

Biotecnología

Bioquímica

Contenidos

Artículos

Cofactor	1
Coenzima	1
Energía libre de Gibbs	3
Nucleófilo	5
Ácidos y bases de Lewis	7
Cinética enzimática	8

Referencias

Fuentes y contribuyentes del artículo	23
Fuentes de imagen, Licencias y contribuyentes	24

Licencias de artículos

Licencia	25
----------	----

Cofactor

Un **cofactor** es un componente no proteico, termoestable y de bajo peso molecular, necesario para la acción de una enzima. El cofactor se une a una estructura proteica denominada apoenzima, y a este complejo se le denomina holoenzima. Entre los cofactores mencionables se encuentran: Iones metálicos (Fe^{2+} , Cu^{2+} , K^+ , Mn^{2+} , Mg^{2+} , entre otros) y moléculas orgánicas. Aquellos cofactores que están fuertemente unidos a la apoenzima son denominados grupos prostéticos; en otros casos los que están unidos débilmente a la apoenzima y actúan fundamentalmente como uno de los sustratos específicos de la reacción, se llaman coenzimas.

El ion metálico puede actuar como:

- Centro catalítico primario.
- Grupo puente para reunir el sustrato y la enzima, formando un complejo de coordinación
- Agente estabilizante de la conformación de la proteína enzimática en su forma catalíticamente activa.

Las enzimas que precisan de iones metálicos se llaman a veces metaloenzimas.

Véase también

- Coenzima
- Grupo prostético

Coenzima

Los **coenzimas** son cofactores orgánicos no proteicos, termoestables, que unidos a una apoenzima constituyen la holoenzima o forma catalíticamente activa de la enzima. Tienen en general baja masa molecular (al menos comparada con la apoenzima) y son claves en el mecanismo de catálisis, por ejemplo, aceptando o donando electrones o grupos funcionales, que transportan de un enzima a otro.

A diferencia de las enzimas, las coenzimas se modifican y consumen durante la reacción química; por ejemplo, el NAD^+ se reduce a NADH cuando acepta dos electrones (y un protón) y por tanto se agota; cuando el NADH libera sus electrones se recupera el NAD^+ , que de nuevo puede actuar como coenzima.

Mecanismo de acción de las coenzimas

El mecanismo de acción básico de las coenzimas es el siguiente:

1. La coenzima se une a un enzima.
2. La enzima capta su sustrato específico.
3. La enzima ataca a dicho sustrato, arrancándole algunos de sus átomos.
4. La enzima cede a la coenzima dichos átomos provenientes del sustrato.
5. La coenzima acepta dichos átomos y se desprende de la enzima.
6. La coenzima transporta dichos átomos y acaba cediéndolos, recuperando así su capacidad para aceptar nuevos átomos.

Este último paso es esencial para no agotar la dotación de coenzimas de una célula ya que las enzimas junto con las que actúa no pueden realizar la reacción química sin el concurso de su coenzima.

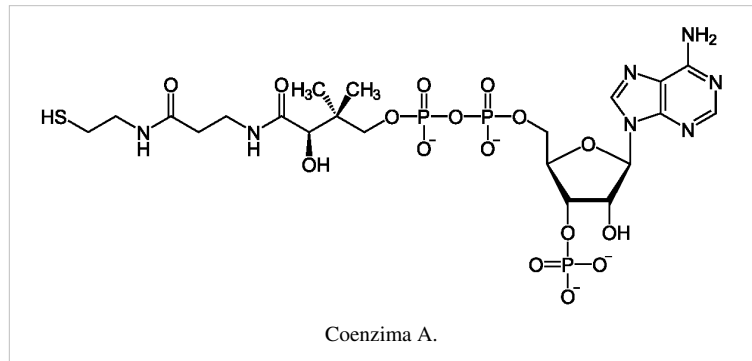
Algunas coenzimas están fuerte y permanentemente unidas a su enzima, constituyendo en la práctica un grupo prostético; tal es el caso del FMN a la enzima NADH deshidrogenasa o el FAD a la succinato deshidrogenasa.

Cada coenzima está especializada en aceptar y transportar un tipo de átomos determinado; unos aceptan hidrógenos, otros grupos acetilo, amino, etc. No obstante, las coenzimas no son nada específicas respecto a las enzimas a las que

se unen, de modo que una misma coenzima puede unirse a un gran número de enzimas distintas y es por ello que el número de coenzimas diferentes es relativamente bajo.

Principales coenzimas

- FAD (flavín-adenín dinucleótido): transferencia de electrones y protones.
- FMN (Flavín mononucleótido): transferencia de electrones y protones.
- NAD⁺ (nicotín-adenín dinucleótido): transferencia de electrones y protones.
- NADP⁺ (nicotín-adenín dinucleótido fosfato): transferencia de electrones y protones.
- Coenzima A: transferencia de grupos acetilo (por ejemplo, en la descarboxilación del ácido pirúvico) y de grupos acilo en general.
- Coenzima Q: transferencia de electrones en la cadena respiratoria.
- Coenzima B₁₂: transferencia de grupos metilo o hidrógenos entre moléculas.
- TPP (Pirofosfato de tiamina): transferencia de grupos aldehído; forma parte, entre otros, del complejo piruvato deshidrogenasa.
- Vitamina C
- PLP (fosfato de piridoxal): transferencia de grupos amino.
- PMP (fosfato de piridoxamina): transferencia de grupos amino.
- FH₄ (ácido tetrahidrofólico): transferencia de grupos formilo, metenilo y metileno.
- Biotina: transferencia de dióxido de carbono.
- Ácido lipoico: transferencia de hidrógenos, grupos acilo y metilamina.



Coenzimas y vitaminas

Muchas vitaminas, o sus derivados, actúan como coenzimas:

- Vitamina B1 o tiamina: su derivado, el pirofosfato de tiamina es esencial para el metabolismo energético de los glúcidos.
- Vitamina B2 o riboflavina: sus derivados son nucleótidos coenzimáticos con gran poder reductor como el FAD y el FMN.
- Vitamina B3 o niacina: sus derivados son nucleótidos coenzimáticos con gran poder reductor como el NAD⁺ o el NADP⁺.
- Vitamina B5 o ácido pantoténico: su principal derivado es la coenzima A (Co-A), con gran importancia en diversos procesos metabólicos.
- Vitamina B6 o piridoxina. Sus principales derivados son los coenzimas PLP (fosfato de piridoxal) y PMP (fosfato de piridoxamina), esenciales en el metabolismo de los aminoácidos.
- Vitamina B7 o biotina (vitamina H). Su derivado, la biocitina, es esencial para el funcionamiento de numerosas carboxilasas (enzimas).
- Vitamina B9 o ácido fólico (vitamina M). Su derivado, el FH₄ es esencial en la síntesis de purinas.
- Vitamina B12 o cianocobalamina: coenzima B₁₂.
- Vitamina E y Vitamina K: químicamente similares al coenzima Q.

Véase también

- Cofactor
- Grupo prostético

Enlaces externos

- Coenzima .com ^[1] - Información sobre coenzimas

Referencias

[1] <http://www.coenzima.com/>

Energía libre de Gibbs

En termodinámica, la **energía libre de Gibbs** o **entalpía libre** es un potencial termodinámico, es decir, una función de estado extensiva con unidades de energía, que da la condición de equilibrio y de espontaneidad para una reacción química (a presión y temperatura constantes).

La segunda ley de la termodinámica postula que una reacción química espontánea hace que la entropía del universo aumente, $\Delta S_{\text{universo}} > 0$, así mismo $\Delta S_{\text{universo}}$ esta en función de $\Delta S_{\text{sistema}}$ y $\Delta S_{\text{alrededores}}$. Por lo general sólo importa lo que ocurre en el sistema en estudio y; por otro lado el cálculo de $\Delta S_{\text{alrededores}}$ puede ser complicado.

Por esta razón fue necesario otra función termodinámica, la **energía libre de Gibbs**, que sirva para calcular si una reacción ocurre de forma espontánea tomando en cuenta solo las variables del sistema.

Cálculo de la energía libre de Gibbs

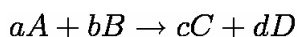
Los cambios en la energía libre

Contenido de calor; T es la temperatura y S es la entropía del sistema. Fue desarrollada en los años 1870 por el físico-matemático estadounidense Williard Gibbs.

Cambios de energía libre estándar

La energía libre de reacción, se denota, $\Delta G_{\text{reaccion}}$, es el cambio de energía en una reacción a condiciones estándares. En esta reacción los reactivos en su estado estándar se convierten en productos en su estado estándar.

Dada la siguiente ecuación química:



La energía libre se calcula como

$$\Delta G_{\text{reaccion}} = (c\Delta G_{f(C)} + d\Delta G_{f(D)}) - (a\Delta G_{f(A)} + b\Delta G_{f(B)})$$

Donde A y B son los reactivos en estado estándar y; C y D son los productos en su estado estándar. Además a, b, c y d son sus respectivos coeficientes estequiométricos. En general:

$$\Delta G_{\text{reaccion}} = \sum n\Delta G_{f(\text{productos})} - \sum m\Delta G_{f(\text{reactivos})}$$

donde m y n son los coeficientes estequiométricos.

Así como en el cálculo de la entalpía, en la energía libre estándar de formación para cualquier elemento en su forma estable (1 atm y 25°C) es 0

La variación de energía libre de Gibbs para un proceso a temperatura constante viene dada por:

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

La temperatura puede ser un factor determinante a la hora de hacer que un proceso sea espontáneo o no lo sea.

Significado de ΔG

- La condición de equilibrio es $\Delta G = 0$
- La condición de espontaneidad es $\Delta G < 0$
- El proceso no es espontáneo cuando: $\Delta G > 0$

(esta última condición nos dice que la reacción no se producirá).

La energía de Gibbs molar parcial, es lo que se conoce con el nombre de potencial químico, que es lo que se maneja en cálculos termodinámicos en equilibrio, ya que el equilibrio químico entre dos sistemas implica la igualdad de potenciales químicos y su uso facilita los cálculos.

Demostración matemática

Partimos de:

$$\Delta S_{universo} = \Delta S_{sistema} + \Delta S_{alrededores}$$

como:

$$\Delta S_{alrededores} = \frac{-\Delta H_{sistema}}{T}$$

Reemplazando:

$$\Delta S_{universo} = \Delta S_{sistema} - \frac{\Delta H_{sistema}}{T}$$

Multiplicando por T:

$$T \cdot \Delta S_{universo} = T \cdot \Delta S_{sistema} - \Delta H_{sistema}$$

Es decir:

$$\Delta G_{sistema} = \Delta H_{sistema} - T \cdot \Delta S_{sistema}$$

Unidades

Al ser una magnitud extensiva, es decir, que depende de la cantidad de sistema, normalmente se va a referir en unidades de energía por unidad de cantidad de materia. En el Sistema Internacional de Unidades se utiliza el kJ/mol, aunque también se puede utilizar kcal/mol. Esta energía sin lugar a dudas tiene una gran aplicabilidad en todos los campos de la termodinámica, y no debemos olvidar el término del ciclo de Carnot.

Véase también

- Termodinámica
- Entalpía
- Reacción química
- Termoquímica

Enlaces externos

- Más información sobre el equilibrio químico ^[1]

Referencias

[1] http://www.netcom.es/pilar_mu/equilibrio.htm

Nucleófilo

En química un **nucleófilo** (*amante de núcleos*) es una especie que reacciona cediendo un par de electrones libres a otra especie (el electrófilo), combinándose y enlazándose covalentemente con ella. Un nucleófilo, concepto cinético, es también por definición una base de Lewis, concepto termodinámico. Un nucleófilo puede ser un anión o una molécula neutra con un par de electrones libres.

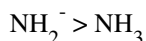
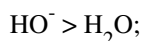
Los *nucleofilos ambidentados* son aquellos que tienen dos posibles centros de reacción. Por ejemplo el tiocianato (SCN⁻).

Nucleofilia

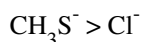
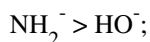
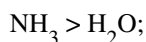
La *nucleofilia* es la fuerza como nucleófilo de una especie. Es un concepto cinético, por tanto se mide comparando constantes de velocidad. En la nucleofilia influyen la carga, la basicidad, la polarizabilidad e impedimentos estéricos del nucleófilo y la naturaleza del disolvente. Intuitivamente, en general, la nucleofilia aumenta con la carga negativa, la basicidad y la polarizabilidad y disminuye por impedimento estérico y con la mayor solvatación (mejor un disolvente polar aprótico).

Para entenderlo mejor unos ejemplos:

- Efecto de la carga:

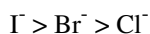


- Efecto de la basicidad:



Podemos ver en estos ejemplos como la nucleofilia disminuye hacia la derecha de la tabla periódica.

- Efecto de la polarizabilidad y del disolvente:



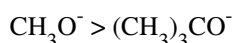
El anión yoduro con una "nube electrónica" más voluminosa es más polarizable. El anión cloruro más pequeño además es solvatado mejor por el disolvente.

- El efecto de la polarizabilidad, del tamaño del átomo nucleófilo, se observa claramente en especies neutras donde el efecto de la solvatación no es tan importante como en las especies cargadas:



Podemos ver con este ejemplo como la nucleofilia aumenta al descender por la tabla periódica.

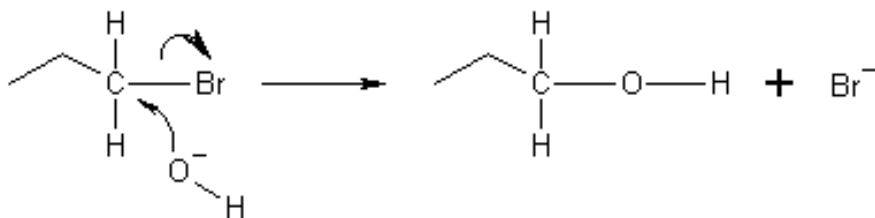
- El efecto del impedimento estérico:



Reactividad

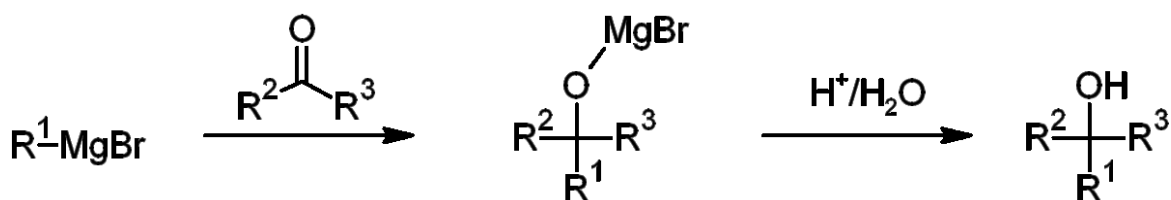
Sustitución nucleófila

En este tipo de reacciones un átomo o grupo es sustituido en el sustrato por el nucleófilo. Por ejemplo la reacción de un haluro de alquilo primario con el ion hidróxido:



Adición nucleófila

El nucleófilo se adiciona a un grupo electrófilo. Por ejemplo la reacción de los reactivos de Grignard con cetonas:



Ejemplos

Nucleófilos de carbono

Lo son reactivos organometálicos como los reactivos de Grignard o reactivos de alquil-litio. Lo son en general los carbaniones.

Nucleófilos de oxígeno

Lo son el agua y los alcoholes. Cuando como disolventes actúan en sustituciones nucleófilas se llama a la reacción solvólisis, (hidrólisis y alcoholólisis respectivamente). También lo son sus respectivos aniones como el hidróxido (OH^-) y los alcóxidos. Sales de ácidos carboxílicos.

Nucleófilos de nitrógeno

El amoníaco (NH_3) y las aminas.

Nucleófilos de azufre

El anión hidrogenosulfuro (HS^-) y los tioles (R-SH), tiolatos (R-S^-) y sulfuros (R-S-R).

Bibliografía

- K. Peter C. Vollhardt (1994). *Química Orgánica*. Barcelona: Ediciones Omega S.A.. ISBN 84-282-0882-4.

Véase también

- Electrófilo

Ácidos y bases de Lewis

El químico estadounidense Lewis dio una definición acerca del comportamiento de la base, en donde se puede definir como una sustancia que puede donar un par de electrones, y para el ácido como una sustancia que puede aceptar un par de electrones.^[1] En 1923 y desarrolló en 1938 su teoría de ácidos y bases:^[2]

El ácido debe tener su octeto de electrones incompleto y la base debe tener algún par de electrones solitarios. El amoníaco es una base de Lewis típica y el trifluoruro de boro un ácido de Lewis típico. La reacción de un ácido con una base de Lewis da como resultado un compuesto de adición. Los ácidos de Lewis tales como el cloruro de aluminio, el trifluoruro de boro, el cloruro estánnico, el cloruro de zinc y el cloruro de hierro (III) son catalizadores sumamente importantes de ciertas reacciones orgánicas.

De esta forma se incluyen sustancias que se comportan como ácidos pero no cumplen la definición de Brønsted y Lowry, y suelen ser denominadas **ácidos de Lewis**. Puesto que el protón, según esta definición, es un ácido de Lewis (tiene vacío el orbital 1s, en donde alojar el par de electrones), todos los ácidos de Brønsted-Lowry son ácidos de Lewis.

- Ejemplos de ácidos de Brønsted-Lowry: HCl, HNO₃, H₃PO₄.
- Ejemplos de ácidos de Lewis: Ag⁺, AlCl₃, CO₂, SO₃.

Se puede tener una idea de la fuerza de una sustancia como ácido o base de Lewis utilizando la constante de disociación de su aducto con una base o ácido de Lewis tomado como referencia. Por ejemplo, para comparar la basicidad del amoníaco, metilamina, dimetilamina y trimetilamina en fase gaseosa, se puede utilizar el trimetilborano.

Constantes de disociación de los compuestos trialquilboro-amina a 100°C

Ácido	Base	K _b
(CH ₃) ₃ B	NH ₃	4.6
(CH ₃) ₃ B	CH ₃ NH ₂	0.0350
(CH ₃) ₃ B	(CH ₃) ₂ NH	0.0214
(CH ₃) ₃ B	(CH ₃) ₃ N	0.472

Un ejemplo, podemos ver el caso de la protonación del amoníaco ([NH₃]⁺), que actúa como una base de Lewis ya que dona un par de electrones al protón H⁺, con ello tiene el comportamiento de un ácido de Lewis porque acepta el par de electrones. Esto nos puede decir que una reacción ácido-base de Lewis es aquella que existen donaciones de un par de electrones de una especie a otra y a diferencia de los demás tipos es que no genera sal y agua.^[3]

Véase también

- Ácido
- Base

Referencias

- [1] Chang, Raymond (2007). *Química* (9ª edición). McGraw-Hill Interamericana.. p. 682. ISBN 9788420507828.
- [2] Morcillo, Jesús (1989). *Temas básicos de química* (2ª edición). Alhambra Universidad. p. 257. ISBN 9788420507828.
- [3] Chang, Raymond (2007). *Química* (9ª edición). McGraw-Hill Interamericana.. p. 682. ISBN 9788420507828.

Cinética enzimática

La **cinética enzimática** estudia la velocidad de las reacciones químicas que son catalizadas por las enzimas. El estudio de la cinética y de la dinámica química de una enzima permite explicar los detalles de su mecanismo catalítico, su papel en el metabolismo, cómo es controlada su actividad en la célula y cómo puede ser inhibida su actividad por fármacos o venenos o potenciada por otro tipo de moléculas.

Las enzimas son proteínas (macromoléculas) con la capacidad de manipular otras moléculas, denominadas sustratos. Un sustrato es capaz de unirse al centro catalítico de la enzima que lo reconozca y transformarse en un producto a lo largo de una serie de pasos denominados mecanismo enzimático. Algunas enzimas pueden unir varios sustratos diferentes y/o liberar diversos productos, como es el caso de las proteasas al romper una proteína en dos polipéptidos. En otros casos, se produce la unión simultánea de dos sustratos, como en el caso de la ADN polimerasa, que es capaz de incorporar un nucleótido (sustrato 1) a una hebra de ADN (sustrato 2). Aunque todos estos mecanismos suelen seguir una compleja serie de pasos, también suelen presentar una etapa limitante que determina la velocidad final de toda la reacción. Esta etapa limitante puede consistir en una reacción química o en un cambio conformacional de la enzima o del sustrato.

El conocimiento adquirido acerca de la estructura de las enzimas ha sido de gran ayuda en la visualización e interpretación de los datos cinéticos. Por ejemplo, la estructura puede sugerir cómo permanecen unidos sustrato y producto durante la catálisis, qué cambios conformacionales ocurren durante la reacción, o incluso el papel en particular de determinados residuos aminoácidos en el mecanismo catalítico. Algunas enzimas modifican su conformación significativamente durante la reacción, en cuyo caso, puede ser crucial saber la estructura molecular de la enzima con y sin sustrato unido (se suelen usar análogos que se unen pero no permiten llevar a cabo la reacción y mantienen a la enzima permanentemente en la conformación de sustrato unido).

Los mecanismos enzimáticos pueden ser divididos en mecanismo de único sustrato o mecanismo de múltiples sustratos. Los estudios cinéticos llevados a cabo en enzimas que solo unen un sustrato, como la triosafosfato isomerasa, pretenden medir la afinidad con la que se une el sustrato y la velocidad con la que lo transforma en producto. Por otro lado, al estudiar una enzima que une varios sustratos, como la dihidrofolato reductasa, la cinética enzimática puede mostrar también el orden en el que se unen los sustratos y el orden en el que los productos son liberados.

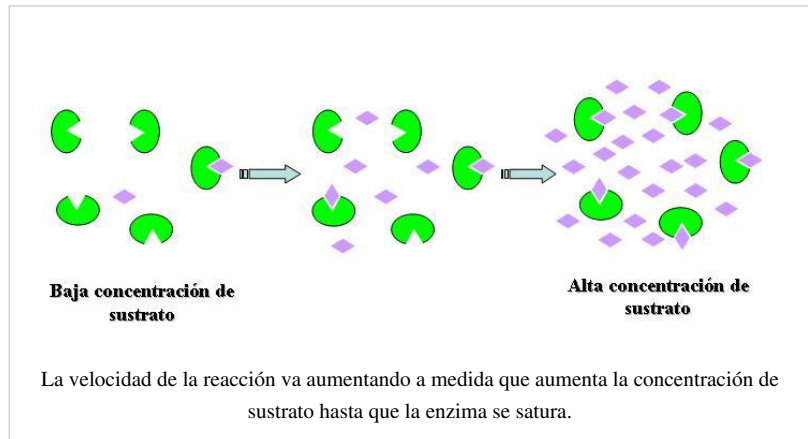
Sin embargo, no todas las catálisis biológicas son llevadas a cabo por enzimas proteicas. Existen moléculas catalíticas basadas en el ARN, como las ribozimas y los ribosomas, esenciales para el splicing alternativo y la traducción del ARNm, respectivamente. La principal diferencia entre las ribozimas y las enzimas radica en el limitado número de reacciones que pueden llevar a cabo las primeras, aunque sus mecanismos de reacción y sus cinéticas pueden ser estudiadas y clasificadas por los mismos métodos.



Imagen generada por ordenador de un modelo de la estructura tridimensional de la enzima purina nucleósido fosforilasa bacteriana.

Principios generales

La reacción catalizada por una enzima utiliza la misma cantidad de sustrato y genera la misma cantidad de producto que una reacción no catalizada. Al igual que ocurre en otros tipos de catálisis, las enzimas no alteran en absoluto el equilibrio de la reacción entre sustrato y producto.^[1] Sin embargo, al contrario que las reacciones químicas, las enzimas se saturan. Esto significa que a mayor cantidad de sustrato, mayor número de

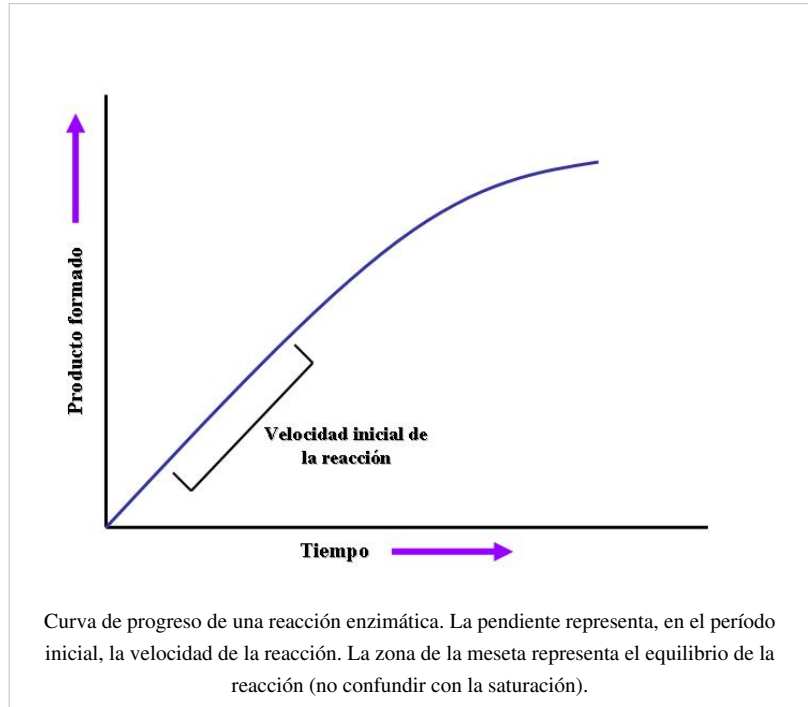


centros catalíticos estarán ocupados, lo que incrementará la eficiencia de la reacción, hasta el momento en que todos los sitios posibles estén ocupados. En ese momento se habrá alcanzado el punto de saturación de la enzima y, aunque se añada más sustrato, no aumentará más la eficiencia.

Las dos propiedades cinéticas más importantes de una enzima son: el tiempo que tarda en saturarse con un sustrato en particular y la máxima velocidad de reacción que pueda alcanzar. El conocimiento de estas propiedades hace posible hipotetizar acerca del comportamiento de una enzima en el ambiente celular y predecir cómo responderá frente a un cambio de esas condiciones.

Ensayos enzimáticos

Un ensayo enzimático es un procedimiento, llevado a cabo en un laboratorio, mediante el cual se puede medir la velocidad de una reacción enzimática. Como las enzimas no se consumen en la reacción que catalizan, los ensayos enzimáticos suelen medir los cambios experimentados bien en la concentración de sustrato (que va decreciendo), bien en la concentración de producto (que va aumentando). Existen diversos métodos para realizar estas medidas. La espectrofotometría permite detectar cambios en la absorbancia de luz por parte del sustrato o del producto (según la concentración de estos) y la radiometría implica incorporación o liberación de radiactividad para medir



la cantidad de producto obtenido por tiempo. Los ensayos espectrofotométricos son los más utilizados, ya que permiten medir la velocidad de la reacción de forma continua. Por el contrario, los ensayos radiométricos requieren

retirar las muestras para medirlas, por lo que son ensayos discontinuos. Sin embargo, estos ensayos son extremadamente sensibles y permiten detectar niveles muy bajos de actividad enzimática.^[2] También se puede

utilizar la espectrometría de masas para detectar la incorporación o liberación de isótopos estables cuando el sustrato es convertido en producto.

Los ensayos enzimáticos más sensibles utilizan láseres dirigidos a través de un microscopio para observar los cambios producidos en enzimas individuales cuando catalizan una reacción. Estas medidas pueden utilizar cambios producidos en la fluorescencia de cofactores que intervienen en el mecanismo de catálisis o bien unir moléculas fluorescentes en lugares específicos de la enzima, que permitan detectar movimientos ocurridos durante la catálisis.^[3] Estos estudios están dando una nueva visión de la cinética y la dinámica de las moléculas individuales, en oposición a los estudios de cinética enzimática tradicionales, en los que se observa y se mide el comportamiento de una población de millones de moléculas de enzima.

En la figura de la derecha se puede observar la típica evolución de una curva obtenida en un ensayo enzimático. Inicialmente, la enzima transforma el sustrato en producto siguiendo un comportamiento lineal. A medida que avanza la reacción, se va agotando la cantidad de sustrato y va disminuyendo la cantidad de producto que se genera por unidad de tiempo (disminuye la velocidad de la reacción), lo que se manifiesta en forma de curva asintótica en la gráfica. Dependiendo de las condiciones del ensayo y del tipo de enzima, el período inicial puede durar desde milisegundos hasta horas. Los ensayos enzimáticos suelen estar estandarizados para que el período inicial dure en torno a un minuto, para llevar a cabo las medidas más fácilmente. Sin embargo, los modernos equipos de mezcla rápida de líquidos permiten llevar a cabo medidas cinéticas de períodos iniciales cuya duración puede llegar a ser inferior a un segundo.^[4] Este tipo de ensayos rápidos son esenciales para medidas de la cinética del estado estacionario, discutida más abajo.

La mayoría de los estudios de cinética enzimática se centran en el período inicial, es decir, en la zona lineal de la reacción enzimática. Sin embargo, también es posible medir toda la curva de la reacción y ajustar estos datos a una ecuación no lineal. Esta forma de medir las reacciones enzimáticas es denominada análisis de la curva de progreso.^[5] Esta aproximación es muy útil como alternativa a las cinéticas rápidas, cuando el período inicial es demasiado rápido para ser medido con precisión.

Factores físico-químicos que pueden modificar la actividad enzimática

- **Temperatura:** las enzimas son sensibles a la temperatura pudiendo verse modificada su actividad por este factor. Los rangos de temperaturas óptimos pueden llegar a variar sustancialmente de unas enzimas a otras. Normalmente, a medida que aumente la temperatura, una enzima verá incrementada su actividad hasta el momento en que comience la desnaturalización de la misma, que dará lugar a una reducción progresiva de dicha actividad.
- **pH:** el rango de pH óptimo también es muy variable entre diferentes enzimas. Si el pH del medio se aleja del óptimo de la enzima, esta verá modificada su carga eléctrica al aceptar o donar protones, lo que modificará la estructura de los aminoácidos y por tanto la actividad enzimática.
- **Concentración salina:** al igual que en los casos anteriormente mencionados, la concentración de sales del medio es crucial para una óptima actividad enzimática. Una elevada concentración o una ausencia de sales en el medio pueden impedir la actividad enzimática, ya que las enzimas precisan de una adecuada concentración de iones para mantener su carga y su estructura.

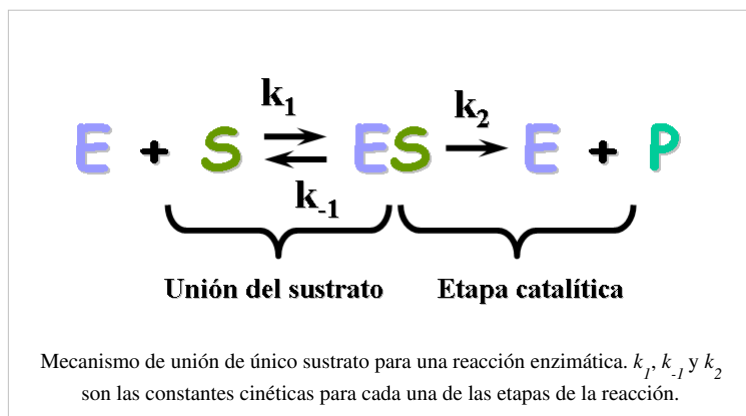
Reacciones con un sustrato

Las enzimas que presentan un mecanismo de único sustrato incluyen isomerasas, tales como la triosafosfato isomerasa o la bisfosfoglicerato mutasa, y liasas intramoleculares, tales como la adenilato ciclasa o la ribozima ARN-liasa.^[6] Sin embargo, existen ciertas reacciones enzimáticas de único sustrato que no pertenecen a esta categoría de mecanismos, como es el caso de la reacción catalizada por la catalasa. La catalasa reacciona inicialmente con una molécula de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) y queda en un estado oxidado tras liberar el producto (agua), y, posteriormente, es reducida por una segunda molécula de sustrato. Aunque durante la reacción

solo participa un sustrato, la existencia de un intermediario enzimático modificado permite incluir al mecanismo de la catalasa en la categoría de mecanismos de ping-pong, un tipo de mecanismo discutido más adelante.

Cinética de Michaelis-Menten

Como las reacciones catalizadas por enzimas son saturables, la velocidad de catálisis no muestra un comportamiento lineal en una gráfica al aumentar la concentración de sustrato. Si la velocidad inicial de la reacción se mide a una determinada concentración de sustrato (representado como [S]), la velocidad de la reacción (representado como V) aumenta linealmente con el aumento de la [S], como se puede ver en la figura. Sin embargo, cuando aumentamos la [S], la enzima se satura de sustrato y alcanza su velocidad máxima (V_{\max}), que no sobrepasará en ningún caso, independientemente de la [S].



El modelo de cinética michaeliana para una reacción de único sustrato se puede ver en la figura de la izquierda. Primeramente, tiene lugar una reacción química bimolecular entre la enzima E y el sustrato S, formándose el complejo enzima-sustrato ES. Aunque el mecanismo enzimático para una reacción unimolecular $ES \rightarrow E + P$ puede ser bastante complejo, existe una etapa enzimática limitante que permite que el mecanismo sea simplificado como una etapa cinética única cuya constante es k_2 .

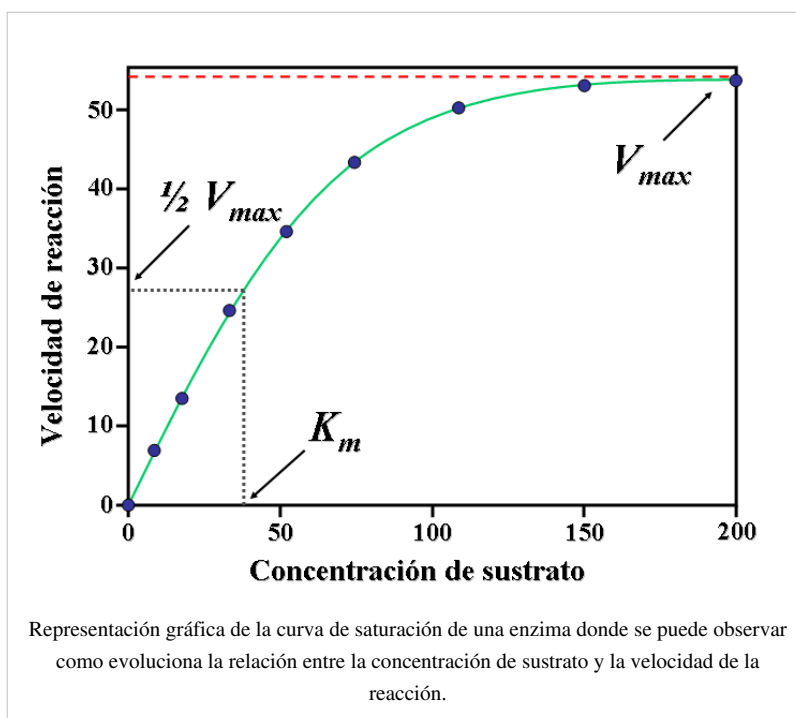
$$v = k_2[ES] \quad (\text{Ecuación 1})$$

k_2 también llamado k_{cat} o número de recambio, hace referencia al máximo número de reacciones enzimáticas catalizadas por segundo.

A bajas concentraciones de sustrato, la enzima permanece en un equilibrio constante entre la forma libre E y el complejo enzima-sustrato ES. Aumentando la [S] también aumentamos la [ES] a expensas de la [E], desplazando el equilibrio de la reacción hacia la derecha. Puesto que la velocidad de reacción depende de la [ES], la velocidad es sensible a pequeños cambios en la [S]. Sin embargo, a altas [S], la enzima se satura y solo queda la forma unida al sustrato ES. Bajo estas condiciones, la velocidad de la reacción ($v \approx k_2[E]_{tot} = V_{\max}$) deja de ser sensible a pequeños cambios en la [S]. En este caso, la concentración total de enzima ($[E]_{tot}$) es aproximadamente igual a la concentración del complejo ES:

$$[E]_{tot} \stackrel{\text{def}}{=} [E] + [ES]$$

La ecuación de Michaelis-Menten^[7] describe como la velocidad de la reacción depende del equilibrio entre la [S] y la constante k_2 . Leonor Michaelis y Maud Menten demostraron que si k_2 es mucho menor que k_1 (aproximación del equilibrio) se puede deducir la siguiente ecuación:



$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Esta famosa ecuación es la base de la mayoría de las cinéticas enzimáticas de sustrato único.

La constante de Michaelis K_m se define como la concentración a la que la velocidad de la reacción enzimática es la mitad de la V_{max} . Esto puede verificarse sustituyendo la concentración de sustrato por dicha constante ($[S] = K_m$). Si la etapa limitante de la velocidad de la reacción es lenta comparada con la disociación de sustrato ($k_2 \ll k_1$), la constante de Michaelis K_m será aproximadamente la constante de disociación del complejo ES, aunque sea una situación relativamente rara.

La situación más común, donde $k_2 > k_1$, es denominada cinética de Briggs-Haldane.^[8] La ecuación de Michaelis-Menten aún se mantiene bajo estas condiciones más generales, como puede derivarse de la aproximación del estado estacionario. Durante el período inicial, la velocidad de la reacción es más o menos constante, indicando que la [ES] también se mantendrá constante:

$$\frac{d}{dt}[\text{ES}] = k_1[\text{E}][\text{S}] - k_2[\text{ES}] - k_{-1}[\text{ES}] \approx 0$$

De esta forma, la concentración de ES viene dada por la siguiente expresión:

$$[\text{ES}] \approx \frac{[\text{E}]_{tot}[\text{S}]}{[\text{S}] + K_m}$$

donde la constante de Michaelis K_m se define así:

$$K_m \stackrel{\text{def}}{=} \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \approx \frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]}$$

Con lo cual, después de operar todos los factores, obtenemos una fórmula general para la velocidad de la reacción que coincide con la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = k_2[\text{ES}] = \frac{k_2[\text{E}]_{tot}[\text{S}]}{[\text{S}] + K_m} = \frac{V_{max}[\text{S}]}{[\text{S}] + K_m}$$

La constante de especificidad k_{cat} / K_m mide la eficiencia con la que una enzima convierte un sustrato en producto. Utilizando la definición de la constante de Michaelis K_m , la ecuación de Michaelis-Menten podría escribirse de la

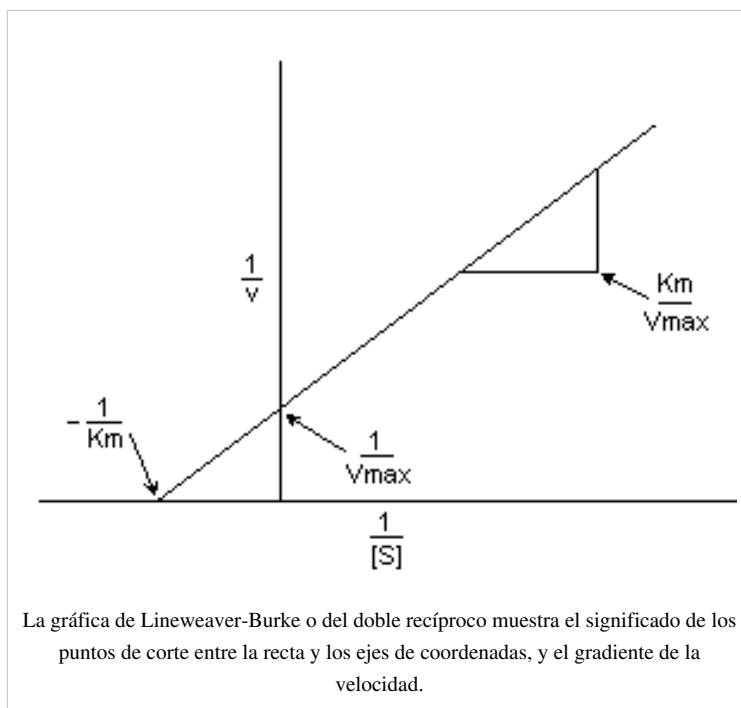
siguiente forma:

$$v = k_2[ES] = \frac{k_2}{K_m}[E][S]$$

donde [E] es la concentración de enzima libre. Así, la constante de especificidad se convierte en una constante bimolecular efectiva de la enzima libre que reacciona con sustrato libre para formar producto. Esta constante viene definida por la frecuencia con la que el sustrato y la enzima se encuentran en una solución, y ronda aproximadamente un valor de $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 25° C . Curiosamente, este máximo no depende del tamaño del sustrato o de la enzima. La proporción de las constantes de especificidad para dos sustratos es una comparación cuantitativa de la eficiencia de la enzima para convertir en productos dichos sustratos. La pendiente de la ecuación de Michaelis-Menten a bajas concentraciones de sustrato (cuando $[S] \ll K_m$) también proporciona la constante de especificidad.

Representación de la ecuación de Michaelis-Menten

La gráfica de velocidad frente a [S] mostrada anteriormente no es lineal. Aunque a bajas concentraciones de sustrato se mantenga lineal, se va curvando a medida que aumenta la concentración de sustrato. Antes de la llegada de los ordenadores, que permiten ajustar regresiones no lineales de forma sencilla, podía llegar a ser realmente difícil estimar los valores de la K_m y la V_{\max} en las gráficas no lineales. Esto dio lugar a que varios investigadores concentraran sus esfuerzos en desarrollar linearizaciones de la ecuación de Michaelis-Menten, dando como resultado la gráfica de Lineweaver-Burke y el diagrama de Eadie-Hofstee. Con el siguiente tutorial de la cinética de Michaelis-Menten realizado en la Universidad de Virginia^α, se puede simular el comportamiento de una enzima variando las constantes cinéticas.



La gráfica de Lineweaver-Burk o representación de doble recíproco es la forma más común de mostrar los datos cinéticos. Para ello, se toman los valores inversos a ambos lados de la ecuación de Michaelis-Menten. Como se puede apreciar en la figura de la derecha, el resultado de este tipo de representación es una línea recta cuya ecuación es $y = mx + c$, siendo el punto de corte entre la recta y el eje de ordenadas equivalente a $1/V_{\max}$, y el punto de corte entre la recta y el eje de abscisas equivalente a $-1/K_m$.

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

Obviamente, no se pueden tomar valores negativos para $1/[S]$; el mínimo valor posible es $1/[S] = 0$, que correspondería a una concentración infinita de sustrato, donde $1/v = 1/V_{\max}$. El valor del punto de corte entre la recta y el eje x es una extrapolación de datos experimentales obtenidos en laboratorio. Generalmente, las gráficas de Lineweaver-Burke distorsionan las medidas realizadas a bajas concentraciones de sustrato y esto puede dar lugar a estimaciones no muy exactas de la V_{\max} y de la K_m .^[9] Un modelo lineal mucho más exacto es el diagrama de Eadie-Hofstee, pero en las investigaciones científicas actuales, todo este tipo de linearizaciones han quedado

obsoletos y han sido sustituidos por métodos más fiables basados en análisis de regresión no lineal. Para analizar los datos es conveniente la normalización de los mismos, ya que esto puede ayudar disminuyendo la cantidad de trabajo experimental a realizar e incrementando la fiabilidad del análisis.^[10]

Significado de las constantes cinéticas

La importancia del estudio de la cinética enzimática reside en dos principios básicos. En primer lugar, permite explicar cómo funciona una enzima, y en segundo lugar, permite predecir cómo se comportará esa enzima *in vivo*. Las constantes cinéticas definidas anteriormente, K_m y V_{max} , son los pilares fundamentales a la hora de intentar comprender el funcionamiento de las enzimas en el control del metabolismo.

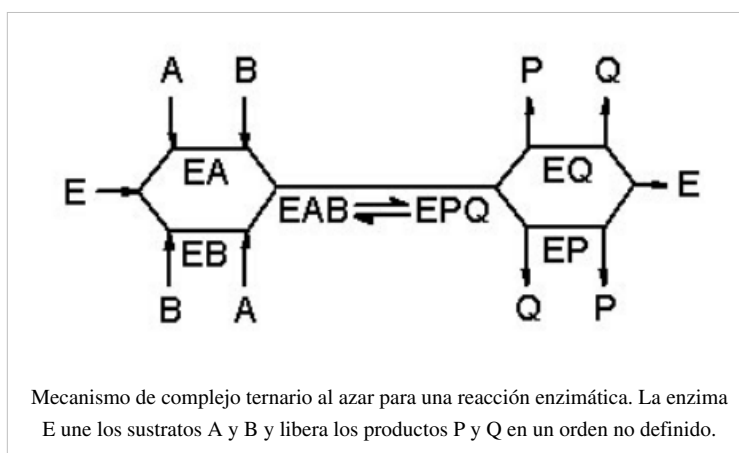
Sin embargo, llevar a cabo estas predicciones no es trivial, incluso en los sistemas más simples. Por ejemplo, la malato deshidrogenasa sintetiza, en el interior de la mitocondria, oxalacetato, el cual puede ser sustrato de diversas enzimas como la citrato sintasa, en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, en la gluconeogénesis, o la aspartato aminotransferasa, en la biosíntesis de ácido aspártico. Para ser capaz de predecir cuánto oxalacetato será desviado por cada una de las rutas es necesario saber tanto la concentración del oxalacetato como la concentración y los parámetros cinéticos de cada una de las enzimas. Este ejemplo denota la complejidad que podemos llegar a encontrar al intentar predecir el comportamiento de rutas metabólicas completas o de organismos enteros, por medio de modelos matemáticos. Aunque estos objetivos aún no se han alcanzado en eucariotas, se han obtenido ciertos progresos en bacterias, utilizando modelos del metabolismo de *Escherichia coli*.^{[11] [12]}

Reacciones multisustrato

Las reacciones multisustrato siguen una serie de complejas ecuaciones que describen cómo se unen los sustratos y en qué orden lo hacen. El análisis de estas reacciones es mucho más sencillo si la concentración del sustrato A se mantiene constante y la del sustrato B varía. En estas condiciones, la enzima se comporta igual que una enzima de único sustrato, por lo que en una gráfica de velocidad la concentración de sustrato dará unos valores aparentes de las constantes cinéticas, K_m y V_{max} , para el sustrato B. Si se realizan una serie de medidas a diferentes concentraciones fijas de sustrato A, los datos obtenidos permitirán saber a qué tipo de mecanismo pertenece la reacción enzimática. Para una enzima que una dos sustratos A y B, y los transforme en dos productos P y Q, existen dos tipos de mecanismos descritos hasta ahora.

Mecanismo de complejo ternario

Las enzimas (E) que presentan este mecanismo de reacción unen al mismo tiempo los dos sustratos (A y B), dando lugar a un complejo ternario EAB. El orden secuencial de unión de los sustratos puede ser al azar (mecanismo al azar) o seguir un orden en particular (mecanismo ordenado). Si fijamos la concentración del sustrato A y variamos la de B, y representamos gráficamente el comportamiento de la enzima mediante un diagrama de Lineweaver-Burke, obtendremos una serie de rectas con un punto de intersección común a todas ellas.

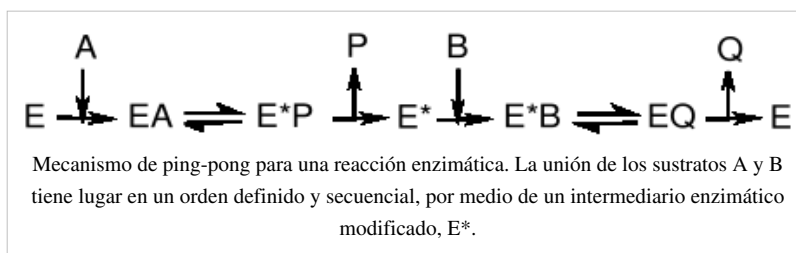


Entre las enzimas que presentan este mecanismo podemos encontrar la glutatión S-transferasa,^[13] la dihidrofolato reductasa^[14] y la ADN polimerasa.^[15] Los siguientes enlaces muestran animaciones del mecanismo de complejo ternario de la dihidrofolato reductasa β y de la ADN polimerasa γ .

Mecanismo de ping-pong

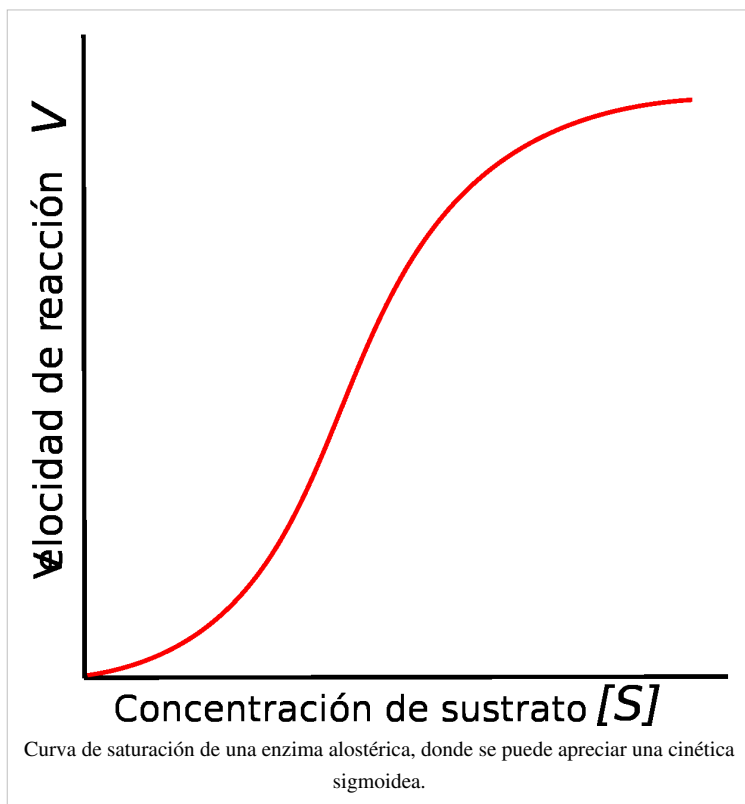
Como se puede apreciar en la figura de la derecha, las enzimas con un mecanismo de ping-pong pueden presentar dos estados, la conformación normal (E) y la conformación modificada químicamente (E*) o conformación intermedia. En este tipo de mecanismo, el sustrato A se une a la enzima E, que pasa a un estado intermedio E*, por ejemplo, por transferencia de un grupo químico al centro activo de la enzima, pudiendo ya ser liberado en forma de producto P. Únicamente cuando el sustrato A ya ha sido liberado del centro activo de la enzima puede unirse el sustrato B, que devuelve a la enzima modificada E* a su estado original E, y liberarlo en forma de producto Q. Si fijamos la concentración de A y variamos la de B, y representamos gráficamente una enzima con mecanismo de ping-pong en un diagrama de Lineweaver-Burke, obtendremos una serie de rectas paralelas entre sí.

Entre las enzimas con este tipo de mecanismo podemos encontrar alguna oxidoreductasa, como la tioredoxina peroxidasa,^[16] transferasas, como la acil-neuraminato citidil transferasa,^[17] y serin proteasas, como la tripsina y la quimiotripsina.^[18] Las serin-proteasas



conforman una diversa familia de enzimas muy comunes, que incluyen enzimas digestivas (tripsina, quimiotripsina y elastasa), varias enzimas del proceso de coagulación y muchas otras. En las serin-proteasas, el estado intermedio E* es una especie acilada en una serina del centro catalítico de la enzima. El siguiente enlace muestra una animación del mecanismo catalítico de la quimiotripsina δ .

Cinéticas no Michaelianas



Algunas reacciones enzimáticas dan lugar a curvas sigmoideas, al ser representadas en una curva de saturación, lo que suele indicar una unión cooperativa del sustrato al centro catalítico de la enzima. Esto quiere decir que la unión de una molécula de sustrato influye en la unión de las moléculas de sustrato posteriores. Este comportamiento es el más común en las enzimas multiméricas, que presentan varias zonas de interacción con el sustrato.^[19] El mecanismo de cooperación es semejante al observado en la hemoglobina. La unión de una molécula de sustrato a una de las zonas de interacción altera significativamente la afinidad por el sustrato de las demás zonas de interacción. Las enzimas con este tipo de comportamiento son denominadas alostéricas. La cooperatividad positiva tiene lugar cuando la primera molécula de sustrato unida incrementa la afinidad del

resto de zonas de interacción. Por el contrario, la cooperatividad negativa tiene lugar cuando la primera molécula de sustrato unida reduce la afinidad de la enzima por nuevas moléculas de sustrato.

Como ejemplos de enzimas con cooperatividad positiva tenemos la aspartato transcarbamilasa bacteriana^[20] y la fosfofructoquinasa,^[21] y con cooperatividad negativa, la tirosil ARNt-transferasa de mamíferos.^[22]

La cooperatividad es un fenómeno bastante común y puede llegar a ser crucial en la regulación de la respuesta enzimática a cambios en la concentración de sustrato. La cooperatividad positiva hace que la enzima sea mucho más sensible a la concentración de sustrato, con lo que su actividad puede llegar a variar en gran medida aunque se mueva en rangos muy estrechos de concentración de sustrato. Por el contrario, la cooperatividad negativa hace que la enzima sea insensible a pequeños cambios en la concentración de sustrato.

La ecuación de Hill^[23] suele ser utilizada para describir cuantitativamente el grado de cooperatividad en cinéticas no michaelianas. El coeficiente de Hill (n) indica cuántas de las zonas de unión de sustrato de una enzima afectan a la afinidad de la unión del sustrato en el resto de las zonas de unión. El coeficiente de Hill puede tomar valores mayores o menores que 1:

- $n < 1$: indica cooperatividad negativa.
- $n > 1$: indica cooperatividad positiva.

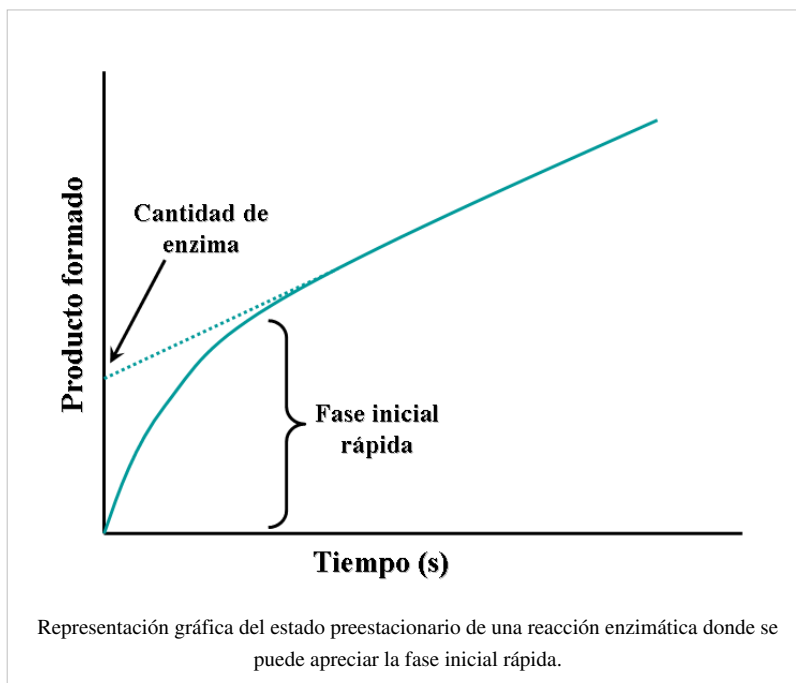
Cinética del estado preestacionario

Al realizar un ensayo enzimático y mezclar la enzima con el sustrato, existe un breve período inicial en el que no se produce ni síntesis de producto, ni estado intermedio de la enzima. El estudio de los milisegundos siguientes a la mezcla es denominado cinética del estado preestacionario y está relacionado con la formación y consumo de los intermediarios enzima-sustrato (ES o E*) hasta el momento en el que se alcanzan ciertas concentraciones y comienza el estado estacionario.

La primera enzima en la que se estudió este proceso, durante la reacción de hidrólisis, fue la quimiotripsina.^[24] La

detección de intermediarios suele ser la principal evidencia necesaria para saber bajo qué mecanismo actúa la enzima. Por ejemplo, al realizar un ensayo de cinética rápida de una reacción enzimática gobernada por un mecanismo de ping-pong, podremos hacer un seguimiento de la liberación de producto P y medir la formación de intermediarios enzimáticos modificados E*.^[25] En el caso de la quimiotripsina, el intermediario enzimático se produce por un ataque nucleofílico del sustrato sobre una serina del centro catalítico, lo que genera una forma intermediaria acilada de la quimiotripsina.

En la figura de la derecha, se puede observar como la enzima pasa rápidamente a un estado intermedio E* durante los primeros segundos de la reacción. Posteriormente, cuando es alcanzado el estado estacionario, la velocidad disminuye. Esta primera fase de la reacción proporciona la tasa de conversión de la enzima. Por lo tanto, la cantidad de producto liberado durante esta fase (que puede obtenerse prolongando la recta correspondiente al estado estacionario hasta cortar el eje y) también da la cantidad de enzima funcional presente en el ensayo.^[26]



Mecanismo químico

Uno de los objetivos más importantes en los estudios de la cinética enzimática es determinar el mecanismo químico que subyace en la reacción enzimática, por ejemplo, determinar la secuencia ordenada de sucesos que transcurren en la transformación de sustrato en producto. Las aproximaciones cinéticas discutidas anteriormente pueden proporcionar información relacionada con la velocidad de reacción de los intermediarios enzimáticos formados, pero no permitirán identificar qué intermediarios son exactamente.

Con el fin de determinar la etapa limitante de la reacción o los intermediarios que se forman durante la misma, se pueden llevar a cabo ensayos enzimáticos en diversas condiciones con enzimas o sustratos ligeramente modificados, que aporten datos al respecto. Un ejemplo característico de etapa limitante de una reacción es aquella en la que se rompe un enlace covalente dando lugar a un átomo de hidrógeno. Si intercambiamos cada átomo de hidrógeno por su isótopo estable, deuterio, podremos saber cual de los posibles hidrógenos transferidos es el que determina la etapa limitante. La velocidad sufrirá una variación cuando el hidrógeno crítico sea reemplazado, debido al efecto isotópico cinético primario, cuyo origen se encuentra en la mayor estabilidad de los puentes de deuterio, más difíciles de romper que los puentes de hidrógeno.^[27] También es posible medir efectos similares por medio de otras sustituciones isotópicas, tales como $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ó $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, pero los efectos producidos en estos casos son más difíciles

de detectar.

Los isótopos también pueden ser utilizados para obtener información acerca del destino de diversas partes de la molécula de sustrato cuando este es transformado en producto. Por ejemplo, a veces es difícil de determinar el origen de un átomo de oxígeno en el producto final, ya que puede provenir del agua o de la molécula de sustrato. Esto puede resolverse mediante la sustitución sistemática de los átomos de oxígeno de las moléculas que participen en la reacción, por su isótopo estable ^{18}O , llevando posteriormente a cabo una búsqueda del isótopo en el producto obtenido. El mecanismo químico también puede ser elucidado estudiando los efectos cinéticos e isotópicos bajo diferentes condiciones de pH,^[28] alterando los niveles de iones metálicos u otros cofactores,^[29] por mutagénesis dirigida de aminoácidos conservados, o mediante el estudio del comportamiento de la enzima en presencia de análogos del sustrato.

Inhibición enzimática

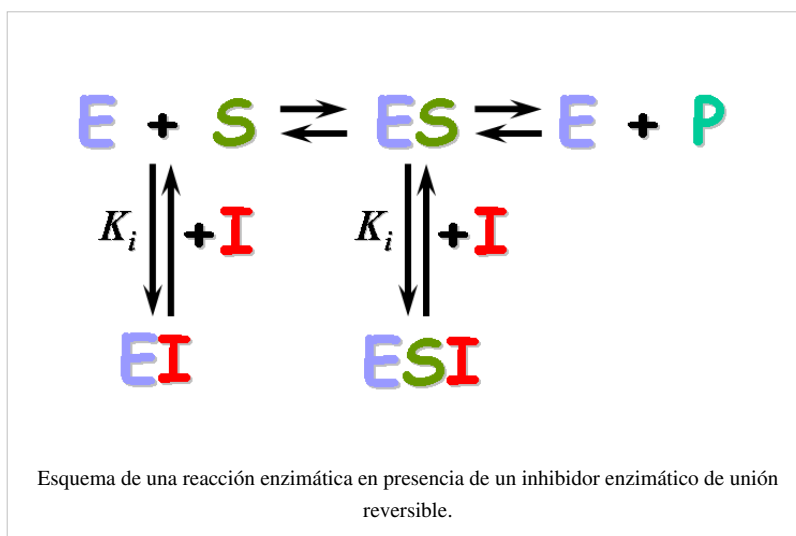
Los inhibidores enzimáticos son moléculas que reducen o anulan la actividad enzimática. Estos inhibidores pueden unirse a las enzimas de forma reversible (la desaparición del inhibidor restaura la actividad enzimática) o irreversible (el inhibidor inactiva permanentemente a la enzima).

Inhibidores reversibles

Los inhibidores enzimáticos reversibles pueden ser clasificados como competitivos, acompetitivos, no competitivos y mixtos, según el efecto que produzcan en las constantes cinéticas K_m y V_{\max} . Este efecto dependerá de que el inhibidor se una a la enzima E, al complejo enzima-sustrato ES o a ambos, como se puede observar en la figura de la derecha y en la tabla inferior. Para clasificar correctamente un inhibidor pueden llevarse a cabo estudios de su cinética enzimática en función de la concentración de inhibidor. Los cuatro tipos de inhibición dan lugar a diagramas de Lineweaver-Burke y de Eadie-Hofstee^[9] que varían de diferente forma con la concentración de inhibidor. Para abreviar, se usan dos símbolos:

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i} \quad \text{y} \quad \alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_i}$$

donde K_i y K'_i son las constantes de disociación para unirse a la enzima y al complejo enzima-sustrato, respectivamente. En presencia de un inhibidor reversible, los valores aparentes de la K_m y la V_{\max} pasan a ser $(\alpha/\alpha')K_m$ y $(1/\alpha')V_{\max}$, respectivamente, como se puede apreciar en la tabla inferior para los casos más comunes.



	Tipo de inhibición	K_m aparente	V_{max} aparente
solo K_i ($\alpha' = 1$)	competitiva	$K_m\alpha$	V_{max}
solo K_i' ($\alpha = 1$)	acompetitiva	$\frac{K_m}{\alpha'}$	$\frac{V_{max}}{\alpha'}$
$K_i = K_i'$ ($\alpha = \alpha'$)	no competitiva	K_m	$\frac{V_{max}}{\alpha'}$
$K_i \neq K_i'$ ($\alpha \neq \alpha'$)	mixta	$\frac{K_m\alpha}{\alpha'}$	$\frac{V_{max}}{\alpha'}$

Los ajustes por regresión no lineal de los datos de cinética enzimática^[30] pueden proporcionar estimaciones muy precisas de las constantes de disociación K_i y K_i' .

Inhibidores irreversibles

Los inhibidores enzimáticos también pueden unirse e inactivar una enzima de forma irreversible, generalmente por medio de modificaciones covalentes de residuos del centro catalítico de la enzima. Estas reacciones decaen de forma exponencial y suelen ser saturables. Por debajo de los niveles de saturación, mantienen una cinética de primer orden con respecto al inhibidor.

Mecanismos de catálisis

El modelo de ajuste inducido es el más utilizado al realizar estudios de interacción enzima-sustrato.^[31] Este modelo propone que las interacciones iniciales entre la enzima y el sustrato son relativamente débiles, pero suficientes para producir ciertos cambios conformacionales en la enzima, que estabilizan e incrementan la fuerza de la interacción. Estos cambios conformacionales implican a una serie de aminoácidos catalíticos del centro activo, en los cuales se producen los enlaces químicos correspondientes entre la enzima y el sustrato. Después de la unión, uno o más mecanismos de catálisis disminuyen la energía del estado de transición de la reacción, por medio de



una ruta alternativa a la reacción. Los mecanismos de catálisis se clasifican en base a diferentes criterios: catálisis covalente, catálisis por proximidad y alineación de orbitales, catálisis ácido-base general, catálisis por iones metálicos y catálisis electrostática.

Los estudios de cinética enzimática no permiten obtener el tipo de catálisis utilizada por una enzima. Sin embargo, algunos datos cinéticos pueden proporcionar una serie de indicios que lleven a realizar otro tipo de estudios dirigidos a determinar dicho tipo de catálisis. Por ejemplo, en un mecanismo de ping-pong la cinética del estado

pre-estacionario puede estar sugiriendo una catálisis de tipo covalente. Por otro lado, variaciones en el pH pueden producir efectos drásticos en la V_{\max} pero no en la K_m , lo que podría indicar que un residuo del centro activo precisa un estado concreto de ionización para que se pueda llevar a cabo la catálisis enzimática.

Véase también

- Enzima
- Catálisis
- Cinética de Michaelis-Menten
- Cinética química
- Ribozima

Notas

- **α** : Tutorial interactivo de la cinética enzimática de Michaelis–Menten (requiere Java) ^[32]
- **β** : Mecanismo enzimático de la dihidrofolato reductasa (Gif) ^[33]
- **γ** : Mecanismo enzimático de la ADN-polimerasa (Gif) ^[34]
- **δ** : Mecanismo enzimático de la quimiotripsina (requiere Flash) ^[35]

Referencias

- [1] Ebbing, D.D. *General chemistry* (4th edition) Houghton Mifflin Co. 1993, ISBN 0-395-63696-5
- [2] Eisenthal R. Danson M.J. (Eds), *Enzyme Assays: A Practical Approach*. Oxford University Press (2002) ISBN 0-19-963820-9
- [3] Xie XS, Lu HP. *Single-molecule enzymology*. (<http://www.jbc.org/cgi/content/full/274/23/15967>) J Biol Chem. 1999 Jun 4;274(23):15967-70. PMID 10347141
- [4] Gibson Q.H. Rapid mixing: Stopped flow *Methods in Enzymology*, (1969) 16:187-228
- [5] Duggleby, R.G. Analysis of enzyme progress curves by non-linear regression. *Methods in Enzymology*, (1995) 249:61-90.
- [6] Hammann C, Lilley DM. *Folding and activity of the hammerhead ribozyme*. *ChemBiochem*. 2002 Aug 2;3(8):690-700. PMID 11779233
- [7] Michaelis L. and Menten M.L. *Kinetik der Invertinwirkung* *Biochem. Z.* 1913; 49:333–369
- [8] Briggs GE, Haldane JB. *A Note on the Kinetics of Enzyme Action*. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1259181&blobtype=pdf>) *Biochem J.* 1925;19(2):338-9. PMID 16743508
- [9] Tseng SJ, Hsu JP. *A comparison of the parameter estimating procedures for the Michaelis–Menten model*. *J Theor Biol.* 1990 Aug 23;145(4):457–64. PMID 2246896
- [10] Bravo, I.G., Busto, F., De Arriaga, D., Ferrero, M. A., Rodríguez-Aparicio, L. B., Martínez-Blanco H., Reglero, A. *A normalised plot as a novel and time-saving tool in complex enzyme kinetic analysis* (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=11577687>) *Biochem. J.* (2001). 358, 573-583. PMID 11577687
- [11] Almaas E, Kovacs B, Vicsek T, Oltvai ZN, Barabasi AL. *Global organization of metabolic fluxes in the bacterium Escherichia coli*. *Nature*. 2004 Feb 26;427(6977):839-43. PMID 14985762
- [12] Reed JL, Vo TD, Schilling CH, Palsson BO. *An expanded genome-scale model of Escherichia coli K-12 (iJR904 GSM/GPR)*. (<http://genomebiology.com/2003/4/9/R54>) *Genome Biol.* 2003;4(9):R54. PMID 12952533
- [13] Dirr H, Reinemer P, Huber R. *X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function*. *Eur J Biochem.* 1994 Mar 15;220(3):645-61. PMID 8143720
- [14] Stone SR, Morrison JF. *Dihydrofolate reductase from Escherichia coli: the kinetic mechanism with NADPH and reduced acetylpyridine adenine dinucleotide phosphate as substrates*. *Biochemistry.* 1988 Jul 26;27(15):5493-9. PMID 3052577
- [15] Fisher PA. *Enzymologic mechanism of replicative DNA polymerases in higher eukaryotes*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1994;47:371-97. PMID 8016325
- [16] Akerman SE, Muller S. *2-Cys peroxiredoxin PfTrx-Px1 is involved in the antioxidant defence of Plasmodium falciparum*. (http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T29-49321S6-2&_coverDate=08/31/2003&_alid=466052639&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_qd=1&_cdi=4913&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=965e18a4c2ad0af711ba05d1a46dc855) *Mol Biochem Parasitol.* 2003 Aug 31;130(2):75-81. PMID 12946843
- [17] Bravo, I.G., Barrallo, S., Ferrero, M. A., Rodríguez-Aparicio, L. B., Martínez-Blanco H., Reglero, A. "Kinetic properties of the Acylneuraminase Cytidyltransferase from Pasteurella haemolytica A2". *Biochem. J.* (2001) 358, 585-598. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=11577688>)
- [18] Kraut J. *Serine proteases: structure and mechanism of catalysis*. *Annu Rev Biochem.* 1977;46:331-58. PMID 332063
- [19] Ricard J, Cornish-Bowden A. *Co-operative and allosteric enzymes: 20 years on*. *Eur J Biochem.* 1987 Jul 15;166(2):255-72. PMID 3301336

- [20] Helmstaedt K, Krappmann S, Braus GH., *Allosteric regulation of catalytic activity: Escherichia coli aspartate transcarbamoylase versus yeast chorismate mutase.* (<http://mmbbr.asm.org/cgi/content/full/65/3/404?view=long&pmid=11528003>) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2001 Sep;65(3):404-21 PMID 11528003
- [21] Schirmer T, Evans PR., *Structural basis of the allosteric behaviour of phosphofructokinase.* Nature. 1990 Jan 11;343(6254):140-5. PMID 2136935
- [22] Ward WH, Fersht AR., *Tyrosyl-tRNA synthetase acts as an asymmetric dimer in charging ARNt. A rationale for half-of-the-sites activity.* Biochemistry. 1988 Jul 26;27(15):5525-30. PMID 3179266
- [23] Hill, A. V. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol. (Lond.)*, 1910 40, iv-vii.
- [24] Hartley B.S. and Kilby B.A. *The reaction of p-nitrophenyl esters with chymotrypsin and insulin.* (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1269615&blobtype=pdf>) Biochem J. 1954 Feb;56(2):288-97. PMID 13140189
- [25] Alan Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding.* W. H. Freeman, 1998. ISBN 0-7167-3268-8
- [26] Bender ML, Begue-Canton ML, Blakeley RL, Brubacher LJ, Feder J, Gunter CR, Kezdy FJ, Killheffer JV Jr, Marshall TH, Miller CG, Roeske RW, Stoops JK. *The Determination of the Concentration of Hydrolytic Enzyme Solutions: a-Chymotrypsin, Trypsin, Papain, Elastase, Subtilisin, and Acetylcholinesterase.* J Am Chem Soc. 1966 Dec 20;88(24):5890-913. PMID 5980876
- [27] Cleland WW. *The use of isotope effects to determine enzyme mechanisms.* (http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WB5-4DD8DXJ-8&_coverDate=01/01/2005&_alid=466049795&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_qd=1&_cdi=6701&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=cf322c4a1c7db6b9f89551a8469a1a2d) Arch Biochem Biophys. 2005 Jan 1;433(1):2-12. PMID 15581561
- [28] Cleland WW. *Use of isotope effects to elucidate enzyme mechanisms.* CRC Crit Rev Biochem. 1982;13(4):385-428. PMID 6759038
- [29] Christianson DW, Cox JD. *Catalysis by metal-activated hydroxide in zinc and manganese metalloenzymes.* Annu Rev Biochem. 1999;68:33-57. PMID 10872443
- [30] Leatherbarrow RJ. *Using linear and non-linear regression to fit biochemical data.* Trends Biochem Sci. 1990 Dec;15(12):455-8. PMID 2077683
- [31] Koshland DE. *Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis.* (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=335371&blobtype=pdf>) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1958 Feb;44(2):98-104. PMID 16590179
- [32] <http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/scriptFrame.html>
- [33] <http://chem-faculty.ucsd.edu/kraut/dhfr.html>
- [34] <http://chem-faculty.ucsd.edu/kraut/dNTP.html>
- [35] http://courses.cm.utexas.edu/jrobertus/ch339k/overheads-2/06_21_chymotrypsin.html

Para más información

- Athel Cornish-Bowden, *Fundamentals of Enzyme Kinetics.* (3rd edition), Portland Press 2004, ISBN 1-85578-158-1.
- Irwin H. Segel, *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems.* Wiley-Interscience; New Ed edition 1993, ISBN 0-471-30309-7.
- Alan Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding.* W. H. Freeman, 1998. ISBN 0-7167-3268-8
- Santiago Schnell, Philip K. Maini, *A century of enzyme kinetics: Reliability of the K_M and v_{max} estimates,* Comments on Theoretical Biology **8**, 169-187, 2004 DOI: 10.1080/08948550390206768 (http://www.informatics.indiana.edu/schnell/papers/ctb8_169.pdf)
- Chris Walsh, *Enzymatic Reaction Mechanisms.* W. H. Freeman and Company. 1979. ISBN 0-7167-0070-0
- Nicholas Price, Lewis Stevens, *Fundamentals of Enzymology,* Oxford University Press, 1999. ISBN 0-19-850229-X
- Tim Bugg, *An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry* Blackwell Publishing, 2004 ISBN 1-4051-1452-5

Enlaces externos

- Animación de un ensayo enzimático (<http://www.kscience.co.uk/animations/model.swf>)
 - MACiE: Base de datos de mecanismos de reacciones enzimáticas (<http://www-mitchell.ch.cam.ac.uk/macie/>)
 - ENZYME(Expasy): Base de datos de nomenclatura enzimática (<http://us.expasy.org/enzyme/>)
 - ExCatDB: Base de datos de mecanismos catalíticos enzimáticos (<http://mbs.cbrc.jp/EzCatDB/>)
 - BRENDA: Base de datos sobre rutas enzimáticas, donde se muestran diagramas de reacción, sustratos y productos de las reacciones (<http://www.brenda.uni-koeln.de/>)
 - SABIO-RK: Base de datos de reacciones cinéticas (<http://sabio.villa-bosch.de/SABIORK/>)
 - Joseph Kraut's Research Group, University of California San Diego: Animaciones de varias reacciones enzimáticas (<http://chem-faculty.ucsd.edu/kraut/dhfr.html>)
 - Simbología y Terminología de la cinética enzimática (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/kinetics/>)
 - Introducción a la cinética enzimática (<http://orion1.paisley.ac.uk/kinetics/contents.html>)
-

Fuentes y contribuyentes del artículo

Cofactor *Fuente:* <http://es.wikipedia.org/w/index.php?oldid=37610610> *Contribuyentes:* AngelHerraez, Diegusjaimes, Florencio, Floripaint, Forretress Kaoe, Joseaperez, Nexem, Retama, Rage, SimónK, Xuankar, Xvazquez, 24 ediciones anónimas

Coenzima *Fuente:* <http://es.wikipedia.org/w/index.php?oldid=45560991> *Contribuyentes:* AngelHerraez, Carlos Sotela, Der Kreole, Edgar181, Fcr, Fernando Estel, Floripaint, FrancoGG, Jorge c2010, Joseaperez, Lasai, Mion, Máximo de Montemar, Oulo-7, Petruss, Retama, Sanbec, Triku, Xuankar, Xvazquez, 57 ediciones anónimas

Energía libre de Gibbs *Fuente:* <http://es.wikipedia.org/w/index.php?oldid=46273610> *Contribuyentes:* José, Sergio, Andresjk, Banfield, Bryant1410, Chayinator, Davius, Diegusjaimes, Dreitmen, Eamezaga, Erik Mora, Estelamargentina12, Ingolll, Javierito92, Jorge c2010, Jurock, Lygeum, MadriCR, Mansonce, Matdrones, Mathias536, Muro de Aguas, OboeCrack, Pablo R. Ojeda, Rjgalindo, Rodrigo, Santiperez, Santisis, Tano4595, Tostadora, 75 ediciones anónimas

Nucleófilo *Fuente:* <http://es.wikipedia.org/w/index.php?oldid=41482294> *Contribuyentes:* Apepca, Kado, Omegakent, Pablolap, RoyFocker, 8 ediciones anónimas

Ácidos y bases de Lewis *Fuente:* <http://es.wikipedia.org/w/index.php?oldid=46271110> *Contribuyentes:* 4lex, Alexav8, Apepca, GermanX, Grillitus, Jmieres, Joseaperez, Kojie, Moriel, Omegakent, Paul 14, Pitxulin1, Rsg, Template namespace initialisation script, 14 ediciones anónimas

Cinética enzimática *Fuente:* <http://es.wikipedia.org/w/index.php?oldid=46275103> *Contribuyentes:* Sergio, 4lex, Alelapyeny, Arapajoe, Arhendt, Astroalicante, Emijrp, Fobenavi, Gonn, Humbefa, Humberto, Ignacio Icke, J35ux, Jorge c2010, Jplastí, Laura Fiorucci, Leonudio, Matdrones, Mion, Morza, Muro de Aguas, Netito777, Petronas, Retama, Rjgalindo, Savh, Sermed, Ubiquitous, Xvazquez, Zigurat, 36 ediciones anónimas

Fuentes de imagen, Licencias y contribuyentes

Archivo:Coenzym A.svg *Fuente:* http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Archivo:Coenzym_A.svg *Licencia:* Public Domain *Contribuyentes:* User:NEUROtiker

Archivo:Hydrox subst.png *Fuente:* http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Archivo:Hydrox_subst.png *Licencia:* GNU Free Documentation License *Contribuyentes:* Annabel, K'lroman

Archivo:Grignard Reaction Scheme.png *Fuente:* http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Archivo:Grignard_Reaction_Scheme.png *Licencia:* Public Domain *Contribuyentes:* Benjah-bmm27, Pdavis68, Rifleman 82, ~K, 1 ediciones anónimas

Archivo:Purine Nucleoside Phosphorylase.jpg *Fuente:* http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Archivo:Purine_Nucleoside_Phosphorylase.jpg *Licencia:* Public Domain *Contribuyentes:* NASA

Archivo:Saturación de una enzima.jpg *Fuente:* http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Archivo:Saturación_de_una_enzima.jpg *Licencia:* Creative Commons Attribution 2.5 *Contribuyentes:* User:Gonn

Archivo:Gráfica de la saturación de una enzima.jpg *Fuente:* http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Archivo:Gráfica_de_la_saturación_de_una_enzima.jpg *Licencia:* Creative Commons Attribution 2.5 *Contribuyentes:* user:Gonn

Archivo:Equilibrio enzima-sustrato.png *Fuente:* http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Archivo:Equilibrio_enzima-sustrato.png *Licencia:* Creative Commons Attribution 2.5 *Contribuyentes:* user:Gonn

Archivo:Gráfica Km.png *Fuente:* http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Archivo:Gráfica_Km.png *Licencia:* Creative Commons Attribution 2.5 *Contribuyentes:* user:Gonn

Archivo:Lineweaver-Burke plot.PNG *Fuente:* http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Archivo:Lineweaver-Burke_plot.PNG *Licencia:* GNU Free Documentation License *Contribuyentes:* Diberrí

Archivo:Random order ternary mechanism.svg.png *Fuente:* http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Archivo:Random_order_ternary_mechanism.svg.png *Licencia:* Public Domain *Contribuyentes:* TimVickers

Archivo:Ping pong.svg.png *Fuente:* http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Archivo:Ping_pong.svg.png *Licencia:* Public Domain *Contribuyentes:* TimVickers

Archivo:Enzima alostérica.svg *Fuente:* http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Archivo:Enzima_alostérica.svg *Licencia:* Public Domain *Contribuyentes:* User:User:Eltopo_gaston on es.wikibooks

Archivo:Estado pre-estacionario.png *Fuente:* http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Archivo:Estado_pre-estacionario.png *Licencia:* Creative Commons Attribution 2.5 *Contribuyentes:* User:Gonn

Archivo:Inhibición enzimática.png *Fuente:* http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Archivo:Inhibición_enzimática.png *Licencia:* Creative Commons Attribution 2.5 *Contribuyentes:* User:Gonn

Archivo:Catalisis enzimatical.jpg *Fuente:* http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Archivo:Catalisis_enzimatical.jpg *Licencia:* Public Domain *Contribuyentes:* User:Gonn

Licencia

Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported
<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>
