ANALISIS CINETICO DE LA FASE DE TRANSICION DE REACCIONES ENZIMATICAS TRISUSTRATO QUE SIGUEN UN MECANISMO AL AZAR B-C UNI UNI BI BI PING PONG

M. García Moreno[a,*]
R. Varón Castellanos[a]
E. Valero Ruiz[a]
F. García Cánovas[b]
J. Tudela Serrano[b]
M. LL. Amo Saus[a]

(a) Departamento de Química. Escuela Universitaria Politécnica de Albacete. Universidad de Castilla-La Mancha.

b) Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Murcia.

RESUMEN

En este trabajo estudiamos la fase de transición del mecanismo al azar B-C Uni Uni Bi Bi Ping-Pong y se obtienen las ecuaciones que relacionan la concentración de los productos con el tiempo. Así mismo, se generaliza para obtener las ecuaciones cinéticas de mecanismos que puedan considerarse casos particulares del anterior. Además, se propone un método para la determinación de todas las constantes de velocidad de los mecanismos.

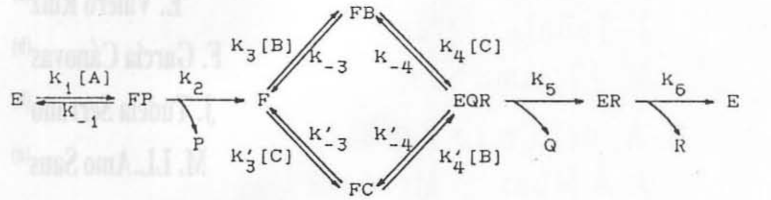
INTRODUCCION

El estudio cinético de las reacciones enzimáticas trisustrato se ha llevado a cabo bajo la aproximación del estado estacionario, la

(*) Autor a quien debe ser dirigida la correspondencia.

expresión de la ecuación de velocidad y sus distintas representaciones gráficas permiten distinguir entre los posibles mecanismos y obtener los parámetros cinéticos (k_M y v_{max}) que caracterizan al enzima actuando sobre los distintos sustratos[1-4]. Sin embargo el enfoque en fase de transición, consigue una información más profunda sobre las distintas etapas del ciclo catalítico que tiene lugar en la transformación de los sustratos a productos. Estudios cinéticos en fase de transición se han realizado fundamentalmente con reacciones enzimáticas mono y bisustrato[5] y recientemente a algunos mecanismos trisustrato.[6,7]

El grupo de mecanismos tipo Ping-Pong en reacciones trisustrato es muy amplio,[4], [8] uno de ellos es el Al Azar B-C Uni Uni Bi Bi Ping-Pong que evoluciona según el siguiente esquema:



(I)

El objetivo de nuestro trabajo es obtener las ecuaciones cinéticas de formación de los productos, válidas tanto para la fase de transición como para el estado estacionario correspondientes al mecanismo (I), y establecer un método para la determinación de todas las constantes de velocidad implicadas en él, a partir de los perfiles concentración-tiempo de los productos, en el caso bastante frecuente de que en el sistema se den las condiciones de equilibrio rápido en la unión de los distintos sustratos.[4]

ANALISIS CINETICO

Si las únicas especies presentes al comienzo de la reacción son los sustratos A, B, y C y el enzima libre, E, siendo la concentración de los sustratos mucho mayor que la del enzima libre, la aplicación de métodos matemáticos descritos en la literatura[9], [10] para la cinética de la fase de transición de los de reacciones enzimáticas, se obtiene:

$$[X] = B_x + \alpha t + \sum_{h=1}^{6} \lambda_{xh} \exp(\lambda_h t) \qquad (X \equiv P, Q \text{ o } R) \qquad (1)$$

siendo las λ_h ($h=1, 2, .., 6$) las raíces de la ecuación:

$$\sum_{i=1}^{6} F_i \lambda^{6-i} = 0 \qquad (2)$$

Los coeficientes F_i ($1 = 1, 2, \ldots 6$) son funciones de a_o, b_o y c_o, y de las constantes de velocidad, estando indicadas sus expresiones en el Apéndice.

Las raíces λ_h pueden ser reales o complejas dependiendo de los valores relativos de los coeficientes F_i, pero si son reales, son negativas y si son complejas, tienen negativa la parte real y no son nunca, por lo tanto, imaginarias puras[5], [10]. A su vez, α, β_P, β_Q, β_R, γ_{Ph}, γ_{Qh} y γ_{Rh} ($h = 1, 2, \ldots, 6$) vienen dados por:

$$\alpha = K_1K_2K_5K_6[K_3K_4(K'_{-3}+K'_4b_o)+K'_3K'_4(K_{-3}+K_4c_o)]a_ob_oc_oe_o/F_6 \qquad (3)$$

$$\begin{aligned}\beta_P = \{&K_1K_2\{K_{-3}K'_{-3}K_6(K_{-4}+K'_4+K_5)+[(K_3K'_{-3}+K_{-3}K'_4)(K_{-4}+K_5)+K_3K'_{-3}K'_{-4}+\\&+K_3K'_4(K_{-4}+K_5)b_o]K_6b_o+[(K'_3K_{-3}+K_4K'_{-3})(K'_{-4}+K_5)+K'_3K_{-3}K_{-4}+(K'_{-4}+\\&+K_5)K'_3K_4c_o]K_6c_o+\{K_3K_4[(K'_4b_o+K'_{-3})(K_5+K_6)+(K'_{-4}+K_5)K_6]+[(K_4c_o+\\&+K_{-3})(K_5+K_6)+(K_{-4}+K_5)K_6]K'_3K'_4+K_4K'_4K_5K_6\}b_oc_o\}a_oe_o-F_5\alpha\}/F_6\end{aligned} \qquad (4)$$

$$\beta_Q = \{K_1K_2K_5[K_3K_4(K_6+K'_{-3}+K'_4b_o)+K'_4K'_3(K_6+K_{-3}+K_4c_o)]a_ob_oc_oe_o-F_5\alpha\}/F_6 \qquad (5)$$

$$\beta_R = \{K_1K_2K_5K_6(K_3K_4+K'_3K'_4)a_ob_oc_oe_o-F_5\alpha\}/F_6 \qquad (6)$$

$$\gamma_{Ph} = (G_0+G_1\lambda_h+G_2\lambda_h^2+G_3\lambda_h^3+G_4\lambda_h^4+G_5\lambda_h^5)e_oT_h \qquad (h=1, 2, \ldots, 6) \qquad (7)$$

siendo:

$$G_0 = K_1K_2K_5K_6[K_3K_4(K'_{-3}+K'_4b_o)+K'_3K'_4(K_{-3}+K_4c_o)]a_ob_oc_o \qquad (8)$$

$$\begin{aligned}G_1 = K_1K_2\{&K_{-3}K'_{-3}K_6(K_{-4}+K'_4+K_5)+[(K_3K'_{-3}+K_{-3}K'_4)(K_{-4}+K_5)+K_3K'_{-3}K'_{-4}+\\&+K_3K'_4(K_{-4}+K_5)b_o]K_6b_o+[(K'_3K_{-3}+K_4K'_{-3})(K'_{-4}+K_5)+K'_3K_{-3}K_{-4}+(K'_{-4}+\\&+K_5)K'_3K_4c_o]K_6c_o+\{K_3K_4[(K'_4b_o+K'_{-3})(K_5+K_6)+(K'_{-4}+K_5)K_6]+[(K_4c_o+\\&+K_{-3})(K_5+K_6)+(K_{-4}+K_5)K_6]K'_3K'_4+K_4K'_4K_5K_6\}b_oc_o\}a_o\end{aligned} \qquad (9)$$

$$G_2=k_1k_2\{(k'_{-3}+k_{-3})(k_{-4}+k'_{-4}+k_5)k_6+k_{-3}[k'_{-3}(k_{-4}+k'_{-4}+k_5+k_6)+k_5k_6]+$$
$$+\{k_3[k'_4b_o(k_{-4}+k_5+k_6)+(k'_{-3}+k_{-4}+k'_{-4}+k_5)k_6+k'_{-3}(k_{-4}+k'_{-4}+k_5)]+$$
$$+k'_4[(k_{-3}+k_{-4}+k_5)k_6+k_{-3}(k_{-4}+k_5)]\}b_o+\{k_4[k'_3c_o(k'_{-4}+k_5+k_6)+(k'_{-3}+$$
$$+k'_{-4}+k_5)k_6+k'_{-3}(k'_{-4}+k_5)]+k'_3[(k_{-3}+k_{-4}+k'_{-4}+k_5)k_6+k_{-3}(k_{-4}+k'_{-4}+$$
$$+k_5)]\}c_o+[k_3k_4(k'_4b_o+k'_{-3}+k'_4+k_5+k_6)+k'_3k'_4(k_4c_o+k_{-3}+k_{-4}+k_5+k_6)+$$
$$+k_4k'_4(k_5+k_6)]b_oc_o\}a_o \qquad (10)$$

$$G_3=k_1k_2\{k_6(k_{-3}+k'_{-3}+k_{-4}+k'_{-4}+k_5)+k_{-3}(k_{-4}+k'_{-4}+k'_{-3}+k_5)+k'_{-3}(k_{-4}+k'_{-4}+$$
$$+k_5)+[k_3(k'_{-3}+k_{-4}+k'_{-4}+k_5+k_6)+k'_4(k_{-3}+k_{-4}+k_5+k_6+k_3b_o)]b_o+[(k_{-3}+$$
$$+k_{-4}+k'_{-4}+k_5+k_6)k'_3+k_4(k'_3c_o+k'_{-3}+k'_{-4}+k_5+k_6)]c_o+[k'_4(k_3+k'_3+k_4)+$$
$$+k_3k_4]b_oc_o\}a_o \qquad (11)$$

$$G_4=k_1k_2[k_{-3}+k'_{-3}+k_{-4}+k'_{-4}+k_5+k_6+(k_3+k'_4)b_o+(k'_3+k_4)c_o]a_o \qquad (12)$$

$$G_5=k_1k_2a_o \qquad (13)$$

$$\gamma_{Qh}=k_1k_2k_5\{k_6[k_3k_4(k'_{-3}+k'_4b_o)+k'_3k'_4(k_{-3}+k_4c_o)]+[k_3k_4(k_6+k'_{-3}+$$
$$+k'_4b_o)+k'_4k'_3(k_6+k_{-3}+k_4c_o)]\lambda_h+(k_3k_4+k'_3k'_4)\lambda_h^2\}\ a_ob_oc_oe_o$$
$$(h=1,2,..,6) \qquad (14)$$

$$\gamma_{Rh}=k_1k_2k_5k_6[k_3k_4(k'_{-3}+k'_4b_o)+k'_3k'_4(k_{-3}+k_4c_o)+(k_3k_4+$$
$$+k'_3k'_4)\lambda_h]a_ob_oc_oe_o \qquad (h=1,2,...,6) \qquad (15)$$

En las ecs (3) - (15) a_o, b_o, c_o, y e_o denotan respectivamente, las concentraciones iniciales de A, B, C y E. Por parte, en las ecs, (7), (14) y (15) T_h (h = 1, 2,... 6).

$$T_h=1/\{\lambda_h^2\prod_{\substack{r=1\\r\neq h}}^{6}(\lambda_r-\lambda_h)\} \qquad (h=1,2,...,6) \qquad (16)$$

RESULTADOS Y DISCUSION

La ec. (1) relaciona la concentración de los productos con el tiempo durante todo el curso de la reacción y es válida, por lo tanto, para la fase de transición y para el estado estacionario. Para este último estado, los términos exponenciales de la ec. (1) son despreciables, por lo que la mencionada ecuación puede simplificarse a:

$$[X] = \beta_X + \alpha t \qquad (X \equiv P,\ Q \text{ o } R) \tag{17}$$

que es la ecuación de una recta cuya pendiente, α, es la velocidad inicial del producto X (X=P, Q o R). Obsérvese que en el estado estacionario los tres productos se forman con la misma velocidad.

A su vez, de las ecs. (17), (3), (4), (5) y (6) se deduce que los periodos de inducción (es decir la intersección de la recta de la ec. (17) con el eje t) de los productos P, Q y R que nosotros denotaremos por τ_P, τ_Q y τ_R, son:

$$\begin{aligned}\tau_P = \{ \{ & K_3K_4[(K'_4b_o+K'_{-3})(K_5+K_6)+(K'_{-4}+K_5)K_6]+K'_3K'_4[(K_4c_o+K_{-3})(K_5+K_6)+ \\ & +(K_{-4}+K_5)K_6+K_4K'_4K_5K_6\}/K_6K_5T+[(K'_3K_{-3}+K_4K'_{-3})(K'_{-4}+K_5)+K'_3K_{-3}K_{-4}+ \\ & +K'_3K_4(K'_{-4}+K_5)c_o]/K_5b_oT+ [(K_3K'_{-3}+K_{-3}K'_4)(K_{-4}+K_5)+K_3K'_{-3}K'_{-4}+ \\ & +(K_{-4}+K_5)K_3K'_4b_o]/K_5c_oT+[K_{-3}K'_{-3}(K_{-4}+K'_4+K_5)]/K_5b_oc_o\} - (F_5/F_6)\end{aligned} \tag{18}$$

$$\tau_Q = \{ [K_3K_4(K_6+K'_{-3}+K'_4b_o)+K'_3K'_4(K_6+K_{-3}+K_4c_o)]/K_6T\} - (F_5/F_6) \tag{19}$$

$$\tau_R = [(K_3K_4+K'_3K'_4)/T] - (F_5/F_6) \tag{20}$$

en las ecs. (18), (19) y (20) T es:

$$T = K_3K_4(K'_{-3}+K'_4b_o)+K'_3K'_4(K_{-3}+K_4c_o) \tag{21}$$

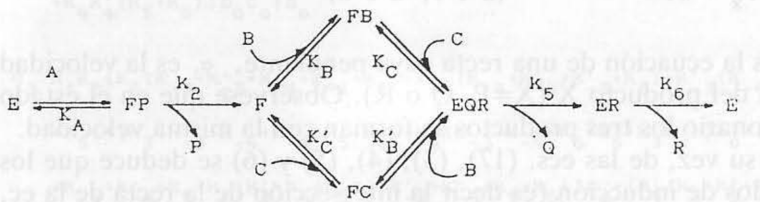
Podemos considerar distintos casos particulares del mecanismo (I) a los que pueden aplicarse las ecuaciones anteriormente deducidas efectuando en ellas los cambios correspondientes, alguno de estos casos se producirá sí:

a) Dos o más de los sustratos A, B y C o de los productos P, Q y R, son iguales o si se dan ambas situaciones simultaneamente. Por ejemplo, si C$\equiv$B y R$\equiv$Q, basta sustituir en todas las ecuaciones c_o

por b_o y tener en cuenta que la concentación de Q es ahora igual a [Q] + [R].

b) Hay una o más constantes de primer (k_i; i = −1, −3, −4, 2, 5, 6 y k'_i; i = −3, −4) o pseudo primer orden (k_1a_o, k_3b_o, k'_4b_o, k_4c_o, k'_3c_o), con valores altos y no muy diferentes, lo que expresamos, en términos matemáticos, estableciendo que estas constantes tienden a infinito y tienen el mismo orden de infinitud.[11]

Un ejemplo de estos mecanismos derivados es:



(II)

el cual resulta si en el mecanismo (I) se verifica:

$$c_i \longrightarrow \infty \quad (i=-1,-3,-4,1,3,4) \tag{22}$$

$$c'_i \longrightarrow \infty \quad (i=-3,-4,3,4) \tag{23}$$

$$c_i/c_j \neq \begin{cases} 0 \\ \infty \end{cases} (i, j=-1,-3,-4,1,3,4) \tag{24}$$

$$c'_i/c'_j \neq \begin{cases} 0 \\ \infty \end{cases} (i, j=-3,-4,3,4) \tag{25}$$

$$c_i/c_j \rightarrow 0 \quad (i=2,5,6;\ j=-1,-3,-4,1,3,4) \tag{26}$$

$$c_i/c'_j \rightarrow 0 \quad (i=2,5,6;\ j=-3,-4,3,4) \tag{27}$$

donde

$$c_i = k_i \quad (i=-1,-3,-4,2,5,6) \tag{28}$$

$$c'_i = k'_i \quad (i=-3,-4) \tag{29}$$

$$c_1 = k_1 a_o \tag{30}$$

$$c_3 = k_3 b_o \tag{31}$$

$$c_4 = k_4 c_o \tag{32}$$

$$c'_4 = k'_4 b_o \tag{33}$$

$$c'_3 = k'_3 c_o \tag{34}$$

siendo:

$$K_A = k_{-1}/k_1,\ K_B = k_{-3}/k_3,\ K'_B = k'_{-4}/k'_4,\ K_C = k_{-4}/k_4 \text{ y } K'_C = k'_{-3}/k'_3$$

En el mecanismo II se supone que se dan las condiciones de equilibrio rápido, y por tanto, las constantes c_i ($i = -1, -3, -4, 1, 3, 4$) y c'_i ($i = -3, -4, 3, 4$) involucradas en estas etapas tenderán a infinito.[11]

Las ecuaciones cinéticas para el mecanismo (II) pueden obtenerse de las correspondientes al mecanismo (I) teniendo en cuenta las condiciones (22) - (27), efectuando los cambios correspondientes, procediendo según métodos descritos en la literatura.[12]

La determinación de las constantes de velocidad del mecanismo (I) se pueden calcular mediante la utilización de un método de análisis de datos cinéticos,[7] basado únicamente en la curva de progreso del producto R o de los productos P y Q si son experimentalmente accesibles. Este método sería válido para cualquiera de los mecanismos que, como el mecanismo (II), pueden ser considerados casos particulares del (I).

Apéndice

Dependencia de los coeficientes F_i (0, 1,...,6) de la concentración inicial de sustratos y de las constantes de velocidad.

$$F_0 = 1 \tag{A1}$$

$$F_1 = K_{-1}+K_2+K_{-3}+K'_{-3}+K_{-4}+K'_{-4}+K_5+K_6+K_1a_o+(K_3+K'_4)b_o+(K'_3+K_4)c_o \tag{A2}$$

$$\begin{aligned}F_2 = {} & (K_{-3}+K'_{-3}+K_{-4}+K'_{-4}+K_5+K_6)(K_{-1}+K_2)+(K_{-3}+K'_{-3})(K_{-4}+K'_{-4}+K_5+K_6)+\\ & +K_{-3}K'_{-3}+K_6(K_{-4}+K'_{-4}+K_5)+K_1(K_2+K_{-3}+K'_{-3}+K_{-4}+K'_{-4}+K_5+K_6)a_o+[(K_3+\\ & +K'_4)(K_{-1}+K_2+K_{-4}+K_5+K_6)+K_3(K'_{-3}+K'_{-4})+K'_4K_{-3}]b_o+[(K'_3+K_4)(K_{-1}+\\ & +K_2+K'_{-4}+K_5+K_6)+K'_3(K_{-3}+K_{-4})+K_4K'_{-3}]c_o+K_1(K_3+K'_4)a_ob_o+K_1(K'_3+\\ & +K_4)a_oc_o+[K_4(K_3+K'_4)+K'_3K'_4]b_oc_o+K_3K'_4b_o^2+K'_3K_4c_o^2\end{aligned} \tag{A3}$$

$$\begin{aligned}F_3 = {} & (K_{-4}+K'_{-4}+K_5)[(K_{-1}+K_2)(K_{-3}+K'_{-3}+K_6)+(K'_{-3}+K_6)K_{-3}+K'_{-3}K_6]+\\ & +K_{-3}K'_{-3}K_6+(K_{-1}+K_2)[K_{-3}(K'_{-3}+K_6)+K'_{-3}K_6]+K_1[(K_{-4}+K'_{-4}+K_5)(K_2+\\ & +K_{-3}+K'_{-3}+K_6)+(K'_{-3}+K_6)(K_2+K_{-3})+K_2K'_{-3}+K'_{-3}K_6]a_o+\{K_3[(K_{-4}+K'_{-4}+\\ & +K_5)(K_{-1}+K_2+K'_{-3}+K_6)+(K_{-1}+K_2)(K'_{-3}+K_6)+K'_{-3}K_6]+K'_4[(K_{-4}+\\ & +K_5)(K_{-1}+K_2+K_{-3}+K_6)+(K_{-1}+K_2)(K_{-3}+K_6)+K_{-3}K_6]\}b_o+K_3K'_4(K_{-1}+K_2+\\ & +K_{-4}+K_5+K_6)b_o^2+\{K'_3[(K_{-4}+K'_{-4}+K_5)(K_{-1}+K_2+K_{-3}+K_6)+(K_{-1}+K_2)(K_{-3}+\\ & +K_6)+K_{-3}K_6]+K_4[(K'_{-4}+K_5)(K_{-1}+K_2+K'_{-3}+K_6)+(K_{-1}+K_2)(K'_{-3}+K_6)+\\ & +K'_{-3}K_6]\}c_o+K'_3K_4(K_{-1}+K_2+K'_{-4}+K_5+K_6)c_o+K_1[(K_3+K'_4)(K_2+K_{-4}+K_5+\end{aligned}$$

$$
\begin{aligned}
&+K_6)+K_3(K'_{-3}+K'_{-4})+K'_4K_{-3}]a_ob_o+K_1K_3K'_4a_ob_o^2+K_1[(K'_3+K_4)(K_2+K'_{-4}+\\
&+K_5+K_6)+K'_3(K_{-3}+K_{-4})+K_4K'_{-3}]a_oc_o+K_1K'_3K_4a_oc_o^2+\{K_4[K_3(K'_{-3}+K'_{-4}+\\
&+K_5+K_6+K_{-1}+K_2)+K'_4(K_{-1}+K_2+K_5+K_6)]+K'_3K'_4(K_{-1}+K_2+K_{-3}+K_{-4}+K_5+\\
&+K_6)\}b_oc_o+K_3K_4K'_4b_o^2c_o+K'_3K_4K'_4b_oc_o^2+K_1[K_4(K_3+K'_4)+K'_3K'_4]a_ob_oc_o
\end{aligned}
\qquad \text{(A4)}
$$

$$
\begin{aligned}
F_4=&(K_{-4}+K'_{-4}+K_5)\{(K_{-1}+K_2)[K_{-3}(K'_{-3}+K_6)+K'_{-3}K_6]+K_{-3}K'_{-3}K_6\}+(K_{-1}+\\
&+K_2)K_{-3}K'_{-3}K_6+K_1\{(K_{-4}+K'_{-4}+K_5)[K_2(K_{-3}+K'_{-3}+K_6)+K_{-3}(K'_{-3}+K_6)+\\
&+K'_{-3}K_6]+K_2K_{-3}(K'_{-3}+K_6)+K'_{-3}K_6(K_2+K_{-3})\}a_o+\{K_3\{(K_{-4}+K'_{-4}+\\
&+K_5)[(K_{-1}+K_2)(K'_{-3}+K_6)+K'_{-3}K_6]+(K_{-1}+K_2)K'_{-3}K_6\}+K'_4\{(K_{-4}+\\
&+K_5)[(K_{-1}+K_2)(K_{-3}+K_6)+K_{-3}K_6]+(K_{-1}+K_2)K_{-3}K_6\}\}b_o+K_3K'_4[(K_{-4}+\\
&+K_5)(K_{-1}+K_2+K_6)+(K_{-1}+K_2)K_6]b_o^2+\{K'_3\{(K_{-4}+K'_{-4}+K_5)[K_{-1}+K_2)(K_{-3}+\\
&+K_6)+K_{-3}K_6]+(K_{-1}+K_2)K_{-3}K_6\}+K_4\{(K'_{-4}+K_5)[(K_{-1}+K_2)(K'_{-3}+K_6)+\\
&+K'_{-3}K_6]+(K_{-1}+K_2)K'_{-3}K_6\}\}c_o+K'_3K_4[(K'_{-4}+K_5)(K_{-1}+K_2+K_6)+(K_{-1}+\\
&+K_2)K_6]c_o^2+K_1\{K_3[K_{-4}+K'_{-4}+K_5)(K_2+K'_{-3}+K_6)+K_2(K_5+K_6)+K'_{-3}K_6]+\\
&+K'_4[(K_{-4}+K_5)(K_2+K_{-3}+K_6)+K_2(K_{-3}+K_6)+K_{-3}K_6]\}a_ob_o+K_1K_3K'_4(K_2+\\
&+K_{-4}+K_5+K_6)a_ob_o^2+K_1\{K'_3[(K_{-4}+K'_{-4}+K_5)(K_2+K_{-3}+K_6)+K_2(K_{-3}+K_6)+\\
&+K_{-3}K_6]+K_4[(K'_{-4}+K_5)(K_2+K'_{-3}+K_6)+K_2(K'_{-3}+K_6)+K'_{-3}K_6]\}a_oc_o+\\
&+K_1K'_3K_4(K_2+K'_{-4}+K_5+K_6)a_oc_o^2+\{K_3K_4[(K_{-1}+K_2)(K'_{-3}+K'_{-4}+K_5+K_6)+\\
&+K'_{-3}(K_5+K_6)+K_6(K'_{-4}+K_5)]+K'_3K'_4[(K_{-1}+K_2)(K_{-3}+K_{-4}+K_5+K_6)+K_{-3}(K_5+\\
&+K_6)+K_6(K_{-4}+K_5)]+K_4K'_4[(K_{-1}+K_2)(K_5+K_6)+K_5K_6]\}b_oc_o+\\
&+K_3K_4K'_4(K_{-1}+K_2+K_5+K_6)b_o^2c_o+K'_3K_4K'_4(K_{-1}+K_2+K_5+K_6)b_oc_o^2+K_1\{(K_2+\\
&+K_5+K_6)[K_4(K_3+K'_4)+K'_3K'_4]+K_3K_4(K'_{-3}+K'_{-4})+K'_3K'_4(K_{-3}+K_{-4})\}a_ob_oc_o+\\
&+K_1K_3K_4K'_4a_ob_o^2c_o+K_1K'_3K_4K'_4a_ob_oc_o^2
\end{aligned}
\qquad \text{(A5)}
$$

$$
\begin{aligned}
F_5=&(K_{-1}+K_2)K_{-3}K'_{-3}K_6(K_{-4}+K'_{-4}+K_5)+K_1\{(K_{-4}+K'_{-4}+K_5)[K_2(K_{-3}K'_{-3}+\\
&+K_{-3}K_6+K'_{-3}K_6)+K_{-3}K'_{-3}K_6]+K_2K_{-3}K'_{-3}K_6\}a_o+\{(K_{-1}+K_2)K_6[(K_{-4}+\\
&+K_5)(K_3K'_{-3}+K'_4K_{-3})+K_3K'_{-3}K'_{-4}]\}b_o+(K_{-1}+K_2)K_3K'_4K_6(K_{-4}+K_5)b_o^2+\\
&+\{(K_{-1}+K_2)K_6[K'_{-4}+K_5)(K'_3K_{-3}+K_4K'_{-3})+K'_3K_{-3}K_{-4}]\}c_o+(K_{-1}+K_2)(K'_{-4}+\\
&+K_5)K'_3K_4K_6c_o^2+K_1\{K_3[(K_{-4}+K'_{-4}+K_5)(K'_{-3}K_6+K_2K'_{-3}+K_2K_6)+K_2K'_{-3}K_6]+\\
&+K'_4[(K_{-4}+K_5)(K_2K_{-3}+K_2K_6+K_{-3}K_6)+K_2K_{-3}K_6]\}a_ob_o+K_1K_3K'_4[(K_{-4}+\\
&+K_5)(K_2+K_6)+K_2K_6]a_ob_o^2+K_1\{K'_3[(K_{-4}+K'_{-4}+K_5)(K_{-3}K_6+K_2K_{-3}+K_2K_6)+
\end{aligned}
$$

$$+K_2K_{-3}K_6\}+K_4[(K'_{-4}+K_5)(K_2K'_{-3}+K_2K_6+K'_{-3}K_6)+K_2K'_{-3}K_6]\}a_oc_o+$$

$$+K_1K'_3K_4[(K'_{-4}+K_5)(K_2+K_6)+K_2K_6]a_oc_o^2+\{K_3K_4\{(K_{-1}+K_2)[K'_{-3}(K_5+K_6)+$$

$$+K_6(K'_{-4}+K_5)]+K'_{-3}K_5K_6\}+K'_3K'_4\{(K_{-1}+K_2)[K_{-3}(K_5+K_6)+K_6(K_{-4}+K_5)]+$$

$$+K_{-3}K_5K_6\}+K_4K'_4(K_{-1}+K_2)K_5K_6\}b_oc_o+K_3K_4K'_4[(K_{-1}+K_2)(K_5+K_6)+$$

$$+K_5K_6]b_o^2c_o+K'_3K_4K'_4[(K_{-1}+K_2)(K_5+K_6)+K_5K_6]b_oc_o^2+K_1\{K_3K_4[K_2(K'_{-3}+$$

$$+K'_{-4}+K_5+K_6)+K'_{-3}(K_5+K_6)+K_6(K'_{-4}+K_5)]+K'_3K'_4[K_2(K_{-3}+K_{-4}+K_5+K_6)+$$

$$+K_{-3}(K_5+K_6)+K_6(K_{-4}+K_5)]+K_4K'_4[K_2(K_5+K_6)+K_5K_6]\}a_ob_oc_o+(K_2+K_5+$$

$$+K_6)K_1K_3K_4K'_4a_ob_o^2c_o+(K_2+K_5+K_6)K_1K'_3K_4K'_4a_ob_oc_o^2 \tag{A6}$$

$$F_6=K_1K_2K_{-3}K'_{-3}(K_{-4}+K'_{-4}+K_5)a_o+K_1K_2K_6[(K_{-4}+K_5)(K_3K'_{-3}+K'_4K_{-3})+$$

$$+K_3K'_{-3}K'_{-4}]a_ob_o+K_1K_3K'_4K_2K_6(K_{-4}+K_5)a_ob_o^2+K_1K_2K_6[(K'_{-4}+K_5)(K'_3K_{-3}+$$

$$+K_4K'_{-3})+K'_3K_{-3}K_{-4}]a_oc_o+K_1K'_3K_4K_2K_6(K'_{-4}+K_5)a_oc_o^2+K_5K_6(K_3K_4K'_{-3}+$$

$$+K'_3K'_4K_{-3})(K_{-1}+K_2)b_oc_o+(K_{-1}+K_2)K_3K_4K'_4K_5K_6b_o^2c_o+K'_3K_4K'_4K_5K_6(K_{-1}+$$

$$+K_2)b_oc_o^2+K_1\{K_3K_4\{K_2[K_6K'_{-4}+K'_{-3}(K_5+K_6)]+K_{-3}K_5K_6\}+K'_3K'_4\{K_2[(K_5+$$

$$+K_6)K_{-3}+K_{-4}K_6]+K_{-3}K_5K_6\}+K_4K'_4K_2K_5K_6\}a_ob_oc_o+K_1K_3K_4K'_4(K_2K_5+$$

$$+K_2K_6+K_5K_6)a_ob_o^2c_o+K_1K'_3K_4K'_4(K_2K_5+K_2K_6+K_5K_6)a_ob_oc_o^2 \tag{A7}$$

BIBLIOGRAFIA

1. FROMM, H.J. (1967) Biochim. Biophys. Acta 139, 221-230.

2. CLELAND, W.W. (1963) Biochim. Biophys. Acta 67, 104-137.

3. DALZIEL, K. (1969) Biochem. 114, 547-556.

4. SEGEL, I.H. (1975) Enzyme Kinetics, p. 727-735 New York, John Wiley & Sons.

5. GALVEZ, J., VARON, R. y GARCIA CANOVAS, F. (1981) J. Theor, Biol. 89, 1-17.

6. VARON, R., GARCIA MORENO, M., GARCIA CANOVAS, F. y GARCIA CARMONA, F. (1987) Afinidad 408, 151-153.

7. GARCA MORENO, M., GARCIA CANOVAS, F., VARON, R., TUDELA, J., GARCIA CARMONA, F., VAZQUEZ, A.M. y VALERO, E. (1987) An. Quím. 83, C, 344-347.

8. FROMM, H.J.(1979) Method in Enzymology 63, 42-53.

9. DARVEY, I.G. (1977) J. Theor. Biol. 65, 645-472.

10. HEARON, J.Z. (1963) Ann. N.Y. Acad. Sci. 108, 36-40.

11. VARON, R., ROMAN, A., GARCIA CANOVAS, F. y GARCIA CARMONA, F. (1986) Bull. Math. Biol. 48, 149-166.

12. GARCIA MORENO, M., GARCIA CANOVAS, F., VARON R., GARCIA CARMONA, F., TUDELA, J. y ROMAM, A. (1987) An. Ciencias (U. Murcia) XLVI, 1-4, 55-40.