

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 Fe^{3+}

La celulosa es un homopolisacárido estructural de la pared celular de las células vegetales. Los enlaces β -1,4- glucosídicos de la celulosa son muy estables y difíciles de hidrolizar. En la naturaleza existen celulasas que degradan esta estructura formando celobiosa. El radical hidroxilo, también puede catalizar la ruptura del enlace β -1,4- glucosídico, aunque de manera inespecífica. En los sistemas biológicos, el radical $\text{OH}^\bullet$ se produce a partir de una reacción espontánea donde participa el Fe^{2+} y el H_2O_2 conocida como reacción de Fenton (1).

La celobiosa deshidrogenasa cataliza la oxidación de la celobiosa, en celobiona- 1,5-lactona más un aceptor de electrones en estado reducido, posteriormente los electrones pueden

ser transferidos a un átomo de Fe^{3+} y reducirlo en Fe^{2+} . El Fe^{2+} producido durante este ciclo catalítico puede participar en la reacción de Fenton (Fig. 1).

Para determinar si la celobiosa deshidrogenasa del hongo *Phanerochaete chrysosporium* tiene como función la reducción del Fe^{3+} , se analizó la actividad de esta enzima en un único ensayo, usando la ecuación integrada de Michaelis-Menten para calcular los parámetros cinéticos.

Debido a que la celobiosa deshidrogenasa es una proteína que se secreta únicamente cuando el hongo se encuentra en etapa de proliferación e invasión, su extracción y purificación representa gran dificultad y el rendimiento es escaso, por lo que Kremer y Wood en 1992 analizaron la actividad de esta enzima en un único ensayo, usando la ecuación integrada de Michaelis-Menten.

La actividad de la celobiosa deshidrogenasa se determinó espectrofotométricamente a 340 nm con acetato férrico en ausencia de O_2 , a 30° C y pH 4.

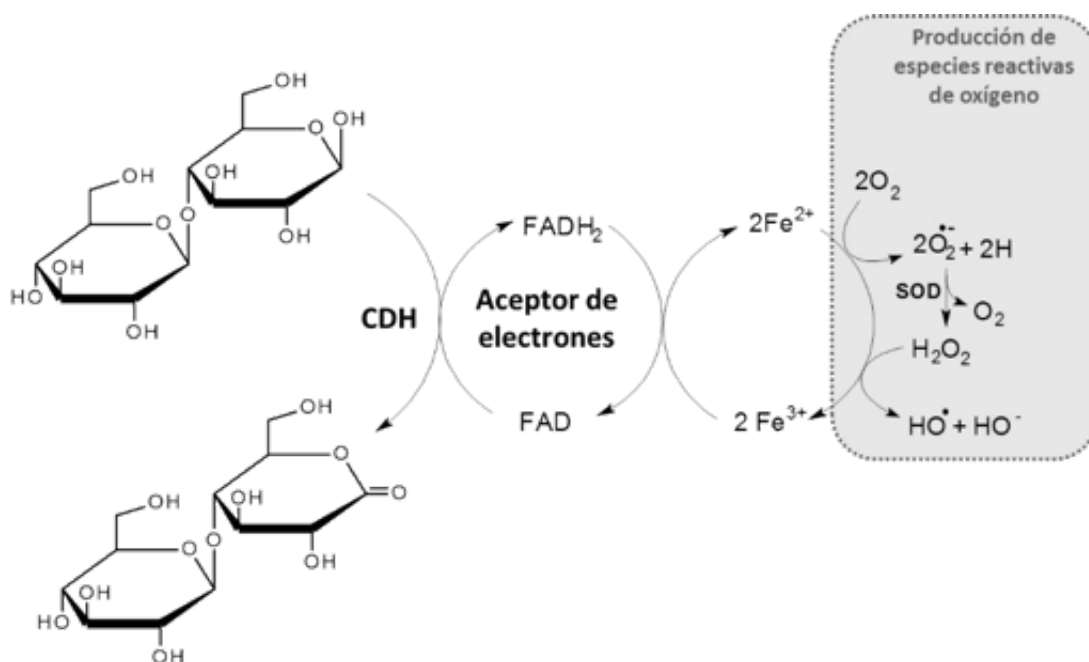


Figura 1. Modelo de reacción de la celobiosa deshidrogenasa.

TABLA 1. Actividad de la celobiosa deshidrogenasa con respecto al tiempo. Datos extraídos de Kremer y Wood (1).

Tiempo (min)	Abs (UA)
0	0.25
0.72	0.15
1	0.12
1.2	0.1
1.5	0.075
1.8	0.05
2	0.04
2.3	0.03
3	0.01

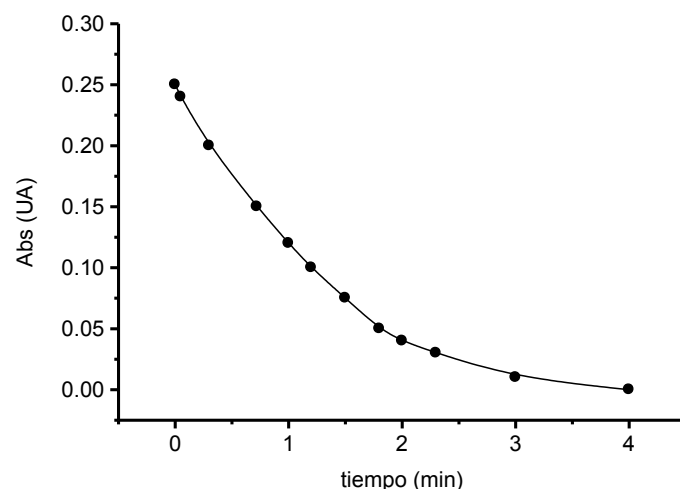


Figura 2. Perfil de reducción del Fe^{3+} con respecto al tiempo. La reacción se llevó a cabo en medio anaeróbico de acetato de sodio/ácido acético 100 mM, 30° C, pH 4 previamente burbujeado con argón por 20 minutos. Posteriormente se añadió celobiosa 1mM y 200 μM acetato de Fe (II). La reacción enzimática se inició con la adición de 0.5 μM de celobiosa deshidrogenasa. La absorbancia (Abs) fue monitoreada a 340 nm. [Tomado de Kremer and Wood (1).

El coeficiente de extinción para el Fe^{3+} es $\epsilon_{340} = 1.33 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los datos experimentales derivaron de la gráfica 1 del artículo de Kremer y Wood (1992) y se muestran a continuación en la tabla 1 y en la figura 2 (1).

Determinar:

a) K_s

b) V_{max}

c) Eficiencia catalítica (V_{max}/K_s)

Nota: calcular los parámetros en μM para la K_s y en $\mu\text{M s}^{-1}$ para la V_{max} .

REFERENCIAS

1. Kremer MS and Wood MP. Evidence that cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is primarily an Fe(III) reductase. *Eur J Biochem.* 1992, 205: 133- 138.