

ENZYMES, GLUCIDES ET CATALYSE ENZYMATIQUE

Document 1 : les enzymes, des catalyseurs biologiques.

Longtemps, les scientifiques ont été surpris par la vitesse élevée des réactions biologiques alors qu'elles ont lieu à basse température (37°C). Les réactions biologiques réalisables à 100°C in vitro ne le sont pas à 37°C (ex : hydrolyse de l'amidon). Pasteur, dans les années 1850, a étudié les fermentations des levures et a essayé de reproduire les réactions in vitro. Sa conclusion était qu'il devait y avoir un phénomène vital qui ne pouvait pas être reproduit. De même, Spallanzani dès 1780 avait fait des expériences sur la digestion en travaillant sur une buse (rapace) ; les oiseaux n'ayant pas de dents, Spallanzani se demandait comment ils pouvaient faire pour broyer les aliments. Il récupéra du suc gastrique et put observer le phénomène de digestion. Le phénomène « vital » de Pasteur et ce qui assure la digestion comme l'observa Spallanzani chez les oiseaux n'est autre que ce que nous appelons aujourd'hui **l'enzyme**.

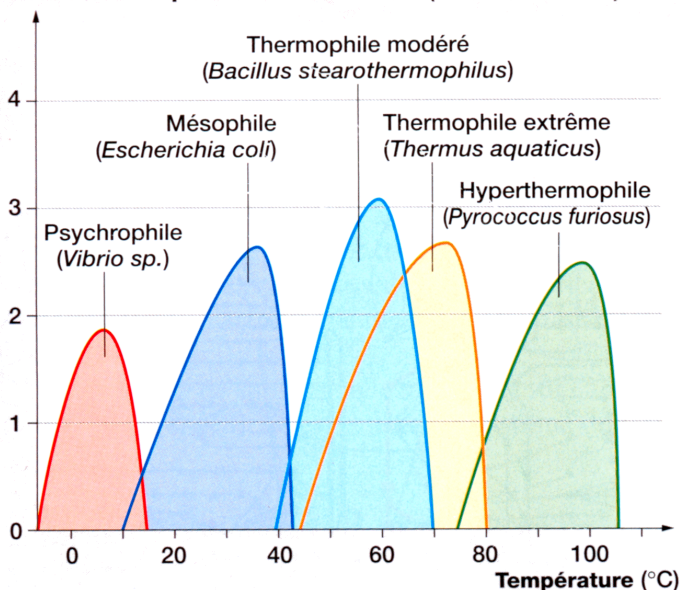
Le mot « enzyme » provient de l'allemand « Enzym », construit avec le préfixe en- (« dans », « à l'intérieur de ») et zumê (« levain »), car le levain contient des enzymes qui permettent la fermentation. Les enzymes sont des substances organiques solubles, de la famille des **protéines**, qui **catalysent** une réaction biochimique. Les enzymes interviennent dans toutes les réactions du **métabolisme** (ensemble des réactions enzymatiques qui se déroulent dans les cellules et dans le milieu intérieur d'un être vivant) et sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. Ces réactions comprennent les réactions de dégradation (**catabolisme**) et les réactions de synthèse (**anabolisme**).

La **catalyse**, emprunté au grec ancien κατάλυσις, katalysis, constitué de κατά, kata (« en-dessous ») et λύσις, lysis (« dissolution ») est la modification de la vitesse d'une réaction chimique produite par certaines substances (nommées **catalyseurs**) qui se retrouvent intactes à la fin de la réaction. Les catalyseurs ne sont pas consommés et sont restitués en fin de réaction. Ils n'apparaissent donc pas dans le bilan de la réaction, et donc pas dans son équation. Les catalyseurs ne peuvent qu'accélérer une réaction réalisable et spontanée dans la nature mais ne peuvent en aucun cas rendre possible une réaction irréalisable naturellement.

Un catalyseur augmente la vitesse de réaction en introduisant de nouveaux chemins de réaction (il crée des intermédiaires réactionnels), et en abaissant son énergie d'activation. Ce faisant il permet d'augmenter la vitesse, ou d'abaisser la température de la réaction. Le catalyseur ne modifie pas la constante d'équilibre.

Document 2 : paramètres modifiant l'efficacité des réactions enzymatiques.

Vitesse de multiplication des bactéries (unités arbitraires)



Les enzymes présentent un optimum de température. Il se situe, en moyenne, aux alentours de 40°C. Si l'on s'éloigne de cette valeur, en abaissant ou en augmentant la température, on constate rapidement une chute de l'activité enzymatique. Mais aux basses températures, l'inactivation est réversible : les enzymes sont inhibées par le froid mais non dénaturées. En revanche, à partir de 50 ou 60°C, les enzymes subissent une dénaturation thermique et sont alors détruites !

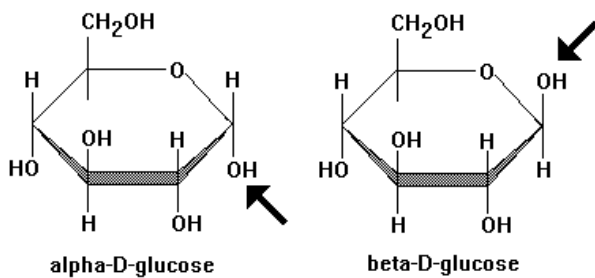
Cet optimum de température peut varier ; il y a des exceptions (voir ci-contre). De même, chaque enzyme a un pH optimal c'est-à-dire un pH pour lequel son activité est maximale. L'amylase a un fonctionnement maximal pour un pH de 7, mais certaines enzymes nécessitent un pH acide et d'autres un pH basique. Température optimale et pH optimal dépendent des enzymes et des organismes concernés.

Document 3 : quelques glucides simples et complexes (source Wikipedia entre autres).

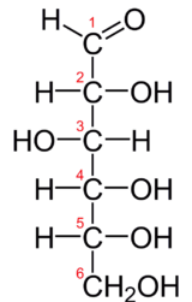
Les glucides sont habituellement répartis entre **oses** (*monosaccharides* tel que le *glucose*, le *galactose* ou le *fructose*) et **osides**, qui sont des polymères d'oses (*oligosaccharides* et *polysaccharides*). Les *disaccharides* (*diholosides*), tel que le *saccharose* ou le *lactose*, font partie de cette dernière catégorie. Mais seules les monosaccharides et les disaccharides ont un **pouvoir sucrant**. Les polysaccharides, comme l'*amiidon*, sont insipides.

- Les **oses** (sucres simples) sont des molécules simples, non hydrolysables, formant des cristaux incolores.
 - Les **aldoses** sont les glucides possédant une fonction **aldéhyde** sur le premier carbone.
 - Les **cétoses** sont les glucides possédant une fonction **cétone** sur le deuxième carbone.
- Les **osides** (sucres complexes), hydrolysables sont des polymères d'oses liés par une **liaison osidique** :
 - Les **oligoholosides** (*oligosides*) ont un indice de polymérisation inférieur à 10 ;
 - Les **polyholosides** (*polyosides*) ont un indice de polymérisation supérieur à 10 (exemple : *amylose*, *amylpectine*, *cellulose*, *glycoène*).

• Le glucose, un hexose simple :

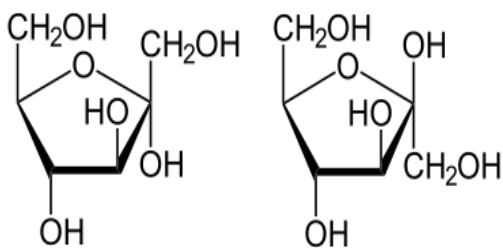


Le glucose, de formule brute $C_6H_{12}O_6$, est une des plus emblématiques molécules de la famille des oses. Il s'agit d'un aldohexose qui possède donc une fonction **aldéhyde** lorsqu'il n'est pas sous forme cyclique (forme linéaire) ce qui lui confère ses **propriétés réductrices** mises en évidence lors du test à la liqueur de Fehling. Sous sa forme cyclique, la fonction aldéhyde (R-CHO) en 1 (figure ci-contre) réagit la plupart du temps avec le groupement hydroxyle (OH) en 5 (figure ci-contre) pour



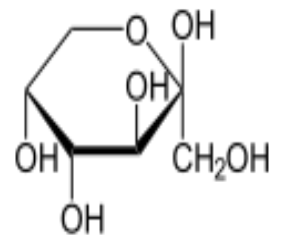
former un **hémiacétal cyclique**. Il existe différents tautomères du glucose dont les plus fréquents sont l' α -D-glucopyranose et le β -D-glucopyranose. Le « D » désigne le stéréoisomère naturel du glucose. La nomenclature D/L fait référence à la configuration absolue, c'est-à-dire à l'arrangement spatial du composé par référence au glycéraldéhyde, l'aldose le plus simple ($C_3H_6O_3$) qui existe sous une forme dextrogyre (d) et lévogyre (l) qui désignent le comportement de la molécule vis-à-vis de la lumière polarisée (lévogyre fait tourner le plan de polarisation sur la gauche et dextrogyre sur la droite). La série D des glucides provient du d-glycéraldéhyde. (Remarque : pour les acides aminés, la série L provient de la référence à la l-alanine, un des acides aminés naturels). Le terme « pyranose » signifie que la cyclisation du glucose se fait sous forme hexagonale là où certaines molécules (dont parfois le glucose également) forment des furanes (cycles en forme de pentagone). Le glucose présente comme isomères le mannose ou encore le fructose.

• Le fructose



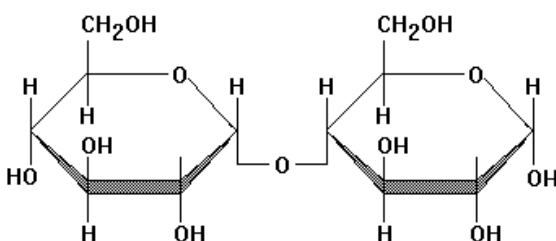
α -D-fructofuranose β -D-fructofuranose

Le fructose, de même formule brute que le glucose est un isomère de ce dernier. Il s'agit d'un **cétose** (le groupement carbonyle C=O est sur le carbone 2) et non d'un aldose (où le groupement carbonyle est sur le carbone 1) ce qui le prive de fonction réductrice : le fructose ne réagit pas directement à la liqueur de Fehling mais peut s'isomériser en glucose qui, lui, réagit. Le fructose adopte souvent une configuration en pyranose. La nomenclature D/L des cétoses dérive de l'érythrulose (cétotétrade de référence).



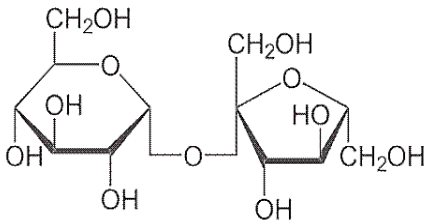
β -D-fructopyranose

• Le maltose



Le maltose est un diholoside dont la formule brute est $C_{12}H_{22}O_{11}$. Il est formé de deux molécules de glucose. C'est un sucre réducteur car l'une des deux molécules de glucose conserve son carbone hémiacétalique issu de la fonction aldéhyde de la forme linéaire du glucose. L'hydrolyse partielle de l'amiidon par l'amylase produit du maltose.

• **Le saccharose**

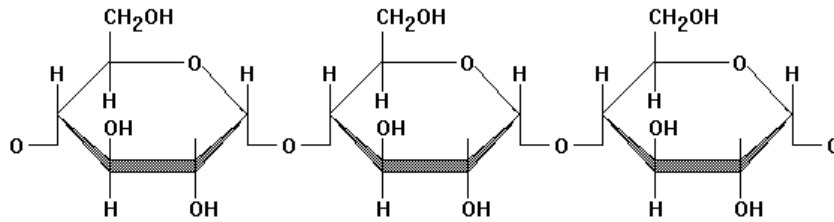


Le saccharose est un diholoside formé d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose reliées par une liaison osidique α (1 \leftrightarrow 2) β . Sa formule chimique non-développée est $C_{12}H_{22}O_{11}$ (α -D-glucopyranosyl-1,2- β -D-fructofuranoside). Il constitue le sucre commun (sucre de table, ou sucre blanc) dont le pouvoir sucrant est par convention de 1 (100 %). Le saccharose ne présente pas de comportement réducteur et ne réagit pas en présence de liqueur de Fehling : le carbone hémicétalique du glucose est impliqué dans la liaison osidique.

• **L'amidon, un polysaccharide :**

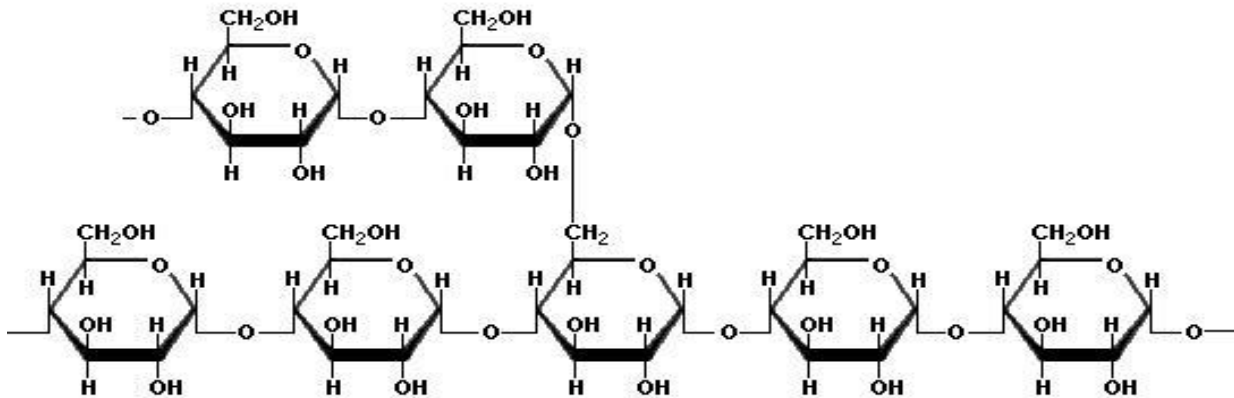
Les polysaccharides (parfois appelés glycanes, polyosides, polyholosides ou glucides complexes) sont des polymères constitués de plusieurs oses liés entre eux par des liaisons O-osidiques. L'amidon est en fait constitué de deux types de molécules : l'amylose et l'amylopectine. En présence d'iode (eau iodée ou lugol), l'amidon se colore en bleu-violet.

➤ **L'amylose (figure ci-dessous)**



Elle représente 15 à 30% de la masse de l'amidon. C'est un polymère linéaire de résidus glucose liés par une liaison α -(1,4)-D-glucosidique. Cette longue chaîne prend la forme d'une hélice (6 résidus de glucose par tour d'hélice), stabilisée par des liaisons hydrogène entre les groupements hydroxyle et les molécules d'eau. Le maltose (diholoside) est libéré par hydrolyse de l'amylose.

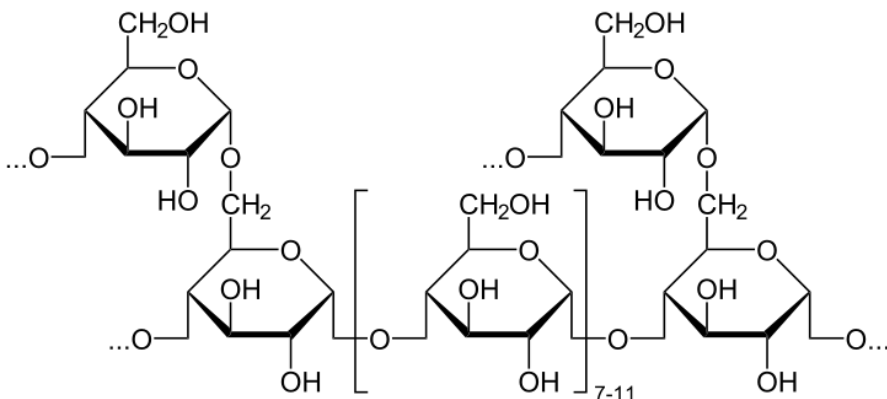
➤ **L'amylopectine (figure ci-dessous)**



Elle représente 70 à 85% de la masse de l'amidon. Elle diffère de l'amylose du fait qu'il s'agit d'un polymère ramifié : il existe des liaisons α -(1,4)-D-glucosidiques et des liaisons α -(1,6)-D-glucosidiques.

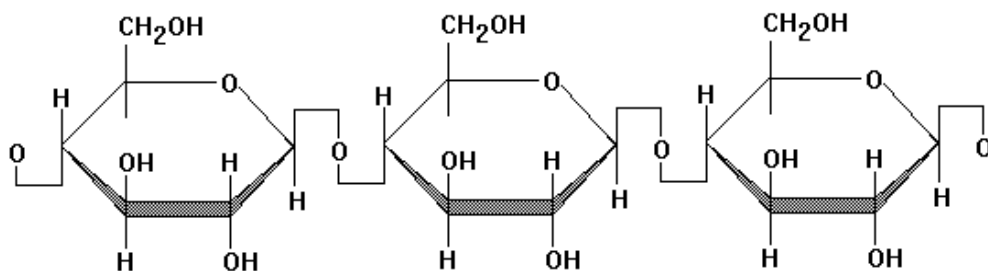
Remarque : il existe un polymère de fructose, l'inuline que l'on trouve dans la chicorée, les artichauts, les pissenlits, les topinambours...

• **Le glycogène**



Le glycogène est un glucide complexe polymère du glucose. Il consiste en une chaîne de glucose lié en α (1-4) et est branché en α (1-6) tous les 8 à 12 résidus. Il est utilisé par les animaux pour stocker de l'énergie et permet de libérer rapidement du glucose (principalement dans le foie et dans les cellules musculaires) au même titre que l'amidon chez les végétaux. En présence d'iode (eau iodée ou lugol), le glycogène se colore en brun acajou.

• **La cellulose**



La cellulose est un glucide constitué d'une chaîne linéaire de molécules de D-Glucose (entre 15 et 15 000) et principal constituant des végétaux et en particulier de la paroi de leurs cellules.

Les monomères de glucose sont liés par des liaisons β (1-4), conduisant à des polymères linéaires.

Les macromolécules de cellulose associées forment des microfibrilles, qui elles-mêmes associées en couches, forment les parois des fibres végétales. Il s'établit des liaisons hydrogène entre les molécules de glucose des différentes chaînes. C'est le principal constituant du bois. La cellulose constitue la matière organique la plus abondante sur la Terre (plus de 50 % de la biomasse). La quantité synthétisée par les végétaux est estimée à 50-100 milliards de tonnes par an.

La cellulose ne réagit pas avec le lugol (eau iodée) sauf en présence d'acide sulfurique pendant un court instant avant d'être dénaturée par l'acide. En revanche on peut mettre en évidence la cellulose par le rouge congo.

Document 4 : quelques tests chimiques d'identification des molécules.

On cherche ...	Test	Mise en œuvre et résultats
AMIDON	<u>Lugol ou eau iodée :</u>	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Placez quelques gouttes en contact avec la substance à testé (solide ou liquide). ➢ Coloration bleu foncé : amidon. ➢ Coloration brune : glycogène. ➢ Pas de coloration (jaune) : négatif.
GLYCOGENE	L'eau iodée met en évidence la présence de polysaccharide	
SUCRES REDUCTEURS (GLUCOSE, FRUCTOSE, ...)	<u>Liqueur de Fehling</u>	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Mettre la substance à tester en solution dans un tube à essai avec de l'eau distillée. ➢ Ajouter quelques gouttes de liqueur de Fehling (couleur bleue). ➢ Faire chauffer au bec bunsen ou mieux mettre au bain-marie à 100°C quelques minutes. ➢ La formation d'un précipité rouge brique indique la présence de sucres réducteurs.
CELLULOSE	<u>Test lugol + acide sulfurique</u>	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Placer l'échantillon 10 min dans du Lugol dilué (1/10). ➢ Monter entre lame et lamelle dans une goutte d'acide sulfurique. ➢ La cellulose imprégnée de Lugol gonfle et se colore en bleu vif en présence de l'acide sulfurique. ➢ La coloration est belle seulement quelques instants avant que la cellulose ne se désorganise.
PROTEINES	<u>Réaction du biuret</u>	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Dans un tube à essai, ajouter à 3 à 4 mL de la solution à tester 1 mL de soude. ➢ Ajouter goutte à goutte du sulfate de cuivre. ➢ Il apparaît une coloration allant du rouge (molécule longue) au bleu (molécule courte) en présence de protéines.
LIPIDES	<u>Coloration au rouge soudan III</u>	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Mettre la substance à tester en solution dans un tube à essai avec de l'eau distillée ou dans un verre de montre. ➢ Ajouter quelques gouttes de rouge Soudan III. ➢ Monter éventuellement entre lame et lamelle pour une observation au microscope.
	<u>Test du papier</u>	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Frotter la substance à tester sur un morceau de papier puis laisser sécher. ➢ La présence de lipides est indiquée par une auréole transparente.

Document 5 : comparaison de l'action d'un catalyseur minéral et d'une enzyme.

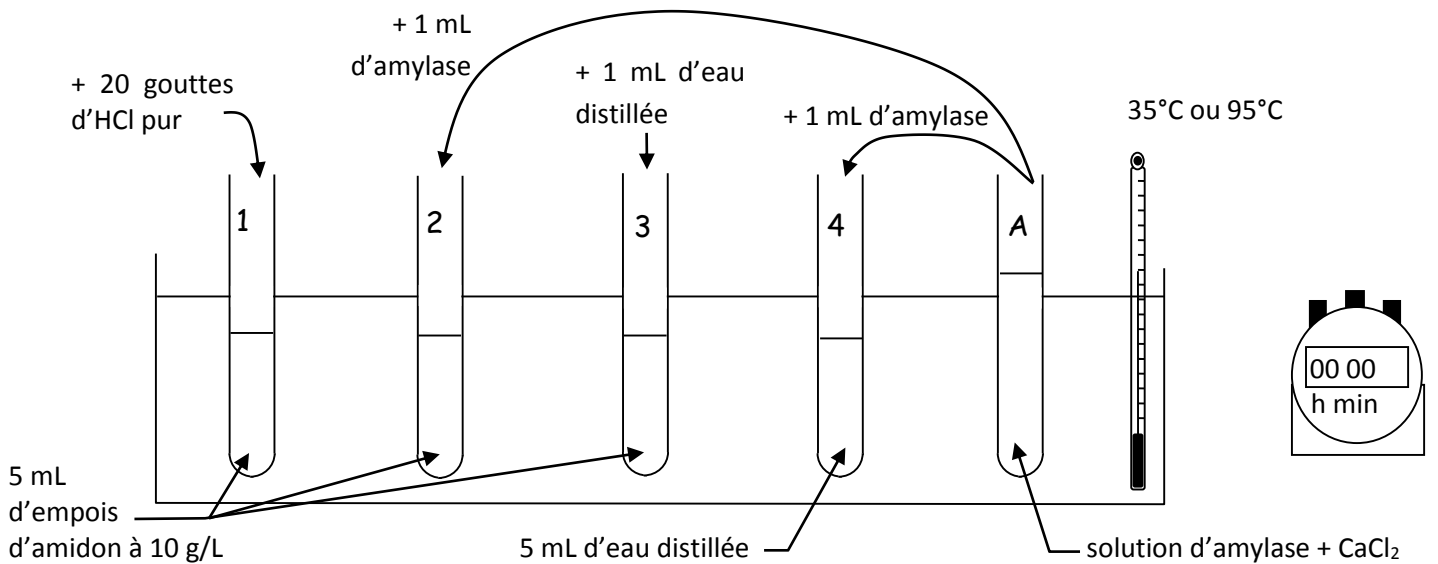
L'hydrolyse de l'amidon (C₆H₁₀O₅)_n peut être obtenue in vitro soit avec un catalyseur minéral (HCl), soit avec une enzyme, l'amylase. Cette hydrolyse libère un sucre réducteur : le glucose (C₆H₁₂O₆) avec HCl et le maltose (C₁₂H₂₂O₁₁) avec l'amylase. L'α amylase présente chez les végétaux est également une enzyme digestive contenue dans la salive et, le suc pancréatique. C'est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de la liaison glycosidique α 1-4 à l'intérieur (endoglucosidase) des chaînes polysaccharidiques mais elle n'a pas d'action sur les liaisons α 1-6. La β amylase présente dans les graines, les tubercules catalyse aussi l'hydrolyse de la même liaison mais en bout de chaîne (exoglucosidase). L'action de ces α glucosidases ne permet pas l'hydrolyse complète des chaînes polyglucosidiques car les liaisons α 1-6 résistent mais elle conduit à la libération d'oligosaccharides et de maltose.

• **Hydrolyse de l'amidon ; protocole expérimental :**

Dans un bain-marie à 35°C ou à 95°C selon les groupes, placez :

- 3 tubes numérotés (n°1, 2, 3) contenant 5 mL d'empois d'amidon à 10 g/L ;
- 1 tube (n°4) contenant 5 mL d'eau distillée ;
- 1 tube (n°A) contenant une solution d'amylase + 1 mL de chlorure de calcium (CaCl₂) à 1 g/L.

Attendre quelques minutes (équilibre des températures). Versez 20 gouttes d'HCl pur dans le tube n°1, 1 mL d'eau distillée dans le tube n°3, 1 mL d'amylase dans les tubes n°2 et n°4. Mélangez et déclenchez le chronomètre. Faites immédiatement un test à l'eau iodée pour les tubes 1 à 4.



Toutes les 3 minutes, faites un prélèvement et un test à l'eau iodée dans un puits de coloration pour chacun des tubes de 1 à 4. Quand l'hydrolyse est terminée, répartissez le contenu de chaque tube hydrolysé (ceux pour lesquels la dégradation de l'amidon a eu lieu) en deux fractions :

- sur la première, effectuez un test à la liqueur de Fehling.
- sur la deuxième, vérifiez si le catalyseur est toujours intact en fin de réaction en ajoutant à nouveau un peu d'empois d'amidon et en effectuant un test à l'eau iodée au bout de 10 minutes après passage au bain-marie.

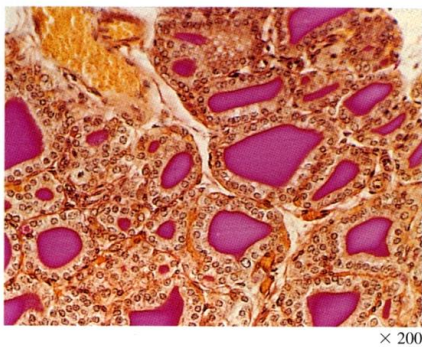
• **Action de l'amidon synthétase sur le glucose.**

Réalisez un filtrat à partir de pommes de terre broyées. Le broyage lèse les cellules et libère leur contenu. Vérifiez avec de l'eau iodée qu'il n'y a pas d'amidon dans le filtrat. Préparez 3 tubes :

- Tube n°1 : 4 mL de filtrat + 4 mL d'eau distillée
- Tube n°2 : 4 mL de filtrat + 4 mL de glucose-1-phosphate à 10 g/L
- Tube n°3 : 4 mL de glucose-1-phosphate à 10 g/L + 4 mL d'eau distillée

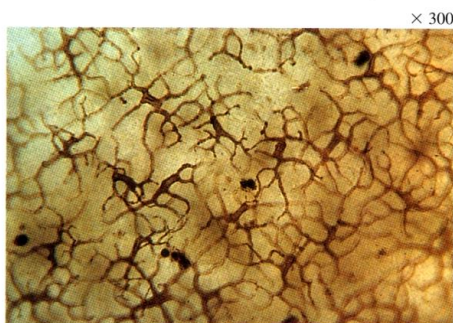
Ces tubes sont mis au bain-marie à 35°C (uniquement dans ceux pré-réglés à 35°C). Prélevez un peu de chaque tube toutes les minutes et effectuez un test à l'eau iodée.

Document 6 : la double spécificité enzymatique.

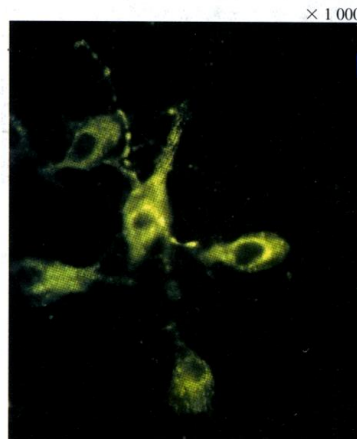


La tyrosine est un acide aminé utilisé par de nombreuses cellules dont les trois présentées ici. Cette molécule intervient dans des réactions chimiques différentes selon le type cellulaire. Ces réactions sont précisées de manière simplifiée pour chaque type cellulaire. Les enzymes requises sont appelées arbitrairement E₁, E₂, E₃...

Dans une cellule de la thyroïde : synthèse d'une hormone*
tyrosine + globuline E₁, thyroglobuline



Dans un mélanocyte : synthèse du pigment de la peau
tyrosine E₂, dopa E₃, dopaquinone E₄, mélanine

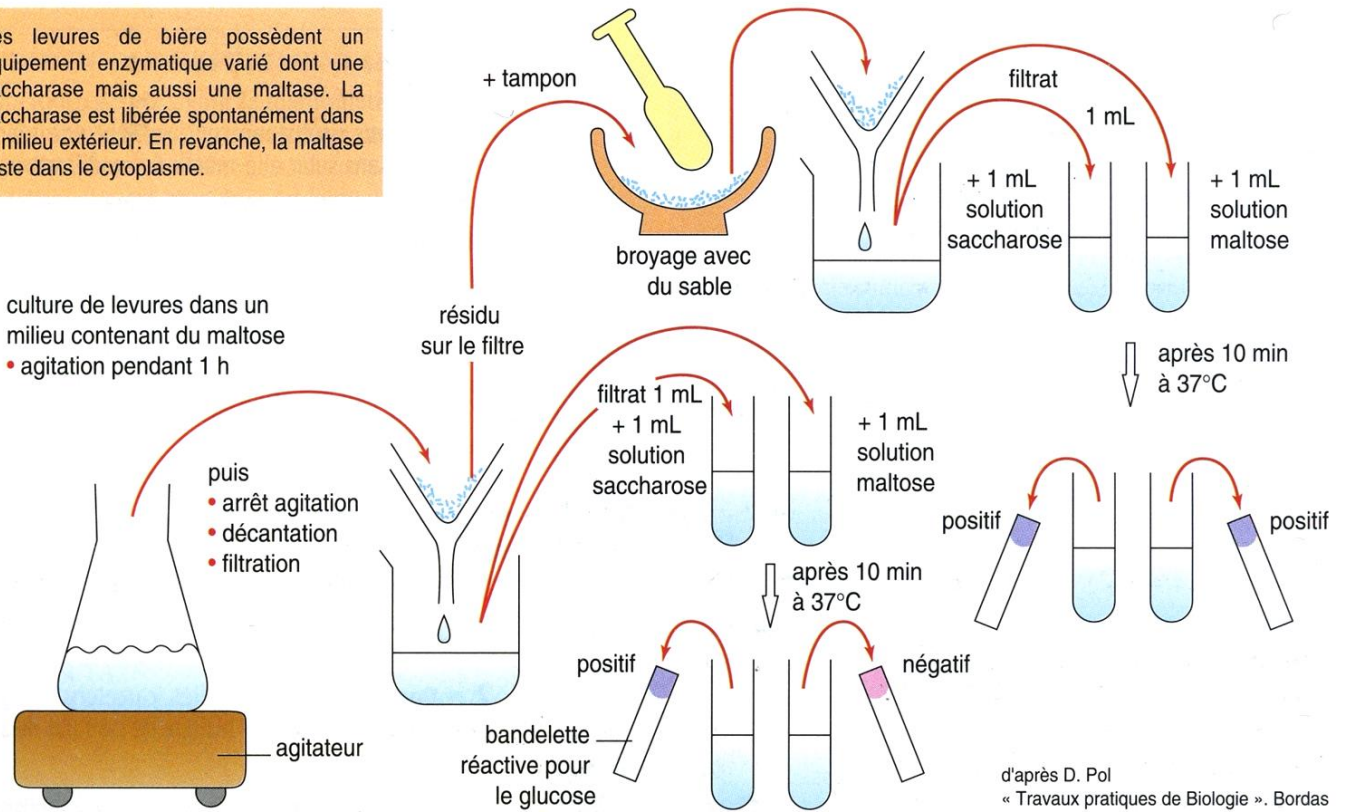


Dans une cellule nerveuse : synthèse d'un neurotransmetteur
tyrosine E₂, dopa E₃, dopamine E₄, noradrénaline

Exemples d'enzymes	Substrat	Réaction chimique
Glucose oxydase	Glucose	Oxydation
Amidon synthétase	Glucose	Synthèse
Glycogène synthétase	Glucose	Synthèse
Maltase	Maltose	Hydrolyse
Amylase salivaire	Amidon	Hydrolyse
Pepsine	Protéines	Hydrolyse
Trypsine	Protéines	Hydrolyse
Chymotrypsine	Protéines	Hydrolyse
PAH	Phénylalanine	Hydroxylation
Enzyme A (groupes sanguins)	Substance H	Synthèse

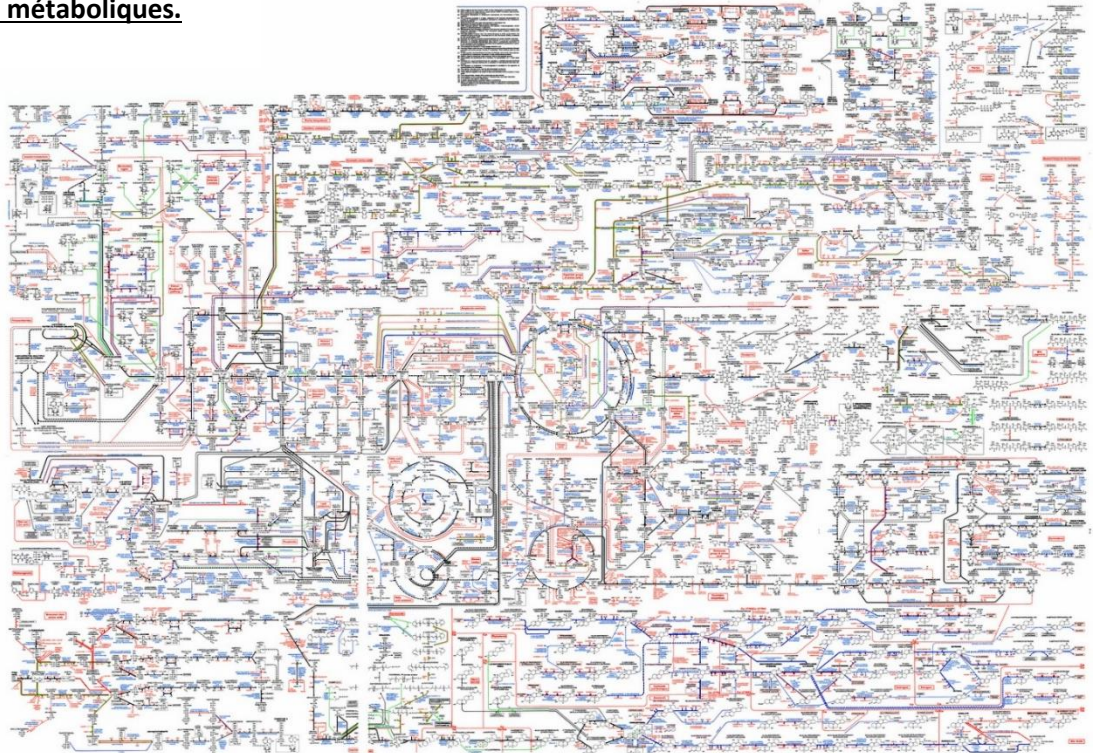
Ci-dessus figurent quelques substrats de quelques réactions enzymatiques.

Les levures de bière possèdent un équipement enzymatique varié dont une saccharase mais aussi une maltase. La saccharase est libérée spontanément dans le milieu extérieur. En revanche, la maltase reste dans le cytoplasme.

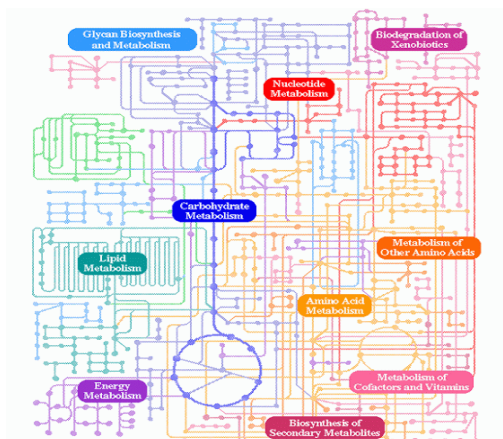


Document 7 : principales voies métaboliques.

Voici l'ensemble des réactions chimiques du métabolisme d'une cellule. Inutile d'essayer d'y distinguer quelque chose, la résolution de l'image ne suffit pas à cette échelle.

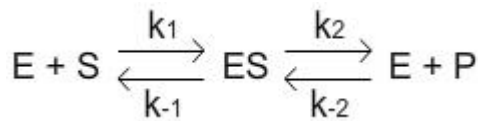


Ci-dessous en revanche, voici la simplification que l'on peut en faire : chaque point correspond à une réaction particulière faisant intervenir un substrat précis avec une enzyme précise.



Document 8 : cinétique enzymatique.

Il existe plusieurs mécanismes enzymatiques différents selon l'enzyme considérée. Les enzymes dites michaeliennes fonctionnent selon le mode suivant : un **substrat S** se lie avec une **enzyme E** pour donner un **intermédiaire ES**, puis cet intermédiaire se dissocie pour donner un **produit P** avec régénération de l'enzyme E. Bien entendu, il existe bien d'autres mécanismes enzymatiques. Citons en particulier les enzymes allostériques qui possèdent nécessairement plus d'un site actif par molécule (au moins 2) et pour lesquelles les caractéristiques cinétiques d'un site actif va varier en fonction de l'état des autres sites de la même molécule (liés ou non liés à un substrat). Chaque mécanisme se traduit par des caractéristiques cinétiques spécifiques (évolution de la vitesse de catalyse au cours du temps). Pour faire une étude cinétique, il faut mesurer la **vitesse initiale ou instantanée (V_i)** de la réaction à différents moments en ayant choisi avec soin les conditions initiales. À partir des mesures on peut tracer des courbes représentant la cinétique de la réaction, ce qui permet de déterminer certaines valeurs caractéristiques. L'équation de Michaelis-Menten est une expression mathématique décrivant les paramètres cinétiques d'une réaction chimique catalysée par une enzyme michaelienne.



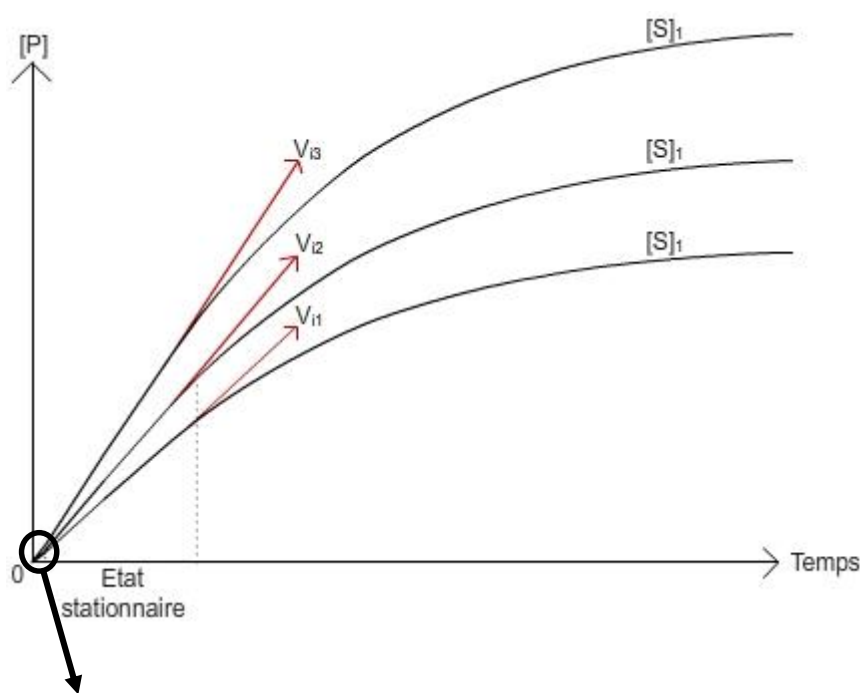
k_1 = constante d'association de E + S

k_{-1} = constante de dissociation du complexe ES

k_2 = constante de réaction de ES en E + P

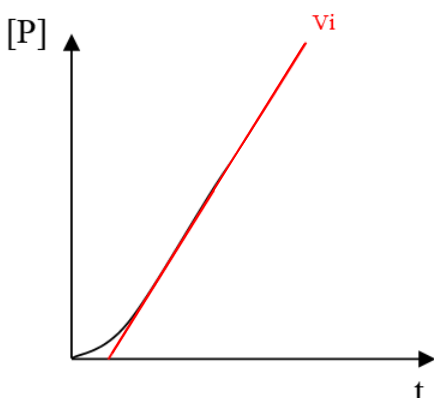
k_{-2} = constante d'association de E + P

La vitesse de réaction (caractérisée par la vitesse d'apparition du produit, soit $v = \frac{d[P]}{dt}$) va évoluer avec le temps (voir graphique 1).



Graphique 1 : Graphique primaire représentant la concentration en produit apparu au cours d'une réaction chimique catalysée par une enzyme michaelienne en fonction du temps.

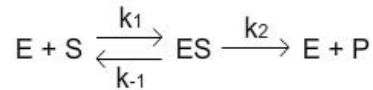
La vitesse de la réaction à un instant t correspond à la dérivée de la courbe à cet instant t. Graphiquement cela revient à mesurer la pente de la tangente à la courbe à cet instant t.



On constate que juste après le temps 0, la pente de la courbe augmente très rapidement, ce qui revient à dire que la vitesse de la réaction augmente rapidement. Cette phase correspond à la mise en place de l'équilibre entre la formation et la disparition du complexe enzyme-substrat. Rapidement, la courbe devient linéaire, ce qui signifie que la vitesse de la réaction devient constante. On parle d'état stationnaire. La vitesse de réaction déterminée sur cette période correspond donc à la V_i (vitesse initiale). Puis, on constate un infléchissement de la courbe, ce qui correspond à une diminution progressive de la vitesse de la réaction. Au cours du temps, la quantité de substrat S va diminuer et la quantité de produit P va augmenter, les deux entraînant une diminution progressive de la vitesse de catalyse jusqu'à atteindre une vitesse nulle. En effet, soit la réaction est totale et une fois le substrat épuisé il n'y a plus de réaction possible

(donc $V = 0$), soit un équilibre va s'instaurer entre la formation de produit ($ES \rightarrow E + P$) et sa destruction ($E + P \rightarrow ES$) ce qui, là encore, se traduit par une vitesse de réaction nulle. Pour simplifier, si on reste dans les conditions de Michaelis, au début

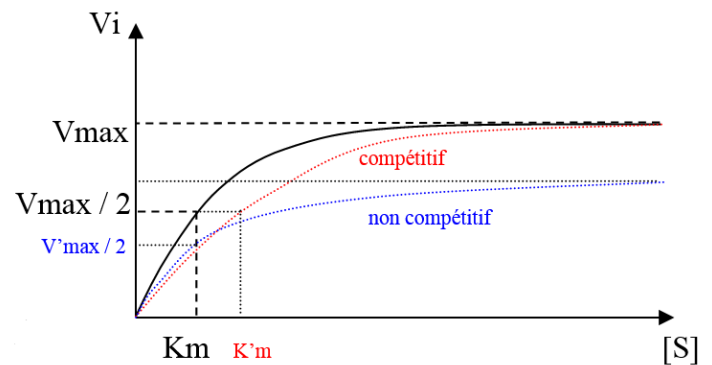
de la réaction la quantité de produit formé étant négligeable, la réaction $E + P \rightarrow ES$ ne se fait pas, on admet alors que la réaction peut s'écrire sous la forme :



On pose $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$

K_m est un produit de constantes, c'est donc également une constante, et sa dimension est celle d'une concentration. K_m est appelée « **constante de Michaelis** ». K_m représente l'**affinité** d'une enzyme pour son substrat (la facilité avec laquelle elle se fixe à lui). Plus K_m est faible, plus l'enzyme a d'affinité pour son substrat et inversement.

Certaines substances chimiques peuvent jouer le rôle d'inhibiteurs de la réaction enzymatique. Il existe les **inhibiteurs compétitifs** qui se fixent à la place du substrat au niveau du site actif de l'enzyme (que l'on assimilera au site catalytique pour simplifier) et les **inhibiteurs non compétitifs** qui modifient la forme du site actif. Dans le cas d'inhibiteurs compétitifs, l'étude cinétique montre une modification de K_m mais pas de V_{max} tandis que pour des inhibiteurs non compétitifs, il y a une modification de V_{max} mais pas de K_m .



En utilisant K_m comme seule constante impliquée dans la réaction, on en déduit après de nombreuses simplifications que

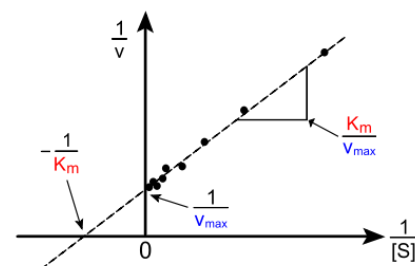
$$V_i = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

Cette équation est appelée équation de Michaelis-Menten. À partir de cette équation, on peut déterminer la V_i pour toutes les conditions initiales connues puisque V_{max} et K_m sont des constantes qui peuvent être déterminées expérimentalement et $[S]$ correspond à une valeur connue puisqu'il s'agit de la concentration en substrat introduite par l'expérimentateur. Pour déterminer les constantes K_m et V_{max} , il faut faire une étude cinétique qui consiste à tracer le graphique représentant les V_i en fonction de la concentration en substrat utilisé. D'après l'équation de Michaélis, on peut déduire que V_i se rapproche asymptotiquement de V_{max} lorsque $[S]$ augmente.

$\frac{[S]}{[S] + K_m}$ est une fonction hyperbolique et $V_i = \frac{1}{2} V_{max}$ lorsque $[S] = K_m$.

On détermine donc graphiquement V_{max} , et connaissant V_{max} on détermine graphiquement K_m comme étant égal à la valeur de $[S]$ pour laquelle $V_i = \frac{1}{2} V_{max}$. La difficulté vient du fait que la détermination graphique d'une asymptote est une chose imprécise, entachant d'erreur la détermination de la V_{max} et du K_m .

Représentation de Lineweaver-Burk



Dans cette approche, on détermine les constantes de l'enzyme K_M et v_{max} par la représentation des inverses (représentation de Lineweaver et Burk) qui est une droite d'équation :

$$\frac{1}{v_i} = \left(\frac{K_M}{v_{max}} \times \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{v_{max}}$$

Pour un graphique de $\frac{1}{v_i}$ en fonction de $\frac{1}{[S]}$, la pente est $\frac{K_M}{v_{max}}$ l'ordonnée à l'origine est $\frac{1}{v_{max}}$, d'où

$$v_{max} = \frac{1}{\text{ordonnee}} \quad \text{et} \quad K_M = \frac{\text{pente}}{\text{ordonnee}}$$