

# RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

Ileana Hernández- Reséndiz, Javier Belmont- Díaz y Sara Rodríguez- Enríquez

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México D.F, México.

Correo E: ileana.resendiz@gmail.com

## APLICACIÓN DE LA ECUACIÓN INTEGRADA DE MICHAELIS-MENTEN PARA EL CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA CELOBIOSA DESHIDROGENASA EN PRESENCIA DE $\text{Fe}^{3+}$

Considerando el esquema general en el que se supone una saturación por sustrato y por lo tanto ausencia de reacción reversa:



De acuerdo con el esquema, se deduce la ecuación integrada de Michaelis-Menten para un sistema de una reacción irreversible en la que  $K_s \ll k_p$  y el  $\Delta G$  de la reacción es muy negativo.

Los parámetros cinéticos se obtuvieron a partir de la ecuación integrada de Michaelis- Menten, la cual es una ecuación de velocidad diferencial que permite obtener un gráfico de tipo lineal (Fig. 3) basado en la ecuación original de Michaelis-Menten.

En la figura 2 se muestra el perfil de tiempo de la reducción del acetato de  $\text{Fe}^{3+}$  utilizando concentraciones de 50- 500  $\mu\text{M}$  de acetato de  $\text{Fe}^{3+}$  a 30° C y pH 4.

La derivación de la ecuación asume que el decrecimiento en velocidad en el tiempo resulta solo de la disminución de la saturación de la enzima y no de la inhibición por producto o a que la enzima ha llegado al equilibrio.

Cuando se llevan a cabo este tipo de experimentos, se toma en cuenta la desaparición del sustrato conforme al tiempo. Cabe mencionar que la ecuación integrada de Michaelis- Menten se utiliza únicamente cuando hay muy poca enzima, poco sustrato o cuando el método de medición presenta muchas dificultades.

## DEDUCCIÓN DE LA ECUACIÓN

Para desarrollar la ecuación integrada de Michaelis-Menten se considera que la velocidad de una reacción catalizada puede ser expresada como el consumo de sustrato con respecto al tiempo (2) (Ec. 1).

$$v = -\frac{dS}{dt} = \frac{V_{max} S}{K_s + S} \dots \dots (1)$$

La expresión (1) puede rearreglarse para plantear la ecuación diferencial (Ec.2) y posteriormente integrarla (Ec. 3)

$$-\left(\frac{K_s + S}{S}\right) dS = V_{max} dt \dots \dots (2);$$

$$-K_s \int_{S_0}^S \frac{dS}{S} - \int_{S_0}^S dS = V_{max} \int_0^t dt \dots \dots (3)$$

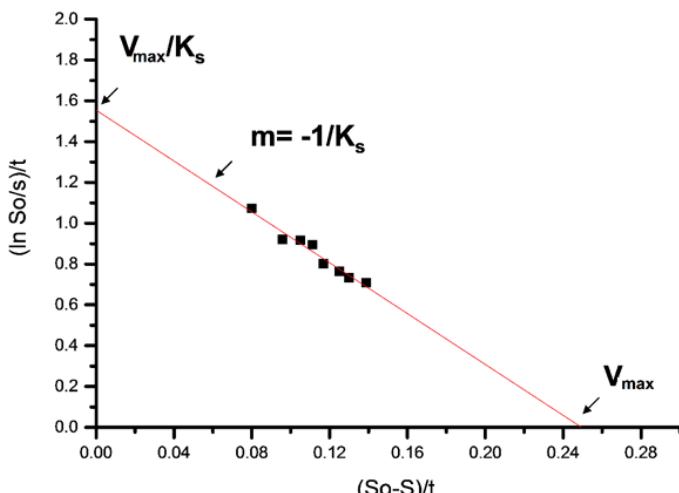


Figura 3. Linearización de los datos obtenidos con la ecuación integrada de Michaelis- Menten a partir de los datos de Kremer y Wood (1).

Al resolver la integral obtenemos:

$$-Ks(\ln S - \ln S_0) - (S - S_0) = V_{max} t \dots \dots (4)$$

Dividiendo la ecuación (4) entre ( $Km^* t$ ) y re-arrugando obtenemos la expresión final para la ecuación de Michaelis-Menten integrada:

$$\frac{\ln(S_0/S)}{t} = \frac{V_{max}}{Ks} - \frac{1}{Ks} \frac{(S_0 - S)}{t} \dots \dots (5)$$

A partir de los datos proporcionados se calcula  $(S_0 - S)/t$  (x) y  $(\ln S_0/S)/t$  (y) y se obtiene el gráfico (Tabla 2 y Fig. 3).

**TABLA 2.** Aplicación de la ecuación integral de Michaelis-Menten para la determinación de los parámetros cinéticos de la cellobiosa deshidrogenasa.

Tiempo (min)	Abs (UA)	$(S_0 - S)/t$	$(\ln S_0/S)/t$
0	0.25		
0.72	0.15	0.14	0.71
1	0.12	0.13	0.73
1.2	0.1	0.13	0.76
1.5	0.075	0.12	0.80
1.8	0.05	0.11	0.89
2	0.04	0.11	0.92
2.3	0.03	0.10	0.92
3	0.01	0.08	1.07

De acuerdo con la ecuación integrada de Michaelis- Menten, los interceptos en los ejes (y) y (x) permiten calcular la  $V_{max}$  y la eficiencia catalítica mediante la ecuación  $Abs = abc$  ( $a=1.33 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;

$b= 1\text{cm}$ ;  $c= \text{concentración}$ ), mientras que la pendiente proporciona la  $K_s$  de la enzima por el  $\text{Fe}^{3+}$ . La  $V_{max}$  fue de  $2.2 \mu\text{Ms}^{-1}$ , la  $K_s$  fue de  $66.5 \mu\text{M}$  y la eficiencia catalítica fue de  $0.03 \text{ s}^{-1}$ . (Lo reportado en el artículo:  $V_{max}= 2.2 \pm 0.05 \mu\text{M s}^{-1}$  y  $K_s= 54 \pm 3 \mu\text{M}$ ) (Fig. 3).

## CONCLUSIONES

La ecuación integrada de Michaelis- Menten es una estrategia que se utiliza para la determinación de los parámetros cinéticos cuando (a) existe poco rendimiento de proteína; y (b) poco sustrato disponible. Cuando se utiliza la ecuación integrada de Michaelis- Menten se considera una  $K_s << K_p, \Delta G$  muy negativa (enzima muy rápida donde prácticamente la reacción reversa no existe).

Se debe considerar que la aplicación de la ecuación de MM como se ilustra en este trabajo tiene como inconveniente, que la concentración de sustrato con respecto al tiempo ( $[S]_t$ ) es una variable con alto grado de error experimental y su transformación lineal podría dar lugar a una errónea estimación de las  $K_s$  y  $V_{max}$  (3). Por lo anterior, se están desarrollado nuevos métodos matemáticos que resuelven la ecuación integrada de Michaelis-Menten con la finalidad de disminuir el error en el cálculo de los parámetros cinéticos (3-5).

## REFERENCIAS

1. Kremer MS and Wood MP. Evidence that cellobiose oxidase from Phanerochaete chrysosporium is primarily an  $\text{Fe(III)}$  reductase. Eur J Biochem. 1992, 205: 133- 138.
2. Segel IH. Enzymatic Kinetics. John Wiley and Sons, New Cork. Cap. 2. pp 54-57.
3. Chetan T. Goudar et al. Biochimica et Biophysica Acta. 1999, 1429: 377-383.
4. Chetan T. Goudar et al. J. Microbiological Methods. 2004, 59: 317 – 326.
5. Marko Golicnik. Analytical Biochemistry. 2010, 406: 94-96.