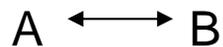
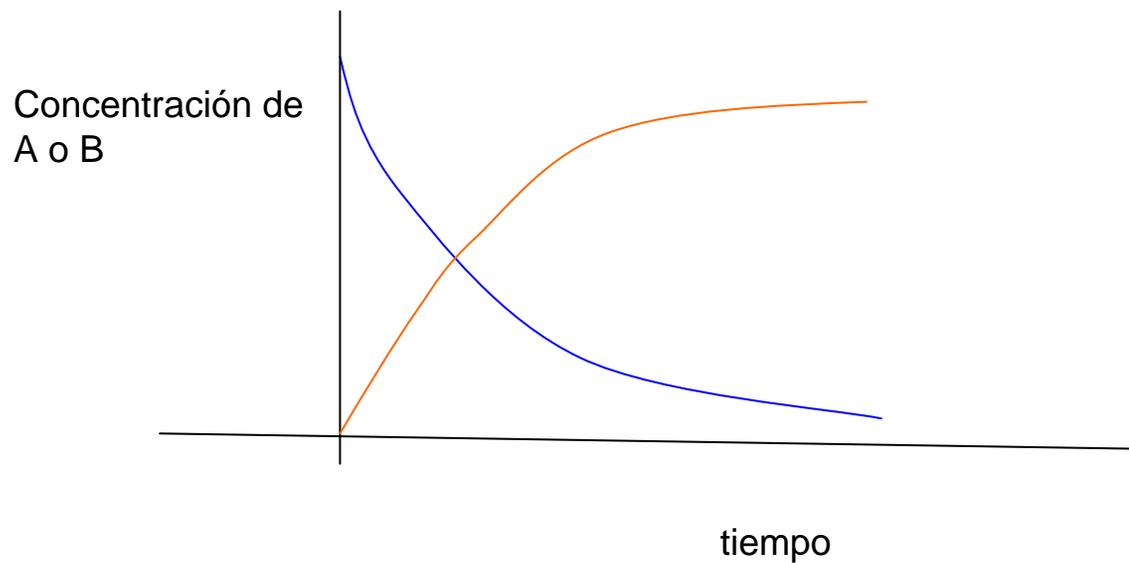


Cinética enzimática



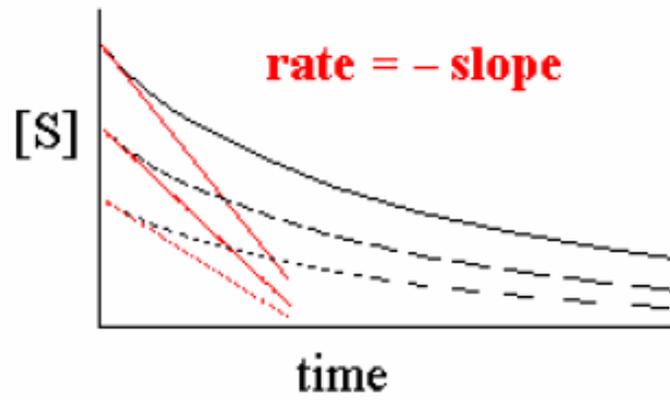
Ej. Cinética de primer orden



Reactivo $-dA/dt = v = k [A]$ $A = A_0 e^{-kt}$

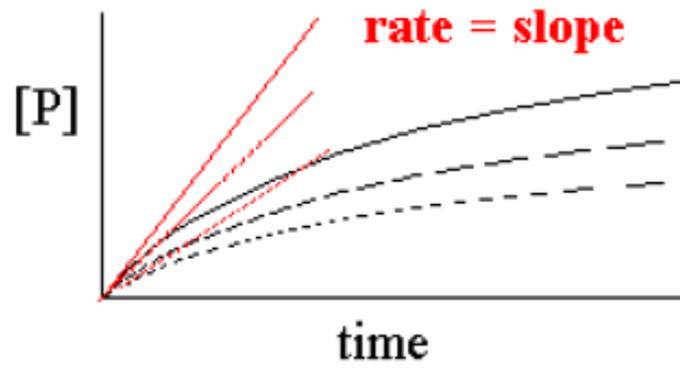
Producto $dB/dt = v = k [A_0] - [B]$ $B = A_0 + e^{kt}$

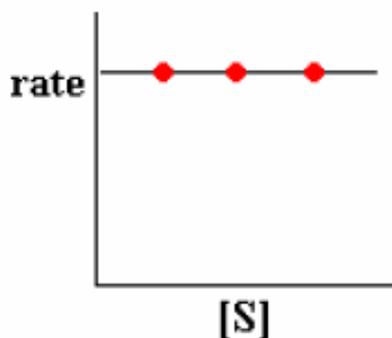
Concentración en función del tiempo



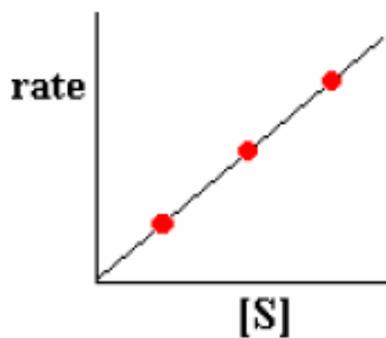
e

t

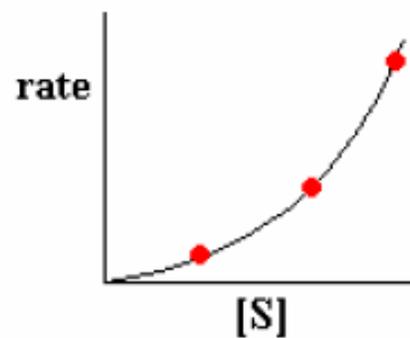




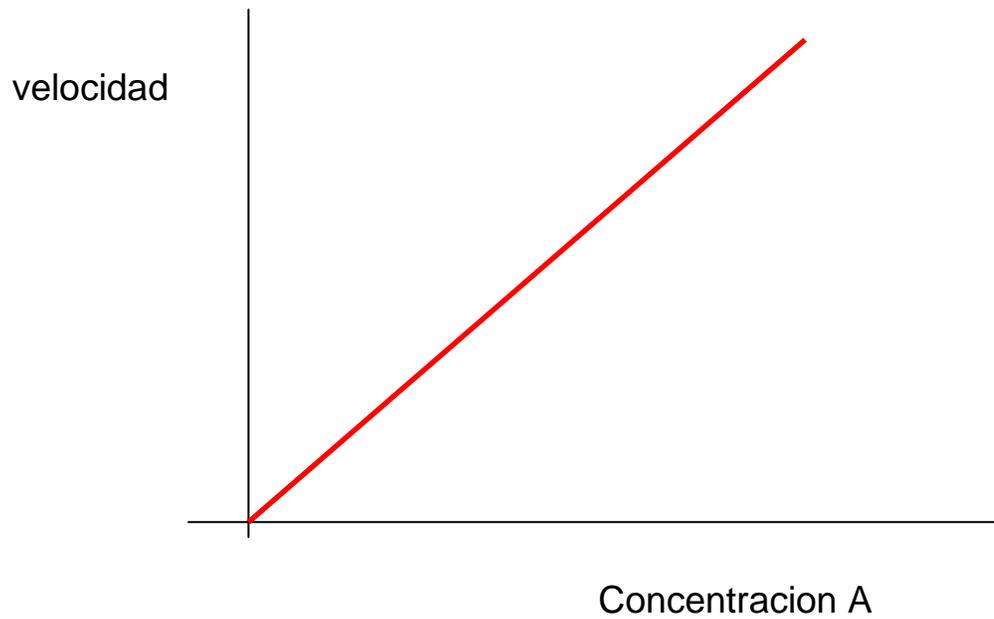
zero order
rate = $k[S]^0$



first order
rate = $k[S]^1$



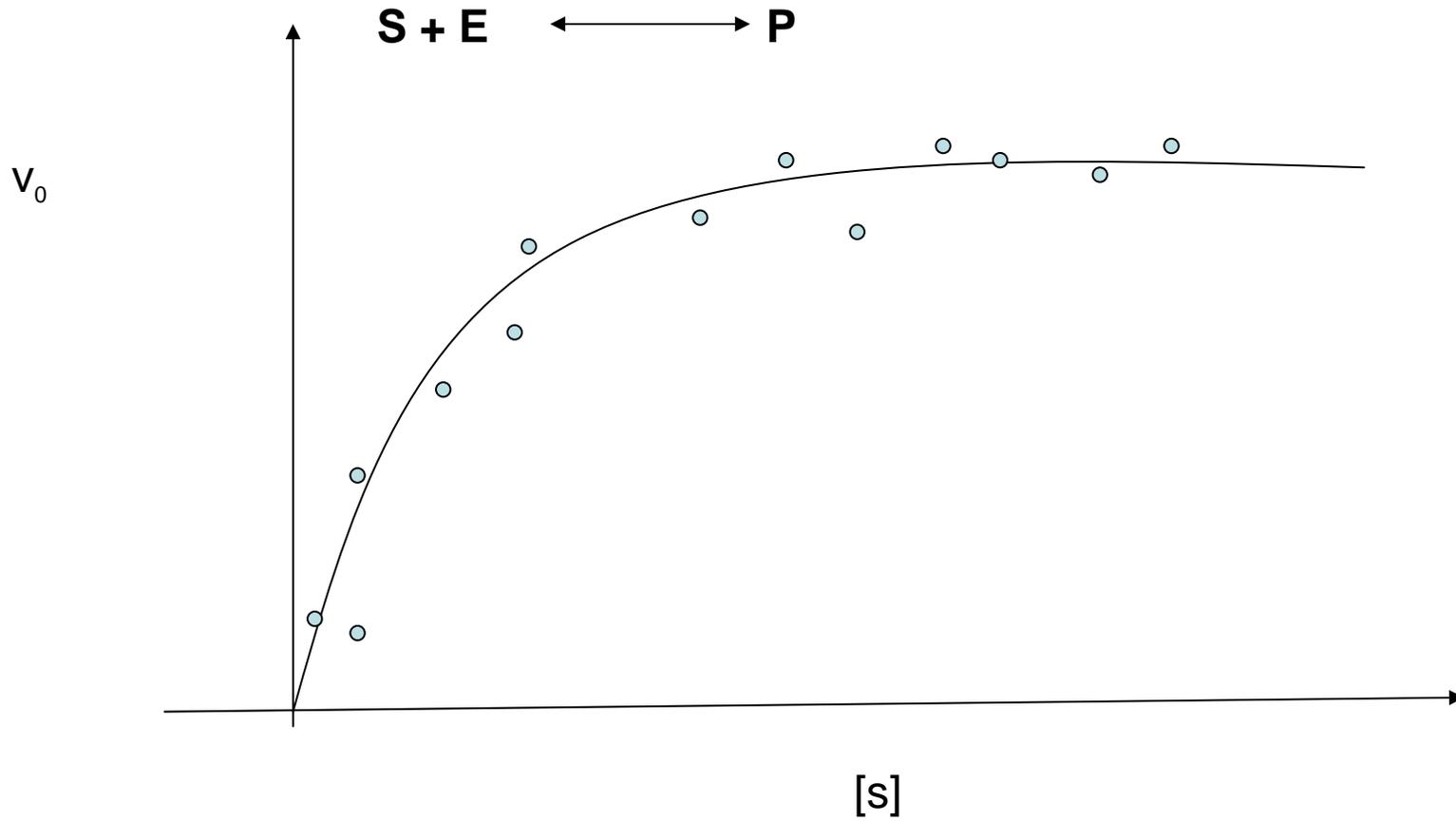
second order
rate = $k[S]^2$



$$v = k [A]$$

Velocidad en función de concentración de Reactivo

Velocidad vs [S] para una reacción catalizada por una enzima

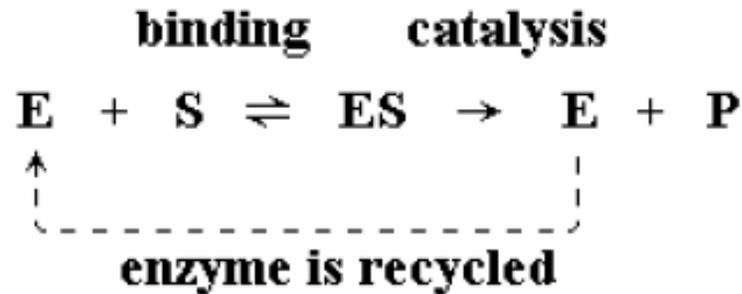


Intermediario de Reacción

A. Brown (1892, 1902)

1. La velocidad de una reacción enzimática NO depende de la concentración de S
2. La velocidad de una reacción enzimática no se puede ajustar a una cinética de orden 2

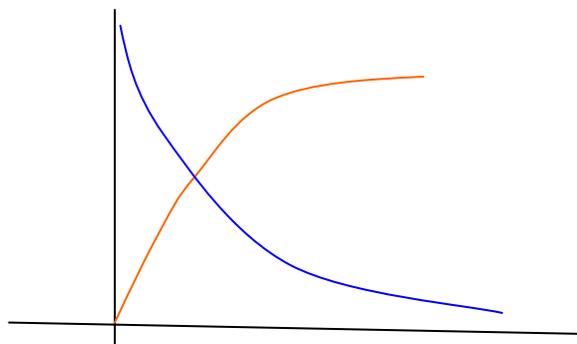
V. Henri (1901, 1903)



1. La E se recicla en la cinética. Su concentración total es constante
2. La $E_t = E + ES$
3. La velocidad global del proceso está dado por $v = k_{cat} [ES]$, donde k_{cat} es la constante cinética del paso lento.

Para una reacción química común, la velocidad en el tiempo cae debido a:

- Disminuye la concentración de reactivo
- La reacción inversa se hace importante al aumentar la [P]
- La reacción alcanza un equilibrio

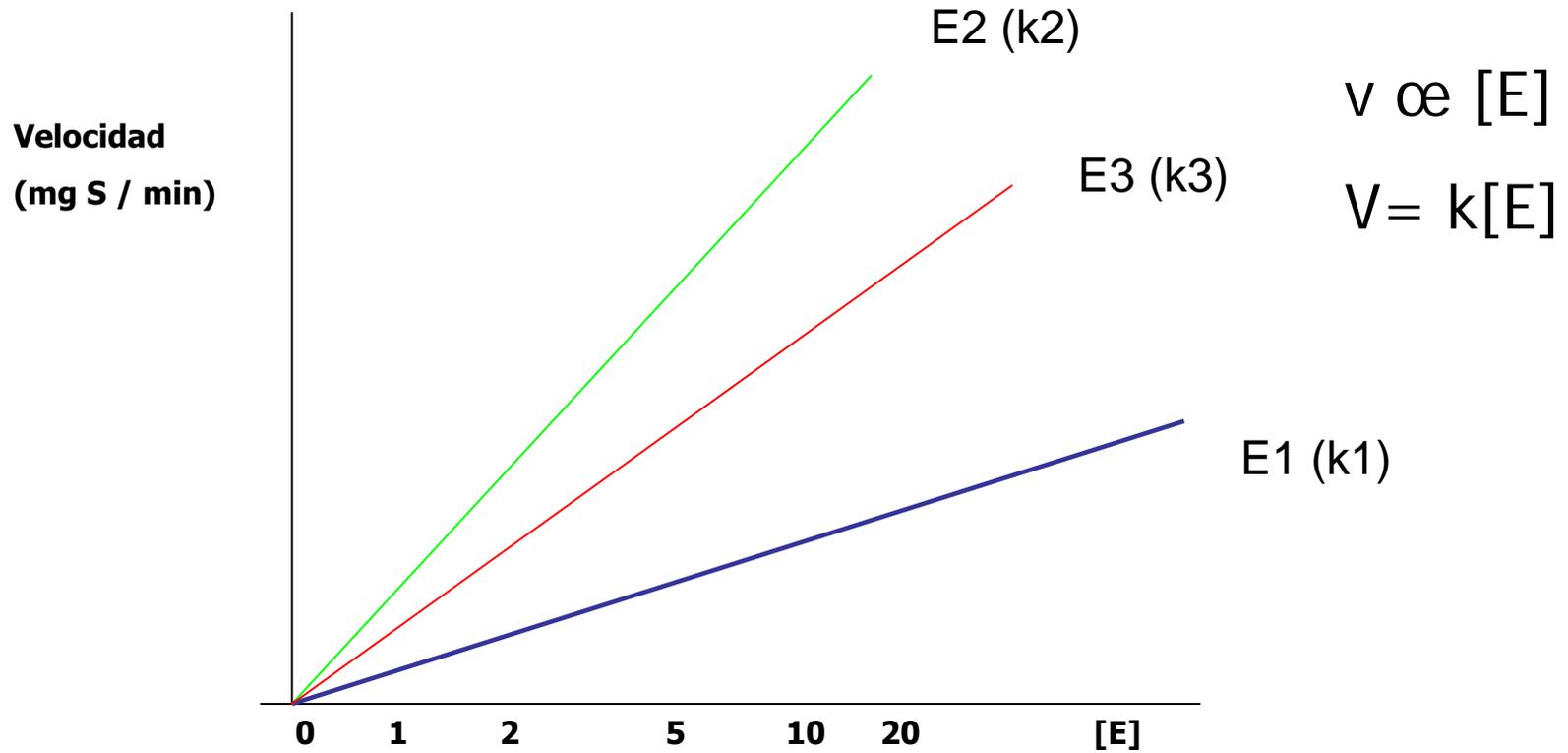


Para una enzima, la velocidad en el tiempo cae debido a:

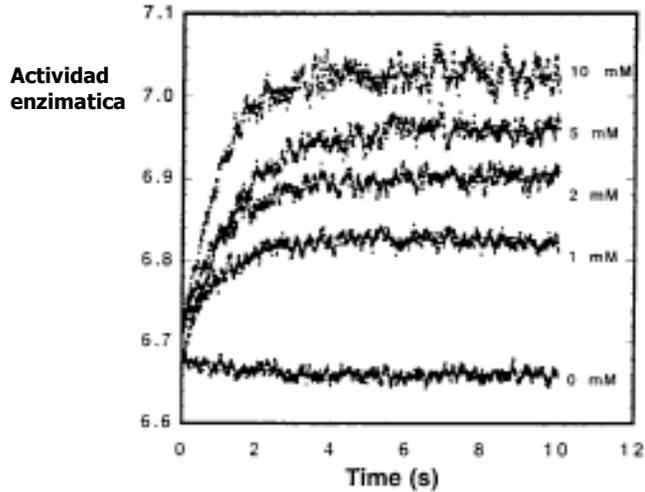
Disminuye la concentración de reactivo (sustrato)

- La reacción inversa se hace importante al aumentar la [P]
- El producto puede inhibir a la enzima
- Cambios de PH o temperatura pueden modificar a la enzima en el curso de la reacción
- Al disminuir la [S] puede disminuir la saturación de la enzima

Velocidad inicial en función de la [E]



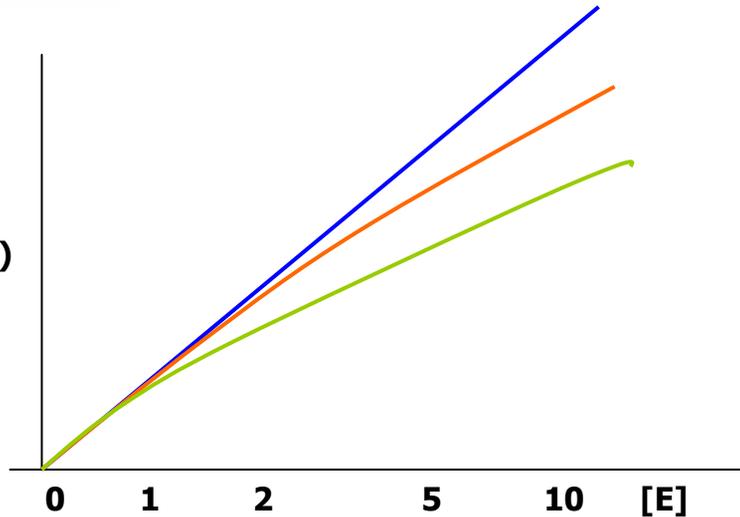
Velocidades iniciales



- Distintas [E]
- Distintas [S]
- Distintos PH
- Distintos sustratos para la misma enzima
- Distintas concentraciones de cofactor

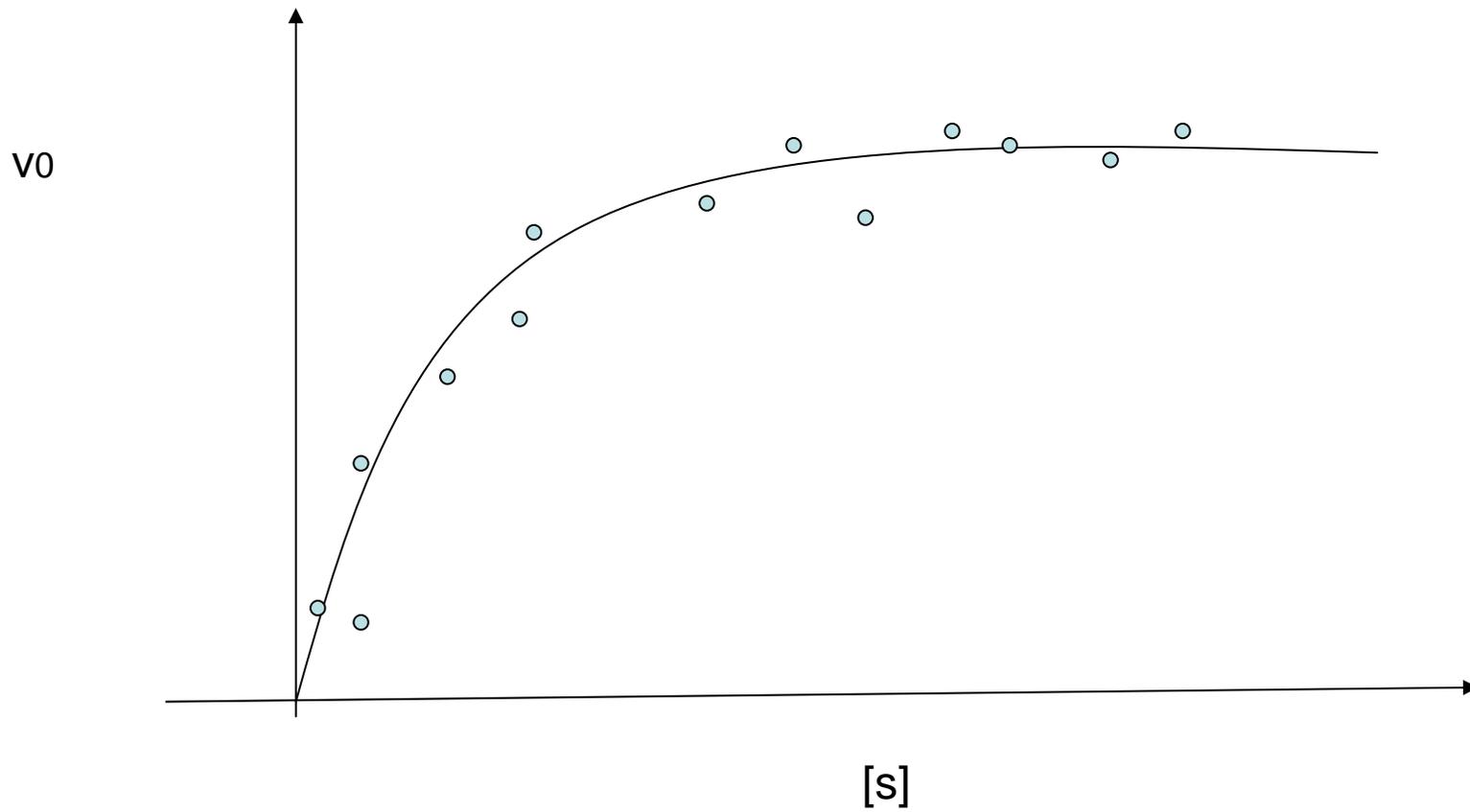


Velocidad
(mg S / min)



Velocidad vs [E]

Velocidad vs [S]



Die Kinetik der Invertinwirkung.

Von

L. Michaelis und Miß Maud L. Menten.

(Eingegangen am 4. Februar 1913.)

Mit 19 Figuren im Text.

Die Kinetik der Wirkung der Fermente wurde besonders häufig am Invertin studiert, weil wegen der Einfachheit und leichten Meßbarkeit seiner Wirkung die Untersuchung gerade dieses Fermentes besonders große Aussichten bietet, das Endziel der kinetischen Forschungen zu erreichen, nämlich aus dem Gange der Reaktion zu Schlüssen über das Wesen derselben zu gelangen. Die hervorragendsten Arbeiten darüber sind von Duclaux¹⁾, Sullivan und Thompson²⁾, A. J. Brown³⁾, sowie besonders von V. Henri⁴⁾. Die Untersuchungen von Henri sind deshalb besonders bedeutungsvoll, weil es ihm gelang, von rationellen Vorstellungen über das Wesen der Fermentwirkung ausgehend zu einer mathematischen Formulierung des Ganges der Fermentwirkung zu gelangen, die sich den Tatsachen in vielen Punkten ganz gut anschloß. Von diesen Vorstellungen Henris werden wir auch in dieser Arbeit ausgehen. Wenn wir es unternommen haben, die ganze Arbeit wieder aufzunehmen, so liegt das daran, daß Henri zwei Momente noch nicht berücksichtigt hat, die von ganz hervorragender Bedeutung geworden sind und deren Vernachlässigung in den Henrischen Arbeiten heute so schwer empfunden werden muß, daß eine Neuuntersuchung notwendig geworden ist. Das erste ist die Berücksichtigung der Wasserstoffionenkonzentration, das zweite die Berücksichtigung der Multirotation des Zuckers.

¹⁾ Duclaux, *Traité de Microbiologie* 1899, Bd. II.

²⁾ O. Sullivan und Thompson, *Journ. Chem. Soc.* 57, 834, 1890.

³⁾ A. J. Brown, *Journ. Chem. Soc.* 1902, 373.

⁴⁾ Victor Henri, *Lois générales de l'action des diastases*, Paris 1903.

Ecuación de Michaelis-Menten (1913)



Leonor Michaelis
1875–1949

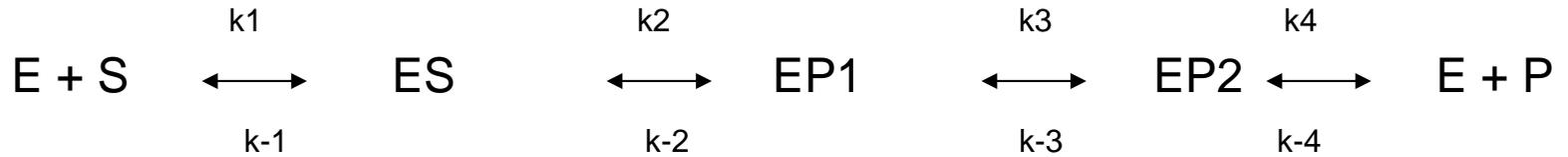


Maud Menten
1879–1960

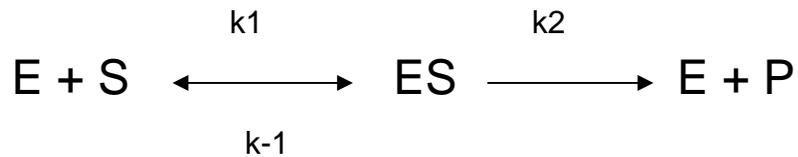


$$V_0 = k_2[ES]$$

Cinética Enzimática: modelos



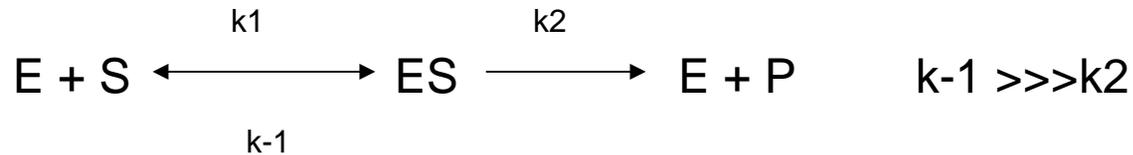
Si el paso que da producto es el limitante, y $P=0$ a $t \rightarrow 0$



Este formalismo se cumple sólo si la velocidad es inicial (v_0)

$$v = k_2 [ES]$$

Resolución usando la hipótesis del equilibrio rápido (Michaelis-Menten, 1913)

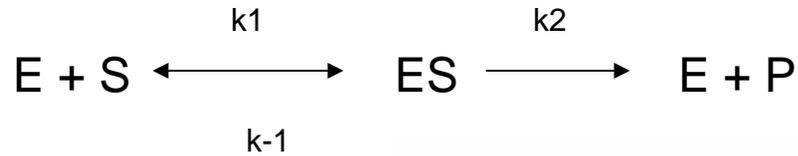


$$V_0 = \frac{k_2[E_t][S]}{K_m + [S]}$$

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

Donde $K_m = k_{-1}/k_1 = K_s$ = constante de disociación de ES

Resolución por la hipótesis del estado estacionario (Briggs-Haldane, 1925)

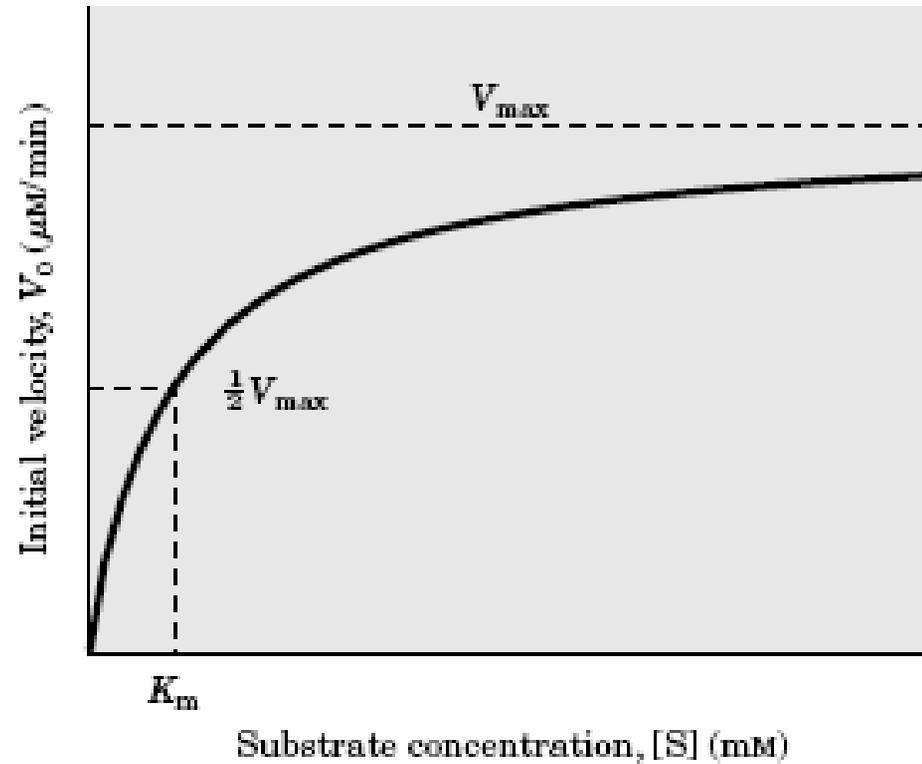


$$V_0 = \frac{k_2[E_t][S]}{K_m + [S]}$$

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

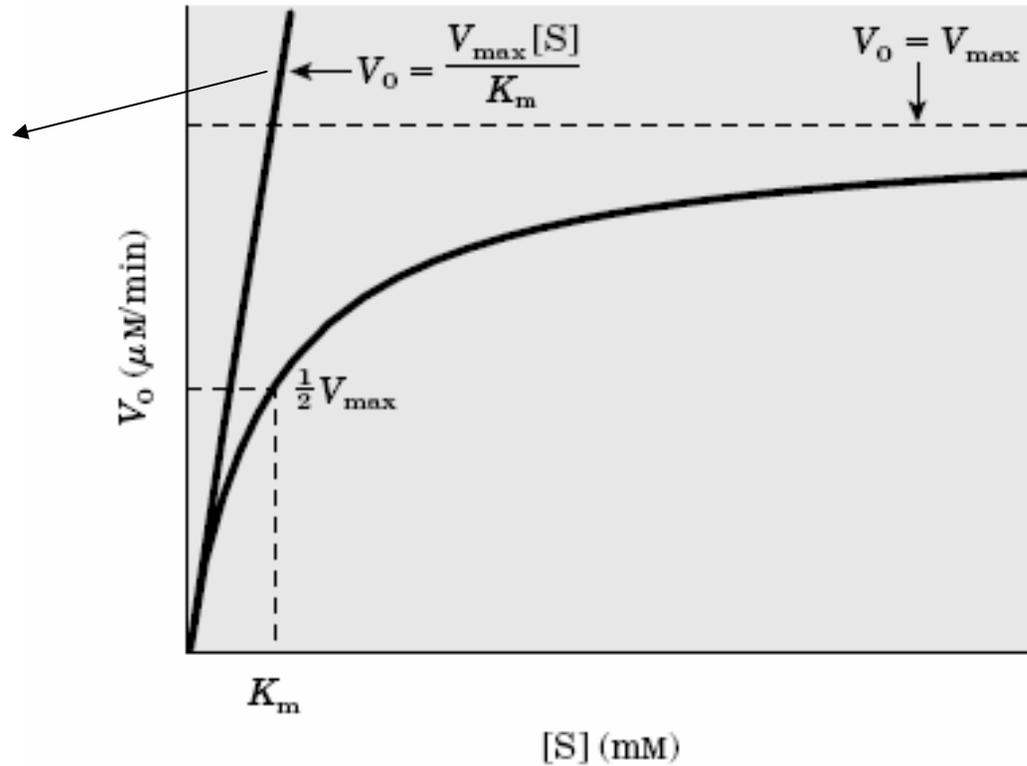
Donde $K_m = (k_2 + k_{-1})/k_1$

Velocidad inicial en función de la [S]



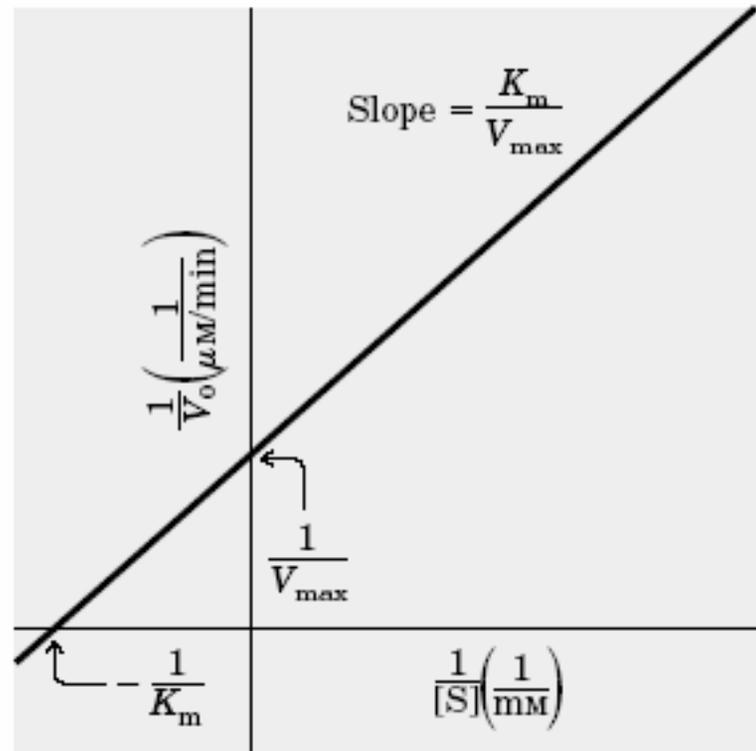
La cinética enzimática puede tener distintos ordenes de reacción

$$V_0 = \frac{k_{\text{cat}} E_t [S]}{K_m}$$



Transformación lineal de Michaelis-Menten: Ecuación de Lineweaver-Burk o doble recíproca

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



Eadie-Hofstee

$$v = -K_m v/[S] + V_{max}$$

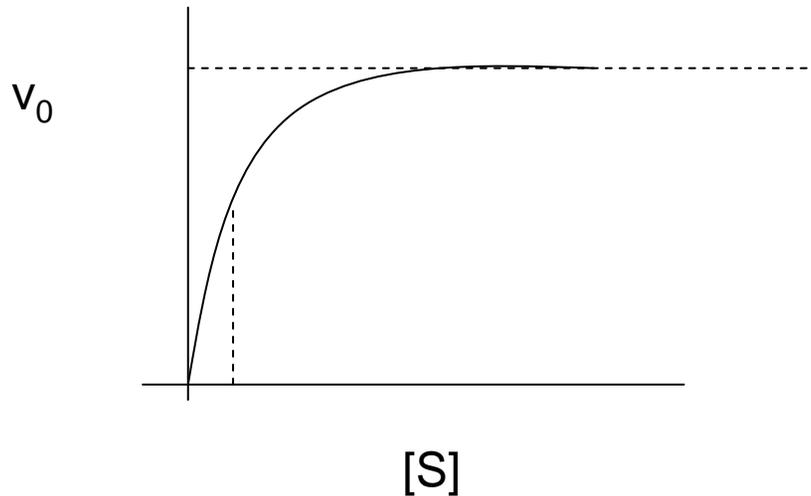
Eadie-Scatchard

$$v/[S] = -1/K_m v + V_{max}/K_m$$

Parámetros derivados del análisis de Michaelis-Menten

- **K_m**

indica la concentración de sustrato intracelular



*es una constante para una enzima determinada $K_m = (k_2 + k_{-1}) / k_1$
esta relacionada con la “afinidad” de la enzima por su sustrato*

•Vmax

es un parámetro directamente proporcional a la concentración de enzima total $V_{max} = k_{cat} [E_t]$

no es una constante ya que depende de $[E_t]$

•Número de recambio

número de moléculas de sustrato transformados por minuto por mol de enzima $K_{cat} [1/s]$

mide la eficiencia de la enzima “turnover number”

sirve para comparar enzimas

$1/k_{cat} [seg]$ tiempo de un ciclo catalítico

•Constante de especificidad

sirve para comparar la eficiencia de una enzima dada para distintos sustratos K_{cat}/K_m

Unidades de actividad enzimática

Unidad internacional: cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 micromol de producto por minuto en condiciones óptimas

Katal: cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 mol de producto por segundo en condiciones óptimas.

La **cantidad** de una enzima entonces se expresa usando una
VELOCIDAD

La **concentración** de una enzima es la cantidad de enzima
(expresada en unidades) por unidad de volumen

La **actividad específica** de una enzima es la cantidad de enzima
(expresada en unidades) por miligramo de proteína

La característica principal de las enzimas es la de catalizar reacciones químicas

Comparison of Uncatalyzed and Catalyzed Rates for Some Enzymatic Reactions			
Enzyme	Nonenzymatic rate $k_{\text{non}} (\text{s}^{-1})$	Enzymatic rate $k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	Rate acceleration $k_{\text{cat}}/k_{\text{non}}$
Cyclophilin	2.8×10^{-2}	1.3×10^4	4.6×10^5
Carbonic anhydrase	1.3×10^{-1}	10^8	7.7×10^8
Chymotrypsin	4×10^{-9}	4×10^{-2}	10^7
Triosephosphate isomerase	6×10^{-7}	2×10^3	3×10^9
Fumarase	2×10^{-8}	2×10^3	10^{11}
Adenosine deaminase	1.8×10^{10}	370	2.1×10^{12}
Urease	3×10^{-14}	3×10^4	10^{14}
Alkaline phosphatase	10^{-15}	10^2	10^{17}
ODCase	2.8×10^{-18}	39	1.4×10^{17}

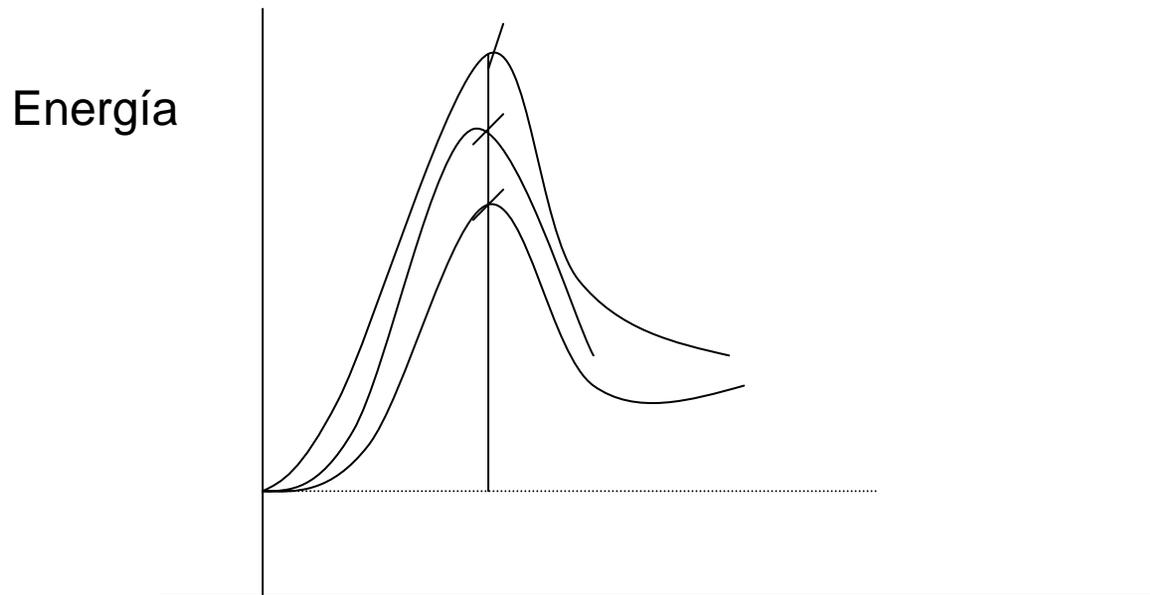
Figure 2-20 Table of the uncatalyzed and catalyzed rates for some representative enzymatic reactions. k is the rate constant for the reaction. Adapted from Radzicka, A. and Wolfenden, R.: *Science* 1995, 267:90–93.

$$K = A_0 \exp(-E_a/RT)$$

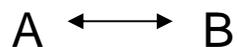
Donde A_0 es un termino pre-exponencial

E_a es la energía de activación

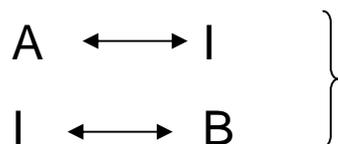
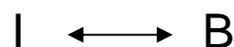
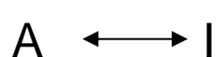
R es la constante general de los gases y T la temperatura



Reacciones simples y complejas



en un paso simple : reacción elemental



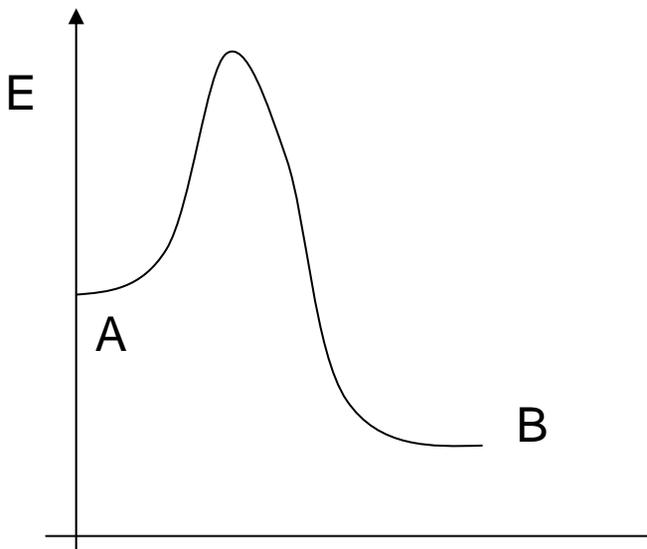
en dos pasos simples: reacción compleja

A: es un reactivo

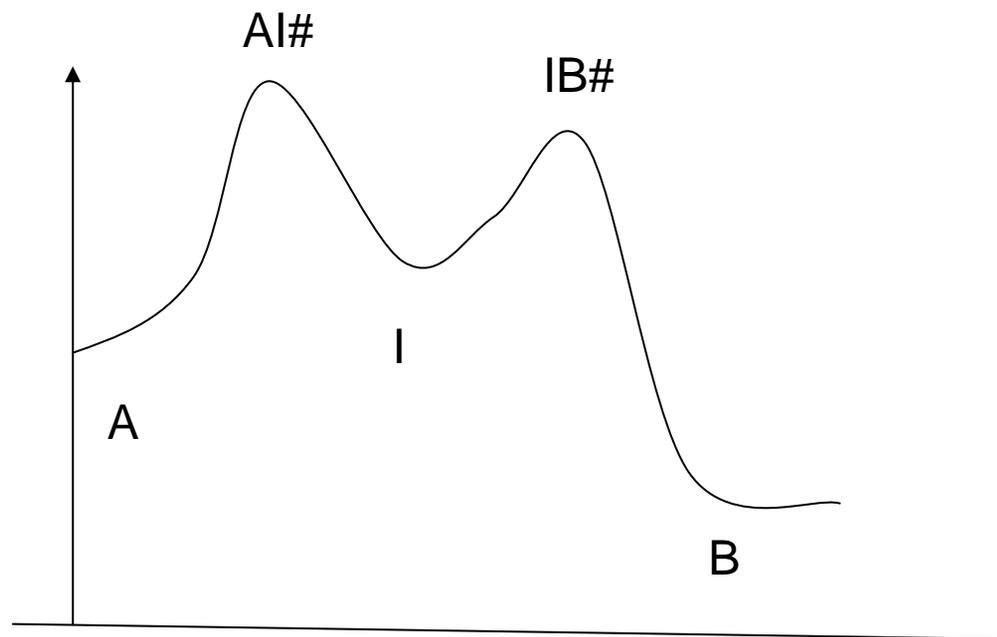
B: es un producto

I: es un intermediario de reacción

Intermediarios de reacción y estados de transición

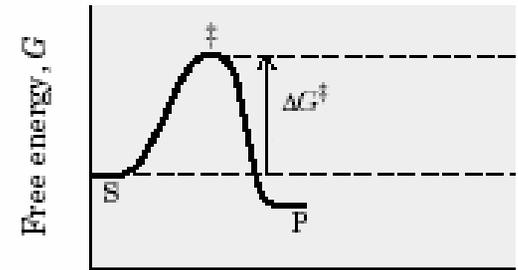
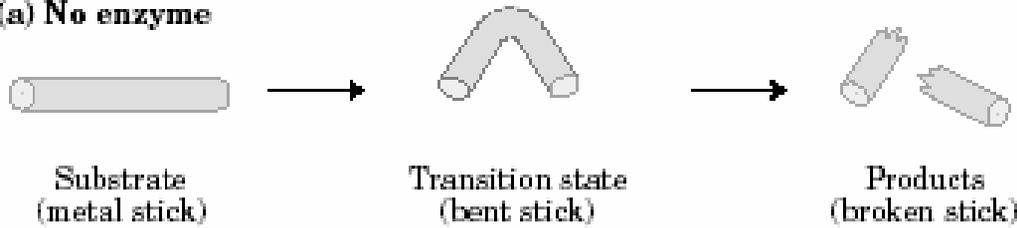


Reacciones simples

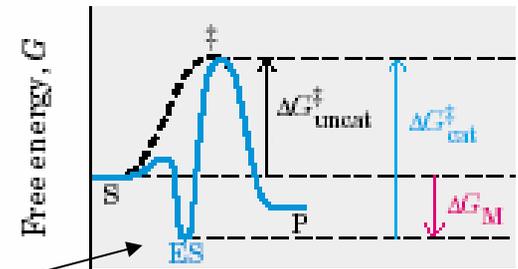
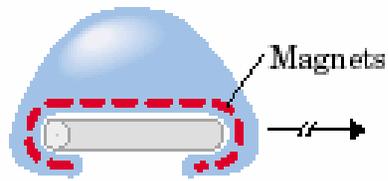


Reacciones complejas

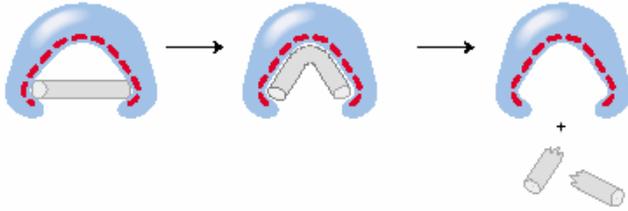
(a) No enzyme



(b) Enzyme complementary to substrate

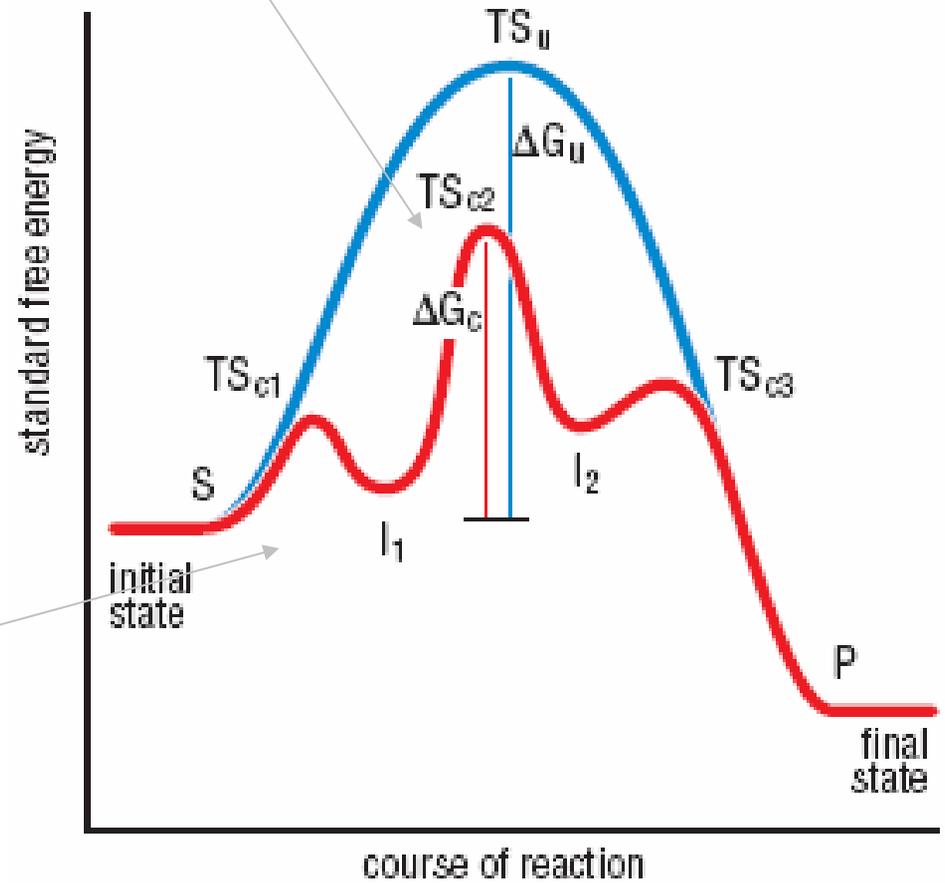


Estabilización del **sustrato**
(modelo llave-cerradura)

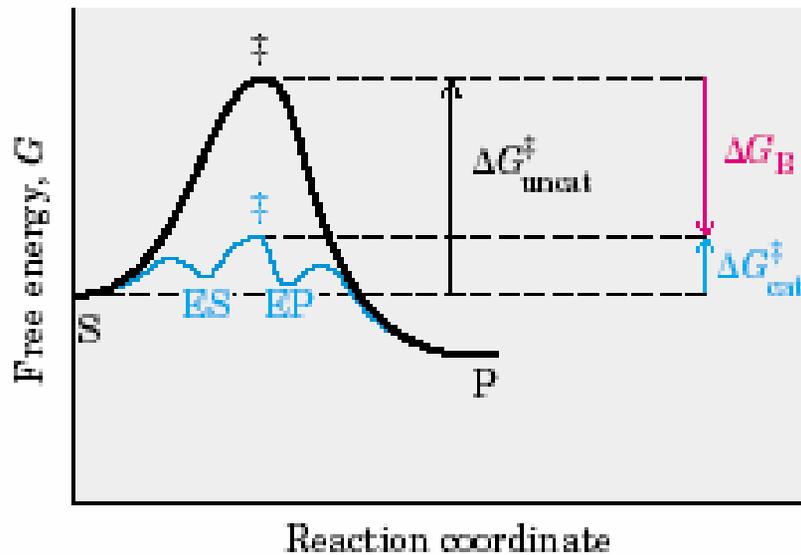


Estabilización del **estado de transición** (modelo ajuste inducido o modelo de Monod)

Desestabilización del **sustrato** (modelo ajuste inducido o modelo de Monod)



Energía de unión= ΔG_B



ΔG_B

- Especificidad de unión
- Fuerza de unión