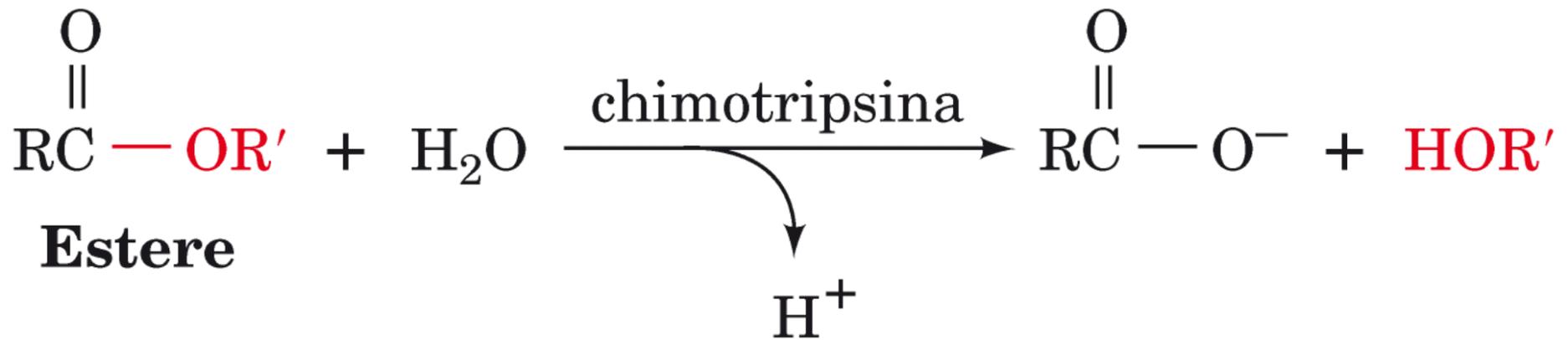
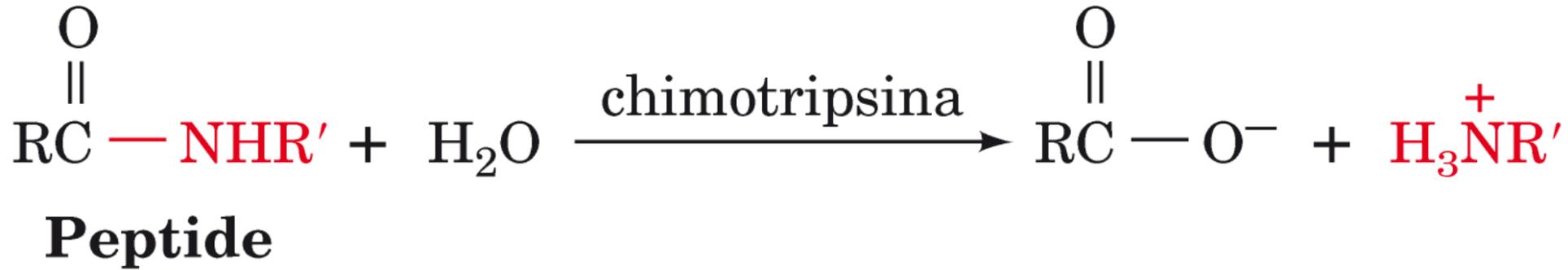
Gli enzimi agiscono su substrati specifici



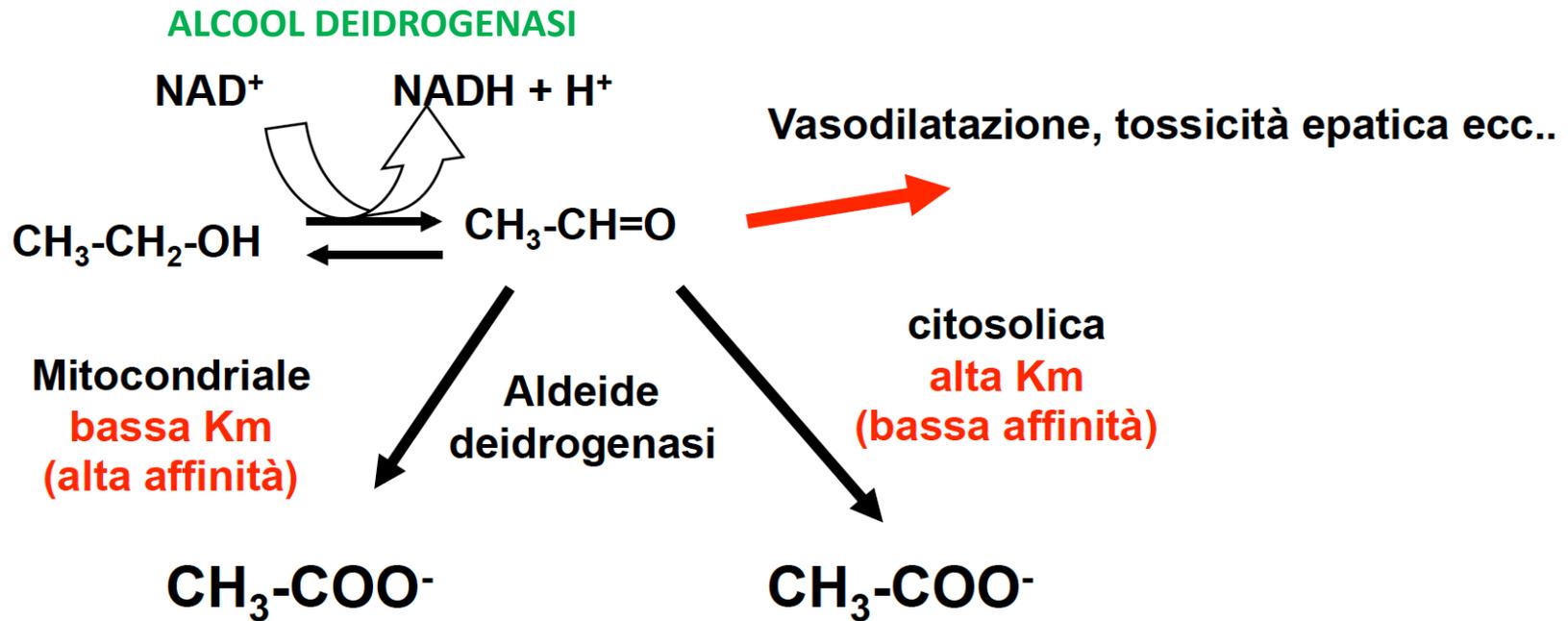
Alcuni enzimi catalizzano reazioni altamente stereospecifiche



Alcuni enzimi sono più permissivi



PERCHE' ALCUNI "NON REGGONO" L'ALCOOL?



ALCOOL DEIDROGENASI

Es. Nei caucasici: sono espresse entrambe le isoforme

Negli asiatici: solo la citosolica

Classe enzimatica	Tipologia di reazione	Descrizione
Ossidoreduttasi EC 1	$A_{\text{red}} + B_{\text{ox}} \rightleftharpoons A_{\text{ox}} + B_{\text{red}}$	Catalizzano le reazioni redox e possono essere categorizzati in ossidasi e reductasi.
Transferrasi EC 2	$A-B + C \longrightarrow A + B-C$	Catalizzano il trasferimento o lo scambio di certi gruppi tra alcuni substrati
Idrolasi EC 3	$A-B + H_2O \longrightarrow A-H + B-OH$	Accelerano l'idrolisi dei substrati
Liasi EC 4	$A-B \rightleftharpoons A + B$	Promuovono la rimozione di un gruppo dal substrato con formazione di doppi legami o catalizzano la sua reazione inversa (sintasi)
Isomerasi EC 5	$A-B-C \rightleftharpoons A-C-B$	Facilitano la conversione tra isomeri, isomeri geometrici o isomeri ottici.
Ligasi EC 6	$A + B + ATP \longrightarrow A-B + ADP + P_i$	Catalizzano la sintesi di due substrati molecolari in un composto molecolare con il rilascio di energia

Classificazione degli Enzimi

<http://www.expasy.org/enzyme>

C. The enzyme classes

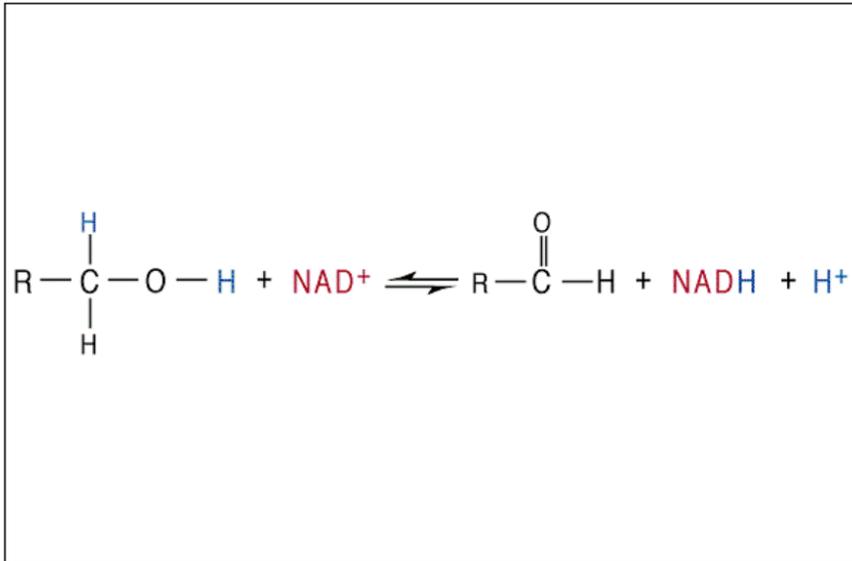
Class	Reaction type	Important subclasses
1 Oxidoreductases	<p>○ = Reduction equivalent</p> <p>A_{red} + B_{ox} ⇌ A_{ox} + B_{red}</p>	Dehydrogenases Oxidases, peroxidases Reductases Monooxygenases Dioxygenases
2 Transferases	<p>A-B + C ⇌ A + B-C</p>	C ₁ -Transferases Glycosyltransferases Aminotransferases Phosphotransferases
3 Hydrolases	<p>A-B + H₂O ⇌ A-H + B-OH</p>	Esterases Glycosidases Peptidases Amidases
4 Lyases ("synthases")	<p>A + B ⇌ A-B</p>	C-C-Lyases C-O-Lyases C-N-Lyases C-S-Lyases
5 Isomerases	<p>A ⇌ Iso-A</p>	Epimerases <i>cis trans</i> Isomerases Intramolecular transferases
6 Ligases ("synthetases")	<p>A + B + XTP ⇌ A-B + XDP + P</p> <p>X = A, G, U, C</p>	C-C-Ligases C-O-Ligases C-N-Ligases C-S-Ligases

Nome raccomandato e nome sistematico.

Numero di Classificazione:

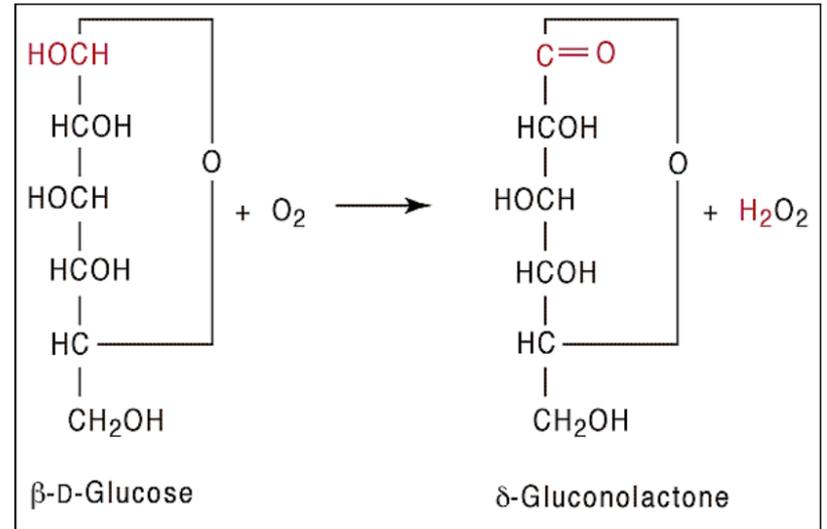
Numero a quattro cifre preceduto da EC (Enzyme Commission: la prima cifra indica la classe, la seconda la sotto-classe, la terza la sotto-sotto-classe, la quarta il numero seriale dell'enzima specifico).

ESEMPI DI OSSIDOREDUTTASI



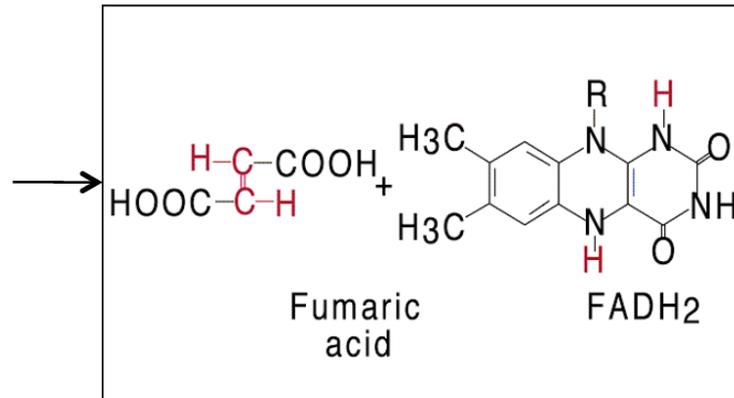
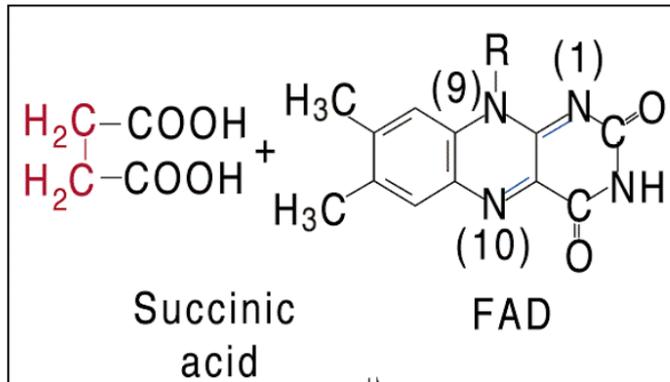
Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.

Alcol deidrogenasi



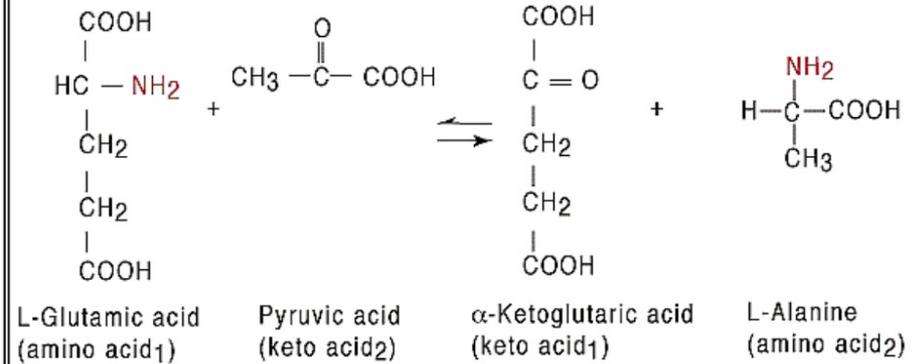
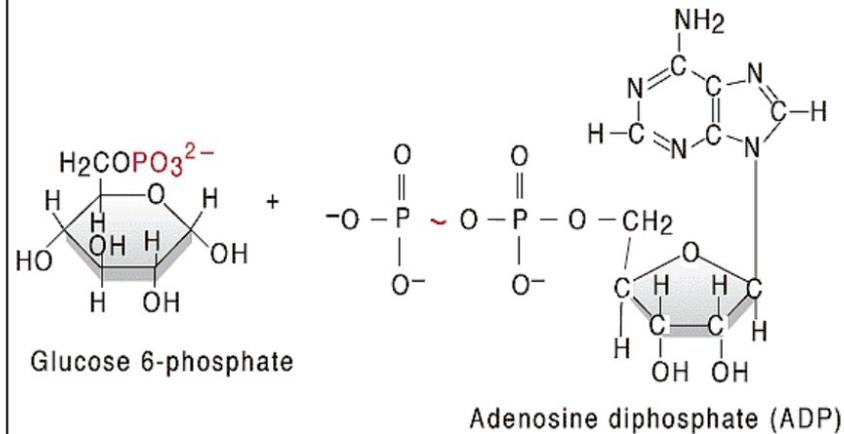
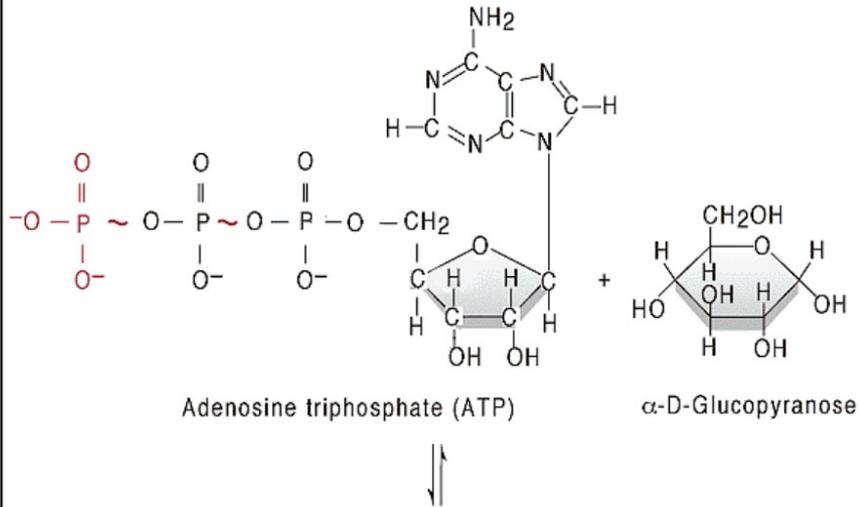
Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.

Glucosio ossidasi



Succinato deidrogenasi

ESEMPI DI TRANSFERASI



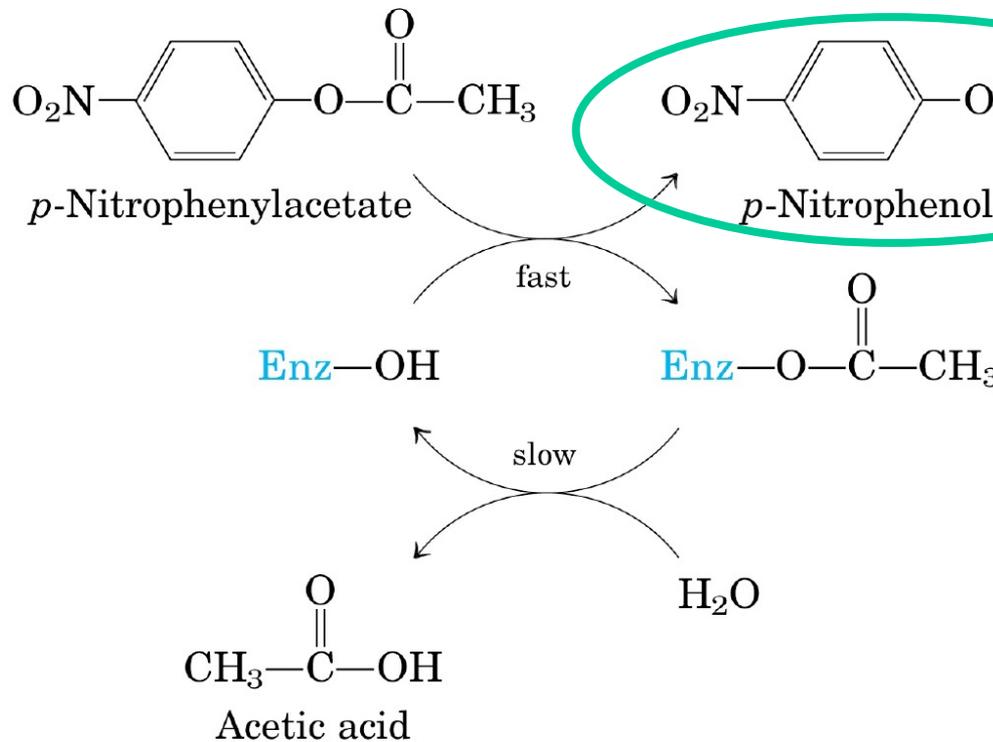
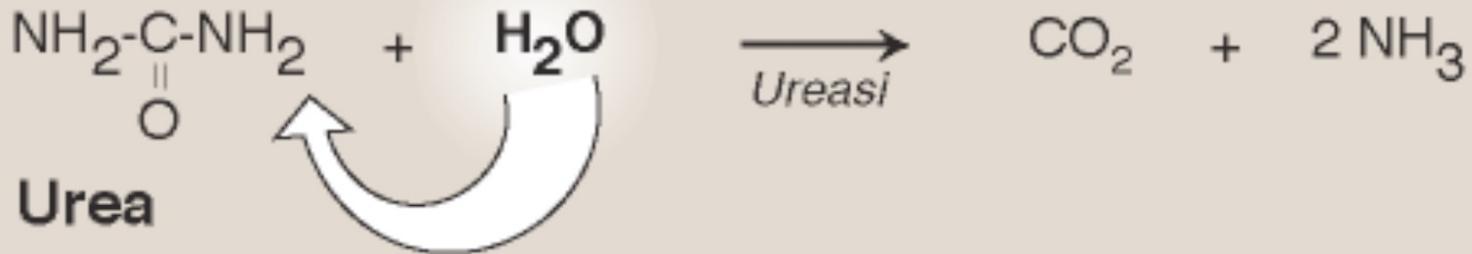
Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.

Amminoransferasi (Transaminasi)

Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.

Esochinasi/glucochinasi

ESEMPI DI REAZIONI CATALIZZATE DA IDROLASI

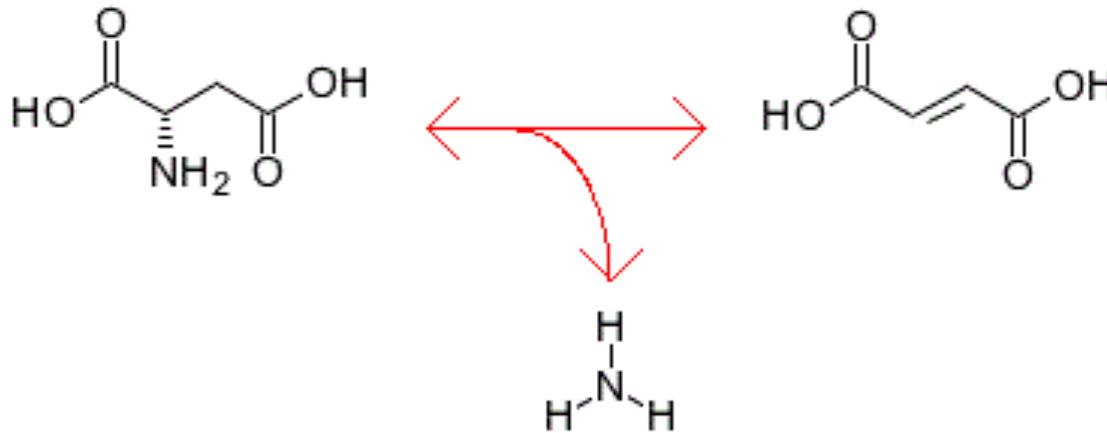


Prodotto che quantificabile perché assorbe intorno a 400nm: posso seguire bene la reazione!!!!

Acil-idrolasi
Esterasi
Peptidasi
Chimotripsina
Tripsina

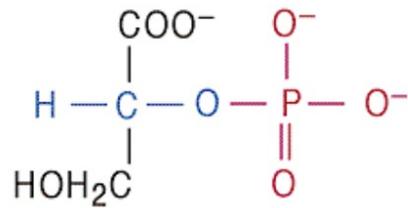
ESEMPI DI LIASI

Aspartato-ammoniaca liasi catalizza la rottura del legame carbonio-azoto presente nell'aspartato che dà fumarato e ammoniaca

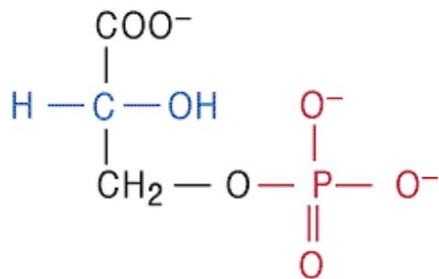
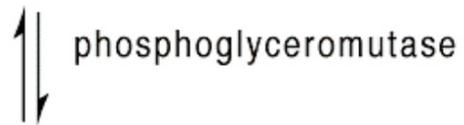


LIASI CATALIZZANO: Addizione o rottura di legami chimici che non passa attraverso ossido-riduzioni oppure idrolisi; si ha spesso formazione di un nuovo doppio legame o una struttura ad anello.

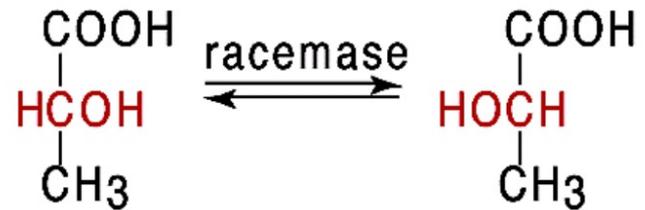
ESEMPI DI ISOMERASI



2-Phosphoglycerate



3-Phosphoglycerate



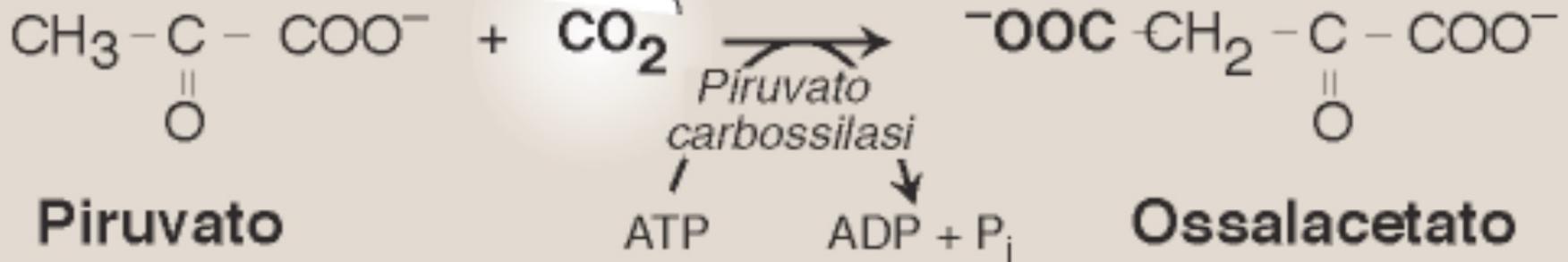
D-Lactic acid

L-Lactic acid

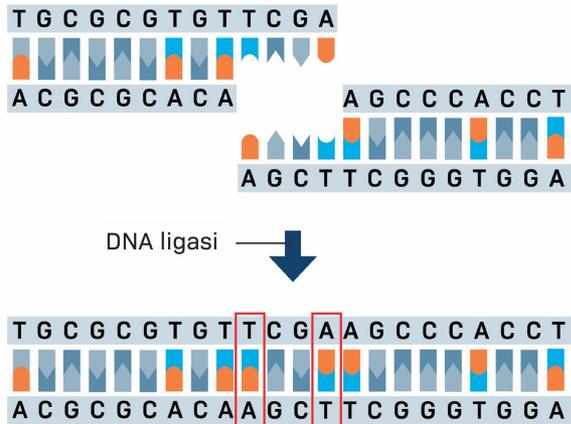
ESEMPI DI LIGASI

6. Ligasi

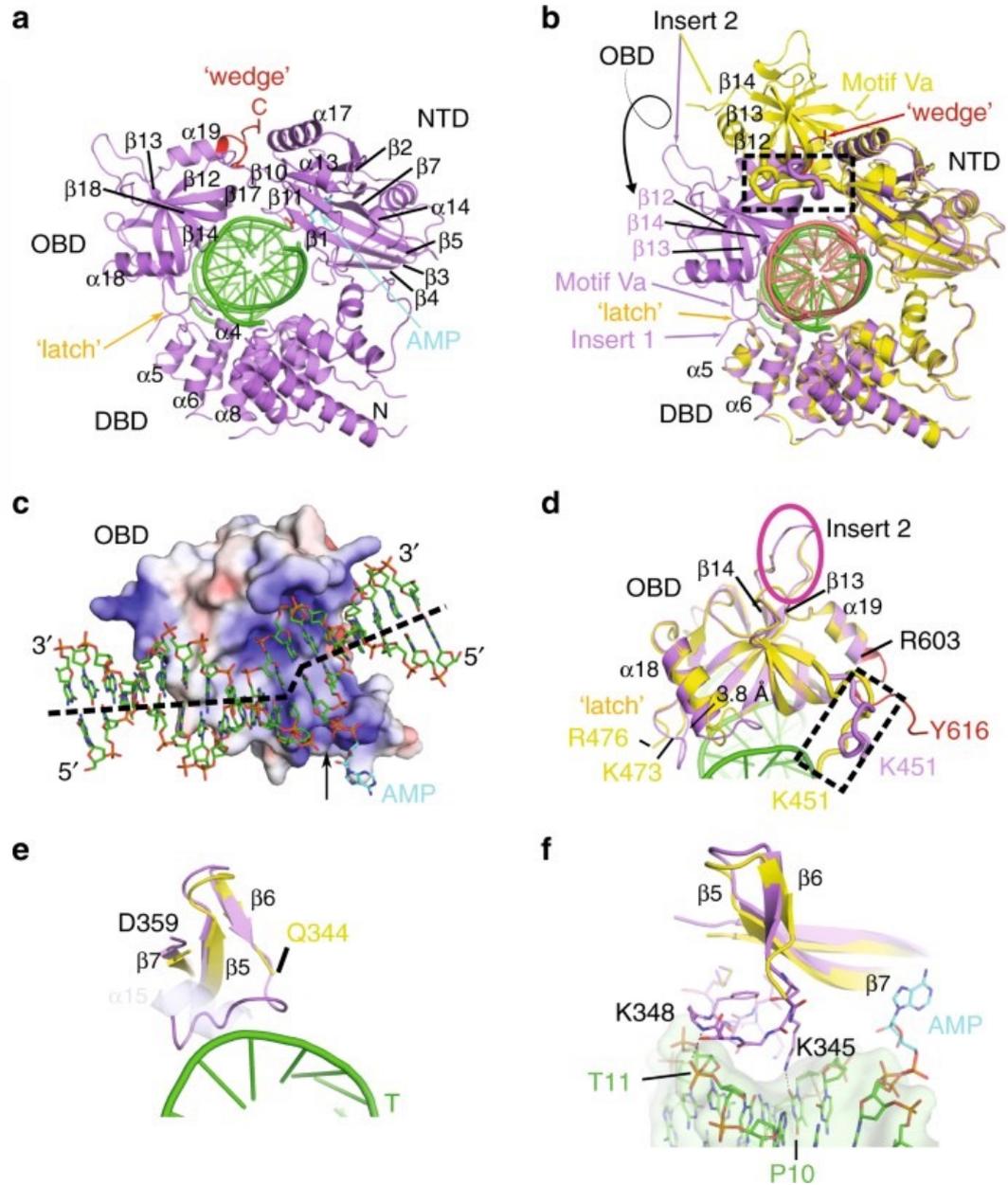
Catalizzano la formazione di legami tra carbonio e O, S o N, accoppiata all'idrolisi di fosfati ad alta energia, per esempio:



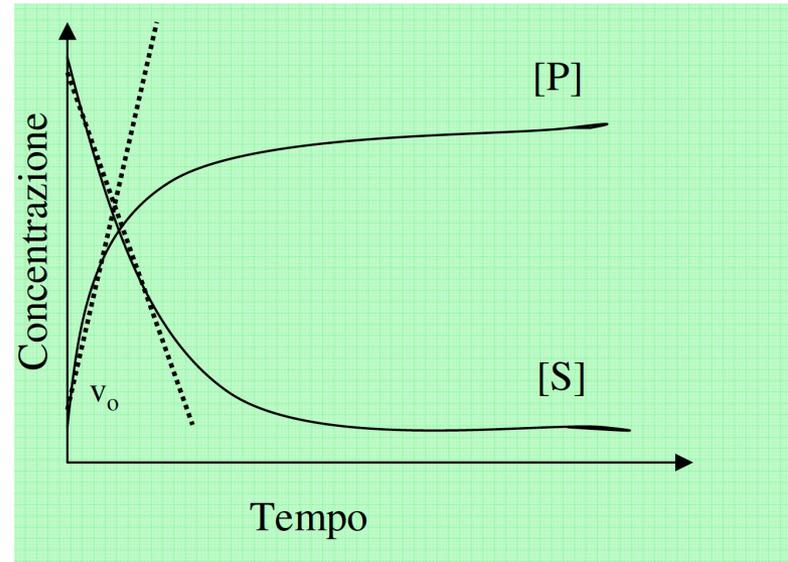
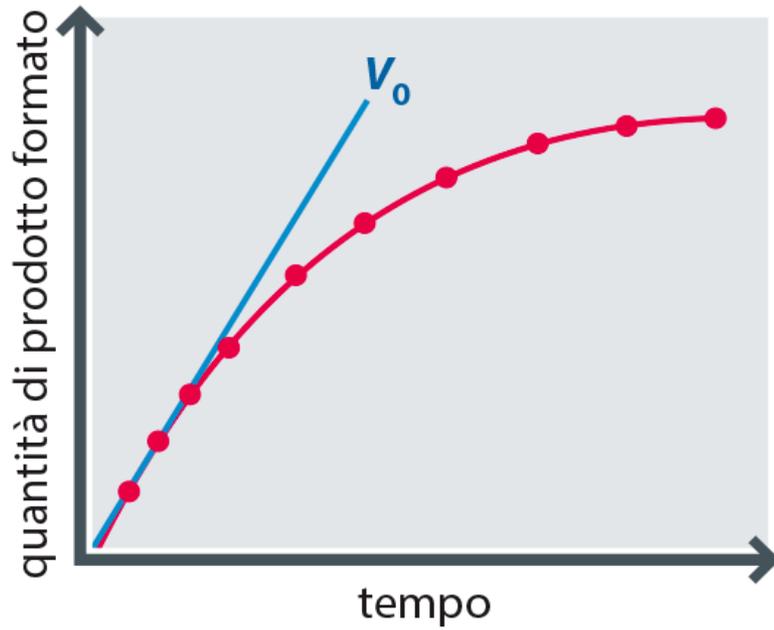
T4 DNA ligasi



La DNA ligasi funziona catalizzando la formazione di un **legame fosfodiesterico** tra nucleotidi su un filamento di una molecola di DNA a doppio filamento al costo di una molecola di ATP. La DNA ligasi è in grado di creare un legame covalente tra il gruppo fosfato 5' di una catena e l'adiacente gruppo OH 3' di un'altra. Questa reazione è importante non solo per unire i nucleotidi durante la replicazione del DNA, ma anche per riparare i danni al DNA.



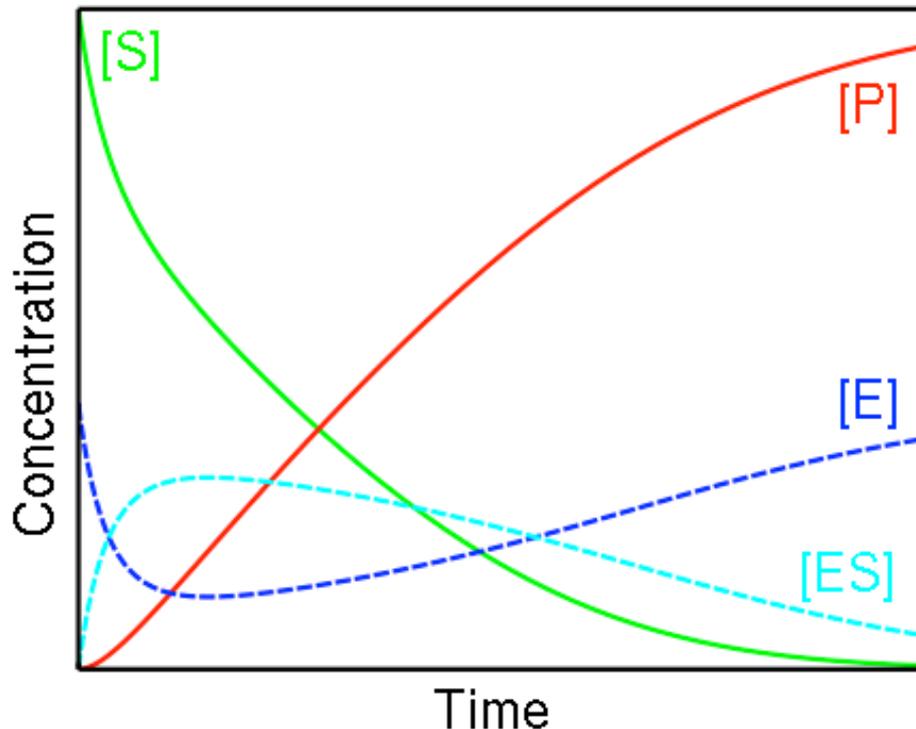
Cinetica enzimatica



La **Cinetica enzimatica** studia la **velocità** delle reazioni e la sua *variazione* quando l'ambiente si modifica



In una reazione enzimatica, la concentrazione delle specie molecolari si modifica nel tempo, ma le maggiori variazioni cinetiche si osservano nelle **fasi iniziali** della reazione



La [S] diminuisce inizialmente in modo molto rapido, come anche la [E] (enzima libero)

Il legame enzima-substrato si riflette nel rapido aumento di [ES]

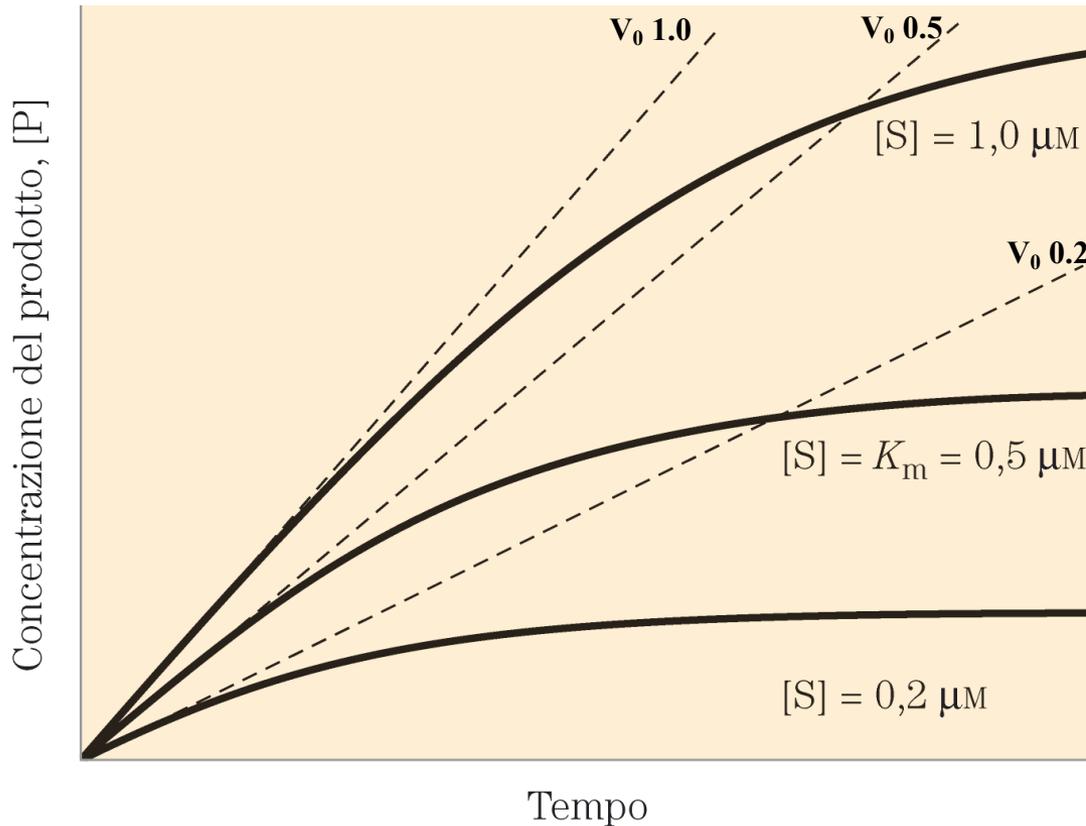
La reazione determina la formazione del prodotto e il rilascio di enzima libero (aumento di [P] e liberazione di [E])

La velocità di una reazione catalizzata da un enzima purificato è determinata dalla concentrazione del substrato [S]

La velocità di reazione dipende dalla [S], che però varia durante la reazione:



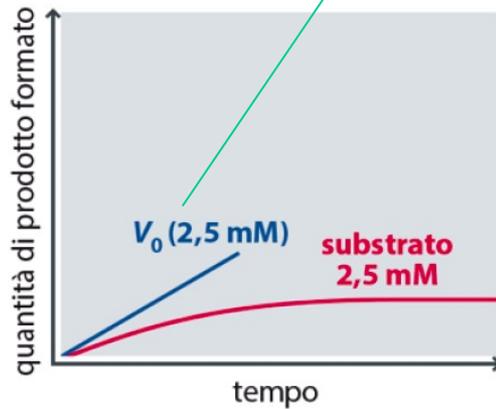
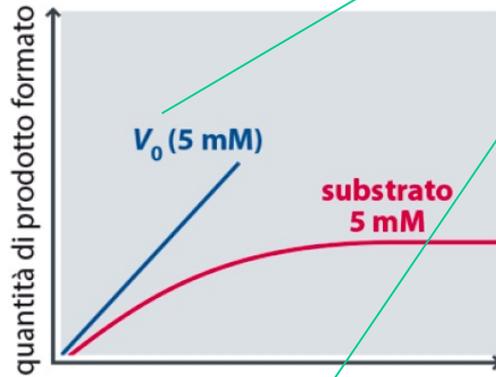
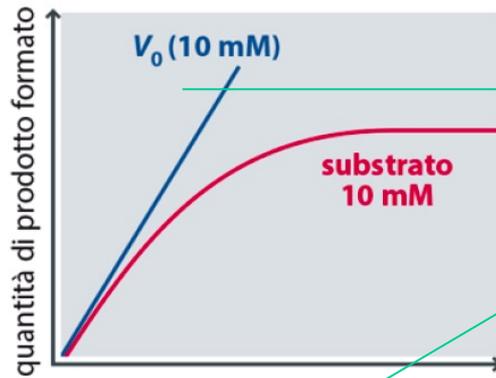
si analizza perciò la **velocità iniziale V_0** , dove si assume che $[S] \gg [E]$



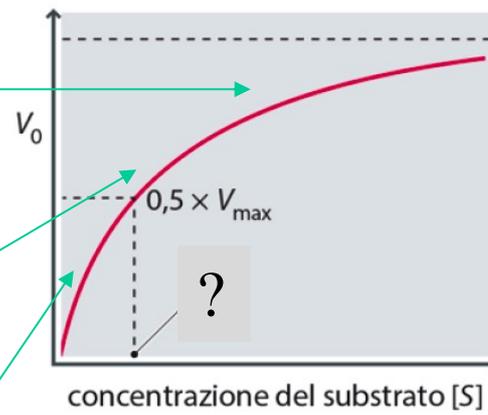
La velocità iniziale V_0 aumenta all'aumentare della [S]

Dopo un iniziale incremento, la velocità di reazione si stabilizza per il progressivo consumo di S (e l'accumulo di P)

(A) V_0 dipende dalla concentrazione del substrato

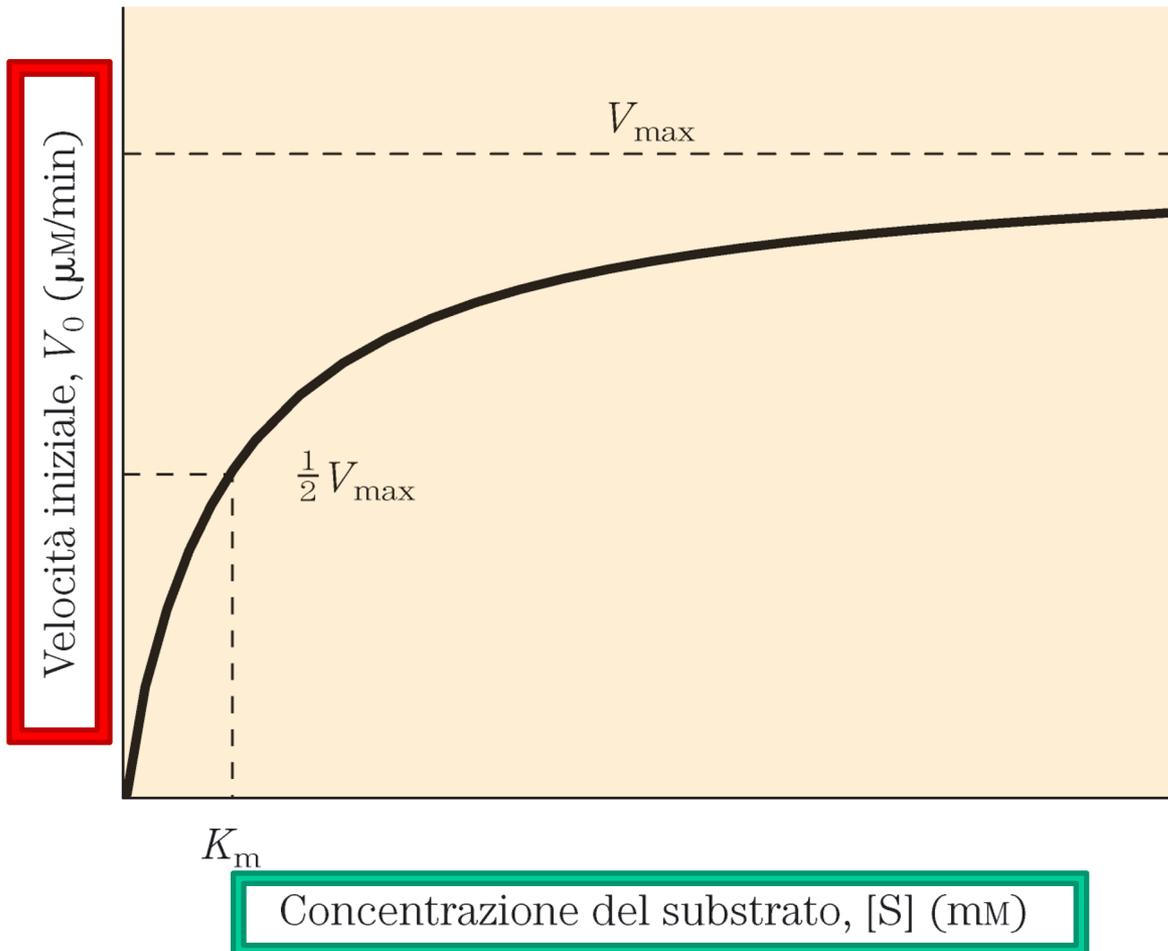


(B) relazione fra V_0 e concentrazione del substrato



Con [E] costante, V_0 ha andamento iperbolico rispetto alla [S]:

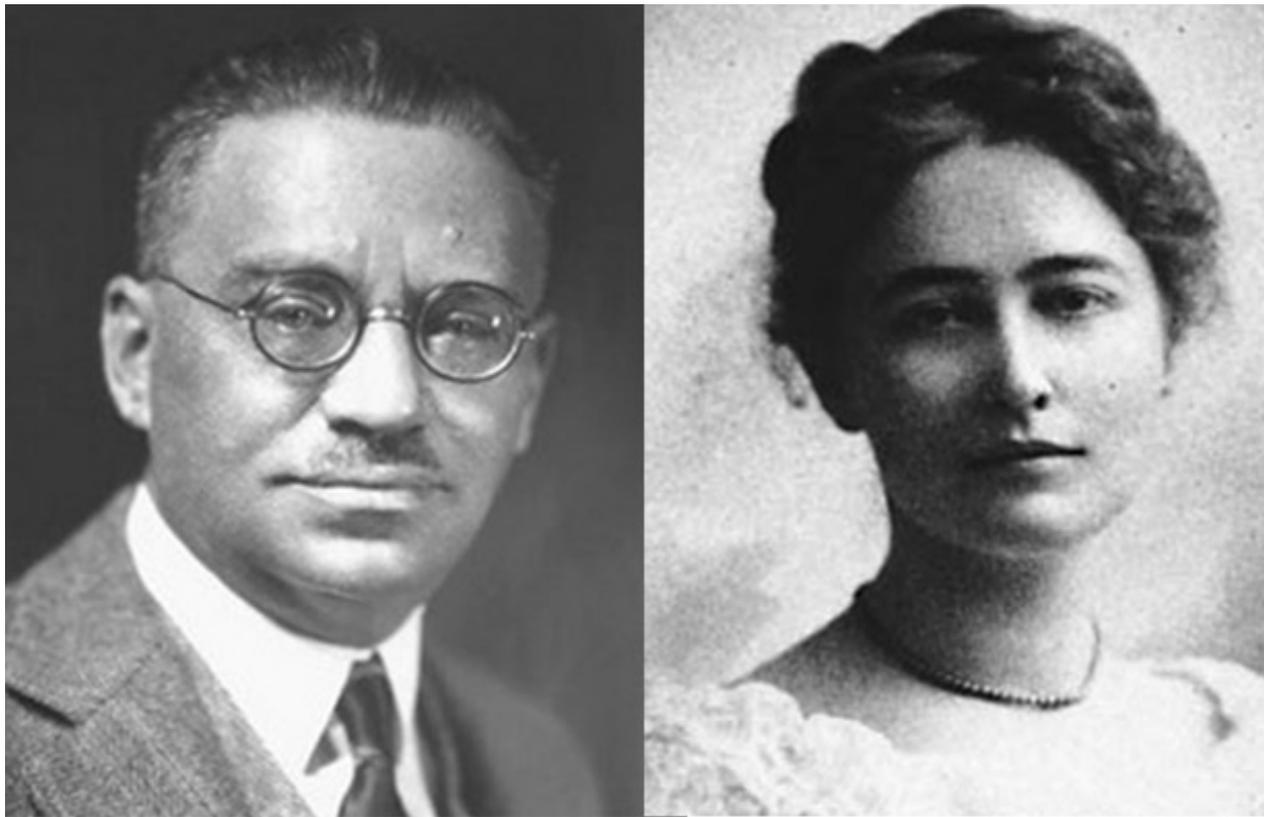
- a concentrazioni basse di substrato la velocità aumenta in maniera praticamente lineare con l'aumento di [S]
- a concentrazioni alte di substrato la velocità è indipendente da [S]



V_{max} rappresenta la **velocità massima** della reazione: ulteriori aumenti di [S] non hanno effetti e viene raggiunta quando tutto l'enzima è legato al substrato (saturazione)

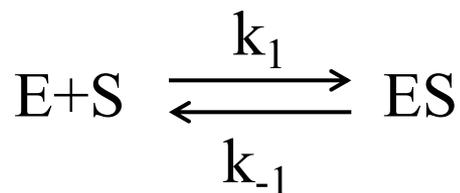
STATO STAZIONARIO

Nel 1913 Michaelis e Menten proposero un'equazione per spiegare l'azione degli enzimi sulla base delle curve sperimentali osservate.

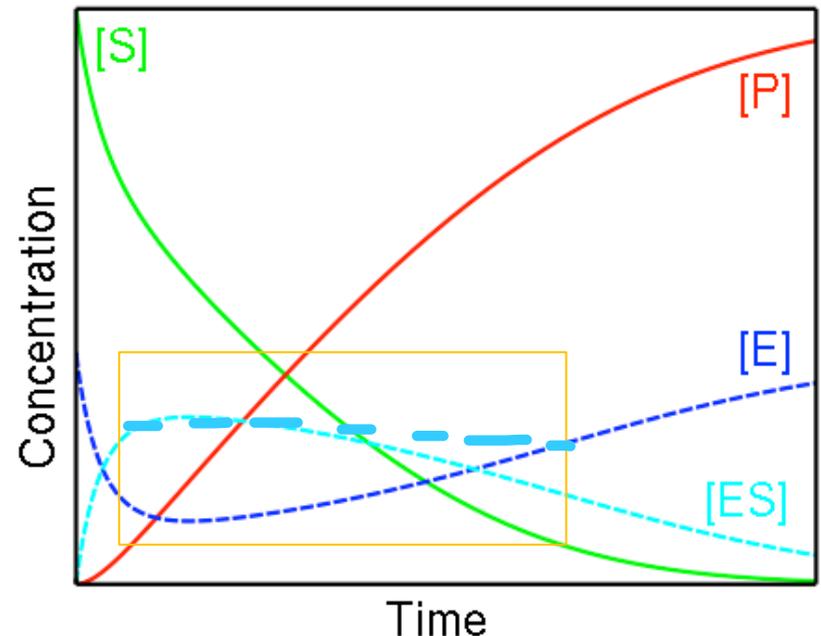


Nel 1913 Michaelis e Menten proposero un'equazione per spiegare l'azione degli enzimi sulla base delle curve sperimentali osservate.

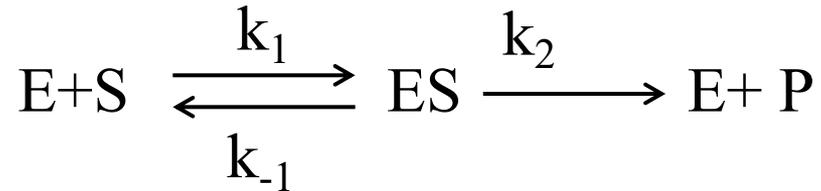
La teoria si basava sull'assunzione che l'enzima (E) ed il suo substrato (S) si associano reversibilmente per formare un complesso ES.



All'equilibrio: $k_{-1}[ES] = k_1[E][S]$



Il prodotto P si forma in un passaggio successivo quando:



→ **Supponendo che la velocità della reazione inversa E+P ES descritta da k_{-2} sia trascurabile**

Velocità di formazione del prodotto: $v = d[P]/dt$

$$V_0 = d[P]/dt = k_2[ES]$$

V_0 è misurabile; k_2 è una frequenza s^{-1}

$$V_f = k_1([E_t] - [ES])[S] \quad \text{(formazione ES)}$$

$$V_d = k_{-1}[ES] + k_2[ES] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad \text{(demolizione ES)}$$

$$d[ES]/dt = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES]$$

Velocità di variazione della concentrazione di ES nel tempo = velocità complessiva di formazione e consumo di ES

[ES] non è facilmente misurabile, si introduce:

E_t = quantità di enzima totale

$[E_t] = [E] + [ES]$ enzima libero + enzima legato a S

$$d[ES]/dt = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES]$$

$$V_f = k_1([E_t] - [ES])[S] \quad (\text{formazione ES})$$

$$V_d = k_{-1}[ES] + k_2[ES] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (\text{demolizione ES})$$

Nel 1925 Briggs e Haldane introducono il concetto di **stato stazionario** (*stato in cui [ES] rimane costante nel tempo*)

Allo stato stazionario $d[ES]/dt = 0$, cioè $V_f = V_d$ quindi:

$$k_1([E_t]-[ES])[S]=(k_{-1}+k_2)[ES]$$

$$\frac{([E_t]-[ES])[S]}{[ES]} = \frac{(k_{-1}+k_2)}{k_1} = K_m \quad \text{Costante di Michaelis (M)}$$

$$([E_t]-[ES])[S] = K_m[ES]$$

che risolvendo per [ES]:

$$[E_t][S]-[ES][S] = K_m[ES]$$

$$[E_t][S]=[ES][S]+K_m[ES]$$

$$[E_t][S] = ([S]+ K_m)[ES]$$

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{K_m + [S]}$$

$$\frac{([E_t]-[ES])[S]}{[ES]} = \frac{(k_{-1}+k_2)}{k_1} = K_m \quad \text{Costante di Michaelis (M)}$$

$$([E_t]-[ES])[S] = K_m[ES]$$

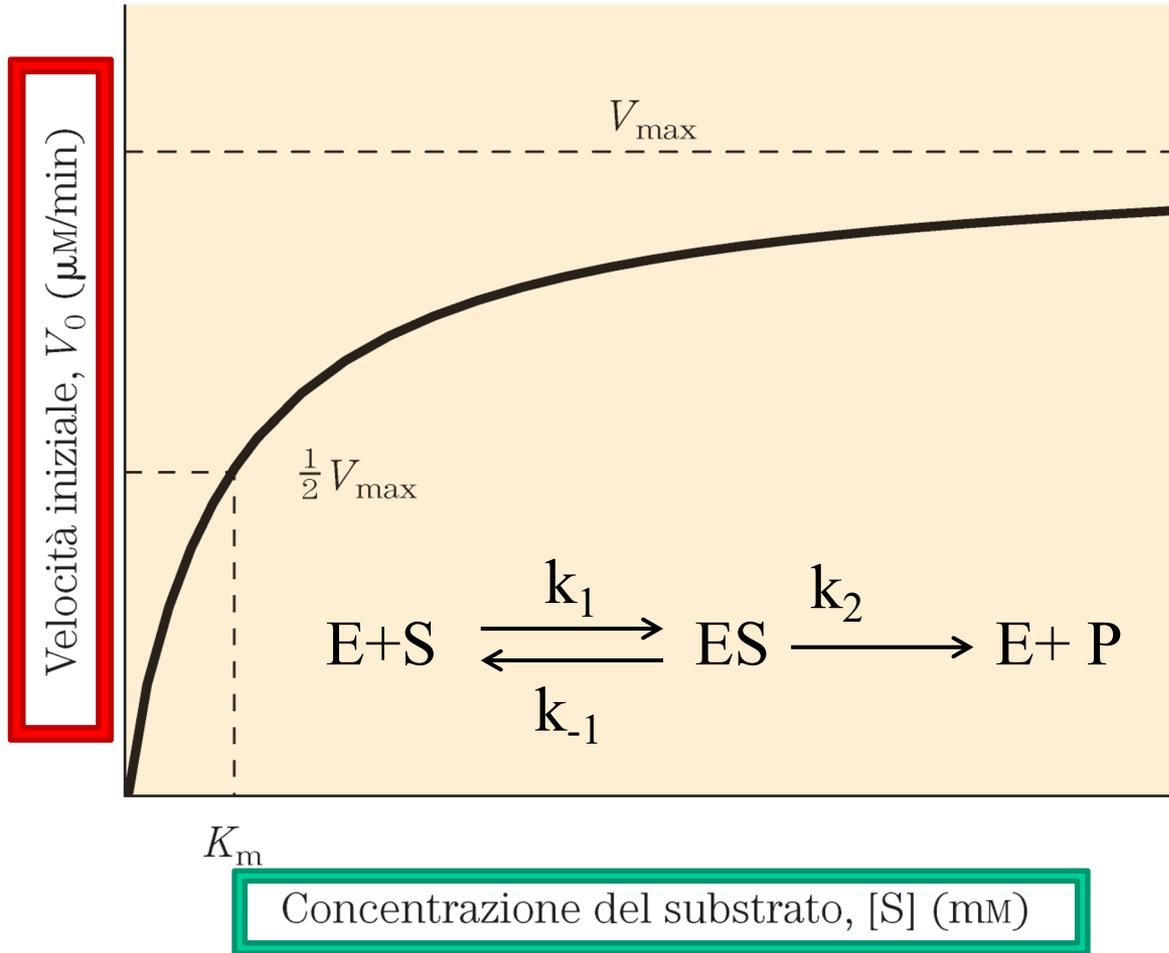
che risolvendo per [ES]:

$$[E_t][S]-[ES][S] = K_m[ES]$$

$$[E_t][S]=[ES][S]+K_m[ES]$$

$$[E_t][S] = ([S]+ K_m)[ES]$$

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{K_m + [S]}$$

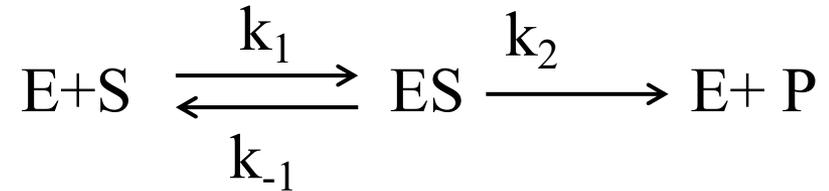


$$V_0 = d[\text{P}]/dt = k_2[\text{ES}]$$

Quindi , considerato che:

$$V_0 = d[P]/dt = k_2[ES]$$

$$[ES] = \frac{[Et][S]}{K_m + [S]}$$



$$v_0 = \frac{k_2[Et][S]}{K_m + [S]}$$

Equazione di Michaelis-Menten

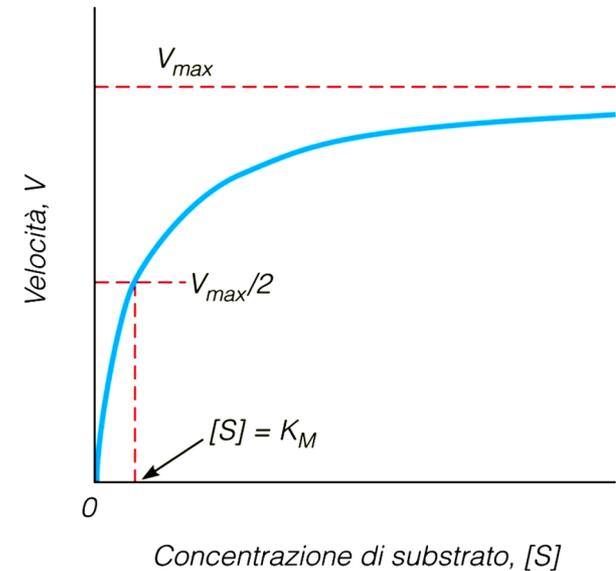
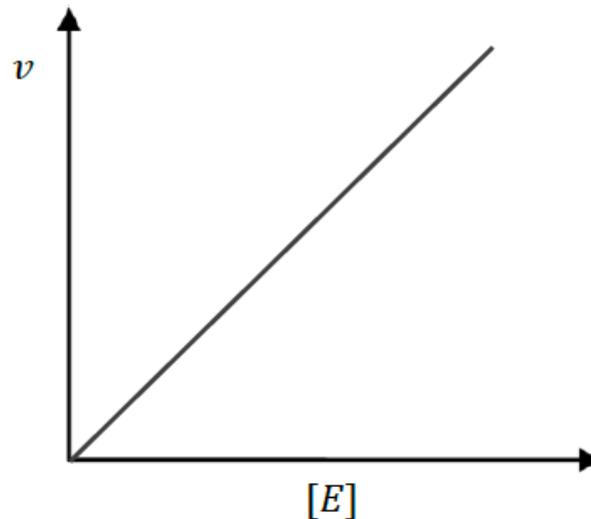
Se $[ES]=[Et]$ io ottengo la massima velocità possibile!

La velocità massima viene raggiunta quando tutto l'enzima è saturato con il substrato, cioè $[ES]=[Et]$ e si definisce $v_{\max} = k_2[Et]$

$$v_0 = \frac{v_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

Equazione di Michaelis-Menten

$$v_0 = \frac{k_2[Et][S]}{K_m + [S]}$$



Variatione della velocità di reazione con la concentrazione dell'enzima.

In alcuni testi $E_t = E_0$ e K_2 è K_C ma la sostanza non cambia!

Ponendo $[E_0]$ la concentrazione iniziale dell'enzima, $[S]$ e $[P]$ le concentrazioni del substrato e del prodotto; l'equazione della velocità di formazione del composto ES alla relativa concentrazione $[ES]$ risulta:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1([E_0] - [ES])[S] - k_{-1}[ES] - k_c[ES]$$

Riferendoci alle condizioni di equilibrio, si può porre $\frac{d[ES]}{dt} = 0$, quindi:

$$0 = k_1([E_0] - [ES])[S] - k_{-1}[ES] - k_c[ES]$$

$$[ES] = \frac{k_1[E_0][S]}{k_{-1} + k_c + k_1[S]} = \frac{[E_0][S]}{\frac{k_{-1} + k_c}{k_1} + [S]}$$

definendo $\frac{k_{-1} + k_c}{k_1} = k_M$ (*costante di Michaelis-Menten*)

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_c [ES]$$

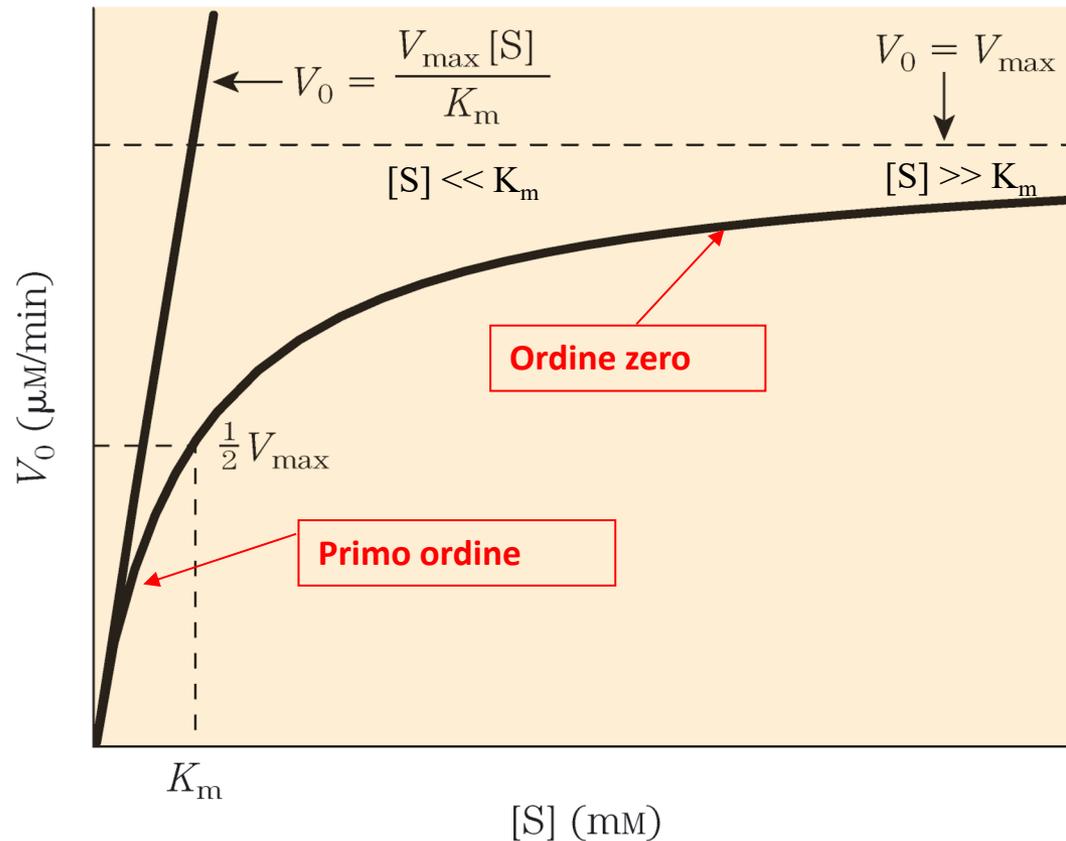
si ottiene l'*equazione di Michaelis-Menten* che lega la velocità di formazione del prodotto con la concentrazione del substrato $[S]$ ad ogni prefissato valore di $[E_0]$:

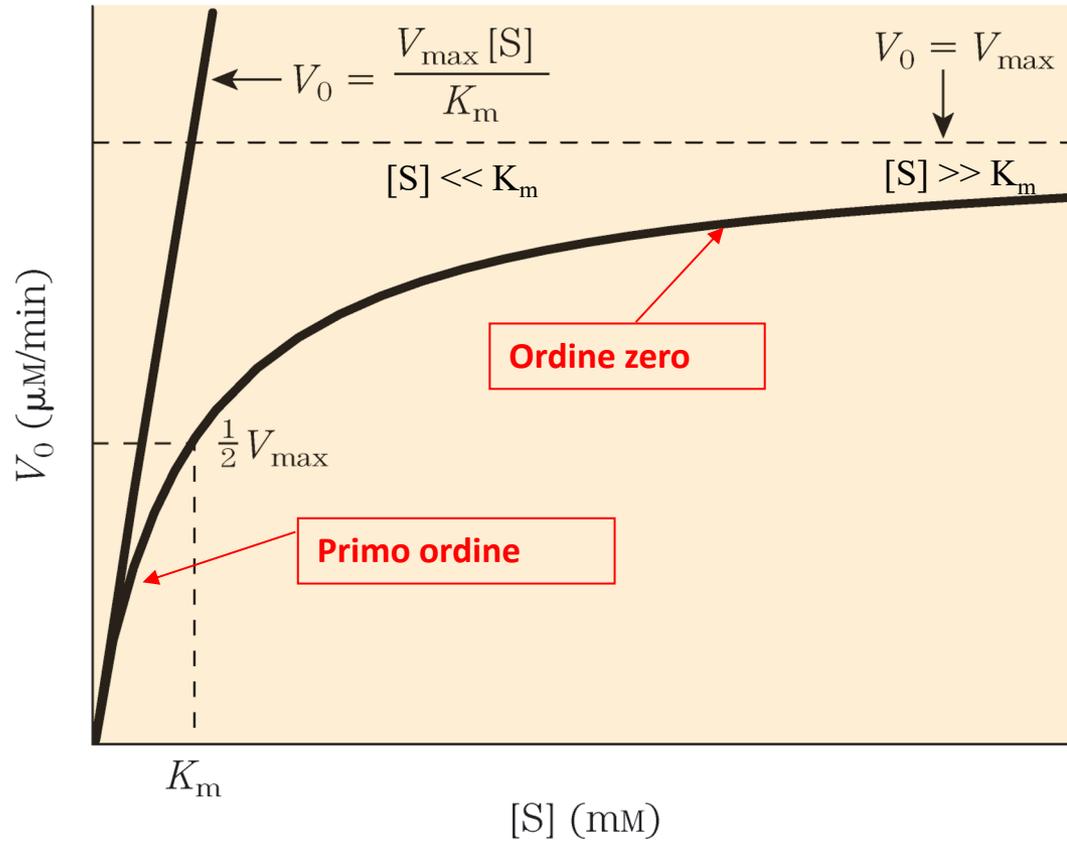
$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{k_c [E_0] [S]}{k_M + [S]} = \frac{V_{MAX} [S]}{k_M + [S]}$$

L'equazione di **Michaelis-Menten** esprime la relazione tra $[S]$ e V_0

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

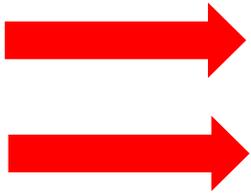
La velocità iniziale di una reazione catalizzata enzimaticamente dipende da due costanti, V_{\max} e K_m e dalla concentrazione iniziale di S





K_m e V_{max} = parametri cinetici fondamentali

K_m è la costante di **Michaelis** e corrisponde alla $[S]$ quando $V_0 = \frac{1}{2}V_{\max}$

1) $V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$  $\frac{1}{2} V_{\max} = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$
 $k_M = [S]$

2) Se $[S] \gg K_M$ allora $V = \frac{V_{\max} [S]}{\cancel{K_m + [S]}}$ e $V = V_{\max}$

3) Se $[S] \ll K_M$ allora $V = k[S]$ $V = \frac{V_{\max} [S]}{\cancel{K_m + [S]}}$

k è semplicemente una costante di proporzionalità (s^{-1}) $k = v_{\max}/K_m$

K_m è la costante di **Michaelis** e corrisponde alla $[S]$ quando $V_0 = \frac{1}{2}V_{max}$

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad \longrightarrow \quad \frac{1}{2} V_{max} = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$
$$\quad \longrightarrow \quad k_M = [S]$$

Se $[S] \gg K_M$ allora $V = \frac{V_{max} [S]}{\cancel{K_m + [S]}}$ e $V = V_{max}$ REAZIONE DI ORDINE ZERO

Se $[S] \ll K_M$ allora $V = k [S]$ REAZIONE DI PRIMO ORDINE $V = \frac{V_{max} [S]}{\cancel{K_m + [S]}}$

k è semplicemente una costante di proporzionalità (s^{-1}) $k = v_{max}/K_m$

Significato di V_{max} , costante che si trova solo nelle reazioni enzimatiche

Effect of substrate concentration

For non-catalyzed reactions

Reaction rate increase with concentration.

Enzyme catalyzed reactions

Also increase but only to a certain point.

V_{max}

maximum velocity

At V_{max} , the enzyme is working as fast
as it can.

VELOCITA' DI UNA REAZIONE ENZIMATICA IN PRESENZA DI DIVERSE CONCENTRAZIONI DI SUBSTRATO

VELOCITA' MASSIMA O V_{max}
Velocità massima a cui l'enzima può catalizzare la reazione;

COSTANTE DI MICHAELIS o K_m
concentrazione di substrato a cui la velocità della reazione è pari a metà della velocità massima ($0,5 \times V_{max}$)

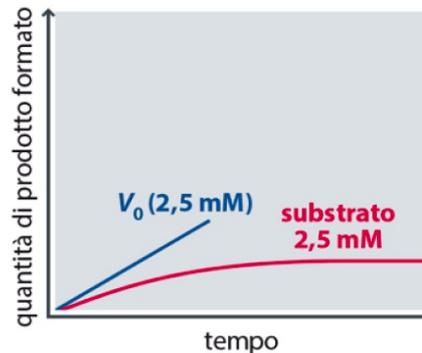
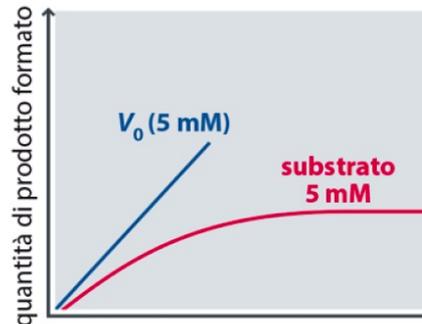
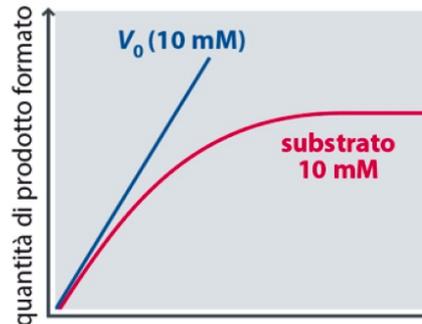


Misura dell'affinità dell'enzima per il suo substrato:

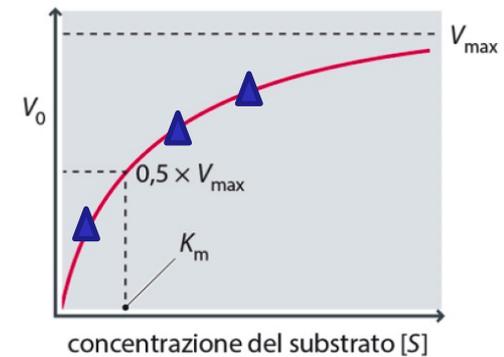
K_m bassa \rightarrow elevata affinità,

K_m alta \rightarrow affinità bassa

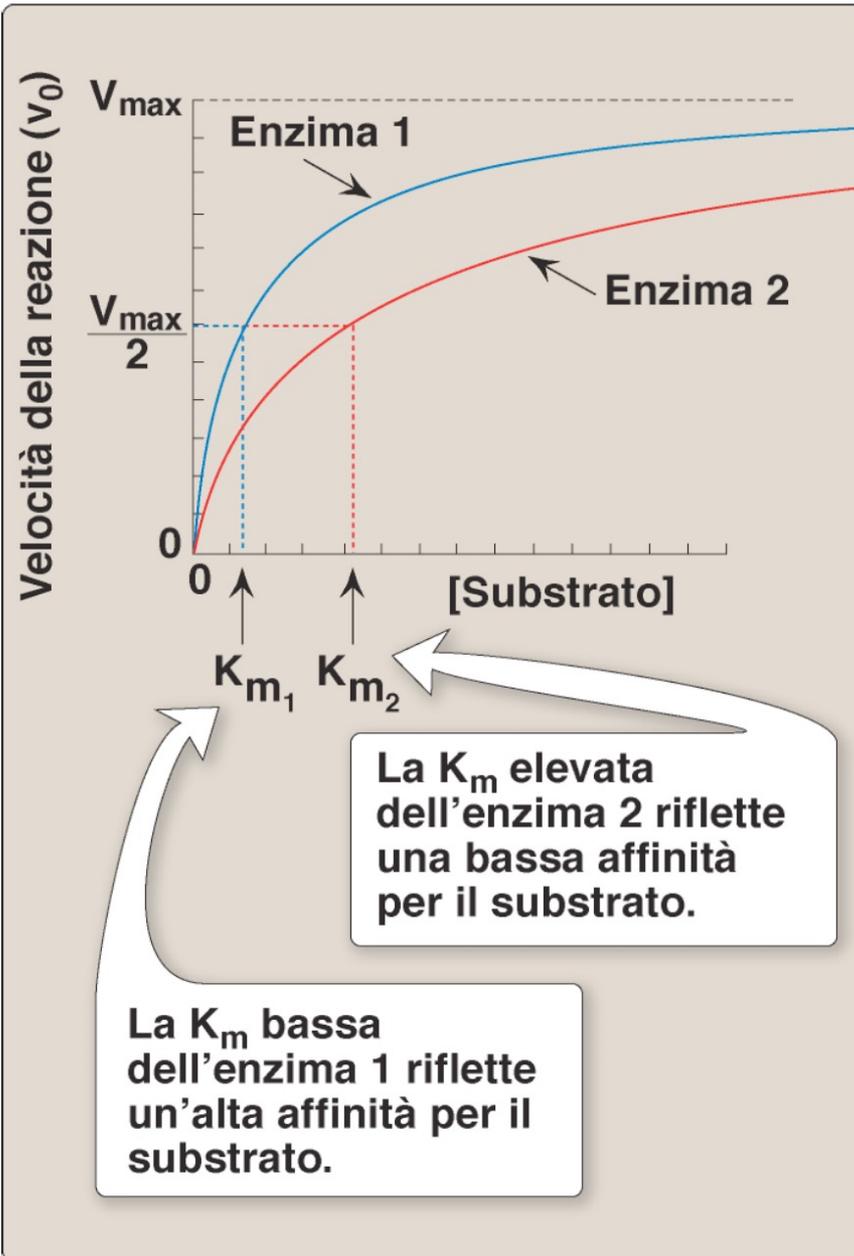
(A) V_0 dipende dalla concentrazione del substrato



(B) relazione fra V_0 e concentrazione del substrato



$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$



K_m dipende dall'affinità dell'enzima per il suo substrato e ci dà una stima dell'affinità del substrato per l'enzima nel complesso attivato pari a k_{-1}/k_1 ; in particolare:

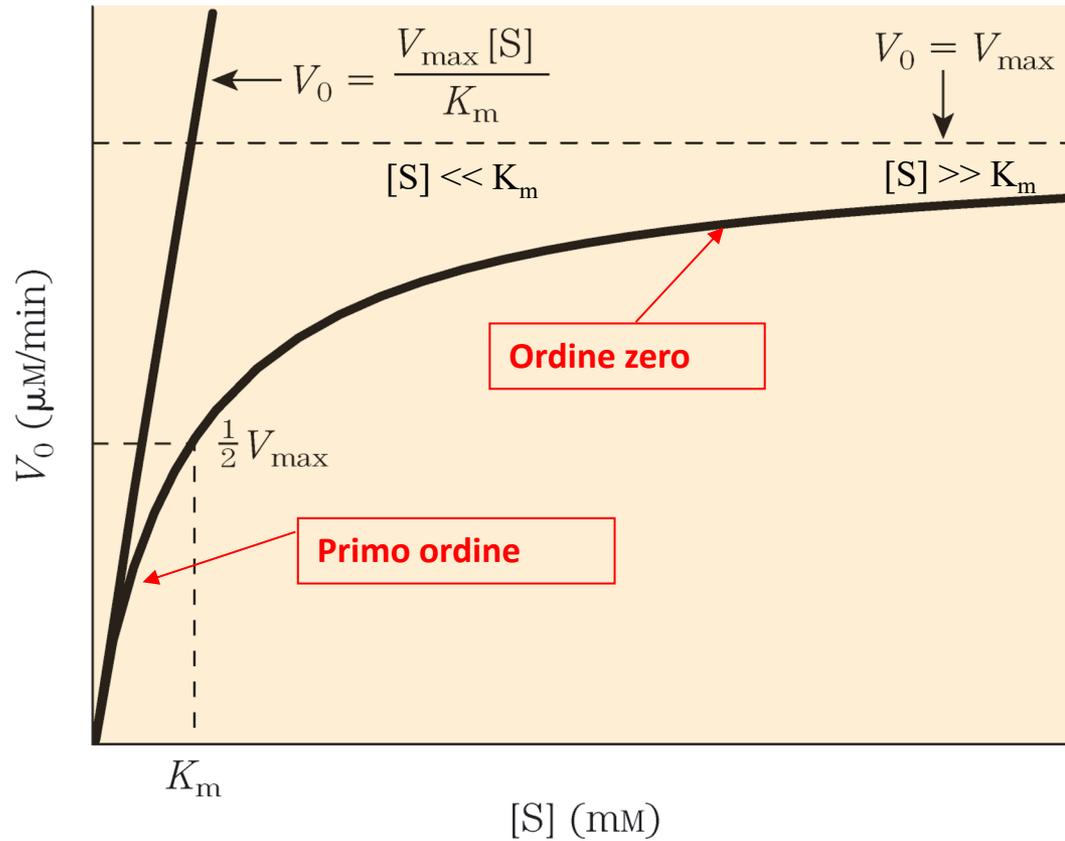
$$K_m = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$$

Se $k_2 \ll k_{-1}$

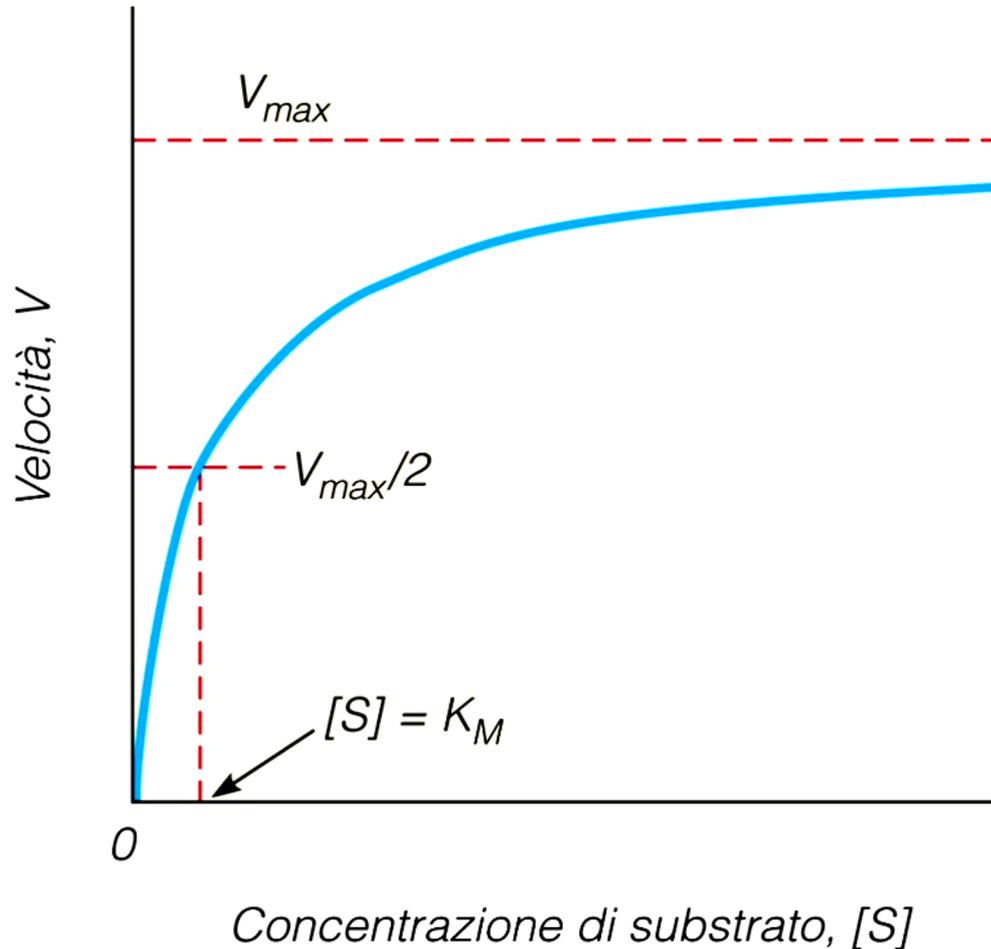
$$K_m \approx \frac{k_{-1}}{k_1}$$

Tuttavia K_m non può essere considerata come una semplice indicazione della affinità del substrato perché spesso una reazione enzimatica procede attraverso diverse tappe dopo la formazione del complesso ES e la K_m diventa una funzione molto complessa

K_m e V_{max} = parametri cinetici fondamentali



Il calcolo “manuale” della K_m e della v_{max} dal grafico Michaelis e Menten è impreciso a causa dell’andamento asintotico della curva



Equazione di Lineweaver – Burk

L'inverso della equazione di Michaelis-Menten.

Si esprime nel grafico dei **Doppi Reciproci**:

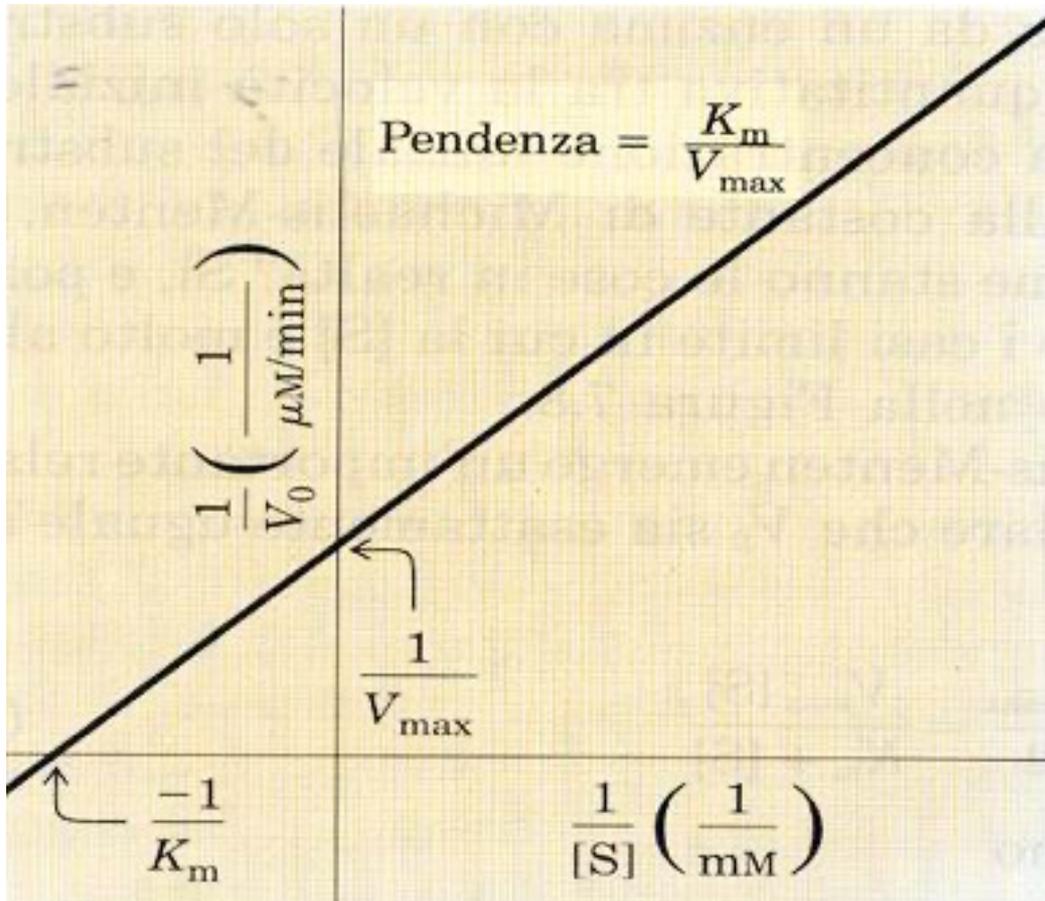
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$y = ax + b$$

$$a = K_m/V_{\max}$$

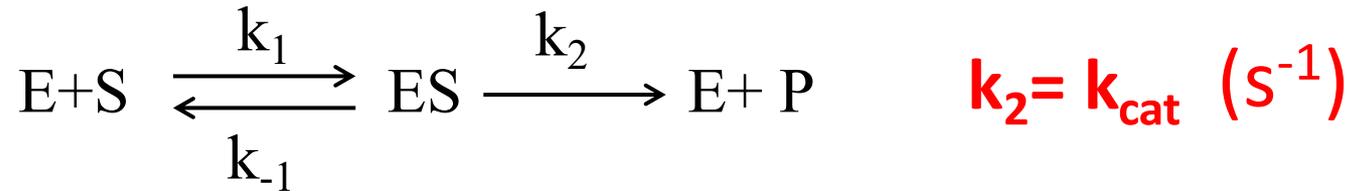
$$b = 1/V_{\max} \quad (x=0)$$

$$x = -1/K_m = -b/a \quad (y=0)$$



- Una retta con pendenza K_m/V_{\max} ;
- L'intercetta dell'asse x: $-1/K_m$;
- L'intercetta dell'asse y: $1/V_{\max}$

Si definisce un'altra costante importante : k_{cat} (**numero di turnover**)
descrive la velocità della tappa limitante.



E' definita come il *numero di molecole di substrato convertite a prodotto in 1 secondo per molecola di enzima.*

$V_0 = V_{\text{max}} = k_2[\text{Et}]$ $k_2 = V_{\text{max}}/[\text{Et}]$ Se la $[\text{Et}]$ è nota, a $[\text{S}]$ saturante,
 k_{cat} può essere determinata da V_{max}

Infatti: $V_0 = V_{\text{max}} = d[\text{P}]/dt = k_2[\text{ES}] = k_2[\text{Et}]$

Perciò l'eq. MM si può scrivere come: $V_0 = \frac{V_{\text{max}}[\text{S}]}{K_m + [\text{S}]} = \frac{K_{\text{cat}}[\text{Et}][\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$

Quando le tappe che limitano la velocità sono più di una, k_{cat} può diventare funzione complessa delle costanti di velocità di varie tappe....Ma il modello di Michaelis e Menten è spesso un'ottima approssimazione.....

Lo stadio che definisce la velocità globale è quello lento perché di fatto gli altri diventano trascurabili....
(rate limiting step...)

Unità di attività enzimatica e dosaggio degli enzimi

Catal (kat, nel sistema SI): è la quantità di enzima che converte 1 mole di reagente nel prodotto in 1 secondo nelle condizioni di reazione standard (ottimali).

L'Unità internazionale (U o UI): corrisponde alla quantità di enzima che converte 1 μ mole di reagente nel prodotto in 1 minuto, nelle condizioni di reazione standard (ottimali).

Poiché $1 \mu\text{mole}/\text{min} = 1,67 \times 10^{-8} \text{ moli}/\text{s}$,
 $1\text{U} = 1,67 \times 10^{-8} \text{ kat}$.

L'attività specifica: è il rapporto tra il numero di U o di kat e il volume che la contiene (U/mL) o la quantità totale di proteina espressa in milligrammi (U/mg).

L'attività specifica è una misura del grado di purificazione dell'enzima ed il suo valore tende a raggiungere un massimo che rimane costante quando tutte le molecole del campione in esame sono molecole di enzima attivo.

Tappa di purificazione	Proteina (mg totali)	U totali ^a	Attività specifica (U/mg di proteina)
Estratto grezzo isolato	12 000	150 000	12,5
Frazionamento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ^b	4000	140 000	35
Cromatografia per gel filtrazione	500	120 000	240
Cromatografia per scambio ionico (pH 6,0)	75	95 000	1260
Cromatografia per scambio ionico (pH 7,8)	6	80 000	13 300

^a U = unità internazionali. Alcune molecole di enzima vengono denaturate e sono perse ad ogni tappa.

^b Le diverse proteine tendono a precipitare a differenti concentrazioni di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Il rapporto k_{cat} / K_m (*costante di specificità*, espressa in $M^{-1}s^{-1}$) definisce l'efficienza di un enzima e si utilizza per confrontare l'efficienza di diversi enzimi o quella dello stesso enzima rispetto a differenti substrati

$$\text{Se: } v_{\text{max}} = k_{\text{cat}}[E_t]$$

$$V_0 = \frac{V_{\text{max}} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{diventa} \quad V_0 = \frac{k_{\text{cat}}[E_t][S]}{K_m + [S]}$$

IN CONDIZIONI FISIologiche [S] E' RARAMENTE SATURANTE

Quando $[S] \ll K_m$ $[E] = [E_t]$

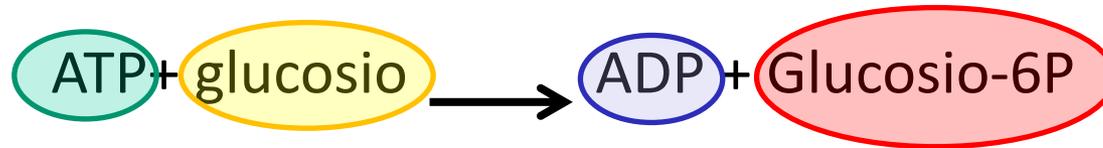
è cioè la costante di velocità della conversione di (E+S) in (E+P)

$$V_0 = \left(\frac{k_{\text{cat}}}{K_m} \right) [E][S]$$

Reazione di primo ordine (andamento lineare) se $[E] = [E_t]$ costante

In molte reazioni enzimatiche due (o più) molecole diverse di substrato si legano all'enzima e partecipano alla reazione e si formano più prodotti (reazioni di ordine superiore a 1).

Es:



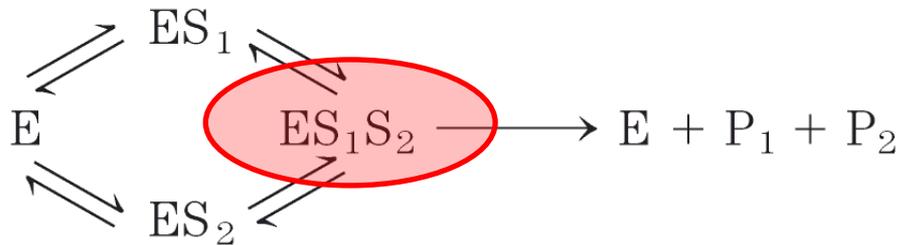
Esochinasi

- Possiamo trattare la reazione complessiva come un processo la cui velocità è determinata sostanzialmente dallo stadio lento
- Possiamo individuare una « K_m » caratteristica per ciascun substrato

Enzima	Substrato	K_m (mM)
Esochinasi	ATP	0.4
	D-Glucosio	0.05
	D-Fruttosio	1.5

(a) Reazione enzimatica con formazione di un complesso ternario

Ordine casuale



Ordinata

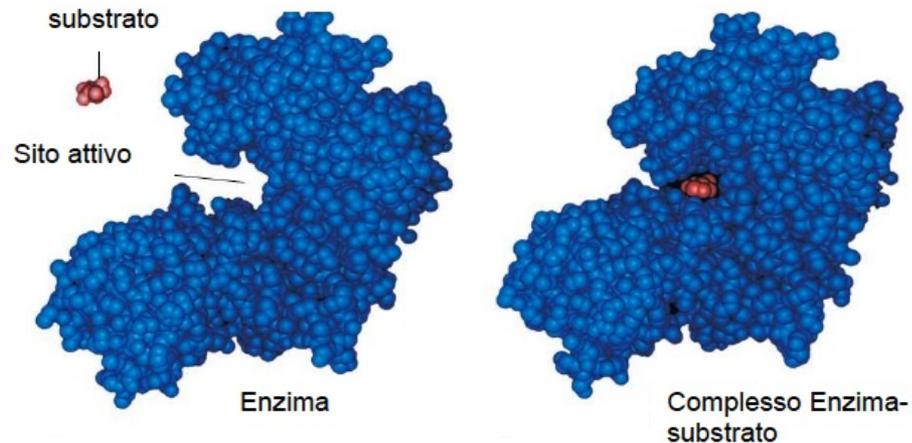
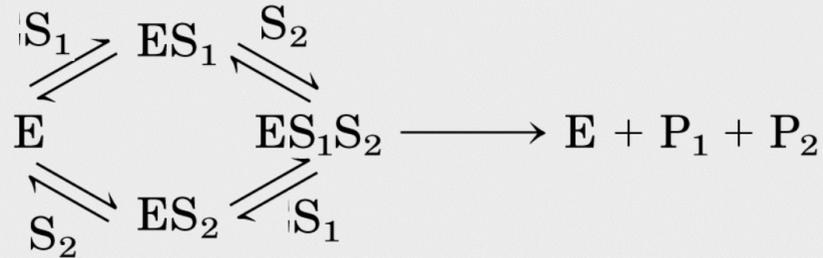


(b) Reazione enzimatica senza formazione di un complesso ternario

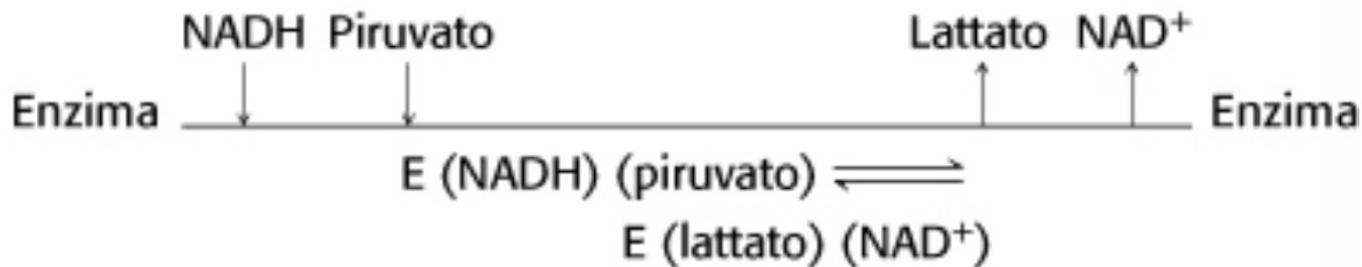
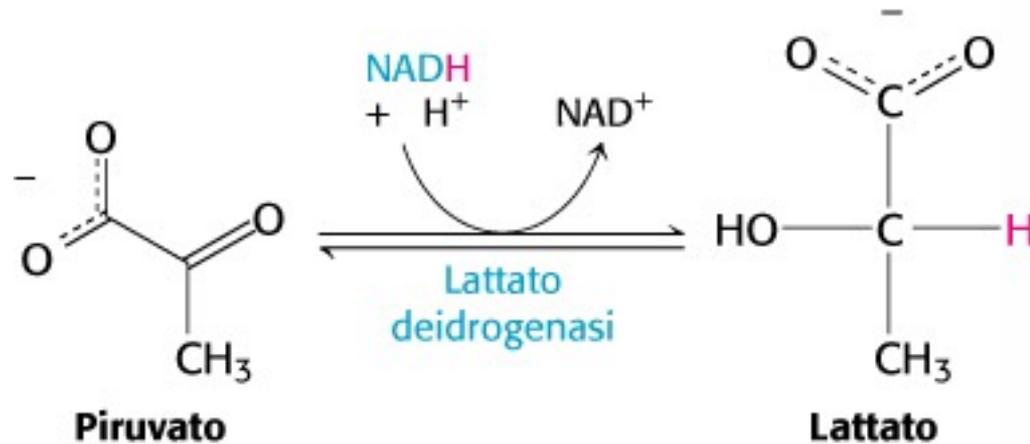


Meccanismo con formazione di un complesso ternario a sequenzialità casuale

Ordine casuale

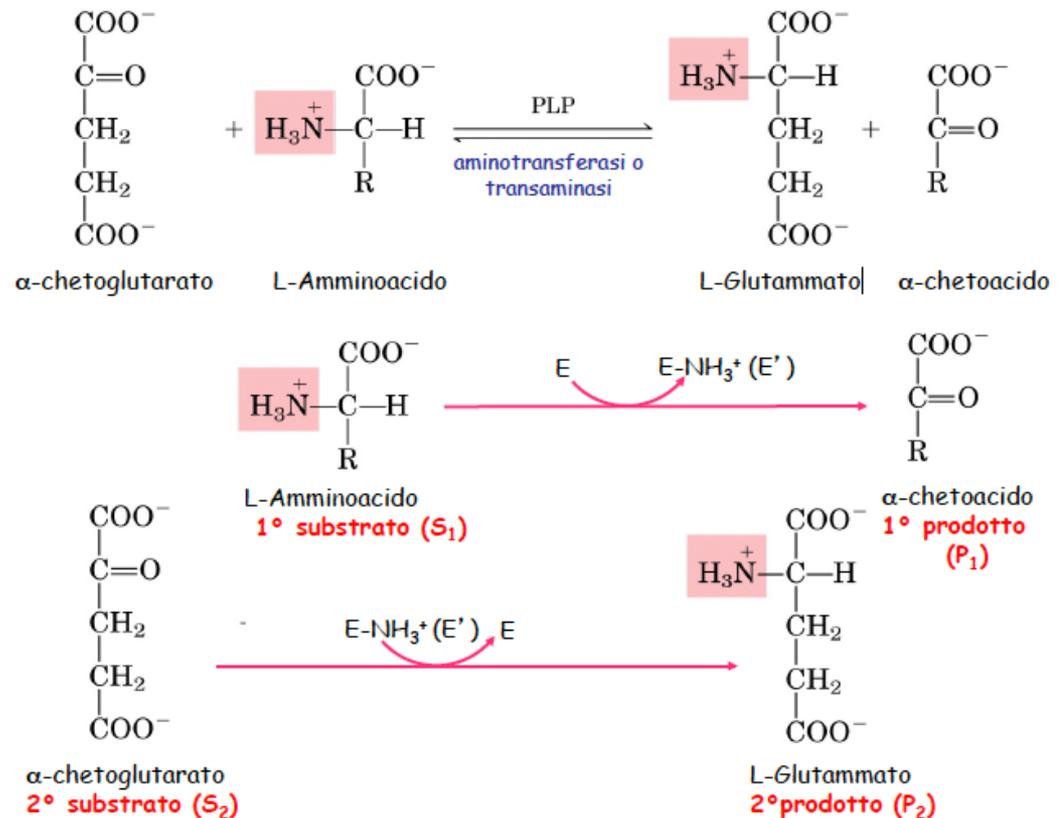
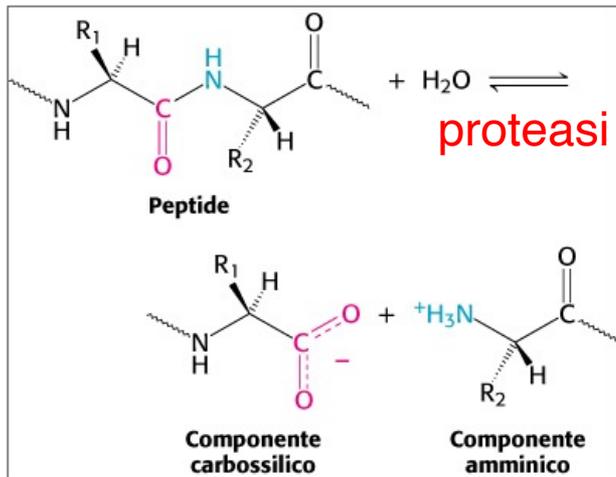


Meccanismo con formazione di un complesso ternario a sequenzialità ordinata



Meccanismo a ping-pong

(b) Enzyme reaction in which no ternary complex is formed



La cinetica/condizione dello stato stazionario ci può aiutare a distinguere queste vie alternative

L'analisi della cinetica dello stato stazionario viene effettuata variando $[S_1]$ e mantenendo costante $[S_2]$.

Viene ripetuta a diversi dosaggi di $[S_2]$.

$$\text{pendenza} = K_m / v_{\max}$$

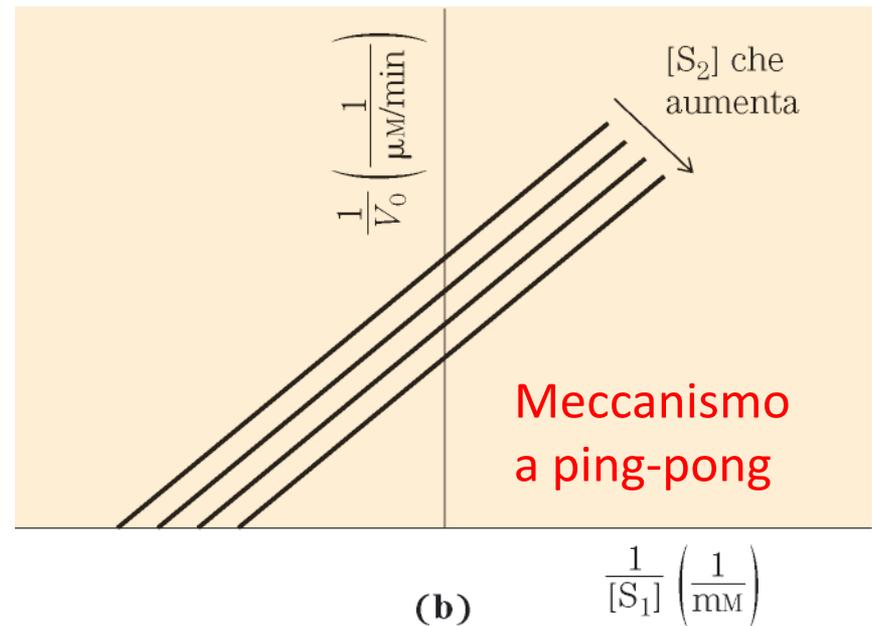
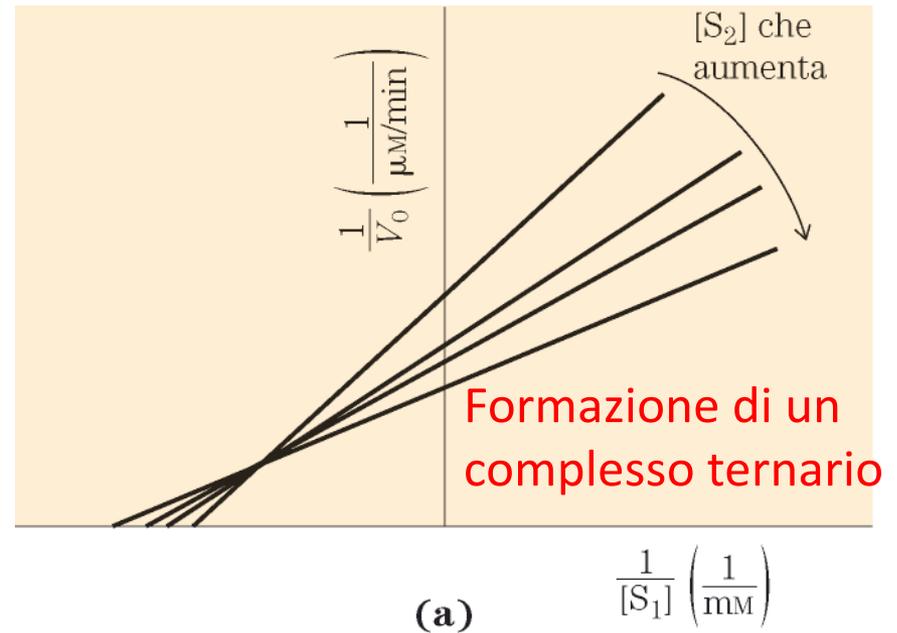


table 8-7

Turnover Numbers (k_{cat}) of Some Enzymes

Enzyme	Substrate	k_{cat} (s^{-1})
Catalase	H_2O_2	40,000,000
Carbonic anhydrase	HCO_3^-	400,000
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	140,000
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2,000
Fumarase	Fumarate	800
RecA protein (an ATPase)	ATP	0.4

I parametri cinetici K_m e k_{cat} si usano per valutare l'efficienza catalitica di un enzima.