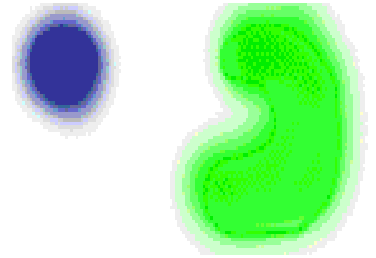


ENZIMAS

Los enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas en los seres vivos. Los enzimas son catalizadores, es decir, sustancias que, sin consumirse en una reacción, aumentan notablemente su velocidad. No hacen factibles las reacciones imposibles, sino que sólomente aceleran las que espontáneamente podrían producirse. Ello hace posible que en condiciones fisiológicas tengan lugar reacciones que sin catalizador requerirían condiciones extremas de presión, temperatura o pH.



ASPECTOS GENERALES SOBRE LOS ENZIMAS

Prácticamente todas las reacciones químicas que tienen lugar en los seres vivos están catalizadas por enzimas. Los enzimas son **catalizadores específicos**: cada enzima cataliza un solo tipo de reacción, y casi siempre actúa sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos. En una reacción catalizada por un enzima:

1. La sustancia sobre la que actúa el enzima se llama **sustrato**.
2. El sustrato se une a una región concreta del enzima, llamada **centro activo**. El centro activo comprende (1) un sitio de unión formado por los aminoácidos que están en contacto directo con el sustrato y (2) un sitio catalítico, formado por los aminoácidos directamente implicados en el mecanismo de la reacción
3. Una vez formados los **productos** el enzima puede comenzar un nuevo ciclo de reacción



Los enzimas, a diferencia de los catalizadores inorgánicos catalizan reacciones específicas. Sin embargo hay **distintos grados de especificidad**. El enzima sacarasa es **muy específico**: rompe el enlace b-glucosídico de la sacarosa o de compuestos muy similares. Así, para el enzima sacarasa, la sacarosa es su **sustrato natural**, mientras

que la maltosa y la isomaltosa son **sustratos análogos**. El enzima actúa con máxima eficacia sobre el sustrato natural y con menor eficacia sobre los sustratos análogos. Entre los **enzimas poco específicos** están las proteasas digestivas como la quimotripsina, que rompe los enlaces amida de proteínas y péptidos de muy diverso tipo.

PROPIEDADES DE LOS ENZIMAS

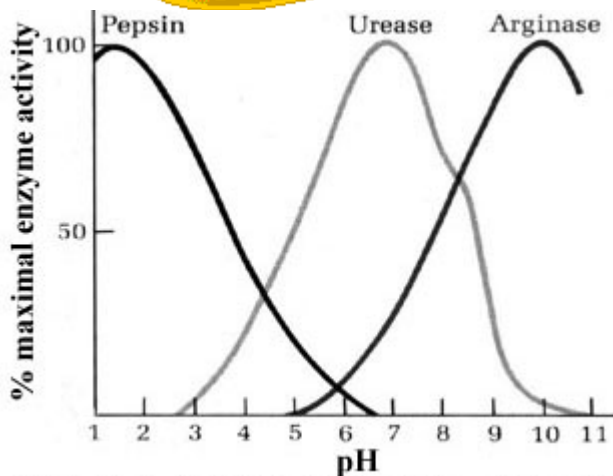
Las propiedades de los enzimas derivan del hecho de ser proteínas y de actuar como catalizadores. Como proteínas, poseen una conformación natural más estable que las demás conformaciones posibles. Así, **cambios en la conformación** suelen ir asociados en **cambios en la actividad** catalítica. Los factores que influyen de manera más directa sobre la actividad de un enzima son:

- pH
- temperatura
- cofactores

EFFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA



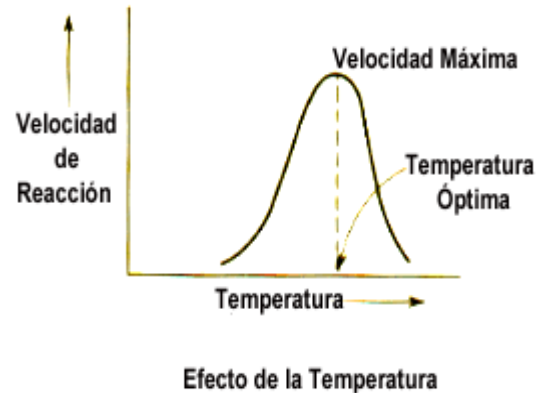
Los enzimas poseen grupos químicos ionizables (carboxilos $-\text{COOH}$; amino $-\text{NH}_2$; tiol $-\text{SH}$; imidazol, etc.) en las cadenas laterales de sus aminoácidos. Según el pH del medio, estos grupos pueden tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra. Como la conformación de las proteínas depende, en parte, de sus cargas eléctricas, habrá un pH en el cual la conformación será la más adecuada para la actividad catalítica. Este es el llamado **pH óptimo**.



La mayoría de los enzimas son muy sensibles a los cambios de pH. Desviaciones de pocas décimas por encima o por debajo del pH óptimo pueden afectar drásticamente su actividad. Así, la pepsina gástrica tiene un pH óptimo de 2, la ureasa lo tiene a pH 7 y la arginasa lo tiene a pH 10 (Figura de la izquierda). Como ligeros cambios del pH pueden provocar la desnaturalización de la proteína, los seres vivos han desarrollado sistemas más o menos complejos para mantener estable el pH intracelular: Los **amortiguadores fisiológicos**.

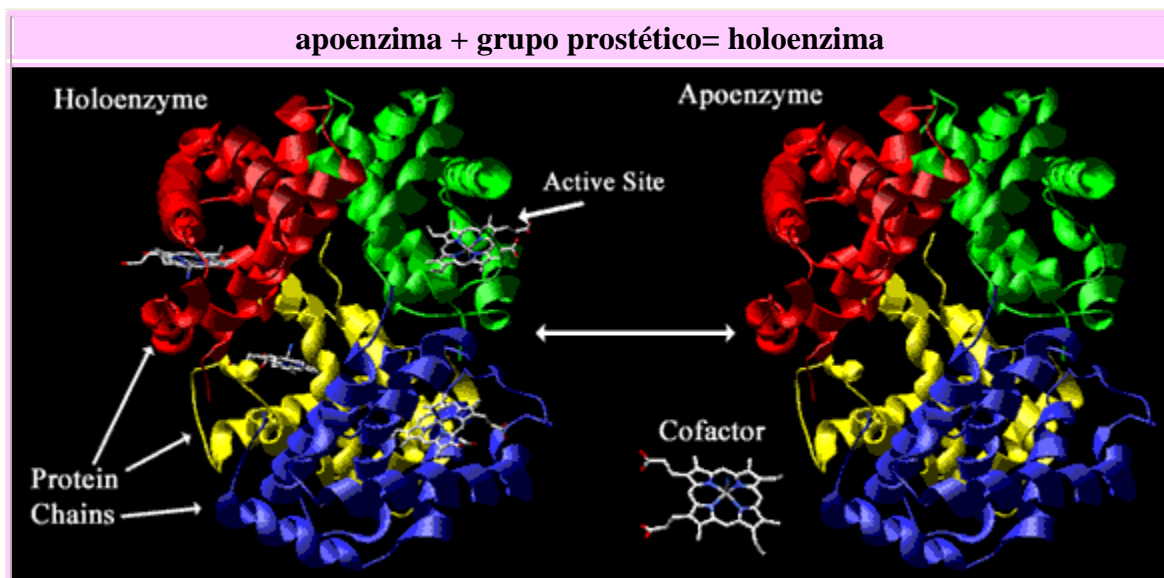
EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

En general, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas: por cada 10°C de incremento, la velocidad de reacción se duplica. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley general. Sin embargo, al ser proteínas, a partir de cierta temperatura, se empiezan a desnaturalizar por el calor. La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama **temperatura óptima** (Figura de la derecha). Por encima de esta temperatura, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica, y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse.



EFFECTO DE LOS COFACTORES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

A veces, un enzima requiere para su función la presencia de sustancias no proteicas que colaboran en la catálisis: los **cofactores**. Los cofactores pueden ser iones inorgánicos como el Fe^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} etc. Casi un tercio de los enzimas conocidos requieren cofactores. Cuando el cofactor es una molécula orgánica se llama **coenzima**. Muchos de estos coenzimas se sintetizan a partir de vitaminas. En la figura inferior podemos observar una molécula de **hemoglobina** (proteína que transporta oxígeno) y su coenzima (el grupo hemo). Cuando los cofactores y las coenzimas se encuentran unidos covalentemente al enzima se llaman **grupos prostéticos**. La forma catalíticamente activa del enzima, es decir, el enzima unida a su grupo prostético, se llama holoenzima. La parte proteica de un holoenzima (inactiva) se llama apoenzima, de forma que:



NOMENCLATURA DE LOS ENZIMAS

Hay varias formas mediante las cuales se asigna un nombre a un enzima:

- nombres particulares
- nombre sistemático
- código de la comisión enzimática (enzyme commission)

NOMBRES PARTICULARES

Antiguamente, los enzimas recibían **nombres particulares**, asignados por su descubridor. Al ir aumentando el número de enzimas conocidos, se hizo necesaria una nomenclatura sistemática que informara sobre la acción específica de cada enzima y los sustratos sobre los que actuaba.

NOMBRE SISTEMÁTICO

El nombre sistemático de un enzima consta actualmente de 3 partes:

- **el sustrato preferente**
- **el tipo de reacción realizado**
- **terminación "asa"**

Un ejemplo sería la glucosa fosfato isomerasa que cataliza la isomerización de la glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato.

Muchos enzimas catalizan **reacciones reversibles**. No hay una manera única para fijar cual de los dos sentidos se utiliza para nombrar al enzima. Así, la glucosa fosfato isomerasa también podría llamarse fructosa fosfato isomerasa.

Cuando la acción típica del enzima es la **hidrólisis** del sustrato, el segundo componente del nombre se omite y por ejemplo, la lactosa hidrolasa se llama simplemente lactasa. Además de los nombre sistemáticos, aún persisten otros consagrados por el uso. Así, la glucosa:ATP fosforiltransferasa se llama habitualmente glucoquinasa.

NOMENCLATURA DE LA COMISIÓN ENZIMÁTICA

El nombre de cada enzima puede ser identificado por un **código numérico**, encabezado por **las letras EC** (enzyme commission), **seguidas de cuatro números separados por puntos**. El primer número indica a cual de las seis clases pertenece el enzima, el segundo se refiere a distintas subclases dentro de cada grupo, el tercero y el cuarto se refieren a los grupos químicos específicos que intervienen en la reacción.

Así, la ATP:glucosa fosfotransferasa (glucoquinasa) se define como EC 2.7.1.2. El número 2 indica que es una

transferasa, el 7 que es una fosfotransferasa, el 1 indica que el aceptor es un grupo OH, y el último 2 indica que es un OH de la D-glucosa el que acepta el grupo fosfato.

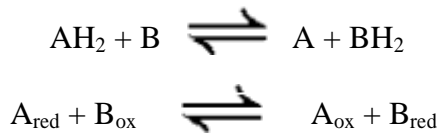
CLASIFICACIÓN DE LOS ENZIMAS

En función de su acción catalítica específica, los enzimas se clasifican en 6 grandes grupos o clases:

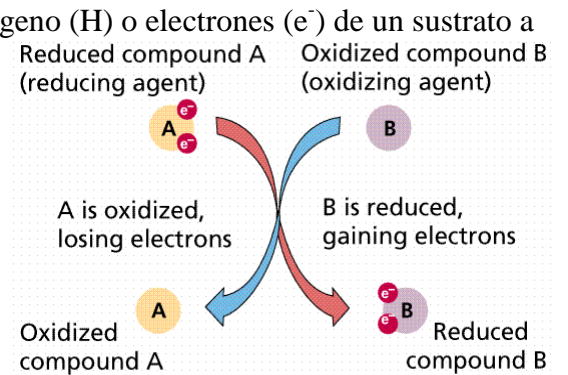
- Clase 1: OXIDORREDUCTASAS
- Clase 2: TRANSFERASAS
- Clase 3: HIDROLASAS
- Clase 4: LIASAS
- Clase 5: ISOMERASAS
- Clase 6: LIGASAS

Clase 1: OXIDORREDUCTASAS

Catalizan reacciones de oxidorreducción, es decir, transferencia de hidrógeno (H) o electrones (e⁻) de un sustrato a otro, según la reacción general:



Ejemplos son la succinato deshidrogenasa o la citocromo *c* oxidasa.

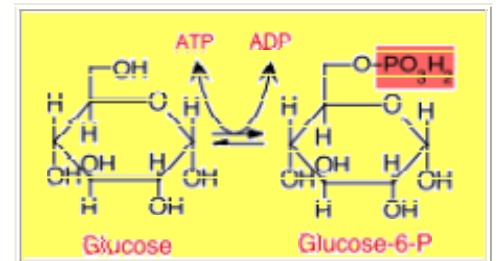
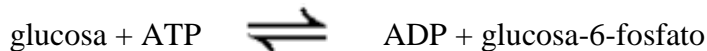


Clase 2: TRANSFERASAS

Catalizan la transferencia de un grupo químico (distinto del hidrógeno) de un sustrato a otro, según la reacción:



Un ejemplo es la glucoquinasa, que cataliza la reacción representada en la Figura de la derecha:



Clase 3: HIDROLASAS

Catalizan las reacciones de hidrólisis:

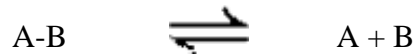


Un ejemplo es la lactasa, que cataliza la reacción:



Clase 4: LIASAS

Catalizan reacciones de ruptura o soldadura de sustratos:



Un ejemplo es la acetacetato descarboxilasa, que cataliza la reacción:

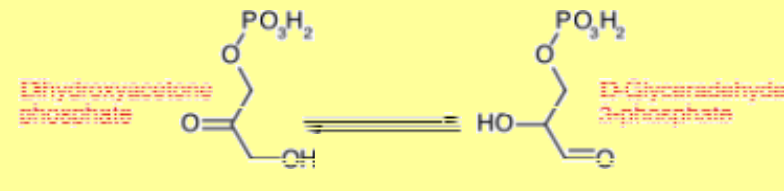
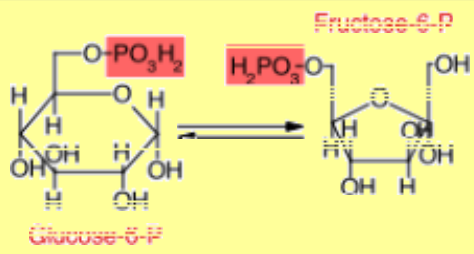


Clase 5: ISOMERASAS

Catalizan la interconversión de isómeros:



Son ejemplos la fosfotriosa isomerasa y la fosfoglucosa isomerasa, que catalizan las reacciones representadas en la tabla inferior:

fosfotriosa isomerasa		fosfoglucosa isomerasa	
gliceraldehído-3-fosfato	\rightleftharpoons	dihidroxiacetona-fosfato	
			

Clase 6: LIGASAS

Catalizan la unión de dos sustratos con hidrólisis simultánea de un nucleótido trifosfato (ATP, GTP, etc.):

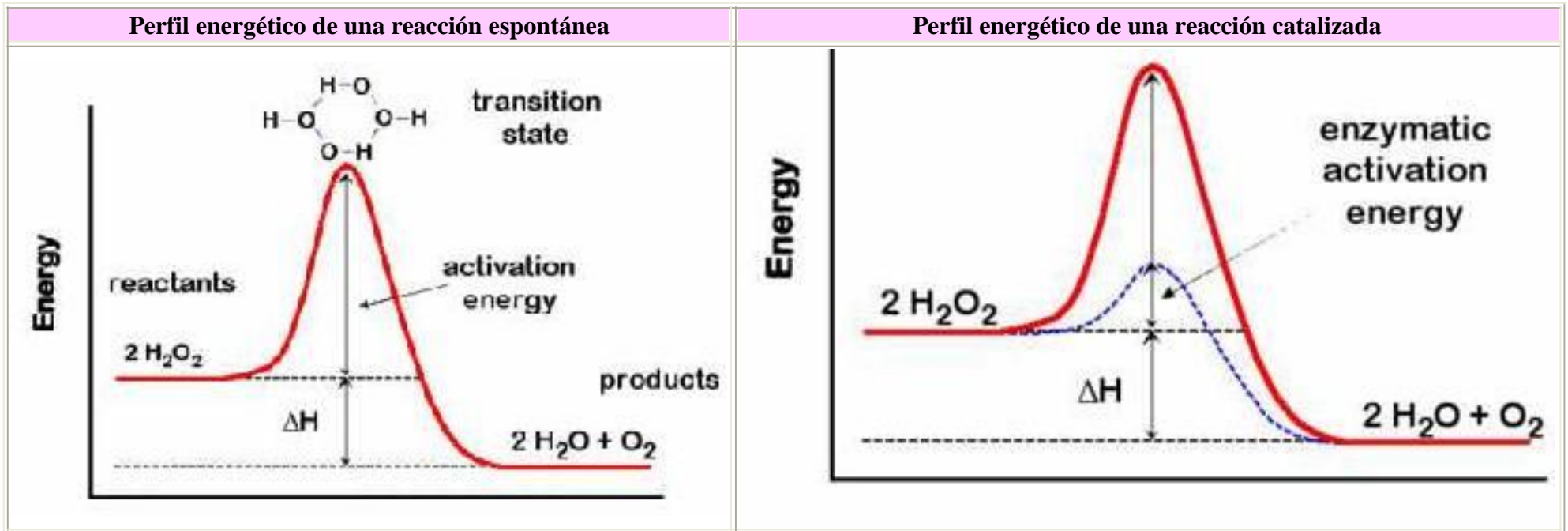


Un ejemplo es la piruvato carboxilasa, que cataliza la reacción:



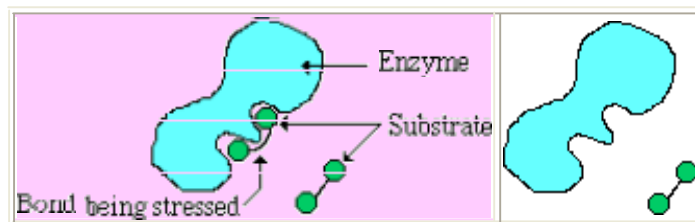
MODO DE ACCIÓN DE LOS ENZIMAS

En las reacciones espontáneas, los productos finales tienen menos energía libre de Gibbs (ΔG) que los reactantes (Figura inferior izquierda). Por tanto, en las reacciones espontáneas se libera energía de Gibbs ($\Delta G < 0$). Sin embargo, el comienzo de la reacción requiere un aporte inicial de energía. Esta energía inicial que hay que suministrar a los reactantes para que la reacción transcurra se llama **energía de activación** (E_a). Cuanto menor es la E_a más fácilmente transcurre la reacción.



La acción de los catalizadores consiste, precisamente, en disminuir la E_a (Figura superior derecha). Los enzimas son catalizadores especialmente eficaces, ya que disminuyen la E_a aún más que los catalizadores inorgánicos. Por ejemplo, la descomposición del agua oxigenada (H_2O_2) para dar H_2O y O_2 puede ocurrir sin catalizador, con un catalizador inorgánico (platino), o con un enzima específico (catalasa). Las respectivas E_a para cada proceso son 18, 12 y 6 Kcal/mol. Así, se puede calcular que el platino acelera la reacción 20.000 veces, mientras que la catalasa la acelera 370.000 veces.

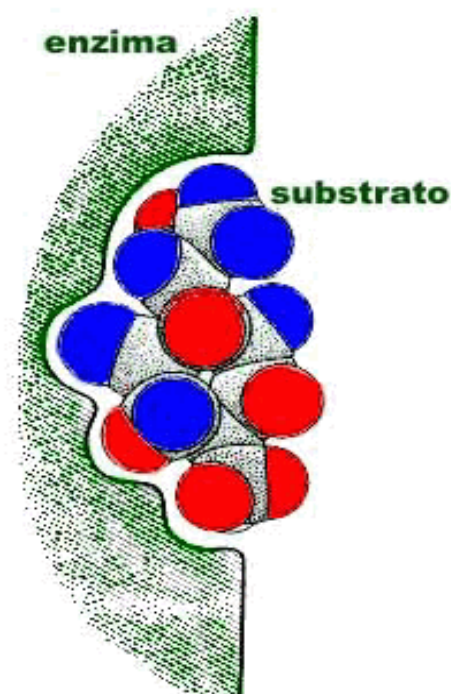
Para que una reacción química tenga lugar, las moléculas de los reactantes deben chocar con una energía y una orientación adecuadas. La actuación del enzima (1) permite que los reactantes (sustratos) se unan a su centro activo con una orientación óptima para que la reacción se produzca y (2) modifica las propiedades químicas del sustrato unido a su centro activo, debilitando los enlaces existentes y facilitando la formación de otros nuevos (Figuras inferiores):

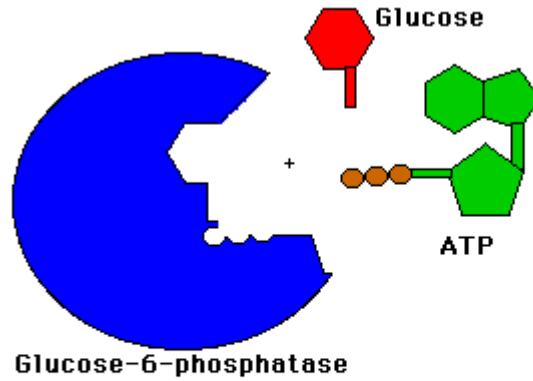


Hay dos modelos sobre la forma en que el sustrato se une al centro activo del enzima:

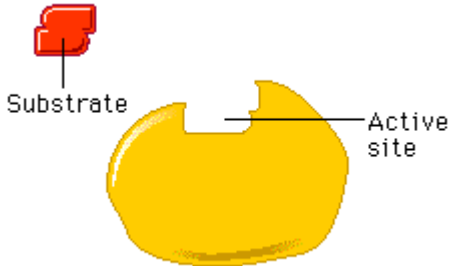
- el modelo **llave-cerradura**
- el modelo del **ajuste inducido**

MODELO LLAVE-CERRADURA El **modelo llave-cerradura** supone que la estructura del sustrato y la del centro activo son complementarias, de la misma forma que una llave encaja en una cerradura. Este modelo es válido en muchos casos, pero no es siempre correcto.





MODELO DEL AJUSTE INDUCIDO



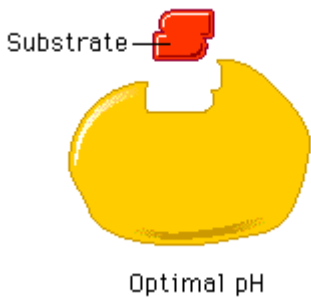
En algunos casos, el centro activo adopta la conformación idónea sólo en presencia del sustrato. La unión del sustrato al centro activo del enzima desencadena un cambio conformacional que da lugar a la formación del producto. Este es el **modelo del ajuste inducido**. Sería algo así como un cascanueces, que se adapta al contorno de la nuez.

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

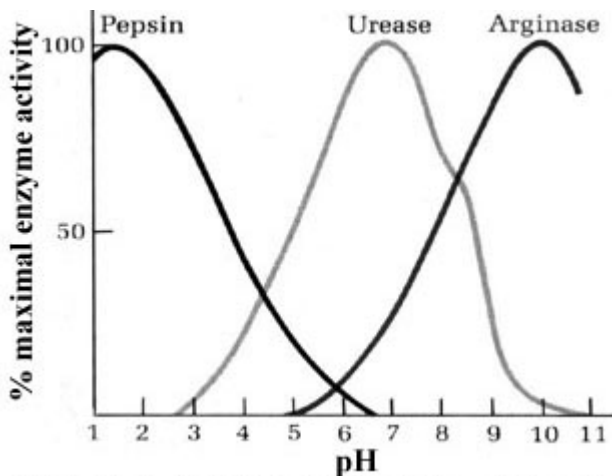
Una molécula de enzima no tiene por qué actuar siempre a la misma velocidad. Su actividad puede estar modulada por:

- cambios en el **pH**
- cambios en la **temperatura**
- presencia de **cofactores**
- las **concentraciones del sustrato y de los productos finales**
- presencia de **inhibidores**
- **modulación alostérica**
- **modificación covalente**
- activación por **proteolisis**
- **isoenzimas**

EFFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA



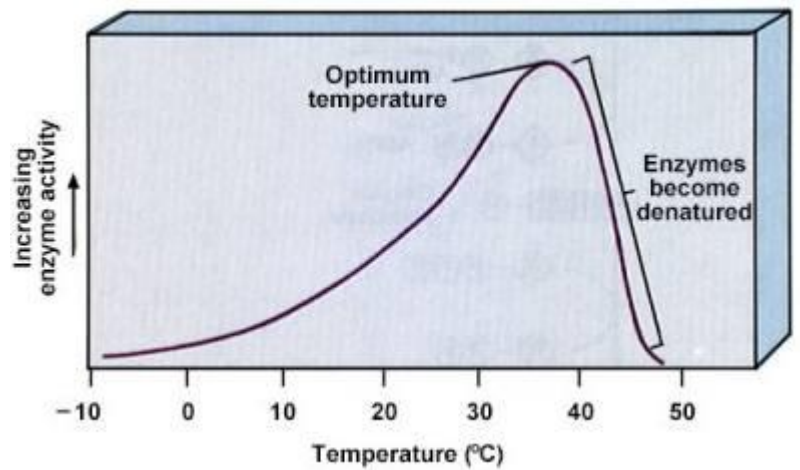
Los enzimas poseen grupos químicos ionizables (carboxilos $-\text{COOH}$; amino $-\text{NH}_2$; tiol $-\text{SH}$; imidazol, etc.) en las cadenas laterales de sus aminoácidos. Según el pH del medio, estos grupos pueden tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra. Como la conformación de las proteínas depende, en parte, de sus cargas eléctricas, habrá un pH en el cual la conformación será la más adecuada para la actividad catalítica (Figura de la derecha). Este es el llamado **pH óptimo**.



La mayoría de los enzimas son muy sensibles a los cambios de pH. Desviaciones de pocas décimas por encima o por debajo del pH óptimo pueden afectar drásticamente su actividad. Así, la pepsina gástrica tiene un pH óptimo de 2, la ureasa lo tiene a pH 7 y la arginasa lo tiene a pH 10 (Figura de la izquierda). Como ligeros cambios del pH pueden provocar la desnaturalización de la proteína, los seres vivos han desarrollado sistemas más o menos complejos para mantener estable el pH intracelular: Los **amortiguadores fisiológicos**.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

En general, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas: por cada 10°C de incremento, la velocidad de reacción se duplica. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley general. Sin embargo, al ser proteínas, a partir de cierta temperatura, se empiezan a desnaturalizar por el calor. La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama **temperatura óptima** (Figura de la derecha). Por encima de esta temperatura, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica, y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse.



EFFECTO DE LOS COFACTORES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

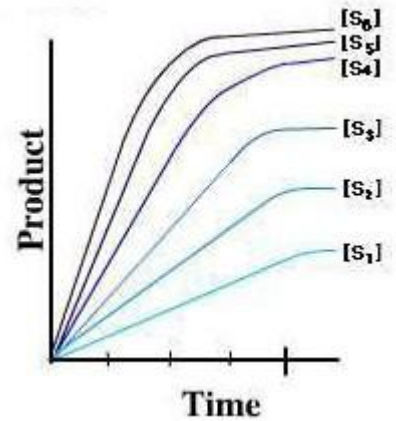
A veces, un enzima requiere para su función la presencia de sustancias no proteicas que colaboran en la catálisis: los **cofactores**. Los cofactores pueden ser iones inorgánicos como el Fe^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} etc. Casi un tercio de los enzimas conocidos requieren cofactores. Cuando el cofactor es una molécula orgánica se llama **coenzima**. Muchos de estos coenzimas se sintetizan a partir de vitaminas. En la figura de la izquierda podemos observar una molécula de mioglobina (proteína que transporta oxígeno al tejido muscular) y su coenzima (el grupo hemo, representado en color verde). Cuando los cofactores y las coenzimas se encuentran unidos covalentemente al enzima se llaman **grupos prostéticos**. La forma catalíticamente activa del enzima, es decir, el enzima unida a su grupo prostético, se llama holoenzima. La parte proteica de un holoenzima (inactiva) se llama apoenzima, de forma que:

apoenzima + grupo prostético = holoenzima

EFFECTO DE LAS CONCENTRACIONES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La velocidad de una reacción enzimática depende de la concentración de sustrato. La Figura de la derecha muestra la velocidad de una reacción enzimática a 6 concentraciones distintas de sustrato.

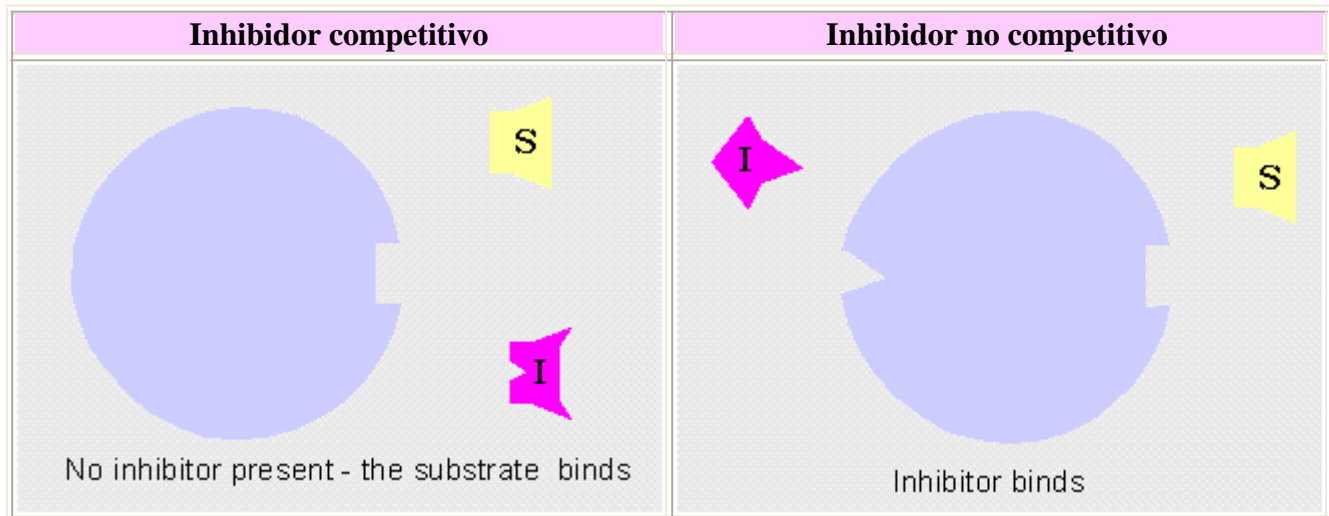
Además, la **presencia de los productos finales** puede hacer que la reacción sea más lenta, o incluso invertir su sentido (Figura inferior).



Equilibrium shifts to left
if product starts to build up

EFFECTO DE LOS INHIBIDORES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Ciertas moléculas pueden inhibir la acción catalítica de un enzima: son los **inhibidores**. Estos inhibidores bien pueden ocupar temporalmente el centro activo por semejanza estructural con el sustrato original (**inhibidor competitivo**) o bien alteran la conformación espacial del enzima, impidiendo su unión al sustrato (**inhibidor no competitivo**) (Figuras inferiores).

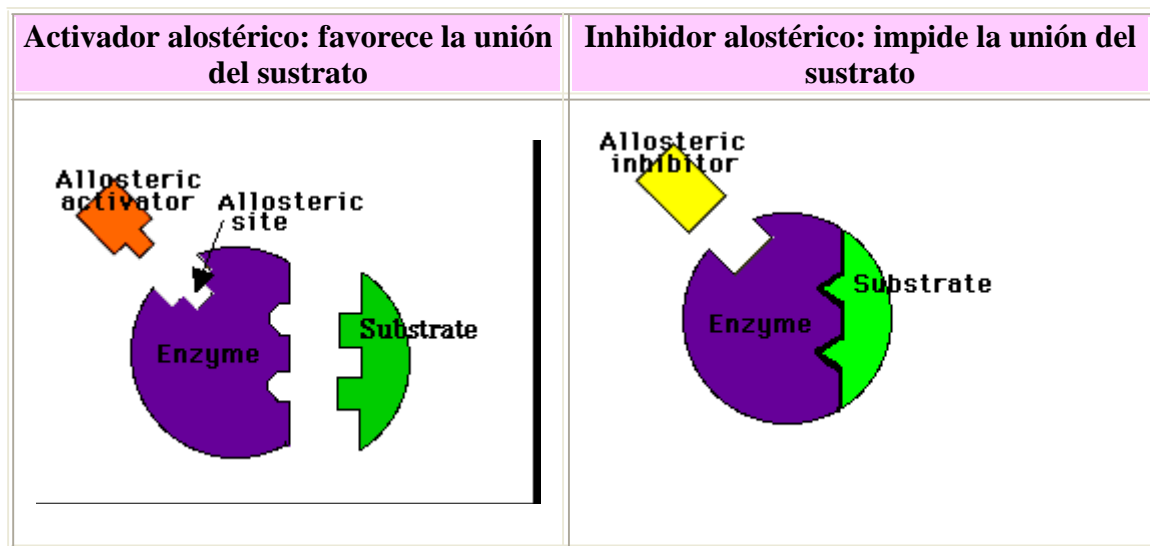


MODULACIÓN ALOSTÉRICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Hay enzimas que pueden adoptar 2 conformaciones interconvertibles llamadas R (relajada) y T (tensa). R es la forma más activa porque se une al sustrato con más afinidad. Las formas R y T se encuentran en equilibrio $R \rightleftharpoons T$ (Figura inferior):



Ciertas sustancias tienden a estabilizar la forma R. Son los llamados **moduladores positivos**. El propio sustrato es a menudo un modulador positivo. Las moléculas que favorecen la forma R pero que actúan sobre una región del enzima distinta del centro activo son los **activadores alostéricos** (Figura inferior izquierda).



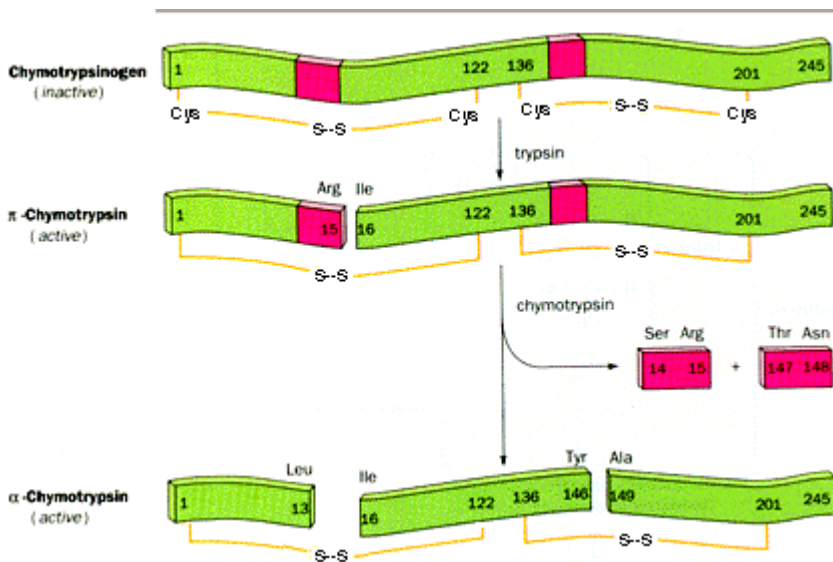
Las sustancias que favorecen la forma T y disminuyen la actividad enzimática son los **moduladores negativos**. Si estos moduladores actúan en lugares distintos del centro activo del enzima se llaman **inhibidores alostéricos** (Figura superior derecha).

EFFECTO DE LA MODIFICACIÓN COVALENTE SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Otros enzimas pasan de una forma menos activa a otra más activa uniéndose covalentemente a un grupo químico de pequeño tamaño como el P_i o el AMP. También se da el caso inverso, en el que un enzima muy activo se desactiva al liberar algún grupo químico. En las enzimas de las vías degradativas del metabolismo, la forma fosforilada es más activa que la no fosforilada, mientras que en las vías biosintéticas ocurre lo contrario. En las figuras inferiores se ilustra la activación de una proteína por fosforilación.



ACTIVACIÓN PROTEOLÍTICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA



Algunos enzimas no se sintetizan como tales, sino como proteínas precursoras sin actividad enzimática. Estas proteínas se llaman **proenzimas o zimógenos**. Para activarse, los zimógenos sufren un ataque hidrolítico que origina la liberación de uno o varios péptidos. El resto de la molécula proteica adopta la conformación y las propiedades del enzima activo. Muchos enzimas digestivos se secretan en forma de zimógenos y en el tubo digestivo se convierten en la forma activa. Es el caso de la **a-quimotripsina**, que se sintetiza en forma de quimotripsinógeno (Figura superior). Si estos enzimas se sintetizasen directamente en forma activa destruirían la propia célula que las

produce. Así, la tripsina pancreática (una proteasa) se sintetiza como tripsinógeno (inactivo). Si por alguna razón se activa en el propio páncreas, la glándula sufre un proceso de autodestrucción (pancreatitis aguda), a menudo mortal.

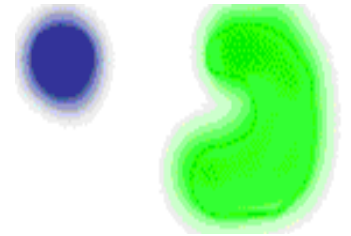
REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR MEDIO DE ISOENZIMAS

Algunos enzimas tienen distinta estructura molecular aunque su función biológica es similar. Se llaman **isozimas** o **isoenzimas**. Estas diferencias de estructura se traducen en ligeros cambios en sus propiedades, de forma que cada isozima se adapta perfectamente a la función que debe realizar. Así, podemos observar la existencia de isoenzimas en función de:

- **el tipo de tejido:** Por ejemplo, la lactato deshidrogenasa presenta isozimas distintos en músculo y corazón.
- **el compartimento celular** donde actúa: Por ejemplo, la malato deshidrogenasa del citoplasma es distinta de la de la mitocondria.
- **el momento concreto del desarrollo** del individuo: Por ejemplo, algunos enzimas de la glicolisis del feto son diferentes de los mismos enzimas en el adulto.

CINÉTICA ENZIMÁTICA

Los principios generales de las reacciones químicas se aplican también a las reacciones enzimáticas. Por este motivo, antes de empezar con la cinética química, se van a repasar algunos conceptos básicos de cinética química. A



continuación, se describirán los siguientes conceptos:

- Cinética enzimática
- Modelo cinético de Michaelis-Menten
- Cálculo de la K_M y la V_{max} de un enzima
- Actividad enzimática

CONCEPTOS BÁSICOS DE CINÉTICA QUÍMICA

En una reacción de **orden cero**, la velocidad de formación del producto es independiente de la concentración de sustrato: $v = k$

En una reacción de **primer orden** la velocidad de formación de los productos es directamente proporcional a la concentración del sustrato: $v = k [A]$. Así, en la reacción:



La velocidad de hidrólisis de la sacarosa es, en todo momento, proporcional a la concentración de sacarosa. Dicho matemáticamente, donde $[A]$ es la concentración de sacarosa a cada tiempo (t) y k es la constante de proporcionalidad. Se dice que ésta es una reacción de primer orden.

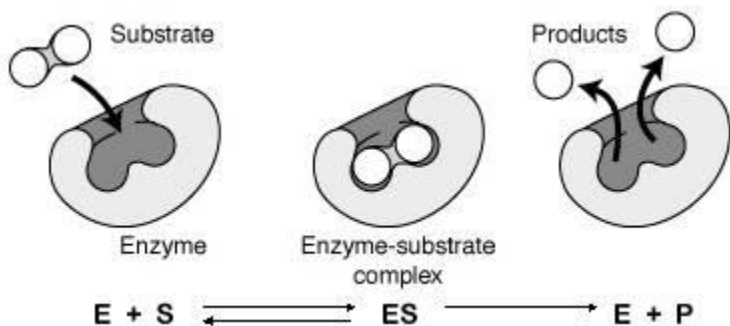
Una reacción de **segundo orden** es aquella en la que la velocidad de formación del producto depende

- de la concentración de dos sustratos (como en una reacción de condensación): $v = k [A_1] [A_2]$
- del cuadrado de la concentración de un único sustrato (reacción de dimerización): $v = k [A]^2$

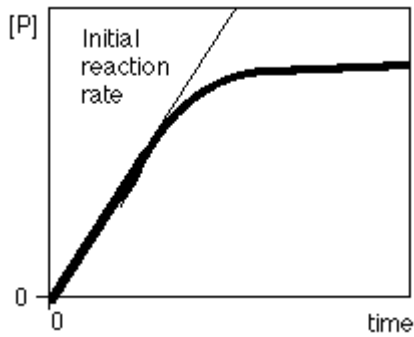
En la tabla siguiente se resumen los distintos tipos de reacción, y la **forma de calcular sus parámetros cinéticos**.

	ORDEN CERO	PRIMER ORDEN	SEGUNDO ORDEN
Expresión diferencial de la velocidad	$-\frac{d[A]}{dt} = k$	$-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot [A]$	$-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot [A]^2$
Ecuación integrada de la velocidad	$[A] = -kt + [A]_0$	$\text{Ln}[A] = -kt + \text{Ln}[A]_0$	$\frac{1}{[A]} = kt + \frac{1}{[A]_0}$
Vida media ($t_{1/2}$)	$\frac{[A]_0}{2k}$	$\frac{0.693}{k}$	$\frac{1}{k[A]_0}$
Representación que da lugar a una recta	$[A]$ vs t	$\text{Ln}[A]$ vs t	$1/[A]$ vs t
Signo de la pendiente	negativo	negativo	positivo
Significado de la pendiente	$-k$	$-k$	k
Significado de la ordenada en el origen	$[A]_0$	$\text{Ln}[A]_0$	$\frac{1}{[A]_0}$
$[A]_0$ es	b	e^b	$1/b$

CINÉTICA ENZIMÁTICA



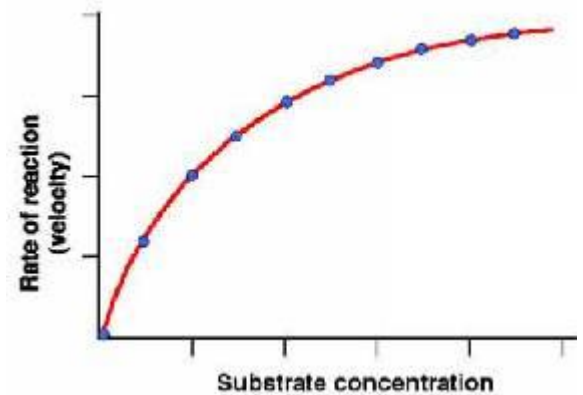
La cinética enzimática **estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas**. Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad del enzima. La velocidad de una reacción catalizada por un enzima puede medirse con relativa facilidad, ya que en muchos casos **no es necesario purificar o aislar el enzima**. La medida se realiza siempre en las **condiciones óptimas** de pH, temperatura, presencia de cofactores, etc, y se utilizan concentraciones saturantes de sustrato. En estas condiciones, la velocidad de reacción observada es la velocidad máxima (V_{max}). La velocidad puede determinarse bien midiendo la aparición de los productos o la desaparición de los reactivos.



Al seguir la velocidad de aparición de producto (o de desaparición del sustrato) en función del tiempo se obtiene la llamada **curva de avance de la reacción**, o simplemente, la cinética de la reacción. A medida que la reacción transcurre, la velocidad de acumulación del producto va disminuyendo porque se va consumiendo el sustrato de la reacción (Figura de la derecha). Para evitar esta complicación se procede a **medir la velocidad inicial de la reacción** (v_0). La velocidad inicial de la reacción es igual a la pendiente de la curva de avance a tiempo cero (Figura de la derecha). De esta forma, la medida de v_0 se realiza antes de que se consuma el 10% del total del sustrato, de forma que pueda **considerarse la [S] como esencialmente constante** a lo largo del experimento. Además, en estas

condiciones **no es necesario considerar la reacción inversa**, ya que la cantidad de producto formada es tan pequeña que la reacción inversa apenas ocurre. De esta forma se simplifican enormemente las ecuaciones de velocidad.

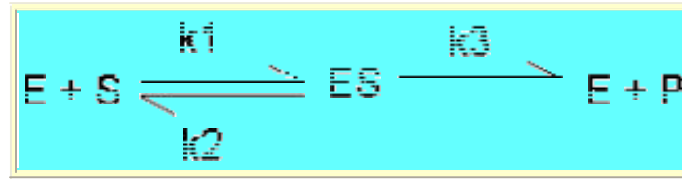
Para estudiar la cinética enzimática se mide el **efecto de la concentración inicial de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción**, manteniendo la cantidad de enzima constante. Si representamos v_0 frente a $[S]_0$ obtenemos una gráfica como la de la Figura de la derecha. **Cuando $[S]_0$ es pequeña**, la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de sustrato, y por tanto, **la reacción es de primer orden**. **A altas $[S]_0$** , el enzima se encuentra saturada por el sustrato, y la velocidad ya no depende de $[S]_0$. En este punto, **la reacción es de orden cero** y la velocidad es máxima (V_{max}).



MODELO CINÉTICO DE MICHAELIS-MENTEN Los estudios sistemáticos del efecto de la concentración inicial del sustrato sobre la actividad enzimática comenzaron a realizarse a finales del siglo XIX. Ya en 1882 se introdujo el concepto del complejo enzima-sustrato como intermediario del proceso de catálisis enzimática. En 1913, **Leonor Michaelis** (foto de la izquierda) y **Maud Menten** (foto de la derecha) **desarrollaron esta teoría** y propusieron una ecuación de velocidad que explica el comportamiento cinético de los enzimas.

Para explicar la relación observada entre la velocidad inicial (v_0) y la concentración inicial de sustrato ($[S]_0$) Michaelis y Menten propusieron que las reacciones catalizadas enzimáticamente ocurren **en dos etapas**: En la primera etapa **se forma el complejo enzima-sustrato** y en la segunda, el complejo enzima-sustrato da lugar a la

formación del producto, liberando el enzima libre:



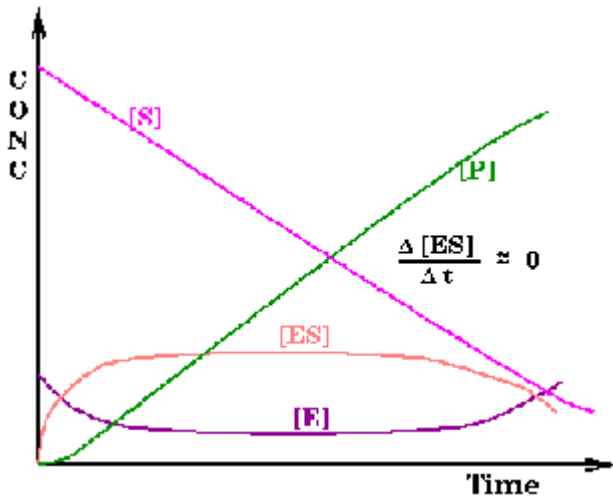
En este esquema, k_1 , k_2 y k_3 son las constantes cinéticas individuales de cada proceso y también reciben el nombre de **constantes microscópicas de velocidad**. Según esto, podemos afirmar que:

- $v_1 = k_1 [E] [S]$
- $v_2 = k_2 [ES]$
- $v_3 = k_3 [ES]$

Se puede distinguir entre **enzima libre** (E) y **enzima unido al sustrato** (ES), de forma que la **concentración total de enzima**, $[E_T]$, (que es constante a lo largo de la reacción) es:

$$[E_T] = [E] + [ES]$$

Como $[E] = [E_T] - [ES]$, resulta que: $v_1 = k_1[S] [E_T] - k_1 [S] [ES]$



Este modelo cinético adopta la **hipótesis del estado estacionario**, según la cual la concentración del complejo enzima-sustrato es pequeña y constante a lo largo de la reacción (Figura de la derecha). Por tanto, la velocidad de formación del complejo enzima-sustrato (v_1) es igual a la de su disociación ($v_2 + v_3$):

$$v_1 = v_2 + v_3$$

Además, como $[ES]$ es constante, la velocidad de formación de los productos es constante:

$$v = v_3 = k_3 [ES] = \text{constante.}$$

Como $v_1 = v_2 + v_3$, podemos decir que:

$$k_1[S] [E_T] - k_1 [S] [ES] = k_2 [ES] + k_3 [ES]$$

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{K_m + [S]}, \text{ siendo } K_m = (k_2 + k_3) / k_1$$

Despejando [ES], queda que: $(k_2+k_3)/k_1$ se ha sustituido por K_M , o **constante de Michaelis-Menten**. Este enlace nos aporta una explicación sobre las razones que hacen de la K_M un parámetro cinético importante.

Por lo tanto, en el estado estacionario, la velocidad de formación del producto es:

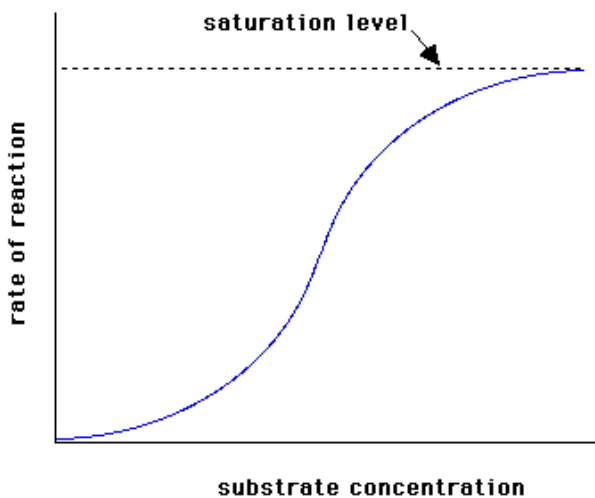
$$v = v_3 = k_3 [ES] = \frac{k_3 [E_T] \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Para cualquier reacción enzimática, $[E_T]$, k_3 y K_M son constantes. Vamos a considerar dos casos extremos:

- **A concentraciones de sustrato pequeñas** ($[S] \ll K_M$) $v = (k_3 [E_T]/K_M) [S]$. Como los términos entre paréntesis son constantes, pueden englobarse en una nueva constante, k_{obs} , de forma que la expresión queda reducida a: $v = k_{obs} [S]$, con lo cual la reacción es un **proceso cinético de primer orden**.
- **A concentraciones de sustrato elevadas** ($[S] \gg K_M$), $v = k_3 [E_T]$. La velocidad de reacción es independiente de la concentración del sustrato, y por tanto, la reacción es un **proceso cinético de orden cero**. Además, tanto k_3 como $[E_T]$ son constantes, y nos permite definir un nuevo parámetro, la **velocidad máxima de la reacción** (V_{max}): $V_{max} = k_3 [E_T]$, que es la velocidad que se alcanzaría cuando todo el enzima disponible se encuentra unido al sustrato.

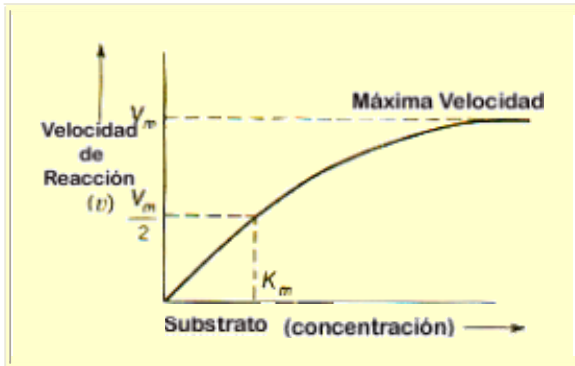
Si introducimos el parámetro V_{max} en la ecuación general de la velocidad, (la fórmula recuadrada anteriormente), obtenemos **la expresión más conocida de la ecuación de Michaelis-Menten**:

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



Hay enzimas que no obedecen la ecuación de Michaelis-Menten. Se dice que su cinética no es Michaeliana. Esto ocurre con los **enzimas alostéricos**, cuya gráfica v frente a $[S]$ no es una hipérbola, sino una sigmoide (Figura de la derecha). En la **cinética sigmoidea**, pequeñas variaciones en la $[S]$ en una zona crítica (cerca de la K_M) se traduce en grandes variaciones en la velocidad de reacción.

CÁLCULO DE LA K_M Y DE LA V_{max} DE UN ENZIMA

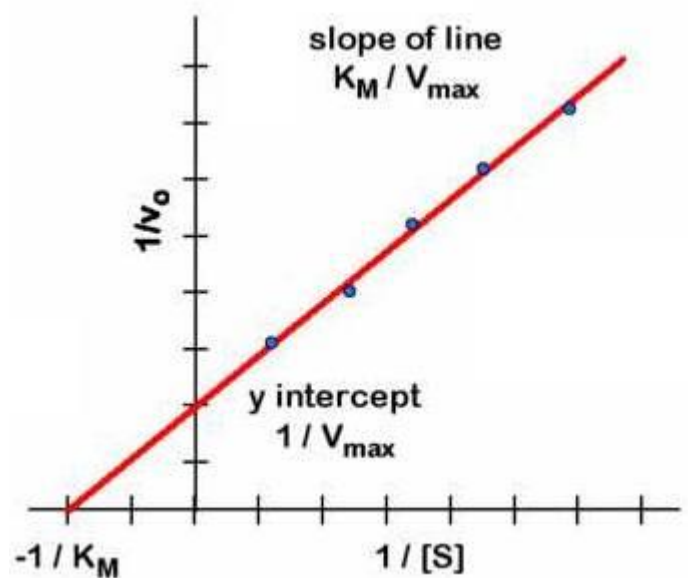


La representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten (v_0 frente a $[S]_0$) es una hipérbola (Figura de la izquierda). La V_{max} corresponde al valor máximo al que tiende la curva experimental, y la K_M corresponde a la concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la V_{max} .

Para determinar gráficamente los valores de K_M y V_{max} es más sencillo utilizar la **representación doble recíproca** ($1/v_0$ frente a $1/[S]_0$), ya que es una línea recta. Esta representación doble recíproca recibe el nombre de **representación de Lineweaver-Burk** (Figura de la derecha). Es una recta en la cual:

- La pendiente es K_M/V_{max}
- La abscisa en el origen ($1/v_0 = 0$) es $-1/K_M$
- La ordenada en el origen ($1/[S]_0 = 0$) es $1/V_{max}$

De esta forma, a partir de los datos experimentales se puede calcular gráficamente, los valores de K_M y V_{max} de un enzima para diversos sustratos.



ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

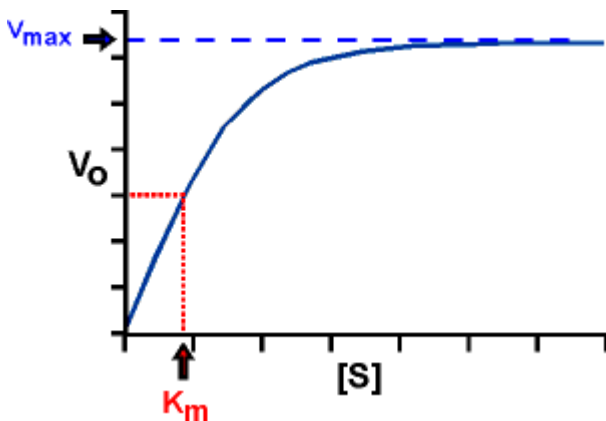
Se define la **unidad de actividad enzimática** (U) como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato en un minuto. La actividad específica es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg prot) o por mililitro de disolución (U/ml).

Recientemente, el Sistema Internacional de unidades (SI) ha definido la unidad de actividad enzimática como la

cantidad de enzima que transforma 1 mol de sustrato por segundo. Esta unidad se llama **katal** (kat). Como 1 mol son 10^6 μ moles y 1 minuto son 60 segundos, resulta que 1 katal equivale a 60×10^6 U. Esta unidad es muy grande, de forma que se utilizan frecuentemente los submúltiplos como el microkatal (μ kat, 10^{-6} kat) o el nanokatal (nkat, 10^{-9} kat).

Cuando se conoce el peso molecular del enzima puro y el número de centros activos por molécula de enzima, las medidas de actividad enzimática permiten calcular **el número de recambio** del enzima, o sea, el número de reacciones elementales que realiza el enzima por cada centro activo y por unidad de tiempo.

MOTIVOS QUE HACEN DE K_M UN PARÁMETRO CINÉTICO IMPORTANTE



La constante de Michaelis-Menten (K_M) es un parámetro cinético importante por múltiples razones:

- K_M es la **concentración de sustrato para la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima**. En efecto, si $K_M = [S]$, la ecuación de Michaelis-Menten se reduce a: $v = V_{max}/2$.
- El valor de K_M **da idea de la afinidad del enzima por el sustrato: A menor K_M , mayor afinidad del enzima por el sustrato, y a mayor K_M , menor afinidad**. Este hecho tiene fácil explicación si tenemos en cuenta que K_M se define como (k_2+k_3/k_1) , donde las reacciones 2 y 3 destruyen el

complejo ES, mientras que la reacción 1 lo forma. Así, si K_M es grande, el complejo ES es inestable pues predomina la tendencia a destruirlo (poca afinidad hacia el sustrato), y si K_M es pequeña, el complejo ES es estable, ya que predomina la tendencia a formarlo (gran afinidad hacia el sustrato).

- La **K_M del sustrato natural es menor que la de los sustratos análogos**. Si dos sustratos del mismo enzima tienen distinta K_M , el que presente mayor K_M tiene menor afinidad por el enzima, y la reacción transcurre siempre a menor velocidad que con el sustrato de menor K_M , salvo a concentraciones saturantes de sustrato, donde la $v = V_{max}$.
- Los **valores de K_M de muchos enzimas son próximos a los de la concentración fisiológica de sus sustratos**, de forma que pequeñas variaciones en la $[S]$ pueden suponer grandes cambios en la velocidad de toda una ruta metabólica.