



PARQUE
CIENTÍFICO
DE MADRID

Cinética Enzimática



SBI
Servicio de
Biotransformaciones
Industriales

CONCEPTOS BÁSICOS

DEFINICIONES.

1. CONVERSION.

Número de moléculas convertidas por número de moléculas iniciales.

$$X_s = \frac{n_{s0} - n_s}{n_{s0}}$$

X_s : conversión del sustrato S

n_{s0} : cantidad (moles) de sustrato S al comienzo de la reacción.

n_s : cantidad (moles) de sustrato S al final de la reacción

CONCEPTOS BÁSICOS

CONVERSION.

✓ Este parametro debe maximizarse para

- evitar el reciclado del sustrato no convertido.
- minimizar el volumen del reactor.
- evitar reacciones no deseadas con el sustrato no convertido.

✓ No obstante

- grandes conversiones requieren largos tiempos de reacción.
- grandes conversiones requieren grandes cantidades de catalizador.

CONCEPTOS BÁSICOS

2. RENDIMIENTO

Número de moléculas de producto sintetizadas por número de moléculas iniciales.

$$\eta_p = \frac{n_p - n_{p0}}{n_{s0}} \cdot \frac{|\nu_s|}{|\nu_p|}$$

η_p : conversión del producto P
 n_{p0} : cantidad (moles) de producto P al comienzo de la reacción.
 n_p : cantidad (moles) de producto P al final de la reacción.
 ν_s : factor estequiométrico para el sustrato S
 ν_p : factor estequiométrico para el producto P

CONCEPTOS BÁSICOS

RENDIMIENTO.

✓ Junto con la conversión y la selectividad define cuantas moléculas de producto son sintetizadas por molécula de sustrato.
 ✓ Esta definición se refiere al rendimiento analítico, y es el que debe utilizarse para el entendimiento de los pasos individuales de reacción y el planteamiento de modelos cinéticos.
 ✓ Es más aplicado hablar de rendimiento aislado, que cuantifica el rendimiento después de los procesos del *downstream*.
 ✓ Si consideramos el proceso completo, el rendimiento global es el producto matemático de todos los pasos individuales.

CONCEPTOS BÁSICOS

3. SELECTIVIDAD


Número de moléculas de producto sintetizadas por número de moléculas convertidas.

$$\sigma_p = \frac{n_p - n_{p0}}{n_{s0} - n_s} \cdot \frac{|\nu_s|}{|\nu_p|}$$

σ_p : selectividad para el producto p
 n_{s0} : cantidad (moles) de sustrato S al comienzo de la reacción
 n_s : cantidad (moles) de sustrato S final de la reacción
 n_{p0} : cantidad (moles) de producto P al comienzo de la reacción.
 n_p : cantidad (moles) de producto P al final de la reacción.
 ν_s : factor estequiométrico para el sustrato S
 ν_p : factor estequiométrico para el producto P

CONCEPTOS BÁSICOS

- **LAS ENZIMAS** son proteínas que se comportan como catalizadores muy potentes y eficaces de las reacciones químicas de los sistemas biológicos.
- La **CATÁLISIS ENZIMÁTICA** es esencial para los sistemas vivos.
- La mayoría de las Reacciones Químicas ocurrirían muy lento en condiciones biológicamente significativas.
- Hace posible que en condiciones fisiológicas tengan lugar reacciones que sin catalizador requerirían condiciones extremas de presión, temperatura o pH.
- Las biomoléculas son muy estables a pH neutro, temperatura suave y ambiente acuoso



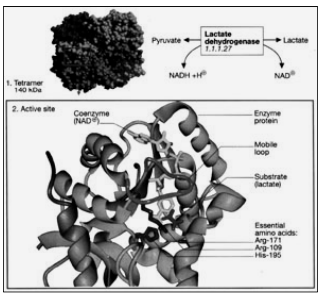
CONCEPTOS BÁSICOS

Características

- Como **catalizadores**, los enzimas actúan en pequeña cantidad y se recuperan indefinidamente, *in vivo*.
- No llevan a cabo reacciones que sean energéticamente desfavorables, sino que solamente aceleran las que espontáneamente podrían producirse. $\Delta G^\circ < 0$
- 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. Esto es cierto *in vivo*, peor no *in vitro*, lo cual es el origen de las Biotransformaciones

Estructura-actividad catalítica

- La actividad catalítica depende del mantenimiento de la conformación proteica nativa
- Si se desnaturaliza la proteína o se disocia en subunidades pierde su actividad.
- Estructuras 1°, 2°, 3° y 4° son esenciales



El sustrato es reconocido por la enzima (centro de reconocimiento) y Biotransformado en el centro activo

enzima y su sustrato

Cofactor (Coenzima):

Átomo, ion o molécula que participa en el proceso catalítico sin ser enzima ni sustrato.

Los cofactores participan de dos maneras distintas:

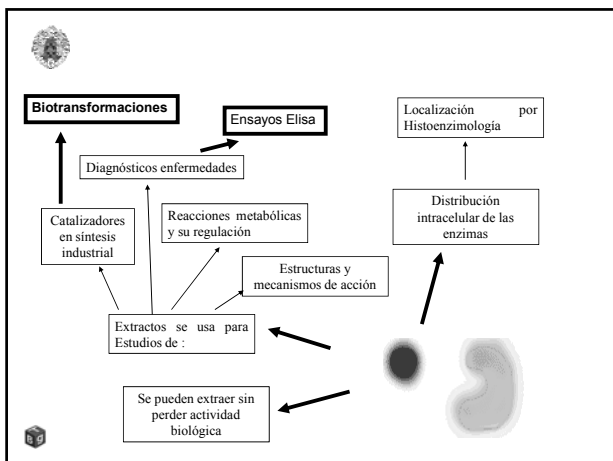
1. A través de una fijación muy fuerte a la proteína y no son modificados en el ciclo catalítico.- cofactor

EJEMPLO DE COFACTOR

2. Como un segundo sustrato; se ven modificados en el ciclo catalítico y por lo general requieren otra enzima para volver al estado original.- coenzima

ENZIMAS COMPLEJOS

apoenzima + coenzima = holoenzima



CINÉTICA ENZIMÁTICA

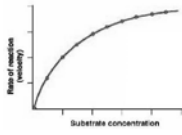
La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad del enzima.

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 progreso 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. 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. 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.

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 elevadas $[S]_0$, 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}).

Activador: Agente que aumenta la actividad enzimática

Inhibidor: Agente que disminuye la actividad enzimática

Inhibidor reversible: establece un equilibrio reversible con la Enzima. Un aumento en la concentración de sustrato elimina la inhibición

$$E + I \rightleftharpoons EI$$

Inhibidor irreversible: modifica químicamente a la enzima. Un aumento de la concentración de sustrato no reactiva la enzima

$$E + I \longrightarrow E'$$

4.1 PARÁMETROS BÁSICOS

SELECTIVIDAD.

- ✓Describe las moléculas de producto sintetizadas en relación con todas las moléculas convertidas.
- ✓Debe ser lo más cercana posible a 1 para evitar gastos innecesarios de sustrato, por lo que es uno de los factores económicos más importantes.
- ✓Es un parámetro decisivo para estimar el tiempo de reacción, pues su evaluación continua nos indicará si debemos detener la reacción en un momento determinado.
- ✓La combinación de estos tres parámetros básicos nos lleva a la siguiente ecuación:

$$\eta = \sigma \cdot X$$

Velocidades de las reacciones químicas
efecto de los catalizadores

- Velocidades de reacción y orden de reacción
 - Reacciones de 1º Orden
 - Para la reacción **irreversible**:

$$V = \frac{d[B]}{dt} \quad V = -\frac{d[A]}{dt}$$

$$V = \frac{d[B]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt} = k_1[A] \quad \boxed{A} \rightarrow \boxed{B}$$

Integrando la ecuación anterior

$$[A]/[A]_0 = e^{-(k_1 t)} \quad k_1 \text{ [s}^{-1}\text{]}$$

donde $[A]_0$ = concentración inicial de A cuando $t = 0$.

Representación gráfica

- Los procesos bioquímicos son reversibles

$$[A] \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} [B]$$

$$-V = \frac{d[A]}{dt} = -k_1[A] + k_{-1}[B]$$

Donde k_1 y k_{-1} son constantes de velocidad de 1º orden, directa e inversa.

En el equilibrio

$$0 = -k_1[A]_{eq} + k_{-1}[B]_{eq}$$

$$\frac{[B]_{eq}}{[A]_{eq}} = \frac{k_1}{k_{-1}} = K$$

Velocidades de las reacciones químicas efecto de los catalizadores

- Reacciones de 2º Orden

$$2A \xrightarrow{k_2} B$$

$$v = \frac{-d[A]}{dt} = -k_2[A]^2$$

Donde k_2 es cte de v de 2º orden [(mol/L)⁻¹ s⁻¹]

Los esquemas de reacciones complejas se simplifican con un paso limitante de la velocidad

Estados de transición y Barreras de reacción

- ¿Qué determina la velocidad de una reacción?
 - Barrera energética
 - Estado de transición

Estados de transición y Barreras de reacción

$K = e^{-\Delta G^\ddagger / RT}$

¿Qué hace un catalizador?

Disminuye la energía libre de activación ΔG^\ddagger sin afectar a la energía libre del proceso ΔG°

Cómo funcionan las enzimas

- Los enzimas disminuyen la energía de activación de las reacciones

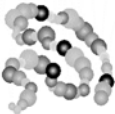
Reacción	Energía de activación (Kcal·mol ⁻¹)
el peróxido de hidrógeno se descompone en: $H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$	18
b) el hierro catalítico (Fe) realiza la reacción $H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$	13
c) el platino catalítico (Pt) realiza la reacción : $H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$	12
d) la catalasa una enzima hepática la realiza $H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$	5




¿Qué hace un catalizador?

- ¿Cómo reduce el catalizador la barrera energética?
 - Reducción de entropía
 - Desolvatación
 - Se compensa tensión o distorsión del sustrato
 - Consigue alineamiento entre grupos funcionales catalíticos de la E y el S

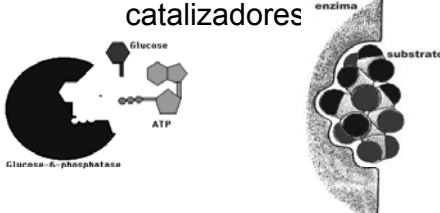
¿Cómo actúan las enzimas como catalizadores?

Sitio Activo



1.- El enzima y su sustrato	2.- Unión al centro activo	3.- Formación de productos
		

¿Cómo actúan las enzimas como catalizadores?



Sustrato y enzima se acoplan de forma estereoespecífica, de la misma manera que una llave se ajusta a su cerradura.

Modelo aceptado durante mucho tiempo; hoy se considera insuficiente al no explicar algunos fenómenos de la inhibición enzimática, por ejemplo

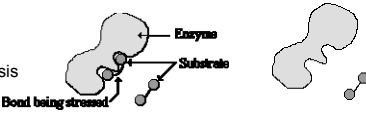
Hipótesis de la Cerradura y la llave (E. Fischer, 1894)

¿Cómo actúan las enzimas como catalizadores?

• **Hipótesis del Ajuste Inducido (Daniel Koshland, 1958)**

– E Induce al S a configuración aproximada al Estado de Transición

1. UNE S
2. REDUCE E_a
3. IMPULSA Catálisis
4. LIBERA P
5. SE REGENERA



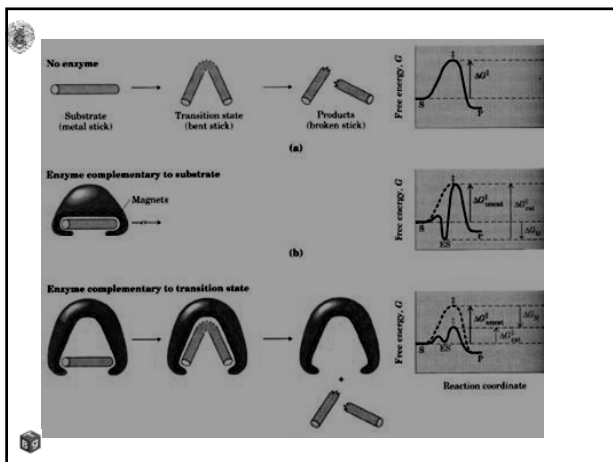
Tanto la enzima como el sustrato sufren una alteración en su estructura por el hecho físico de la unión.

Está mucho más de acuerdo con todos los datos experimentales conocidos hasta el momento.


La teoría del Ajuste Inducido se amplía en la actualidad definiendo la acción enzimática como

Estabilización del Estado de Transición


Según lo cual, el Centro Activo enzimático es en realidad complementario no al sustrato o al producto, sino al estado de transición entre ambos.



● Cinética de Michaelis-Menten



Leonor Michaelis
1874-1949



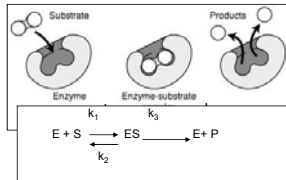
Maud Menten
1876-1960

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:

$$E + S \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} ES \xrightarrow{k_3} E + P$$

Cinética de la Catálisis Enzimática

- Cinética de Michaelis-Menten
 - 1º etapa se forma el complejo enzima-sustrato.
 - 2º etapa, el complejo enzima-sustrato da lugar a la formación del producto, liberando la enzima libre:



$$V_1 = k_1 [E] [S]$$

$$V_2 = k_2 [ES]$$

$$V_3 = k_3 [ES] \text{ Paso lento}$$

Cinética de la Catálisis Enzimática

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 unida 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: $v_1 = k_1 [S] [E_T] - k_1 [S] [ES]$

Podría expresarse V como función de $[E]$, y $[S]$

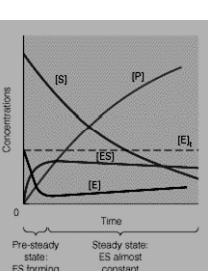
Asumiendo que **E** y **S** están en equilibrio cuando $k_2 \ll k_3$

$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

K_S cte de disociación

Pero **E**, **S** y **ES** no están en equilibrio pues **ES** se convierte en **P** Continuamente

Modelo de Briggs – Haldane: **Estado Estacionario**



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. 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:

$$v = v_2 = k_2 [ES] = \text{constante.}$$

Como $v_1 = v_2 = v_{-1}$, podemos decir que:
 $k_1[S][E_1] - k_{-1}[S][ES] = k_2[ES] + k_3[ES]$
 Despejando [ES], queda que:

$$[ES] = \frac{[E_1][S]}{K_m + [S]}$$

siendo $K_m = (k_2 + k_3) / k_1$

donde la expresión $(k_2 + k_3) / k_1$ se ha sustituido por K_m , o **constante de Michaelis-Menten**.

Esta relación nos explica 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:

$$v = v_3 = k_3[ES] = \frac{k_3[E_1][S]}{K_m + [S]}$$

Para cualquier reacción enzimática, $[E_1]$, k_3 y K_m son constantes. Vamos a considerar dos casos extremos:

- **A concentraciones de sustrato pequeñas** ($[S] \ll K_m$) $v = (k_3[E_1]/K_m)[S]$. 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** ($[S] \gg K_m$), $v = k_3[E_1]$. 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 $[E_1]$ son constantes, y nos permite definir un nuevo parámetro, la **velocidad máxima de la reacción** (V_{max}): $V_{max} = k_3[E_1]$, 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**:

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

Cinética de la Catálisis Enzimática

Pero **E**, **S** y **ES** no están en equilibrio pues **ES** se convierte en **P** Continuamente

Modelo de Briggs – Haldane: **Estado Estacionario**

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

Formation from enzyme and substrate Breakdown into enzyme and substrate Breakdown into enzyme and product

$$[ES] = \left(\frac{k_1}{k_{-1} + k_2} \right) [E][S]$$

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

Entonces $K_M[ES] = [E][S]$

Cinética de la Catálisis Enzimática

$$V = \frac{k_2[E][S]}{K_M + [S]}$$

Ecuación de Michaelis - Menten

- K_M es característica de cada reacción
- Tiene unidades de concentración
- Cuando $K_M \gg [S]$ se alcanza V_{max}

$$V_{max} = k_2[E]_t$$

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Cinética de la Catálisis Enzimática

- Para reacciones de pasos múltiples:

$$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} EP \xrightarrow{k_3} E + P$$

Se hace un análisis similar pero teniendo presente el paso lento de la reacción como determinante de la misma

$$V = \frac{k_{cat}[E][S]}{K_M + [S]}$$

K_2 es un caso particular la K_{cat}

Cinética de la Catálisis Enzimática

Significado de K_M , K_{cat} , K_{cat}/K_M

- K_M
 - Cuando $k_2 \ll k_{-1}$ Entonces $K_M \cong k_{-1}/k_1 = K$
 - Afinidad de la enzima por el sustrato
 - $K_M = [S]$ cuando $V = \frac{1}{2} V_{max}$
 - Es una medida de la $[S]$ necesaria para alcanzar una catálisis eficaz

• **K_m**
indica la concentración de sustrato intracelular

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

Cinética de la Catálisis Enzimática

Significado de K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M

- **k_{cat} [segundos⁻¹]**
 - Medida directa de la producción catalítica en condiciones óptimas (enzima saturada)
 - Tiempo necesario para cambiar **S** en **P**
 - **Número de recambio** (N° moléculas de S transformadas por segundo)

Cinética de la Catálisis Enzimática

Significado de K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M

$$V \cong \frac{k_{cat}}{K_M} [E][S]$$

- **k_{cat}/K_M**
 - Cuando $[S] \ll K_M$ Entonces $[E]_t \ll [E]$
 - Medida directa de eficiencia y especificidad de la enzima
 - Permite comparar eficiencia de una enzima con diferentes sustratos
 - Valor máximo entre 10^8 y 10^9 (mol/L)⁻¹ s⁻¹

•Vmax
es un parámetro directamente proporcional a la concentración de enzima total $V_{max} = k_{cat} [E_t]$
no es una constante ya que depende de [Et]

•Número de recambio
número de moléculas de sustrato transformados por minuto por mol de enzima $K_{cat} [1/s]$
mide la eficiencia de la enzima "turnover number"
sirve para comparar enzimas
 $1/k_{cat}$ [seg] tiempo de un ciclo catalítico


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

Cinética de la Catálisis Enzimática

Algunos valores representativos

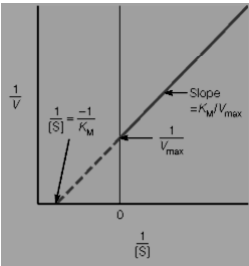
Enzyme	Reaction Catalyzed	K_M (mol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M [(mol/L) $^{-1}$ s $^{-1}$]
Chymotrypsin	Ac-Phe-Ala $\xrightarrow{H_2O}$ Ac-Phe + Ala	1.5×10^{-2}	0.14	9.3
Pepsin	Phe-Gly $\xrightarrow{H_2O}$ Phe + Gly	3×10^{-4}	0.5	1.7×10^6
Tyrosyl-tRNA synthetase	Tyrosine + tRNA \rightarrow tyrosyl-tRNA	9×10^{-4}	7.6	8.4×10^6
Ribonuclease	Cytidine 2', 3' cyclic phosphate $\xrightarrow{H_2O}$ cytidine 3'-phosphate	7.9×10^{-3}	7.9×10^2	1.0×10^6
Carbonic anhydrase	$HCO_3^- + H^+ \rightarrow H_2O + CO_2$	2.6×10^{-2}	4×10^5	1.5×10^7
Fumarase	Fumarate $\xrightarrow{H_2O}$ malate	5×10^{-6}	8×10^2	1.6×10^8

Cinética de la Catálisis Enzimática

Amino Acid in Ester	Amino Acid Side Chain	k_{cat}/K_M [(mol/L) $^{-1}$ s $^{-1}$]
Glycine	-H	1.3×10^{-1}
Norvaline	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	3.6×10^2
Norleucine	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	3.0×10^3
Phenylalanine	-CH ₂ - 	1.0×10^5

Cinética de la Catálisis Enzimática

- Representación doble inversa o de Lineweaver-Burk



$$\text{Al. } \frac{1}{V} = \frac{K_M + [S]}{V_{\max}[S]} = \frac{K_M}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

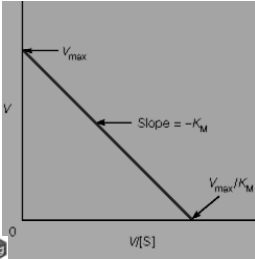
$$\frac{1}{V} = \left(\frac{K_M}{V_{\max}} \right) \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$0 = \frac{K_M}{V_{\max}[S]_0} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$1/[S]_0 = -1/K_M$$

Cinética de la Catálisis Enzimática

- Representación de Eadie-Hofstee

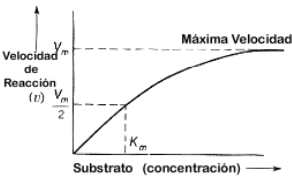


$$V = V_{\max} - K_M \frac{V}{[S]}$$

Factores que afectan la velocidad de reacción

- Efecto de la variación de la concentración del sustrato

En condiciones de concentración de [E], pH y temperatura constante se observa que la accisa correspondiente a $V_{\max}/2$ es K_m



Efecto de la concentración del sustrato

Factores que afectan la velocidad de reacción

- **Efecto de la variación de la concentración de la enzima**

En condiciones de concentración de S crecientes hasta la saturación, pH y temperatura constante se observa que la velocidad inicial crece con [S]

substrato transformado

Tiempo de reacción

Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de reacción

Factores que afectan la velocidad de reacción

- **Efecto 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, Q_{10} .

Increasing enzyme activity

Optimum temperature

Enzymes become denatured

Temperature (°C)

Factores que afectan la velocidad de reacción

- **Efecto del pH sobre la actividad enzimática**

– Los enzimas poseen grupos químicos ionizables (carboxilos -COOH; amino -NH₂; tiol -SH; imidazol, etc.) en las cadenas laterales de sus aminoácidos

% maximal enzyme activity

pH

Substrate

Optimal pH

Cinética Enzimática

- Reacciones en que intervienen dos o más sustratos. Puede haber dos casos extremos:
 - Unión aleatoria de los sustratos

$$\begin{array}{c} \text{either } S1 \rightarrow E \cdot S1 \\ \text{or } S2 \rightarrow E \cdot S2 \\ \downarrow \quad \downarrow \\ E \cdot S1 \cdot S2 \rightarrow E + P1 + P2 \end{array}$$

- Unión ligeramente priorizada de uno de los sustratos
 La fosforilación de la glucosa con ATP, catalizada con hexokinasa, con tendencia a unirse a la glucosa en primer lugar.

Cinética Enzimática

- Reacciones en que intervienen dos o más sustratos
 - Unión ordenada de los sustratos

$$E \xrightarrow{S1} E \cdot S1 \xrightarrow{S2} E \cdot S1 \cdot S2 \rightarrow E + P1 + P2$$

Se observa en oxidaciones de sustratos con la coenzima nicotinamida adenindinucleotido (NAD+).

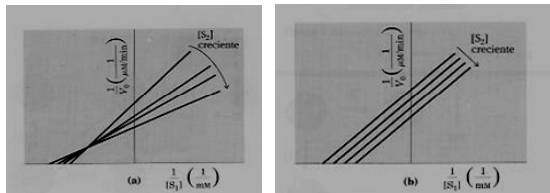
Cinética Enzimática

- Reacciones en que intervienen dos o más sustratos
 - Mecanismo "ping-pong"

$$E \xrightarrow{S1} E \cdot S1 \xrightarrow{P1} E^* \xrightarrow{S2} E^* \cdot S2 \xrightarrow{P2} E$$

La ruptura de una cadena polipeptídica con una serin-proteasa, tal como la tripsina o la α-chymotripsina.

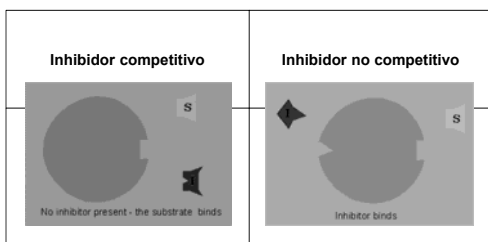
Cinética Enzimática



Análisis cinético en el estado estacionario de las reacciones bi-sustrato

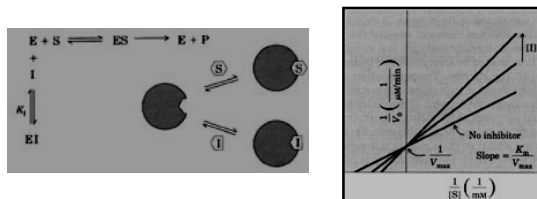
Cinética Enzimática

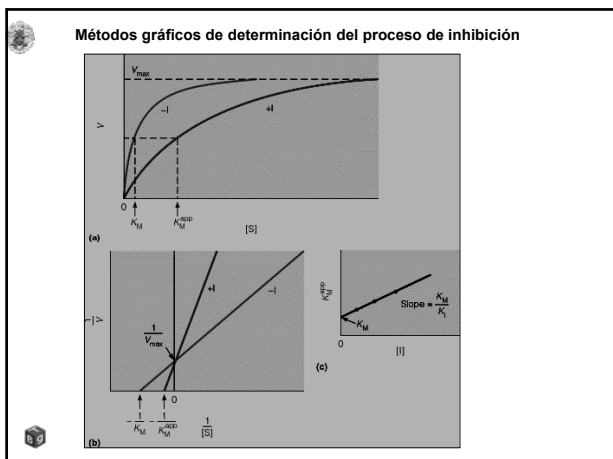
- Mecanismos de Inhibición

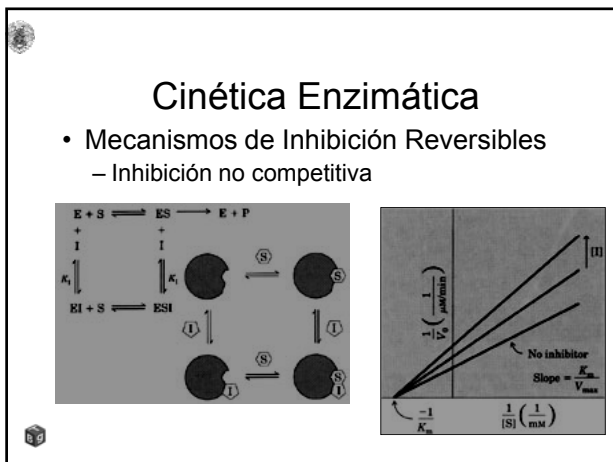


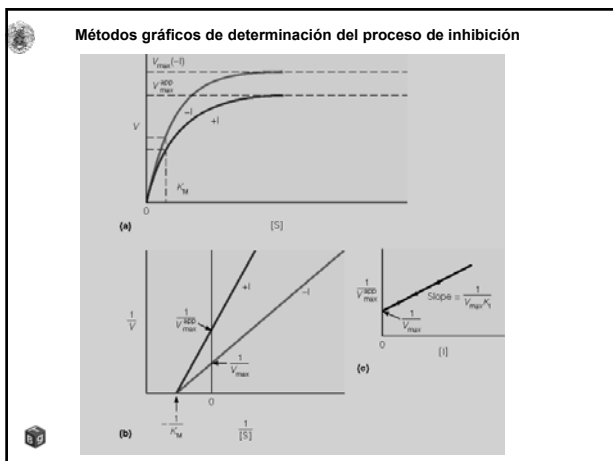
Cinética Enzimática

- Mecanismo de Inhibición Reversible
- Inhibición competitiva



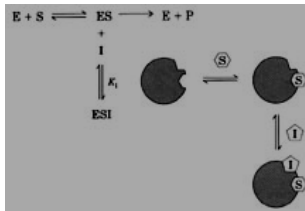






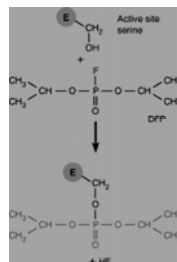
Cinética Enzimática

- Mecanismos de Inhibición Reversibles
 - Inhibición no-competitiva



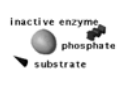

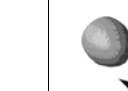
Cinética Enzimática

- Mecanismos de Inhibición Irreversibles
 - Análogos del estado de transición
 - Marcadores de afinidad
 - Inhibidores suicidas



Activador alostérico: favorece la unión del sustrato	Inhibidor alostérico: impide la unión del sustrato

Activación enzimática por fosforilación de la enzima

Elementos de la reacción	El enzima no fosforilado es inactivo	El enzima fosforilado es activo
 <p>inactive enzyme phosphate substrate</p>		

Resolución de mezclas racémicas

Hay tres metodologías para preparar compuestos ópticamente puros

- 1) Partir de compuestos quirales enantioméricamente puros (se obtiene de la Naturaleza)
- 2) Resolución cinética de mezclas racémicas
- 3) Síntesis asimétrica a partir de sustratos proquirales y un catalizador quiral

El primer método tiene el problema de la dificultad de hallar el producto adecuado en la Naturaleza

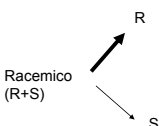
La biocatálisis se emplea a nivel industrial en los otros dos métodos dadas las Características de las enzimas como catalizadores.

Resolución cinética

Se basa en la distinta velocidad de reacción de cada uno de los dos Enantiómeros de un racémico frente a un catalizador quiral

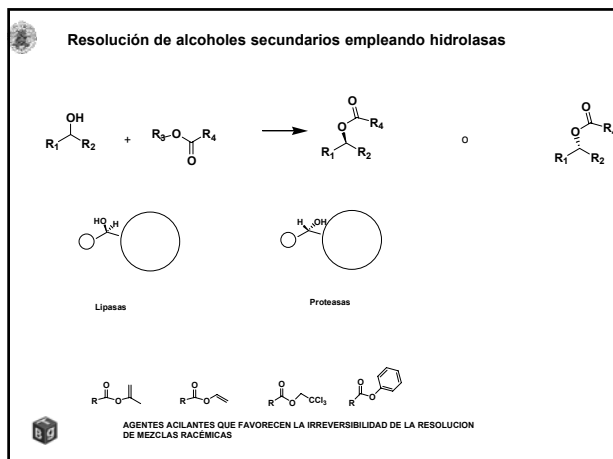
En el caso ideal, el máximo rendimiento que se puede obtener es de un 50%. No obstante siempre el valor es menor pues la velocidad de reacción depende de la concentración de sustrato y a medida que avanza la resolución el proceso se ralentiza para el enantiómero más gastado.

Racémico (R+S)



$$e.e = \frac{\%R - \%S}{\%R + \%S}$$

*para lograr buenos e.e. se detiene la reacción antes de llegar al 50% de rendimiento



4.1 PARÁMETROS BÁSICOS

4.EXCESO ENANTIOMÉRICO
 En una mezcla de dos enantiómeros, es el porcentaje de uno de los enantiómeros menos el del otro.

$$ee_R = \frac{n_R - n_S}{n_R + n_S}$$

ee_R : exceso enantiomérico del enantiómero R.
 n_R : cantidad (moles) del enantiómero R
 n_S : cantidad (moles) del enantiómero R

PARÁMETROS BÁSICOS en biocatálisis

EXCESO ENANTIOMÉRICO.

- ✓Describe la pureza óptica de una molécula ópticamente activa.
- ✓Debido a que los dos enantiómeros pueden tener propiedades muy diferentes, deben buscarse procesos que transcurran de manera lo más enantioselectiva posible.
- ✓Muchos procesos, sobre todo en la industria de producción de fármacos y agroquímicos (pesticidas, fungicidas, ...), que originalmente se producían en forma racémica, comienzan a ser producidos de forma enantioméricamente pura.(RACEMIC SWITCH).
- ✓Ventajas obvias: se produce menos del enantiómero no deseado, aumenta la capacidad de la fábrica, hay menos contaminación,

PARÁMETROS BÁSICOS en biocatálisis

Resolución cinética dinámica de alcoholes secundarios y de aminas primarias

Esquema 13. DKR S-selectiva de alcoholes secundarios.

Esquema 14. DKR S-selectiva de aminas primarias.

[Ru], R = *p*-MeO-C₆H₄

Molteni An. Quim. 2006, 102, 46-52

PARÁMETROS BÁSICOS en biocatálisis

Resolución cinética dinámica

Ar = Ph, 4-MeO-C₆H₄, 4-EtO-C₆H₄, 2-furanyl, 3-furanyl, 2-thienyl, 3-thienyl

100% e.e.
98% yield

Hoyos y col. J. Org. Chem 2006, 71, 7632-7

TIPOS DE PRECISIÓN ENZIMÁTICA

• LA PRECISIÓN SE TRADUCE EN:

- SELECTIVIDAD HACIA SUSTRATO
- QUIMIOSELECTIVIDAD (grupo)
- REGIOSELECTIVIDAD (zona)
- ESTEROSELECTIVIDAD (esteroquímica)

PARÁMETROS BÁSICOS en biocatálisis


5. NÚMERO DE RECAMBIO

(TURNOVER NUMBER).

Número de moléculas sintetizadas por número de moléculas de catalizador usadas.

$$tn = \frac{n_p}{n_{cat}} \cdot \frac{1}{|\nu_p|}$$

tn : número de recambio
 n_p : cantidad (moles) de producto P al final de la reacción
 n_{cat} : cantidad (moles) de catalizador
 ν_p : factor estequiométrico para el producto P




PARÁMETROS BÁSICOS en biocatálisis

NÚMERO DE RECAMBIO

Turnover number.

- ✓ Es una medida de la eficiencia del catalizador.
- ✓ tn debe ser lo mayor posible con vistas a la reducción del precio final del producto, sobre todo en los casos en los que el catalizador sea muy caro.
- ✓ Suele combinarse con otros parámetros (velocidad de desactivación, tiempo de vida medio) para dar una idea más correcta de la eficacia del catalizador.
- ✓ En el caso de reacciones en las que existan cofactores o coenzimas necesarias para la actividad catalítica se pueden definir valores de tn para estas moléculas.




PARÁMETROS BÁSICOS en biocatálisis

6. FRECUENCIA DE RECAMBIO

Número de moléculas convertidas por unidad de tiempo.

$$tof = \frac{\partial n_s}{\partial t \cdot n_{catalyst}}$$

tof : frecuencia de recambio (s^{-1})
 ∂n_s : diferencial de cantidad (moles, μ moles) de sustrato convertido
 n_{cat} : cantidad (moles, μ moles) de catalizador
 ∂t : diferencial de tiempo para la conversión (s)



PARÁMETROS BÁSICOS en biocatálisis

FRECUENCIA DE RECAMBIO.

- ✓Es una medida de la actividad enzimática.
- ✓Es mucho mayor para biocatalizadores que para catalizadores químicos.
- ✓Ejemplo:
 - catalizador químico para la epoxidación (Mn-Saleno): tof 3 h⁻¹.
 - Catalizador enzimático: cloroperoxidasa (CPO): tof 4500 h⁻¹
- ✓Pero también deben considerarse los pesos moleculares: 635 frente a 42000 g · mol⁻¹.



PARÁMETROS BÁSICOS en biocatálisis

7. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Velocidad de reacción por unidad de peso de catalizador (proteína).

$$V = \frac{\partial n_s}{\partial t \cdot m_{catalyst}}$$

- V : máxima actividad de la enzima en unas condiciones determinadas (katal · kg⁻¹, U · mg⁻¹)
 ∂n_s : diferencial de cantidad (moles, µmoles) de sustrato convertido
 m_{cat} : peso (kg, mg) de catalizador
 ∂t : diferencial de tiempo para la conversión (s, min)



PARÁMETROS BÁSICOS en biocatálisis

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

- ✓La unidad en el Sistema Internacional: KATAL (kat = mol · s⁻¹ = 6 · 10⁷ U). Como suelen ser valores muy pequeños, se habla generalmente de microkat, nanokat o picokat.
- ✓Es más práctico el uso de UNIDADES (1U = 1 µmol · min⁻¹).
- ✓Los valores de actividad deben expresarse siempre para un sustrato determinado y en unas determinadas condiciones de reacción (temperatura, tipo y conc. de buffer, pH, ...)
- ✓Para determinar la concentración de una disolución de proteína se suelen emplear métodos indirectos, bien fotométricos (Bradford, Biuret, Lowry) o analíticos (electroforesis)
- ✓La actividad también puede expresarse por unidad de volumen (U · mL⁻¹) cuando la concentración enzimática no puede determinarse.



PARÁMETROS BÁSICOS en biocatálisis

8. VELOCIDAD DE DESACTIVACIÓN

Es la pérdida de actividad catalítica por unidad de tiempo.

$$V_1 = V_0 \cdot e^{-k_{deact} \cdot (t_1 - t_0)}$$

k_{deact} : velocidad de desactivación.
 V_0 : actividad de la enzima al comienzo de la medición ($U \cdot mg^{-1}$)
 V_1 : actividad de la enzima al final de la medición ($U \cdot mg^{-1}$)
 t_0 : tiempo inicial de medición (min, h, d)
 t_1 : tiempo final de medición (min, h, d)

Expresa la estabilidad del catalizador.

PARÁMETROS BÁSICOS en biocatálisis

9. VIDA MEDIA

Tiempo al que la actividad enzimática se reduce a la mitad.

$$V_1 = V_0 \cdot e^{-k_{deact} \cdot (t_1 - t_0)}$$

$$V_2 = V_0 \cdot e^{-k_{deact} \cdot (t_2 - t_0)}$$

$$V_1 = \frac{1}{2} \cdot V_2$$

$$\Rightarrow t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{deact}}$$

$t_{1/2}$: vida media (min, h, d)
 k_{deact} : velocidad de desactivación.
 V_x : actividad de la enzima un tiempo x ($U \cdot mg^{-1}$)
 t_x : tiempo medición (min, h, d)

Expresa estabilidad.

Suele seguir un decaimiento exponencial

TIPOS DE PRECISIÓN ENZIMÁTICA

• SELECTIVIDAD DE SUSTRATO

• Incluso conociendo la estructura 3D de una enzima, a veces es difícil entender por qué una enzima reconoce un tipo de sustratos, mientras que otros similares no son transformados.

• Por ejemplo, la transaminasa de *Escherichia coli* puede producir una gran variedad de 2-oxoácidos usando ácido L-glutámico o L-Aspártico como donador del grupo amino.

Proceso irreversible

TIPOS DE PRECISIÓN ENZIMÁTICA

SELECTIVIDAD DE GRUPO FUNCIONAL

•Es la capacidad de las enzimas para actuar sobre un grupo funcional determinado en una molécula en la cual existe otro grupo funcional más reactivo en condiciones químicas.

Nitrilase

TIPOS DE PRECISIÓN ENZIMÁTICA

•REGIOSELECTIVIDAD

•Es la capacidad de las enzimas para actuar sobre un grupo funcional determinado en una molécula en la cual existe otro grupo funcional similar o idéntico en reactividad.

lipasa de *Geotrichum candidum*
medio acuoso

(R,S) inalterado

R1	R2	selectividad (E)
heptilo	propilo	11
undecilo	propilo	20
pentadecilo	propilo	20
5,5-dibutilpentilo	propilo	62
undecilo	clorometilo	3
undecilo	heptilo	5

TIPOS DE PRECISIÓN ENZIMÁTICA

Thermolysin

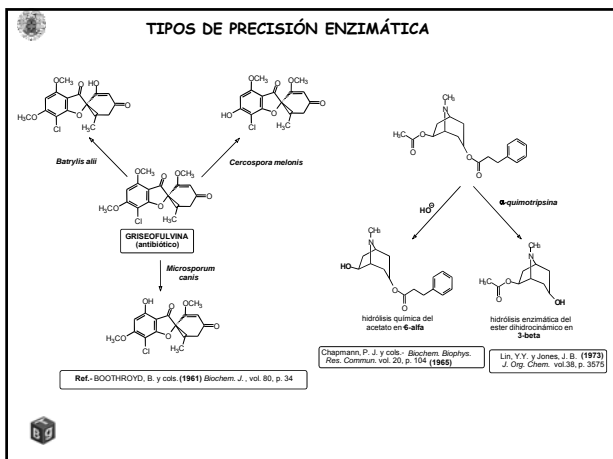
Z-Aspartame

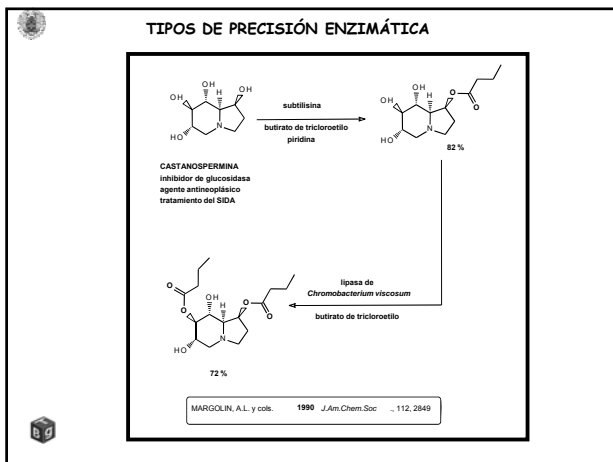
Acilasa

papaína

α-quimotripsina

R= Leu-Leu-encefalina
R= Met-Met-encefalina





TIPOS DE PRECISIÓN ENZIMÁTICA

•ESTEREOSELECTIVIDAD

- Es la capacidad de las enzimas para reconocer quiralidad o proquiralidad en un sustrato.
- Es sin duda la propiedad enzimática más empleada en Biotransformaciones.
- Como la quiralidad es una cuestión de espacio, un sustrato debe ubicarse de una manera determinada en tres dimensiones para permitir un alto grado de enantioselectividad.
- Existe una teoría basada en este hecho, como es la llamada **REGLA DE LOS TRES PUNTOS**, que permite explicar los tres tipos de estereoselectividad enzimática.

TIPOS DE PRECISIÓN ENZIMÁTICA

REGLA DE LA UNIÓN POR TRES PUNTOS
 A. OGSTON, *Nature*, 1948, 162, 963

DISCRIMINACIÓN ENANTIOTÓPICA

DISCRIMINACIÓN ENANTIOFACIAL

REGLA DE LA SECUENCIA A-B-C

TIPOS DE PRECISIÓN ENZIMÁTICA

DISCRIMINACIÓN ENANTIOMÉRICA

Schematized Enantiomer Recognition in the Receptor Site of an Enzyme

One enantiomer docks in an enzyme receptor "pocket".
 The other enantiomer does not fit (as well) into the receptor site.

Enzyme

ASPECTOS CINÉTICOS de la resolución de racémicos

$E + A \xrightarrow{\text{[EA]}^\ddagger} E + P$
 $E + B \xrightarrow{\text{[EB]}^\ddagger} E + Q$

$\Delta\Delta G^\ddagger = \Delta\Delta H^\ddagger - T\Delta\Delta S^\ddagger = -RT \ln (V_A/V_B)$

