

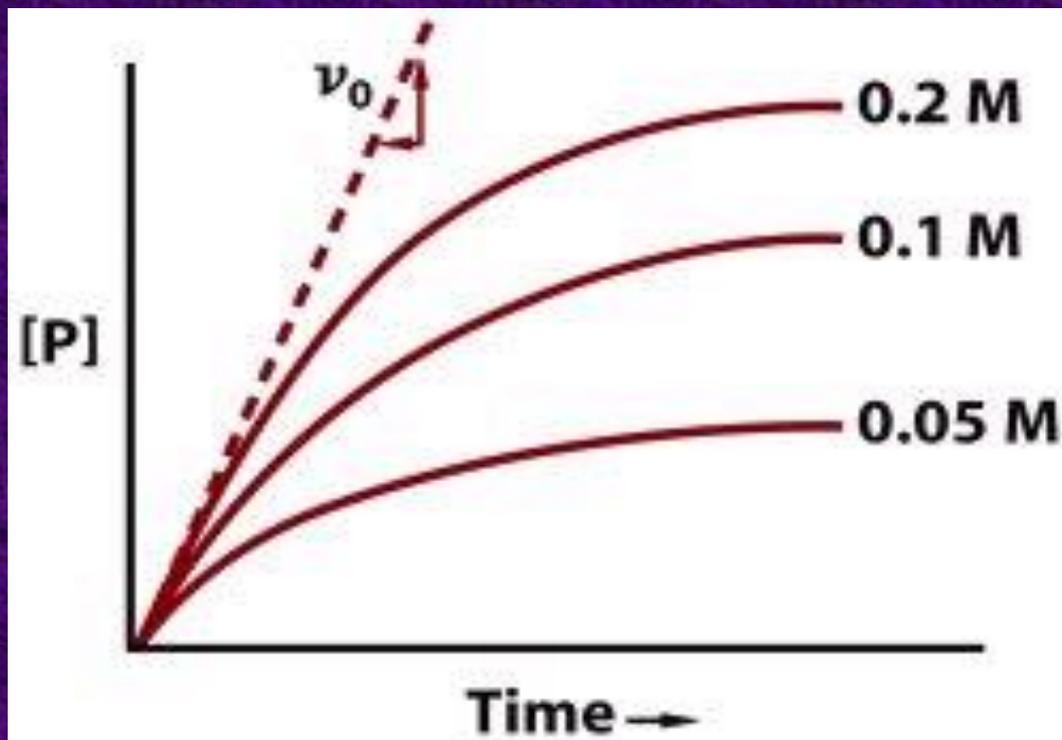
CINETICA ENZIMATICA

**ESTUDIA LA VELOCIDAD DE LAS
REACCIONES BIOQUÍMICAS**

Es la medida de la formación de producto o la desaparición de sustrato por unidad de tiempo.



Velocidad de una reacción se muestra a través de la construcción de un gráfico perfil de velocidad expresando la concentración de producto y el tiempo transcurrido



La pendiente de las tangentes a la curva que representa el perfil de velocidad, proporciona la velocidad de la reacción en ese punto, V_t , la velocidad cambia constantemente, es 0 en el equilibrio.

- La velocidad en cada punto es la pendiente de la recta tangente
- La velocidad de la reacción $S \longrightarrow P$

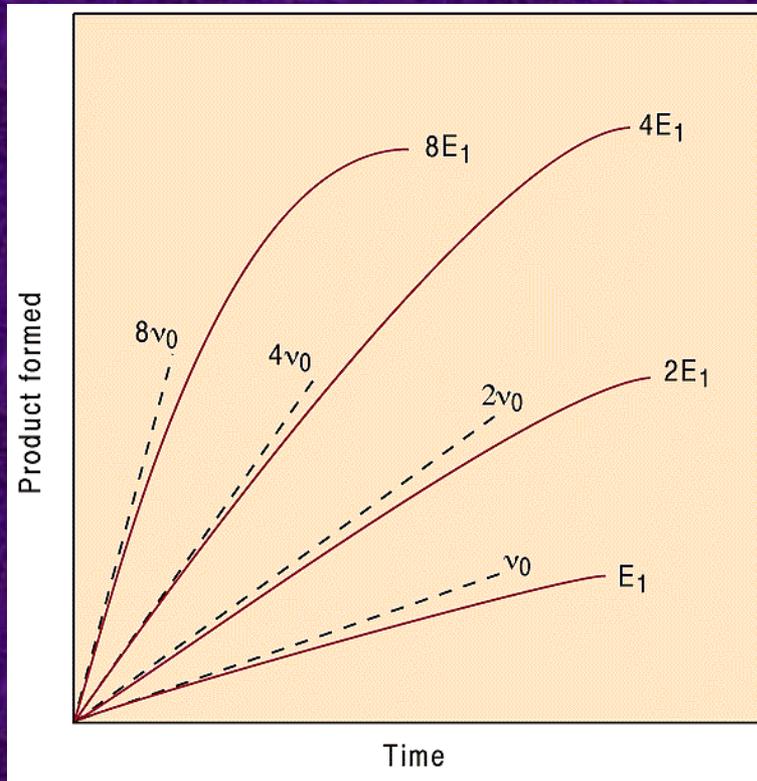
Se expresa:

$$\frac{-\delta [S]}{\delta t} = \frac{\delta [P]}{\delta t} = k [S]^n$$

$$v = k [S]^n$$

La ecuación de velocidad indica que la velocidad inicial de una reacción va a depender de la concentración inicial de reactivos [S] elevada a la potencia n, multiplicada por una constante k o constante de velocidad.

La velocidad es proporcional a la concentración de la enzima:



Se observan diferentes perfiles de velocidad en función de concentraciones crecientes de enzima, en las que hay una cantidad de sustrato suficiente para saturar la enzima a cualquier concentración a la que se encuentre.

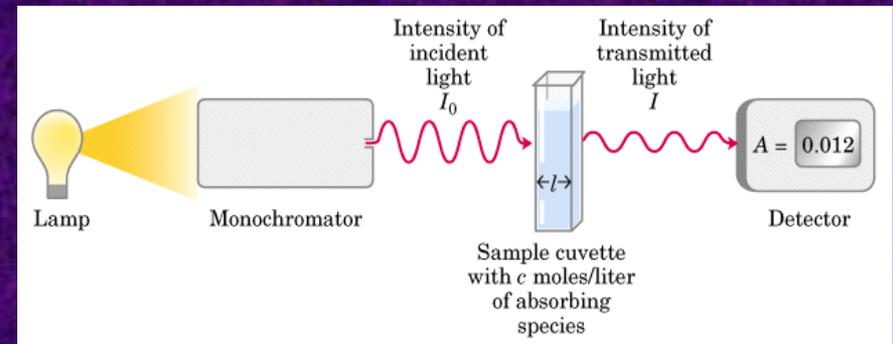
La velocidad se duplica cada vez que lo hace la concentración de enzima

Debido a que la concentración de sustrato no varía, las concentraciones finales de producto serán idénticas,

Pero la concentración final de producto se obtendrá más lentamente con cantidades menor de enzima.

La actividad enzimática se determina cuantitativamente observando el efecto catalítico que produce la enzima. Para lo cual es necesario conocer:

- 1- la ecuación global de la reacción catalítica
- 2- un procedimiento analítico sencillo para determinar la desaparición del sustrato o la aparición de los productos de reacción
- 3- si la enzima necesita de cofactores
- 4- el valor de K_m para el sustrato
- 5- su pH óptimo
- 6- la zona de temperatura en la que muestra actividad elevada y es estable

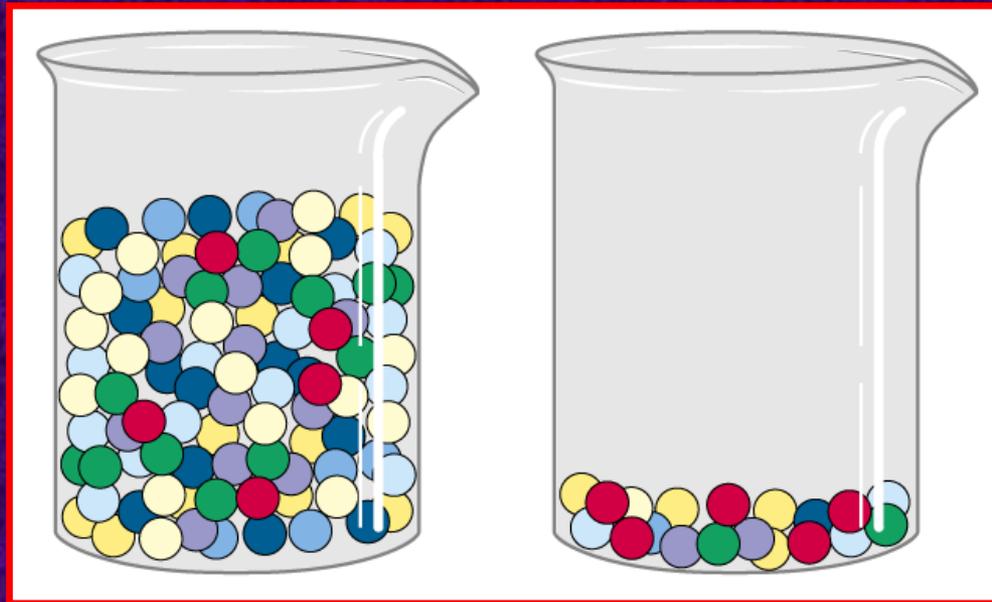


La actividad enzimática se va a expresar en unidades de micromoles de sustrato, convertidos en producto por minuto, en determinadas condiciones de reacción

U: Unidad de actividad enzimática \longrightarrow **$\mu\text{mol}/\text{min}$ a 25°C**

U: actividad que cataliza 1 μmol de sustrato por minuto a 25°C .

Actividad específica: nº de unidades de enzima por miligramo de proteína $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ proteína o **U/mg proteína**



La actividad específica aumenta durante la purificación de una enzima

- **Constante catalítica o n° de recambio** para una enzima determinada:

son las unidades de actividad enzimática por mol de enzima

n° recambio: $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mol de enzima}$

Permite una comparación directa de la capacidad catalítica relativa entre enzimas. Ej: Catalasa es 250 veces más activa que la amilasa

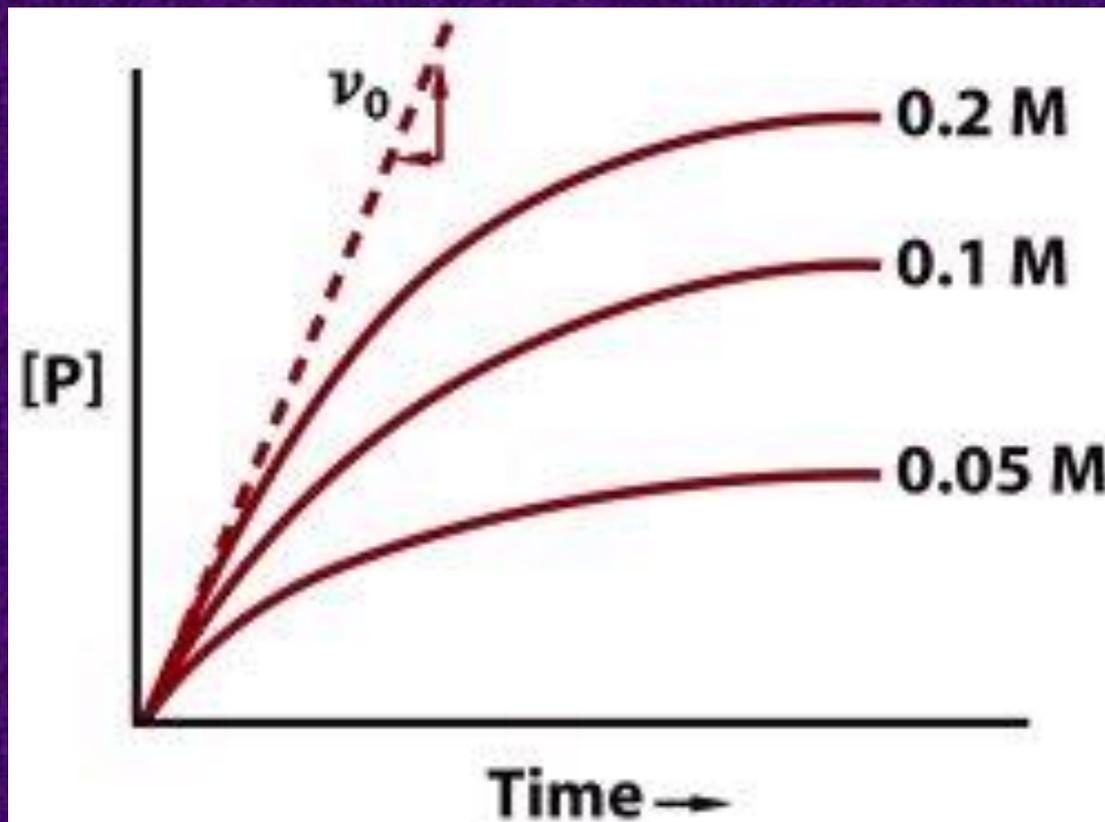
- La comisión de enzimas recomienda:

Katal: mol / seg conversión de un mol de sustrato / seg

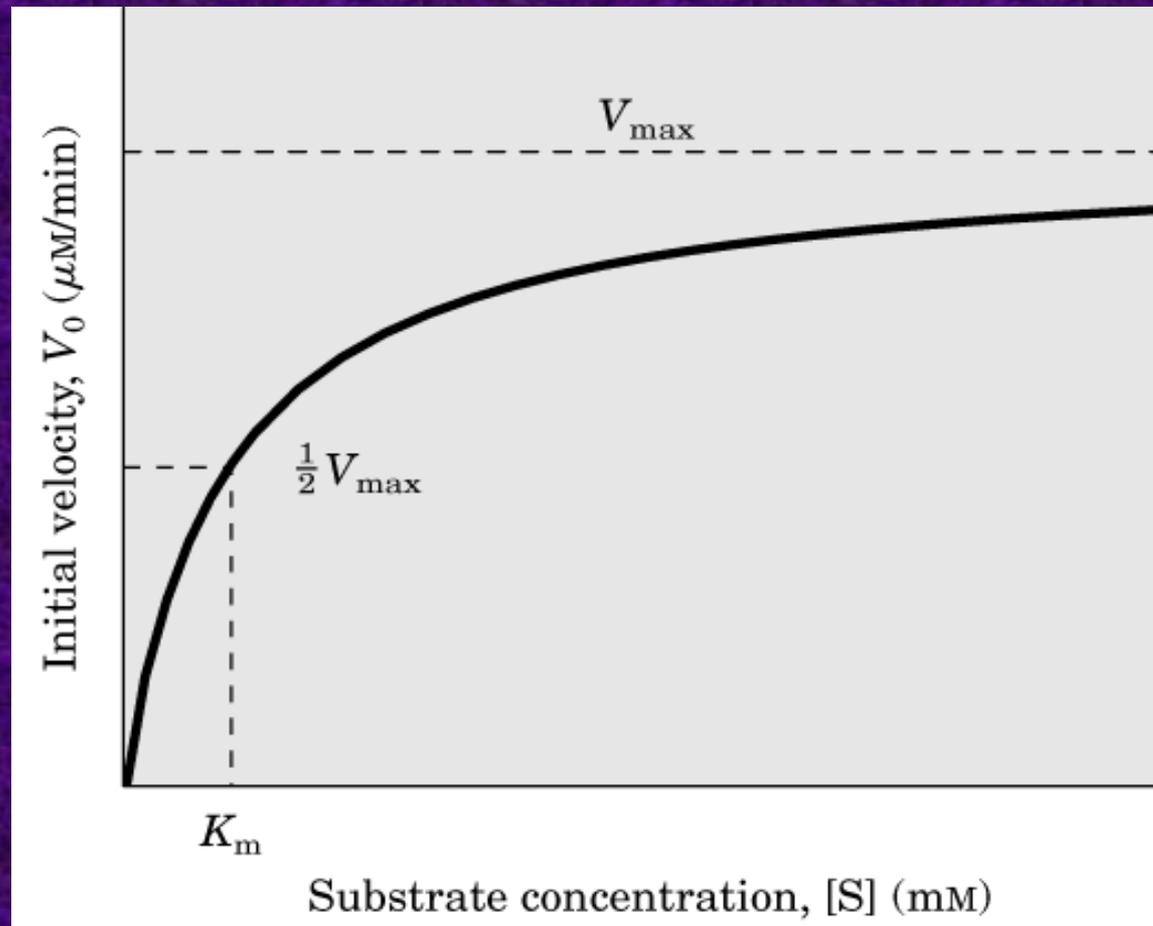
1 Katal = 60.000.000 U

La velocidad inicial V_0 de una reacción catalizada por una enzima va a depender de la concentración de sustrato $[S]$

Si la cantidad de enzima permanece constante, a medida que aumenta la $[S]$, V_0 aumenta hasta que la enzima libre se agota, llegando a saturarse por el sustrato.

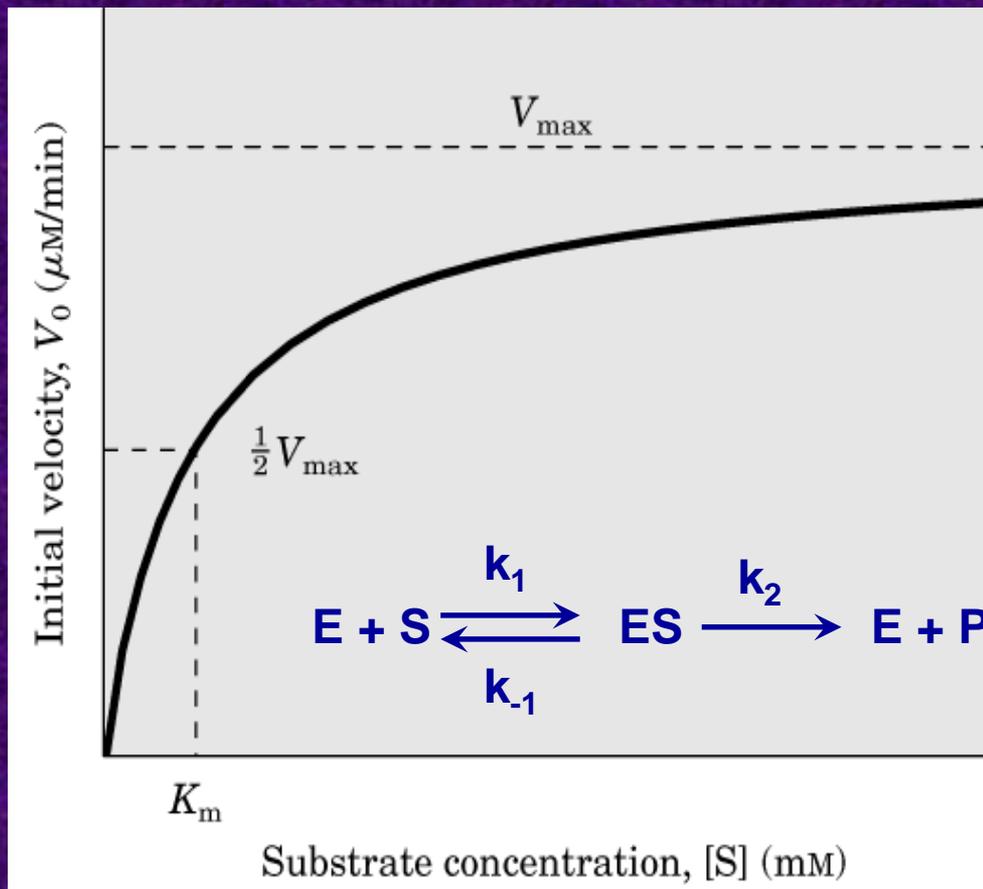


Cuando la concentración de enzima permanece constante, la reacción alcanza un valor máximo en su velocidad inicial cuando todos los centros específicos del sustrato están saturados por la enzima.



Ecuación de Michaelis Menten

La hipérbola característica de la curva de saturación de la enzima por el sustrato. Se expresa matemáticamente por la ecuación:



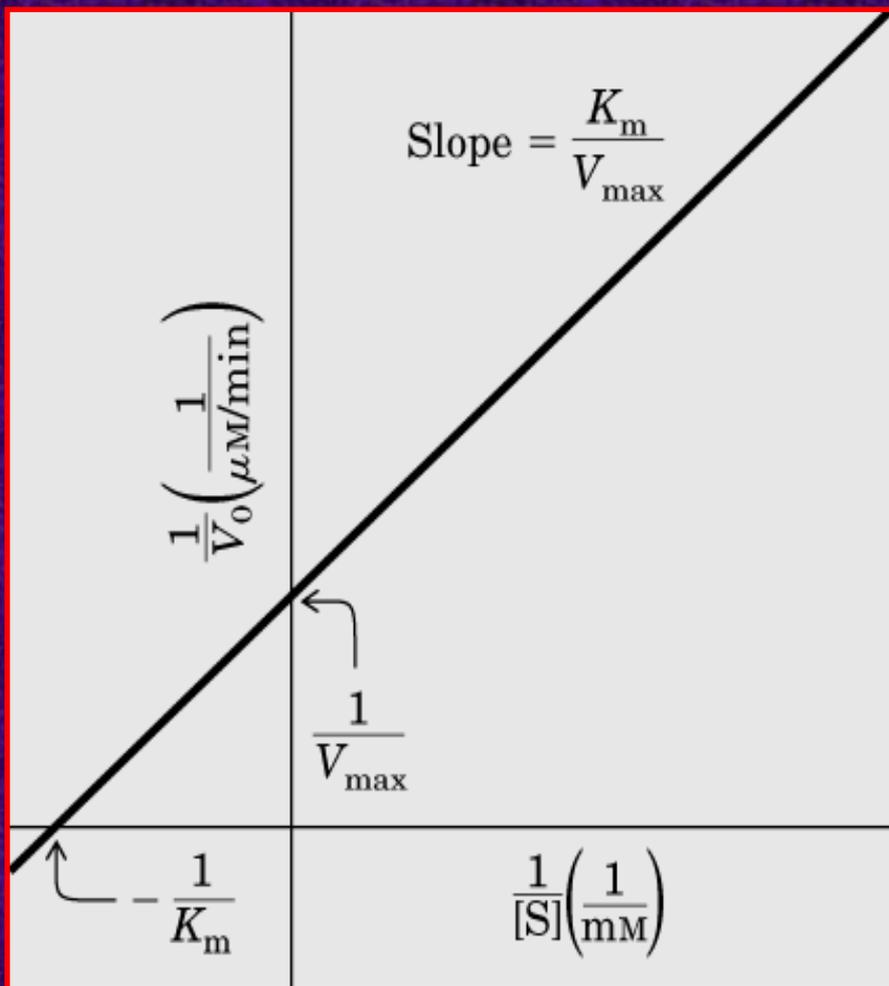
$$v = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_m + [S]}$$

K_m concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es $\frac{1}{2}$ de su velocidad máxima

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

- En las reacciones enzimáticas en que participan más de un sustrato, cada uno de ellos posee su propia K_m
- La K_m representa una medida inversa de la afinidad de la enzima por el sustrato.
- Cuanto mayor es el valor de K_m menor será la afinidad de la enzima por el sustrato.

La forma lineal de la ecuación de Michaelis-Menten se conoce como gráfica de los dobles recíprocos o de Lineweaver-Burk y se utiliza para el cálculo de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} .



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

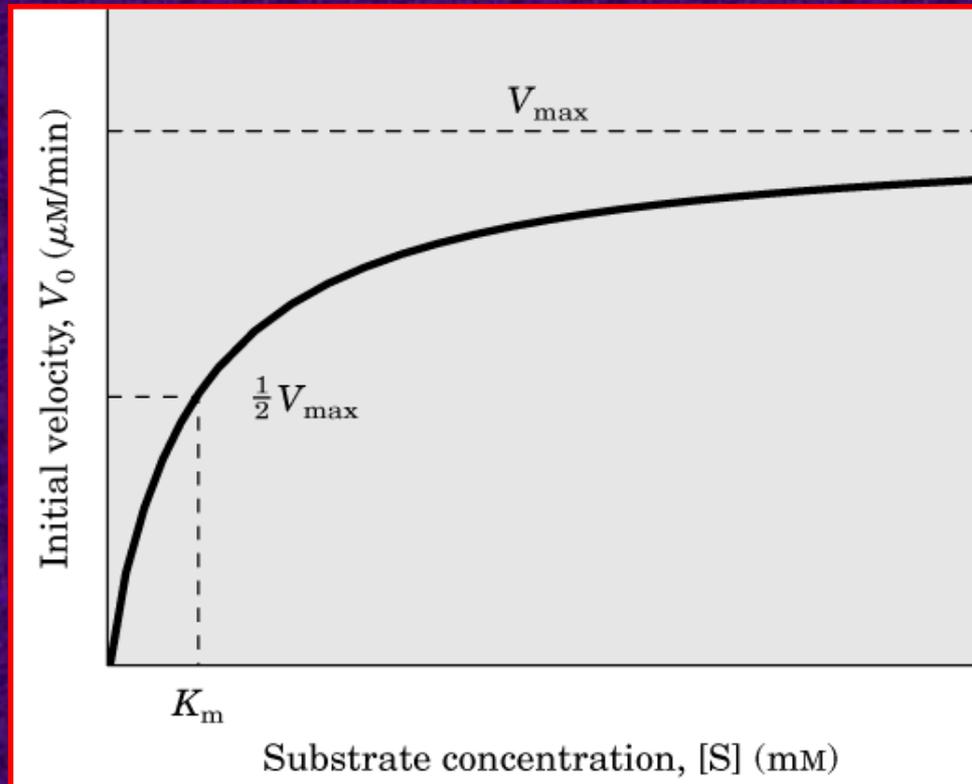
$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{max}[S]}$$

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

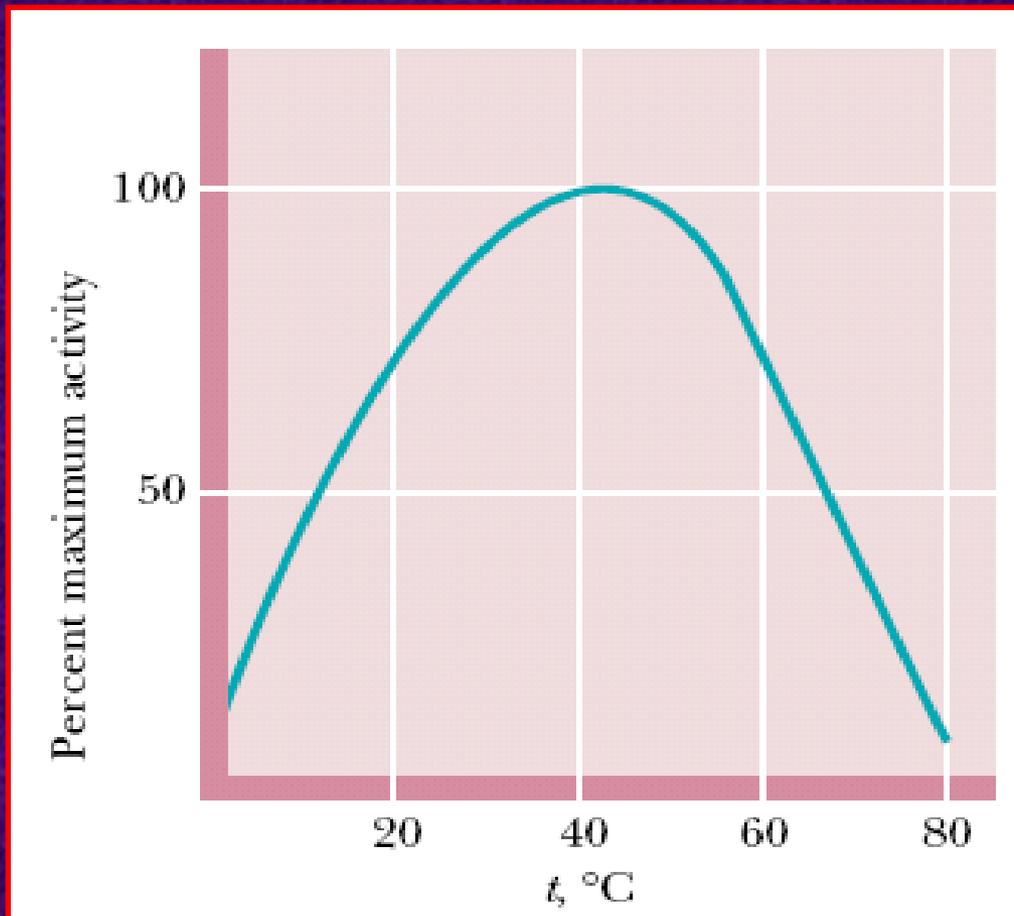
$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Ecuación de Lineweaver-Burk

- Factores que modifican la velocidad de reacción de una enzima:
- **Concentración de sustrato**



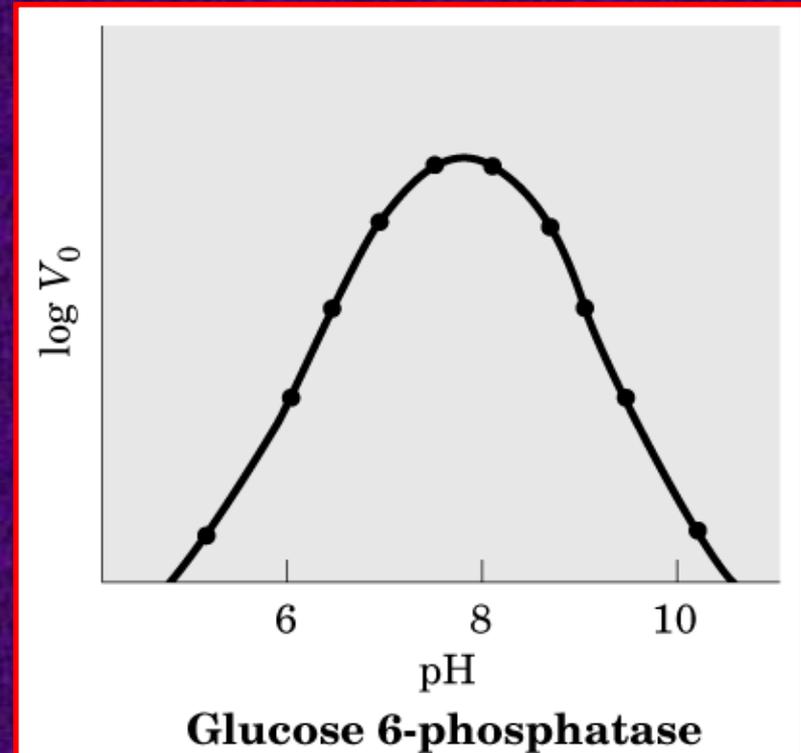
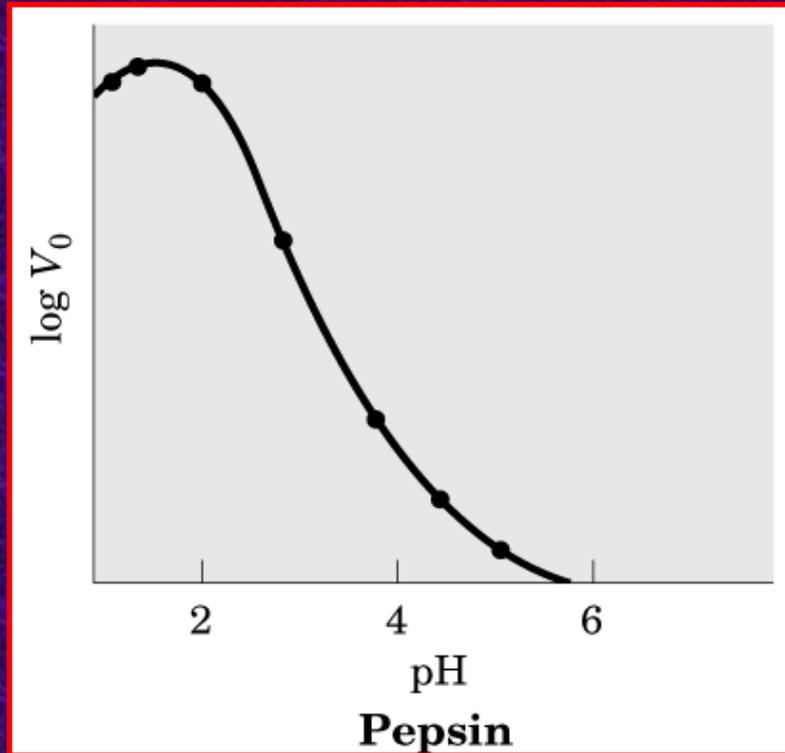
- **Concentración de enzima**
- **Temperatura**
 - Aumenta la energía cinética
 - Algunas son termoestables



Debajo 40°C predomina el aumento de la velocidad con la temperatura

Encima 40°C predomina la desnaturalización térmica de la enzima

pH: Efecto del pH sobre la actividad enzimática



A pH extremos la proteína se desnaturaliza y la **actividad biológica decae**

INHIBIDORES: compuestos que pueden inhibir de forma específica la actividad catalítica y su resultado puede ser reversible o irreversible

Inhibidores irreversibles

Se unen a la enzima a través de un enlace covalente

Inhibidores reversibles

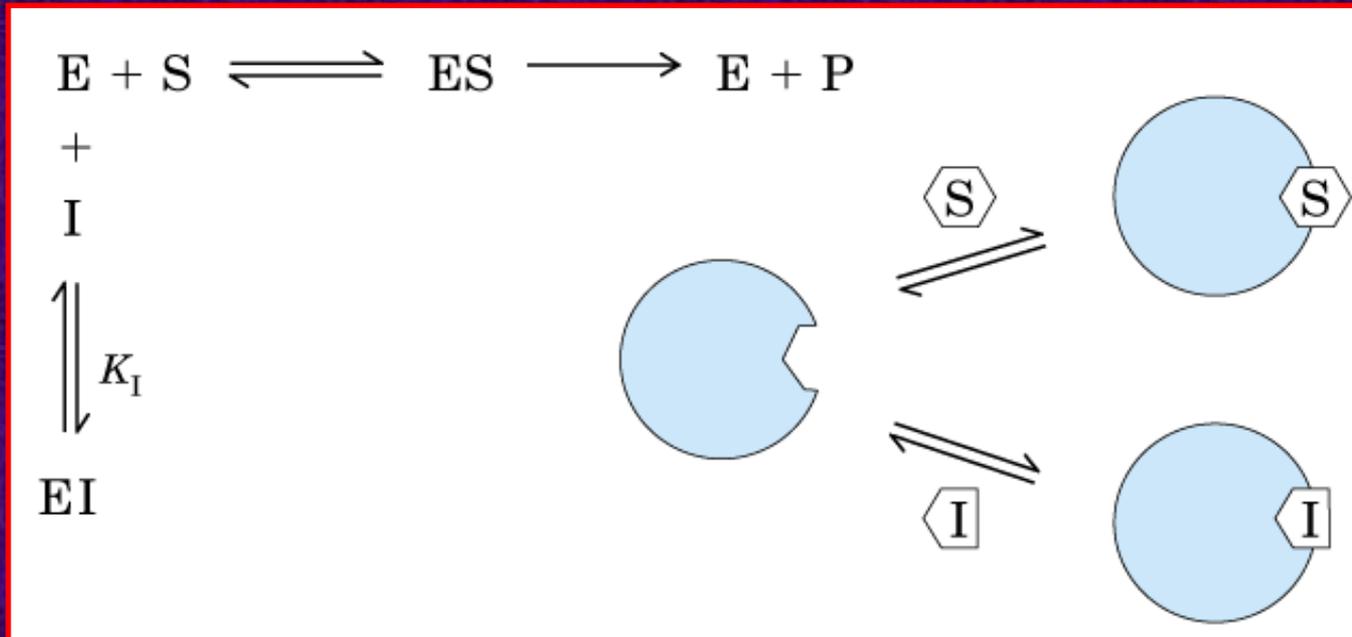
Se unen a la enzima a través de interacciones no covalentes

Inhibidores reversibles

Inhibidores competitivos

Inhibidores no competitivos

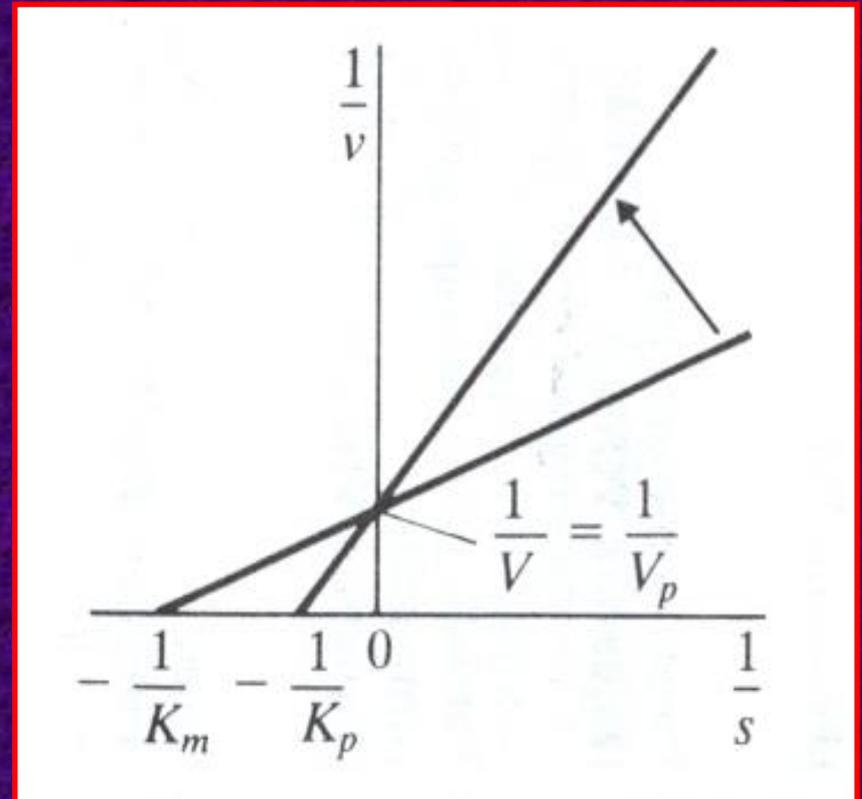
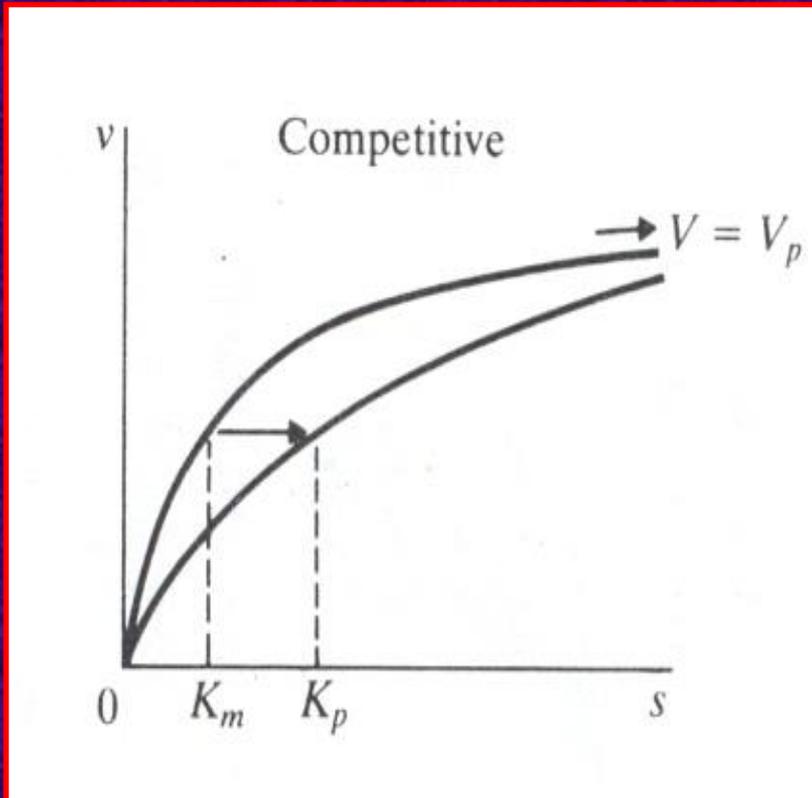
Inhibición competitiva



El inhibidor y el sustrato compiten por el mismo centro activo de la enzima

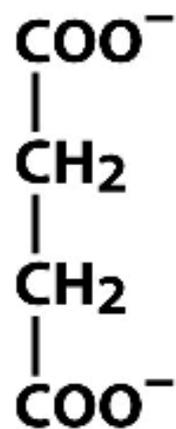
Similitud estructural con el sustrato

Al aumentar la concentración de sustrato se desplaza al inhibidor



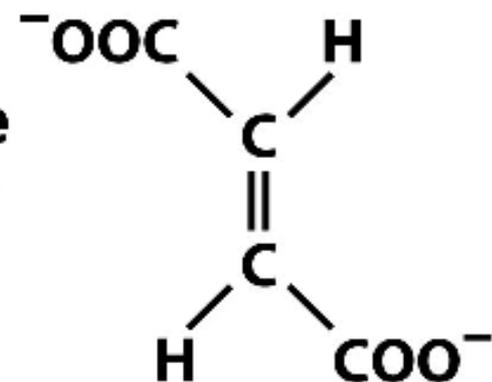
La velocidad máxima permanece constante

El valor de K_m aumenta

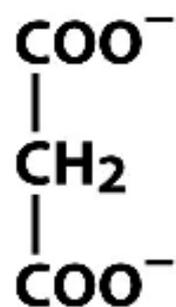


Succinate

succinate dehydrogenase



Fumarate



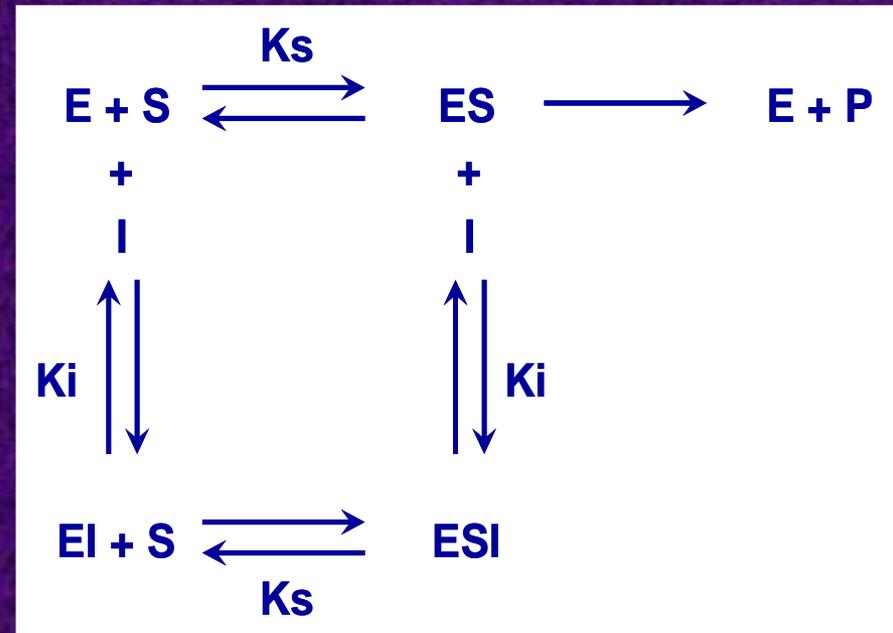
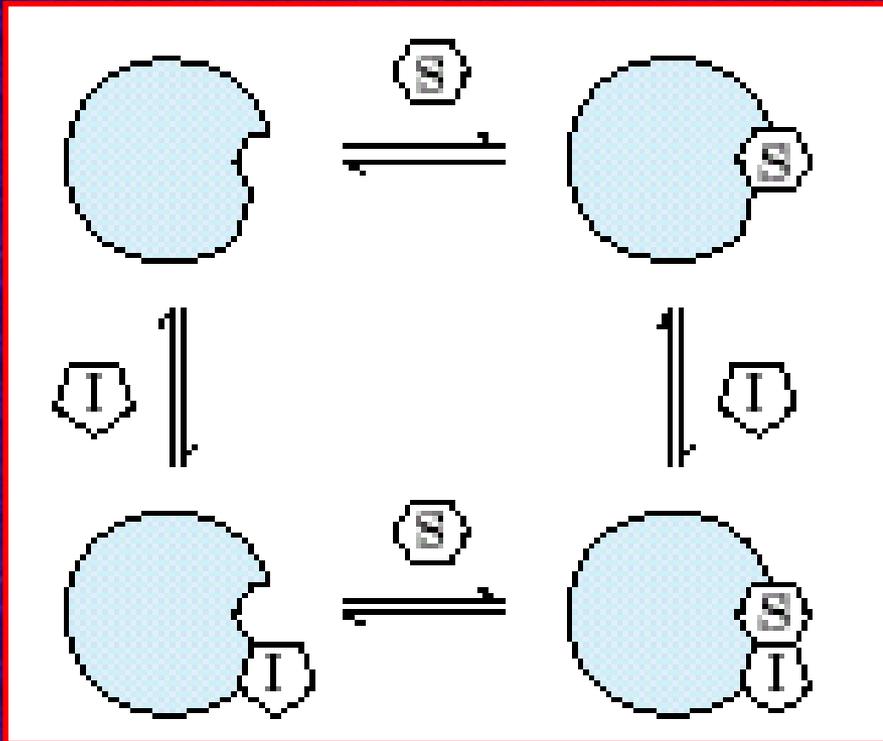
Malonate

succinate dehydrogenase



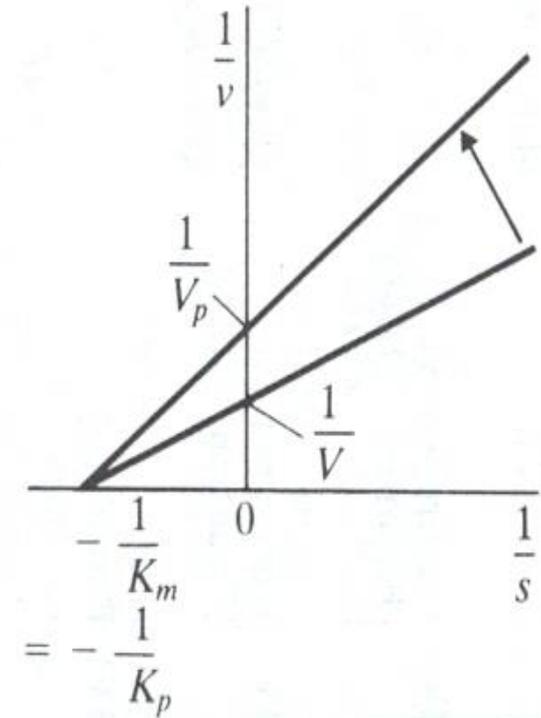
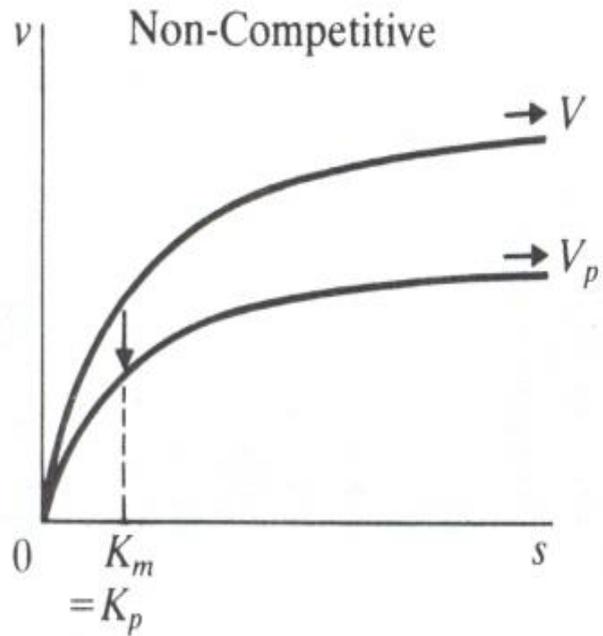
NO REACTION

Inhibición no competitiva



El inhibidor se une en un sitio diferente al sitio activo de la enzima de manera que se puede unir a la enzima o al complejo ES pero en ninguno de los casos obtendremos productos.

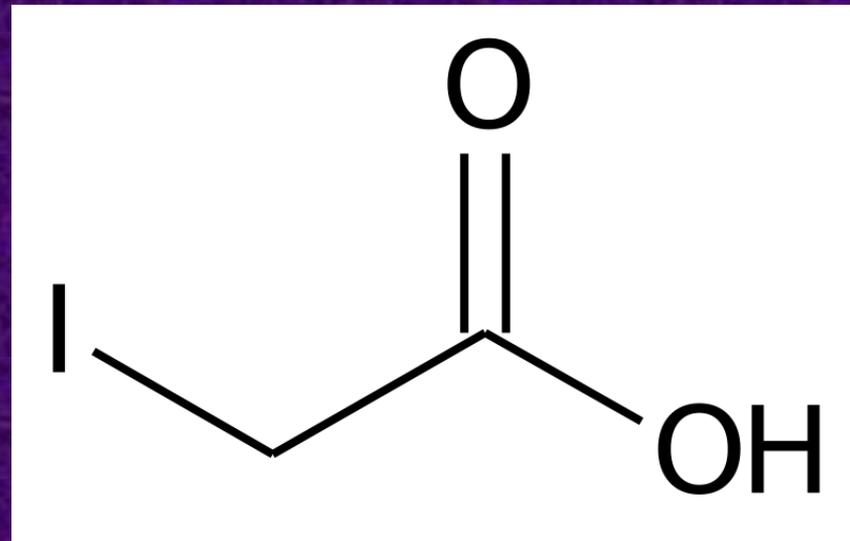
No se revierte por agregado de más sustrato



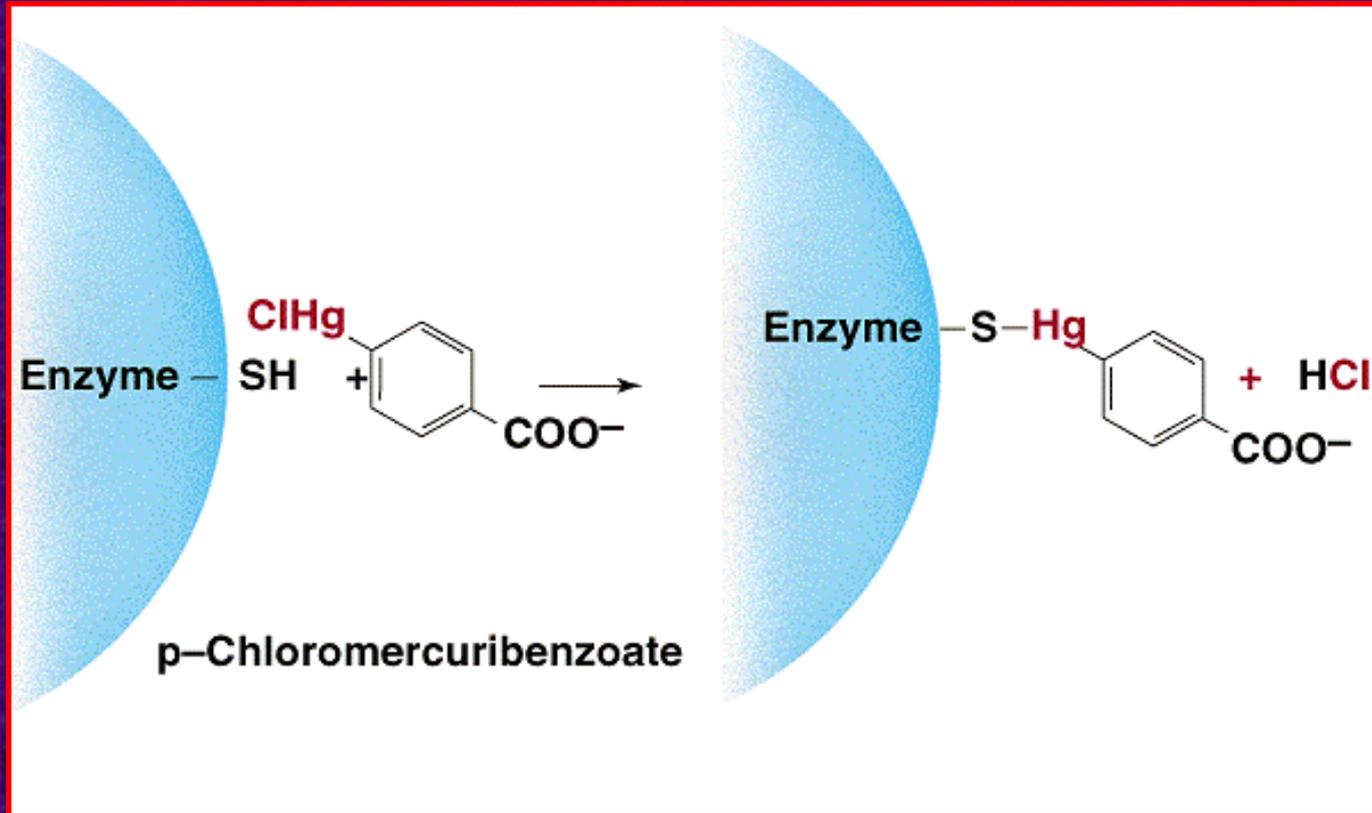
Los inhibidores no competitivos disminuyen la V_{max} de la reacción

K_m permanece constante

Ej. El ácido iodoacético inhibe la transformación de glucosa en ácido láctico a nivel muscular porque compite con la enzima gliceraldehído fosfato deshidrogenasa



Inhibidores irreversibles



Modificación o destrucción de un grupo funcional imprescindible para la actividad enzimática.

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

- Regulación de la concentración de la enzima:

- Síntesis
- Degradación

- Modulación de la actividad de la enzima:

- Regulación alostérica

- **Inhibición del producto final**

Retroalimentación negativa en una ruta metabólica. El producto final Z se acumula e inhibe alguno de los primeros pasos de la ruta. Inhibición competitiva

- **Regulación alostérica**

poseen un sitio alostérico alejado del sitio activo donde se une un activador o un inhibidor

- **Regulación genética**

Se impide el pasaje de ADN → ARN (transcripción) se impide la síntesis de la enzima