

## Práctica 5

### CINÉTICA ENZIMÁTICA: DETERMINACIÓN ESPECTOFOTOMÉTRICA DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN DE LA PAPAÍNA

#### 1. Objetivo

Se pretende calcular la constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ), la constante catalítica ( $k_{cat}$ ) y la velocidad máxima inicial ( $V_{max}$ ) de la reacción de proteólisis de un sustrato específico (N-benzoil-arginina-p-nitroanilida, BAPNA) catalizada por la proteína papaína.

#### 2. Fundamento teórico

##### 2.1. Actividad enzimática

Los enzimas son proteínas altamente especializadas que catalizan numerosas reacciones en los sistemas biológicos. Una propiedad importante es su especificidad a la hora de reaccionar con sustratos, acelerando determinadas reacciones químicas en disolución.

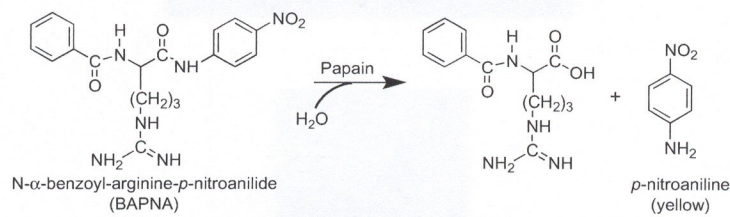
En general, un enzima proporciona el ambiente en que una reacción determinada es, energéticamente, más favorable. El rasgo distintivo de una reacción catalizada enzimáticamente es que ocurre en un lugar específico del enzima, el **sitio activo**. La molécula fijada en el sitio activo y sobre la que actúa el enzima se denomina **sustrato**. El **complejo enzima-sustrato** formado es de vital importancia para definir el comportamiento cinético de las reacciones catalizadas. Una reacción enzimática sencilla puede formularse como sigue:



donde E, S y P representan enzima, sustrato y producto, respectivamente. ES y EP son complejos del enzima con el sustrato y con el producto.

La función del catalizador es aumentar la *velocidad* de una reacción reduciendo la energía de activación de la misma,  $E_a$ . Los catalizadores no modifican los *equilibrios* de la reacción ni se consumen durante el proceso.

En esta práctica se estudia la cinética de ruptura del enlace peptídico de la molécula *N-benzoil-arginina-p-nitroanilida* (BAPNA) catalizada por la papaína, una proteína de peso molecular 23.400 g/mol (ver Esquema 1).



**Esquema 1**

Esta proteína pertenece al grupo de enzimas *tiol-proteasas*, ya que en el sitio activo se encuentra un grupo sulfhidrilo (-SH). La papaína se encuentra en el extracto de la papaya y tiene varios usos comerciales. Por ejemplo, en la industria de la cerveza hidroliza proteínas que provocan su turbidez. También es usada para evitar el endurecimiento de la carne, mediante la hidrólisis de enlaces peptídicos del colágeno de los tejidos conectivos, la elastina y la actomiosina. Finalmente, también se usa en la limpieza de lentes de contacto, eliminando los depósitos proteicos.

La interacción específica con el sustrato (BAPNA) se produce a través del residuo de fenilalanina. La hidrólisis de este enlace peptídico genera entre otros productos de reacción, la p-nitroanilina, de color amarillo, lo que permite seguir espectrofotométricamente el progreso de la reacción mediante la medida de la velocidad de formación de este producto. Con este objeto se mide el aumento de absorbancia de la disolución con el tiempo, a la longitud de onda de máxima absorción de la p-nitroanilina ( $\lambda_{max}=400\text{ nm}$ , coeficiente de extinción molar,  $\epsilon = 1.08 \cdot 10^4\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) para distintas concentraciones iniciales de BAPNA. La concentración de producto se obtiene aplicando la **ley de Lambert-Beer** ( $A=\epsilon lc$ ).

## 2.2. Velocidad de reacción. Cinética de Michaelis-Menten

La velocidad de una reacción cualquiera viene determinada por la concentración de reactivo/s y por una *constante de velocidad*, k, y expresada por una **ley de velocidad**. Por ejemplo para una reacción unimolecular o de primer orden,  $S \rightarrow P$ , la cantidad de S que ha reaccionado por unidad de tiempo viene dado por la siguiente expresión:

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k[S] \quad [2]$$

donde k, tiene unidades de  $s^{-1}$  y S de  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Así pues, la concentración de sustrato, [S], afecta a la velocidad de una reacción catalizada por un enzima.

No obstante, el estudio del efecto de [S] en una reacción enzimática no es simple. Este tipo de comportamiento cinético es explicado por la teoría de

**Michaelis y Menten**, que postula que el enzima se combina con el sustrato en un paso reversible rápido, para dar el complejo ES, según se muestra en la reacción [4].



La reacción de esta forma alcanza rápidamente un **estado estacionario** en el que [ES] permanece aproximadamente constante con el tiempo. El complejo ES se descompone seguidamente en un segundo paso más lento que limita la velocidad de la reacción global dando el enzima libre E y el producto de reacción P. Por tanto la ley de velocidad para la reacción global viene determinada por la etapa más lenta, según indica la ecuación [5]:

$$V = k_2 [ES] \quad [5]$$

donde V se determina por la descomposición de ES. Bajo las condiciones de estado estacionario ([ES]=cte) la velocidad del proceso se mantiene constante en los primeros estadios de la reacción y coincide con la **velocidad inicial**,  $V_o$ . Experimentalmente  $V_o$  puede determinarse calculando la pendiente de la representación de [P] frente al tiempo (ecuación [2]).

Además, a medida que la concentración inicial de S aumenta, desplazando el equilibrio hacia la formación de ES, también lo hace  $V_o$  hasta alcanzar un valor constante. Este valor final se denomina **velocidad máxima**,  $V_{max}$ . Esto se observará cuando prácticamente todo el enzima esté formando complejo ES y la concentración de E libre sea extremadamente pequeña ([ES]=[E<sub>t</sub>], donde E<sub>t</sub> es la concentración total de enzima utilizada). En estas condiciones, el enzima está saturado por el sustrato, de forma que un aumento adicional en la [S] ya no tiene efecto sobre la velocidad inicial del proceso. De esta manera, se puede definir que  $V_{max} = k_2 \cdot [E_t]$ , la cual varía de un enzima a otro, y donde  $k_2$  se define de manera general como  $k_{cat}$ , una constante de velocidad de primer orden que se denomina **número de recambio**.

Utilizando la aproximación del estado estacionario, se obtiene la **Ecuación de Michaelis-Menten**:

$$V_o = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad [6]$$

La expresión [6] puede transformarse en la **Ecuación de Lineweaver-Burk**, la cual es más útil para la determinación de  $K_m$  y  $V_{max}$ . Esto se lleva a cabo tomando la inversa de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad [7]$$

Los parámetros cinéticos  $k_{cat}$  y  $K_m$  son útiles para el estudio y comparación de los diversos enzimas a través de su eficiencia catalítica. La eficiencia catalítica se define como la relación entre ambos ( $k_{cat}/K_m$ ).

### 3. Material y reactivos

- 3 matraces aforados de 25 ml
- 1 matraz aforado de 100 ml
- 1 erlenmeyer de 100 ml
- 2 vasos de precipitado de 50 ml
- 1 embudo
- 10 tubos de ensayo y gradilla
- 1 mortero
- 1 agitador magnético
- 1 tijeras
- parafilm (de uso común)
- Pipetas de 10, 5 y 1 ml
- Espectrofotómetro y cubetas
- pH metro
- Latex de papaya (papaína)
- $\alpha$ -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA)
- Dimetilsulfoxido (DMSO)
- Fosfato monobásico y dibásico de potasio

### 4. Procedimiento experimental

#### 4.1. Preparación de disoluciones

- Disolución 1. Se preparan 100 ml de tampón fosfato 0.1 M a pH 6.0 mezclando 1.19 g de  $H_2KPO_4$  y 0.214 g de  $HK_2PO_4$ . Se enrasa y se mide el pH final de la disolución.
- Disolución 2. Se pesan 0.5 g de latex de papaya y se divide finamente usando un mortero. Se adicionan 25 ml de la disolución tampón de pH 6.0, previamente medidos en un matraz aforado, a un vaso de precipitado con el reactivo molido. Agitar la mezcla durante 30 minutos. A continuación se filtra 2-3 veces, hasta que se elimina la turbidez de la disolución y se observa que no queda sólido retenido en el papel de filtro. A continuación la disolución obtenida se diluye a la mitad utilizando la disolución tampón. Se mide la absorbancia a  $\lambda = 325$  nm, cuyo valor debe estar entorno a 0.7. En dichas condiciones la concentración de papaína disuelta corresponderá aproximadamente a 1.2 mg/l (cálculo realizado mediante el Método de Biuret).
- Disolución 3. 25 ml de una disolución de BAPNA 0.015 M en DMSO.

#### 4.2. Preparación de mezclas de reacción. Medidas espectrofotométricas.

- Se toma en un tubo de ensayo 5 ml de disolución patrón de BAPNA 0.015 M. También se preparan por diluciones sucesivas a partir de la disolución 3, 5 ml de disoluciones de las siguientes concentraciones: 0.012, 0.009, 0.006 y 0.003 M (disoluciones 4-7, respectivamente).
- Se selecciona una  $\lambda = 400$  nm en el espectrofotómetro. Se introducen 2.5 ml de la disolución tampón (disolución 1) en la celda y se añaden 0.5 ml de disolución de BAPNA 0.003 M. Se mezcla homogéneamente tapando la celda con un trozo de parafilm. Finalmente, se ajusta a cero el valor de absorbancia. En otra celda, se sustituye la disolución tampón por 2.5 ml de disolución de papaína y se adicionan 0.5 ml de sustrato BAPNA mezclando la muestra de reacción como se ha descrito anteriormente. A continuación se registra la variación de absorbancia observada con el tiempo, anotando su valor en intervalos de 10 s durante un total de 6 minutos. El proceso se repite en orden creciente de concentraciones para el resto de disoluciones de BAPNA (disoluciones 6 a 3).

### 5. Resultados

- Calcular la velocidad inicial de reacción,  $V_o$ , para cada concentración de sustrato utilizada, representando los valores de *absorbancia* frente a *tiempo* (Se recomienda la utilización de Excel). Expresar la velocidad de formación de producto (p-nitroanilina) en unidades de  $\text{absorbancia} \cdot \text{s}^{-1}$  y  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .
- Confeccionar una tabla con  $V_o$ ,  $1/V_o$ , [BAPNA] y  $1/[BAPNA]$ .
- Representar  $V_o$  frente a [BAPNA] y la ecuación de *Lineweaver-Burk* a partir de  $1/V_o$  vs  $1/[S]$  (ecuación [7]). Calcular  $V_{\text{max}}$ ,  $K_M$  y  $k_{\text{cat}}$  de la reacción enzimática.

### 6. Cuestiones

- 6.1. Indique si la dependencia de  $V_o$  con la concentración de sustrato sigue la cinética propuesta por Michaelis-Menten. ¿Cuál sería el mecanismo cinético específico de reacción?.
- 6.2. El valor de  $K_M$  para la hidrólisis de BAPNA catalizada por la tripsina es de  $9.4 \cdot 10^{-2}$  M y la  $k_{\text{cat}}$  de  $0.611 \text{ s}^{-1}$ . Compare los resultados obtenidos para el caso de la papaína. Explique y razone las posibles diferencias observadas. ¿Qué enzima presenta una mayor eficiencia catalítica<sup>(1)</sup>?

<sup>(1)</sup> Eficiencia catalítica =  $k_{\text{cat}}/K_M$