

CINETICA DE LAS REACCIONES ENZIMATICAS QUE EVOLUCIONAN SEGUN UN MECANISMO UNI-BI

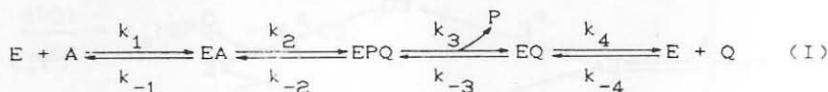
R. Varón, M. García, E. Valero

F. García, R. Madrid, M. Ll. Amo

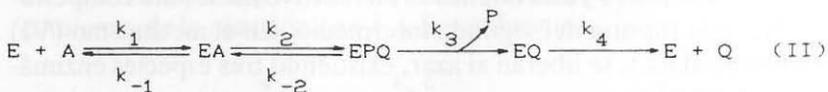
R. Varón, M. García y E. Valero pertenecen a la cátedra de Química I (Industrial) en la Escuela Universitaria Politécnica de Albacete, Universidad de Castilla-La Mancha. F. García pertenece al departamento de Bioquímica y Biología Molecular en la Universidad de Murcia. R. Madrid, M. Ll. Amo pertenecen al departamento de Química Agrícola, Geología y Edafología en la Universidad de Murcia.

INTRODUCCION

Muchas reacciones enzimáticas tienen lugar a través de mecanismos Uni-Bi, es decir, la obtención de dos productos a partir de un único sustrato. La ecuación correspondiente a la reacción Uni-Bi es [1]:

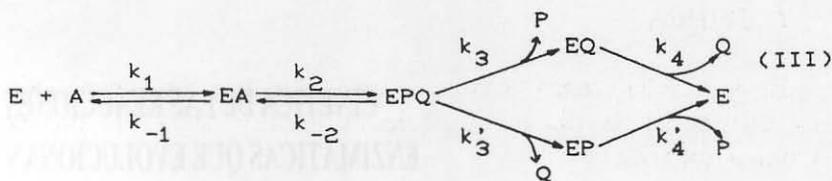


Si inicialmente no se encuentran presentes ninguno de los productos, el mecanismo correspondiente a los primeros instantes de la reacción, esto es, a la fase de transición, puede esquematizarse por:

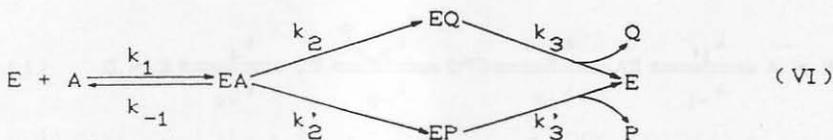
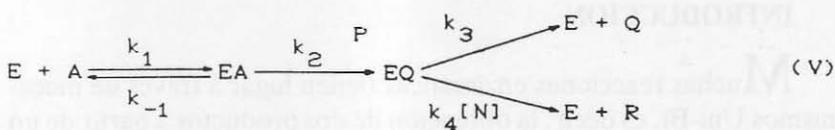
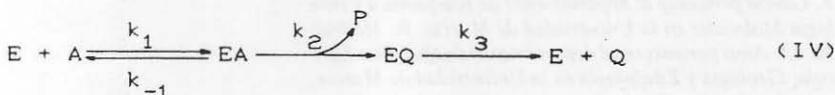


ya que $K_3[EPQ] \gg K_{-3}[EQ][P]$ por ser $[EQ][P]$ un infinitésimo de orden superior a $K_3[EPQ]$, pues tanto $[EPQ]$, como $[EQ]$ y $[P]$ son cantidades muy pequeñas durante la fase de transición de la reacción.

El mecanismo (II) puede ampliarse en el sentido de que la formación de productos sea al azar, o sea:



Existen varios estudios cinéticos [2, 3, 4] de la fase de transición de reacciones Uni-Bi, pero en todos los casos el mecanismo propuesto es más sencillo que el mecanismo (III). Algunos de estos mecanismos son:



En los mecanismos (IV) y (V) sólo existen dos intermedios, pero en el mecanismo (V) está implicado un reactivo nucleófilo competitivo, N, en la ruptura del segundo intermedio. En el mecanismo (VI) los dos productos se liberan al azar, existiendo tres especies enzimáticas intermedias.

El objetivo de este trabajo es hacer el estudio cinético completo de una reacción Uni-Bi que evoluciona según el mecanismo (III). Este estudio consistirá en: a) obtener las ecuaciones que relacionan la concentración de los productos con el tiempo desde $t=0$; b) obtener, a partir de las ecuaciones anteriores, las correspondientes si en las etapas reversibles se dan las condiciones de equilibrio rápido y c) proponer métodos de determinación de las constantes de velocidad.

2. TEORIA

El sistema de ecuaciones diferenciales que describe la evolución con el tiempo de las distintas especies enzimáticas que participan en el mecanismo (III) es:

$$\left. \begin{aligned}
 \frac{d[E]}{dt} &= -k_1[A][E] + k_{-1}[EA] + k_4[EQ] + k_4'[EP] \\
 \frac{d[EA]}{dt} &= k_1[A][E] - (k_{-1} + k_2)[EA] + k_{-2}[EPQ] \\
 \frac{d[EPQ]}{dt} &= k_2[EA] - (k_{-2} + k_3 + k_3')[EPQ] \\
 \frac{d[EQ]}{dt} &= k_3[EPQ] - k_4[EQ] \\
 \frac{d[EP]}{dt} &= k_3'[EPQ] - k_4'[EP] \\
 \frac{d[P]}{dt} &= k_3[EPQ] + k_4'[EP] \\
 \frac{d[Q]}{dt} &= k_3'[EPQ] + k_4[EQ]
 \end{aligned} \right\} \quad (1)$$

Si suponemos que $[A]_0 \gg [E]_0$, siendo $[A]_0$ y $[E]_0$ las concentraciones iniciales de A y E respectivamente, se verifica aproximadamente, que durante todo el curso de la reacción es $[A] = [A]_0$, con lo que el sistema de ecuaciones diferenciales (1) es lineal. La solución de este sistema suponiendo que las únicas especies presentes al comienzo de la reacción son A y E conduce a:

$$[X] = \beta_X + \alpha t + \sum_{h=1}^4 \gamma_{X,h} e^{\lambda_h t} \quad (X = P \text{ ó } Q) \quad (2)$$

En la ecuación anterior $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ y λ_4 son las raíces de la ecuación:

$$\lambda^4 + F_1 \lambda^3 + F_2 \lambda^2 + F_3 \lambda + F_4 = 0 \quad (3)$$

cuyos coeficientes F_i ($i=1, 2, 3, 4$) son funciones de las constantes de velocidad y de $[A]_0$. Las expresiones de F_i ($i=1, 2, 3, 4$), β_X ($X=P$ ó Q) y $\lambda_{h,X}$ ($X=P$ ó Q ; $h=1, 2, 3, 4$) están indicadas en el Apéndice A. Las raíces λ_h ($h=1, 2, 3, 4$) son reales negativas o complejas con la parte real negativa.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

La ec. (2) es válida desde $t=0$ supuesto el mecanismo (III). De esta ecuación se deduce que para valores altos de t (estado estacionario, $t \longrightarrow \infty$) la acumulación con el tiempo de los productos es lineal:

$$[X] = \beta_X + \alpha t \quad (4)$$

Obsérvese que α es la velocidad inicial de formación de los productos P y Q en el estado estacionario. Por otra parte, el período de inducción del producto X ($X=P$ ó Q), τ_X , es decir, la intersección de la recta de ec. (4) con el eje de abscisas es, según se deduce de la anterior ecuación:

$$\tau_X = - \frac{\beta_X}{\alpha} \quad (X = P \text{ ó } Q) \quad (5)$$

Si en la ec. (5) se tienen en cuenta las expresiones de β_P y β_Q del Apéndice A, resulta:

$$\tau_P = - \frac{k_3(k_4 + k'_4) + k'_3k_4}{k_4k'_4(k_3 + k'_3)} + \frac{F_2}{F_3} \quad (6)$$

$$\tau_Q = - \frac{k'_3(k_4 + k'_4) + k_3k_4}{k_4k'_4(k_3 + k'_3)} + \frac{F_2}{F_3} \quad (7)$$

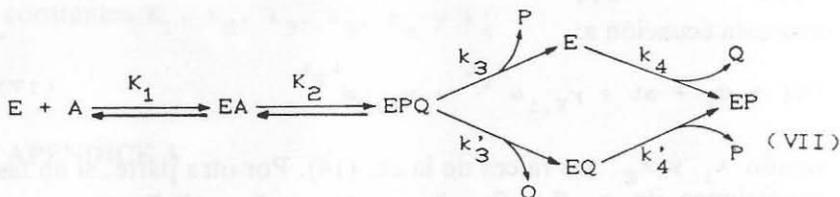
Obsérvese que

$$\tau_P - \tau_Q = \frac{(k'_3/k'_4) - (k_3/k_4)}{k_3 + k'_3} \quad (8)$$

Como se ve la diferencia $\tau_P - \tau_Q$ es independiente de $[A]_0$. Si $k'_3k_4 > k_3k'_4$ es $\tau_P > \tau_Q$, y viceversa. Evidentemente $\tau_P = \tau_Q$ si $k'_3k_4 = k_3k'_4$.

3.1. Condiciones de equilibrio rápido.

Si se dan las condiciones de equilibrio rápido en las etapas reversibles, esto es, si $k_1 [A]_0$, k_{-1} , k_2 y k_{-2} son mucho mayores que las demás constantes de velocidad y no muy diferentes entre sí, el mecanismo (III) ha de escribirse ahora como:



siendo $K_i = k_{-i}/k_i$ ($i=1, 2$)

Las ecuaciones correspondientes al mecanismo (VII) son las del mecanismo (III) pasando al límite cuando entre las constantes de velocidad se dan las condiciones antes citadas. Así, si en las ecs. (A1) – (A4) del Apéndice A tenemos en cuenta estas condiciones, resulta:

$$F_1 = k_1 [A]_0 + k_{-1} + k_{-2} + k_2 \quad (9)$$

$$F_2 = k_1 (k_{-2} + k_2) [A]_0 \quad (10)$$

$$F_3 = k_1 \left\{ (k_4 + k'_4)(k_{-2} + k_2) + k_2 (k_3 + k'_3) \right\} [A]_0 + k_{-1} k_{-2} (k_4 + k'_4) \quad (11)$$

$$F_4 = k_1 \left\{ k_4 k'_4 (k_{-2} + k_2) + k_2 (k_3 k'_4 + k'_3 k_4) \right\} [A]_0 + k_4 k'_4 k_{-1} k_{-2} \quad (12)$$

En estas condiciones es fácil demostrar que dos de las raíces, sean λ_3 y λ_4 , de la ec. (3) son mucho mayores, en valor absoluto, que el valor absoluto de la otras dos, λ_1 y λ_2 , es decir

$$|\lambda_i| \ll |\lambda_j| \quad (i = 1, 2; j = 3, 4) \quad (13)$$

coincidiendo éstas, aproximadamente, con las raíces de la ecuación

$$\lambda^2 + \frac{F_3}{F_2} \lambda + \frac{F_4}{F_2} = 0 \quad (14)$$

Evidentemente se verifica:

$$\lambda_1 + \lambda_2 = -F_3 \sqrt{F_2} \quad (15)$$

$$\lambda_1 \lambda_2 = F_4 \sqrt{F_2} \quad (16)$$

El resultado (13) permite despreciar en la ec. (2) los términos $\gamma_{X,3} e^{\lambda_3 t}$ y $\gamma_{X,4} e^{\lambda_4 t}$ frente a los demás, simplificándose esta ecuación a:

$$[X] = \beta_X + \alpha t + \gamma_{X,1} e^{\lambda_1 t} + \gamma_{X,2} e^{\lambda_2 t} \quad (17)$$

siendo λ_1 y λ_2 las raíces de la ec. (14). Por otra parte, si en las expresiones de α , β_P , β_Q , $\gamma_{P,1}$, $\gamma_{P,2}$, $\gamma_{Q,1}$ y $\gamma_{Q,2}$ del Apéndice A se tienen en cuenta las relaciones entre las constantes de velocidad, resultan para α , β_P , β_Q , $\gamma_{X,h}$ ($X=P$ ó Q ; $h=1, 2$) las expresiones del Apéndice B.

3.2. Determinación de las constantes de velocidad

El segundo miembro de la ec. (B1) del Apéndice B que relaciona α con $[A]_0$ y $[E]_0$ puede escribirse como $a[A]_0[E]_0/(b[A]_0+c)$, siendo los coeficientes a, b y c iguales, respectivamente, a $k_3 + k'_3$, $1 + K_2 + (k_3 k'_4/k_4) + (k'_3 k_4)$ y $K_1 K_2$. Un ajuste por regresión no lineal [5, 6] de α vs. $[A]_0$, conocida $[E]_0$ permite determinar los valores de a, b y c. Las estimaciones iniciales de a, b y c pueden obtenerse como sigue: el valor límite de $1/\alpha$ cuando $[A]_0 \rightarrow 0$, cuyo valor aproximado puede determinarse experimentalmente, coincide con c; por otra parte, una representación de $1/\alpha$ vs. $1/[A]_0$ es una recta de pendiente c/a y ordenada b/a . A partir de estas relaciones pueden obtenerse las estimaciones iniciales de a, b y c.

Por otra parte, a partir de las ecs. (15), (16), (10)-(12), resulta:

$$\lambda_1 + \lambda_2 = - \frac{k_3 + k'_3 + (k_4 + k'_4)(1 + K_2)}{1 + K_2} - \frac{K_1 K_2 (k_4 + k'_4)}{1 + K_2} \frac{1}{[A]_0}$$

$$\lambda_1 \lambda_2 = \frac{k_3 k'_4 + k'_3 k_4 + k_4 k'_4 (1 + K_2)}{1 + K_2} + \frac{k_4 k'_4 K_1 K_2}{1 + K_2} \frac{1}{[A]_0}$$

Mediante regresión no lineal es posible ajustar los datos experimentales de $[X]$ ($X=P$ ó Q) y t a la ec. (17), lo que permite la determinación de λ_1 y λ_2 ; Sendas representaciones de $\lambda_1 + \lambda_2$

y de $\lambda_1 \lambda_2$ vs. $1/[A]_0$ permiten determinar $[k_3 + k'_3 +$

$(k_4 + k'_4)(1 + K_2)] / (1 + K_2)$, $K_1 K_2 (k_4 + k'_4) / (1 + K_2)$ y

$k_4 k'_4 K_1 K_2 / (1 + K_2)$. A partir de todos estos datos, resolviendo el sistema de seis ecuaciones correspondientes se pueden calcular las constantes K_1 , K_2 , k_3 , k'_3 , k_4 y k'_4 .

APENDICE A

Expresiones de F_i ($i = 1, 2, 3, 4$)

$$F_1 = k_1 [A]_0 + k_{-2} + k_{-1} + k_2 + k_3 + k'_3 + k_4 + k'_4 \quad (A1)$$

$$F_2 = k_1 (k_{-2} + k_2 + k_3 + k'_3 + k_4 + k'_4) [A]_0 + (k_{-1} + k_4 + k'_4) (k_{-2} + k_3 + k'_3) + (k_{-1} + k_2) (k_4 + k'_4) + k_2 (k_3 + k'_3) + k_4 k'_4 \quad (A2)$$

$$F_3 = k_1 (k_4 k'_4 + (k_4 + k'_4) (k_{-2} + k_2 + k_3 + k'_3) + k_2 (k_3 + k'_3)) [A]_0 + (k_{-2} + k_3 + k'_3) (k_4 k'_4 + k_{-1} (k_4 + k'_4)) + k_4 k'_4 (k_{-1} + k_2) + k_2 (k_3 + k'_3) (k_4 + k'_4) \quad (A3)$$

$$F_4 = k_1 (k_4 k'_4 (k_{-2} + k_2 + k_3 + k'_3) + k_2 (k_3 k'_4 + k'_3 k_4)) [A]_0 + k_4 k'_4 (k_{-1} (k_{-2} + k_3 + k'_3) + k_2 (k_3 + k'_3)) \quad (A4)$$

Expresiones de α , β_P , β_Q , γ_{Ph} y γ_{Qh}

$$\alpha = \frac{k_1 k_2 k_4 k'_4 (k_3 + k'_3) [A] [E]_0}{F_4} \quad (A5)$$

$$\beta_P = \frac{k_1 k_1 (k_3 k'_4 + k_3 k_4 + k'_3 k'_4) [A] [E]_0}{F_4} - \frac{F_3}{F_4} \alpha \quad (A6)$$

$$\beta_Q = \frac{k_1 k_2 (k'_3 k_4 + k'_3 k'_4 + k_3 k_4) [A] [E]_0}{F_4} - \frac{F_3}{F_4} \alpha \quad (A7)$$

$$\gamma_{Ph} = - \frac{k_1 k_2 \langle k_4 k_4' (k_3 + k_3') + (k_3 k_4' + k_3' k_4 + k_3' k_4') \lambda_h + k_3 \lambda_h^2 \rangle [A]_0 [E]_0}{\lambda_h^2 \prod_{\substack{r=1 \\ r \neq h}}^4 (\lambda_r - \lambda_h)} \quad (A8)$$

(h = 1, 2, 3, 4)

$$\gamma_{Qh} = - \frac{k_1 k_2 \langle k_4 k_4' (k_3 + k_3') + (k_3' k_4 + k_3 k_4' + k_3 k_4) \lambda_h + k_3 \lambda_h^2 \rangle [A]_0 [E]_0}{\lambda_h^2 \prod_{\substack{r=1 \\ r \neq h}}^4 (\lambda_r - \lambda_h)} \quad (A9)$$

(h = 1, 2, 3, 4)

APENDICE B

Expresiones de α , β_X (X = P ó Q) y $\gamma_{X,h}$ (X = P ó Q; h = 1, 2) de la ec. (17).

$$\alpha = \frac{(k_3 + k_3') [A]_0 [E]_0}{(1 + K_2 + k_3' / k_4 + k_3' / k_4') [A]_0 + K_1 K_2} \quad (B1)$$

$$\beta_P = \frac{(k_3 k_4' + k_3' k_4 + k_3' k_4') [A]_0 [E]_0}{\langle k_4 k_4' (1 + K_2) + k_3 k_4' + k_3' k_4 \rangle [A]_0 + k_4 k_4' K_1 K_2} - \frac{\langle (k_4 + k_4') (1 + K_2) + k_3 + k_3' \rangle [A]_0 + K_1 K_2 (k_4 + k_4')}{\langle k_4 k_4' (1 + K_2) + k_3 k_4' + k_3' k_4 \rangle [A]_0 + k_4 k_4' K_1 K_2} \quad (B2)$$

$$\beta_Q = \frac{(k_3' k_4 + k_3 k_4' + k_3' k_4') [A]_0 [E]_0}{\langle k_4 k_4' (1 + K_2) + k_3 k_4' + k_3' k_4 \rangle [A]_0 + k_4 k_4' K_1 K_2} - \frac{\langle (k_4 + k_4') (1 + K_2) + k_3 + k_3' \rangle [A]_0 + K_1 K_2 (k_4 + k_4')}{\langle k_4 k_4' (1 + K_2) + k_3 k_4' + k_3' k_4 \rangle [A]_0 + k_4 k_4' K_1 K_2} \quad (B3)$$

$$\gamma_{P,h} = - \frac{k_4 k_4' \langle k_3 + k_3' \rangle + (k_3 k_4' + k_3' k_4 + k_3' k_4') \lambda_h + k_3 \lambda_h^2}{\lambda_h^2 (\lambda_r - \lambda_h) \langle (1 + K_2) [A]_0 + K_1 K_2 \rangle} [A]_0 [E]_0 \quad (B4)$$

(r, h = 1, 2; r ≠ h)

$$\gamma_{Q,h} = \frac{k_4 k_4' \langle k_3 + k_3' \rangle + (k_3' k_4 + k_3 k_4' + k_3 k_4) \lambda_h + k_3 \lambda_h^2}{\lambda_h^2 (\lambda_r - \lambda_h) \langle (1 + K_2) [A]_0 + K_1 K_2 \rangle} [A]_0 [E]_0 \quad (B5)$$

(r, h = 1, 2; r ≠ h)

4. BIBLIOGRAFIA

1. SEGEL, I. H. (1975). *Enzyme Kinetics*. P. 544. John Wiley and Sons. New York.
2. LAIDLER, K. J. y BUNTING, P. S. (1973). *The chemical kinetics of enzyme action*. 2nd edn., p. 185. Oxford: Clarendon Press.
3. MAGUIRE, R. J., HIJAZI, N. H. y LAIDLER, K.J. (1974). *Biochem. Biophys. Acta*, 341, 1.
4. GALVEZ, J., VARON, R., GARCIA CANOVAS, F. y GARCIA CARMONA, F. (1982), *J. Theor. Biol.*, 94, 413.
5. MARQUARDT, D. W. (1963). *J. Soc. Ind. Appl. Math.*, 11, 431.
6. WILKINSON, G. N. (1961). *Biochem. J.*, 80, 324.