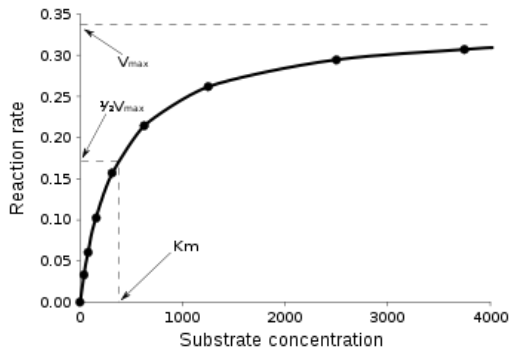


3° laboratorio Biochimica – Laurea Triennale in Scienze Biologiche

Cinetica enzimatica – Determinazione Km e Vmax Fosfatasi Alcalina

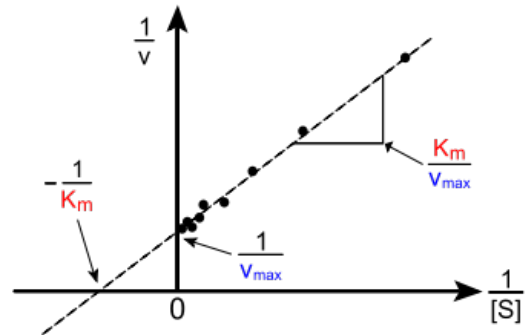
Michaelis-Menten

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

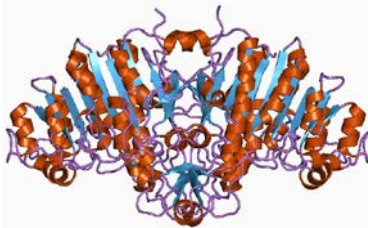


Lineweaver-Burk (doppi reciproci)

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



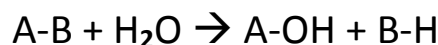
Enzima: Fosfatasi Alcalina



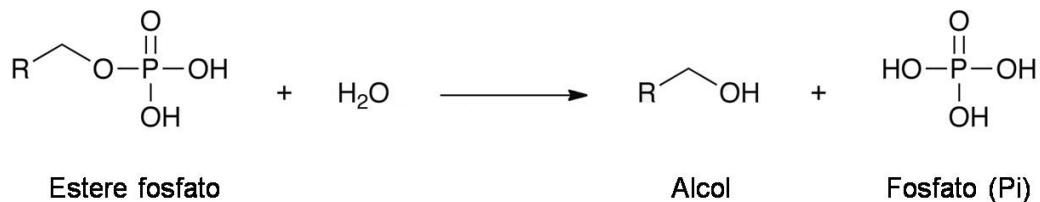
La fosfatasi alcalina è un enzima omodimerico di 160 kDa che appartiene alla classe delle idrolasi ed è responsabile della rimozione di gruppi fosfato da diversi tipi di molecole. Come indica il nome, la massima efficienza di questo enzima si ottiene a pH basici (pH 8-10).

Per la sua attività catalitica necessita della presenza di tre ioni metallici a livello di ogni sito attivo, due ioni Zn^{2+} e uno ione Mg^{2+} . Idrolizza monoesteri fosfato producendo fosfato inorganico (Pi) e un alcol (R-OH).

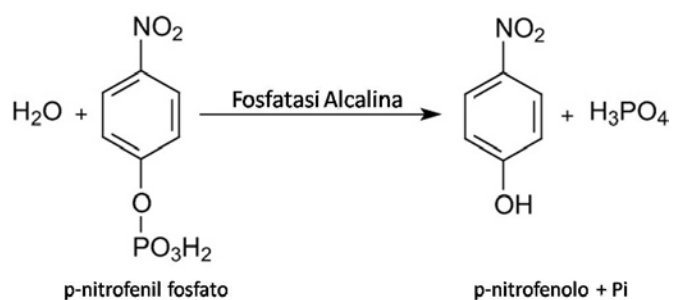
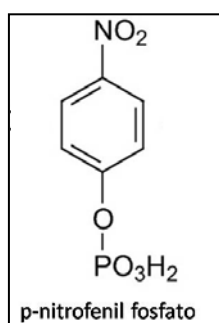
Reazione generica catalizzata da una idrolasi:



Reazione generica di idrolisi di un gruppo fosfato (defosforilazione) da parte di una fosfatasi:



Substrato: *p*-nitrofenil fosfato → Conversione del *p*-nitrofenil fosfato ad opera della Fosfatasi Alcalina:

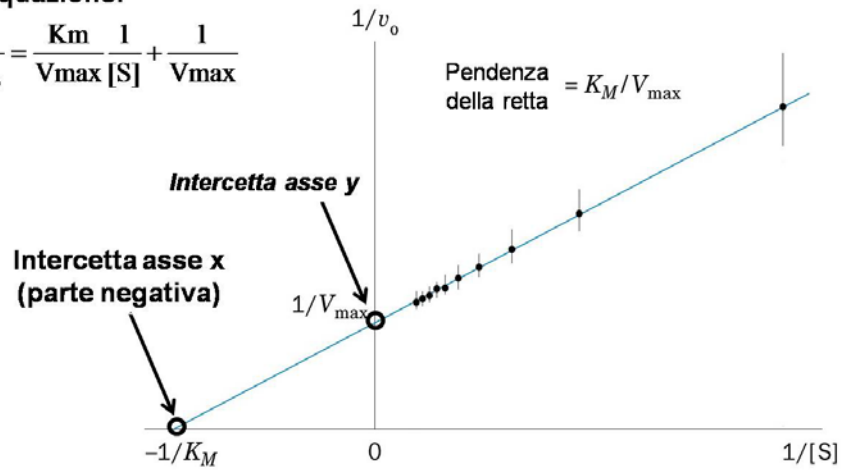


Risultati sperimentali:

Come calcolare Km e Vmax

Equazione:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$



L'**intercetta** sull'asse delle **ordinate** consente di ricavare **Vmax**

Prolungando verso l'asse delle ascisse la retta che tendenzialmente passa per i punti sperimentali si ricava **Km** (**intercetta** sulla **parte negativa** dell'asse delle **ascisse**)