

Práctica 7: Determinación de parámetros cinéticos de una reacción catalizada

Enzimología

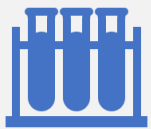
Profesor: MC. Carlos Montejo Dávila



Editar con WPS Office



Objetivos



- Caracterizar una enzima mediante un ensayo acoplado



- Determinar K_m , V_{max} y eficiencia (V_{max}/K_m)



- Evaluar cooperatividad de la reacción



🌟 ¿Por qué es importante?

- **Entrada a la glucólisis:** Es la primera reacción clave del metabolismo energético de la glucosa, crucial para la producción de energía celular.
- **Puente con la vía de las pentosas:** Es vital para la síntesis de nucleótidos (ADN/ARN) y la defensa antioxidante de la célula, a través de la producción de NADPH.
- **Estudio de isoenzimas:** La hexoquinasa (HK) presenta isoenzimas específicas para diferentes tejidos, lo que es útil en la investigación metabólica y farmacológica.
- **Aplicación clínica:** importantes en el diagnóstico y monitoreo de condiciones como la diabetes.





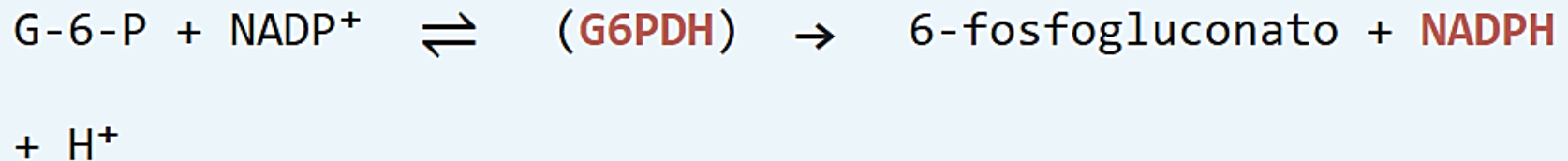
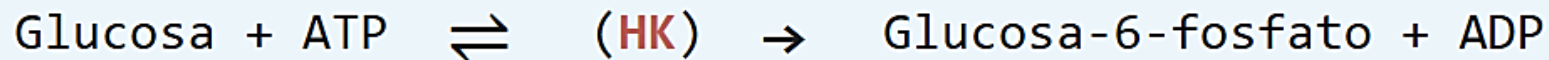
Reacción Enzimática de la Glucosa

Puntos clave

- La glucosa se transforma en glucosa-6-fosfato mediante la acción de la enzima **hexoquinasa (HK)**.
- Posteriormente, la glucosa-6-fosfato es convertida en **6-fosfogluconato** por la enzima **G6PDH**, un proceso que simultáneamente genera **NADPH**.
- NADPH es una coenzima crucial porque su producción puede ser medida espectrofotométricamente a **340 nm**



La glucosa se activa con ATP gracias a la hexoquinasa (HK), formando glucosa -6-fosfato. Luego, la G6PDH la transforma en 6-fosfogluconato, generando NADPH, que sirve como energía reductora para proteger y construir dentro de la célula.



Fundamentos



- Reacciones enzimáticas siguen la ecuación de Michaelis-Menten



- K_m : concentración de sustrato al 50% V_{max}



- V_{max} : velocidad máxima con enzima saturada



- Curva de saturación puede ser hiperbólica o sigmoidea



Materiales y reactivo s



- Espectrofotómetro (340 nm), celdas de 1 mL



- Glucosa 50 mM (diluciones 0–8 mM)



- Reactivo de actividad (R1+R2)



- Pipetas y micropipetas, gradilla, cronómetro



Procedimiento experimental



1. Preparar diluciones de glucosa según tabla



2. Ajustar absorbancia a 340 nm



3. Iniciar reacción agregando reactivo



4. Registrar Abs cada 10 s por 3 min



Organización de datos



Tabla: tiempo (s)
vs Abs 340 nm



Calcular
pendiente inicial
($\Delta\text{Abs}/\Delta t$)



Expresar como
velocidad inicial
de reacción



Análisis de datos

Graficar V_0 vs $[S]$

Ajustar a
Michaelis–
Menten (no lineal)

O usar
Lineweaver–Burk
(doble recíproco)



Resultados esperados

Curva de saturación con V_{max} definido

K_m en rango esperado para hexocinasa

Si hay cooperatividad: curva sigmoidea



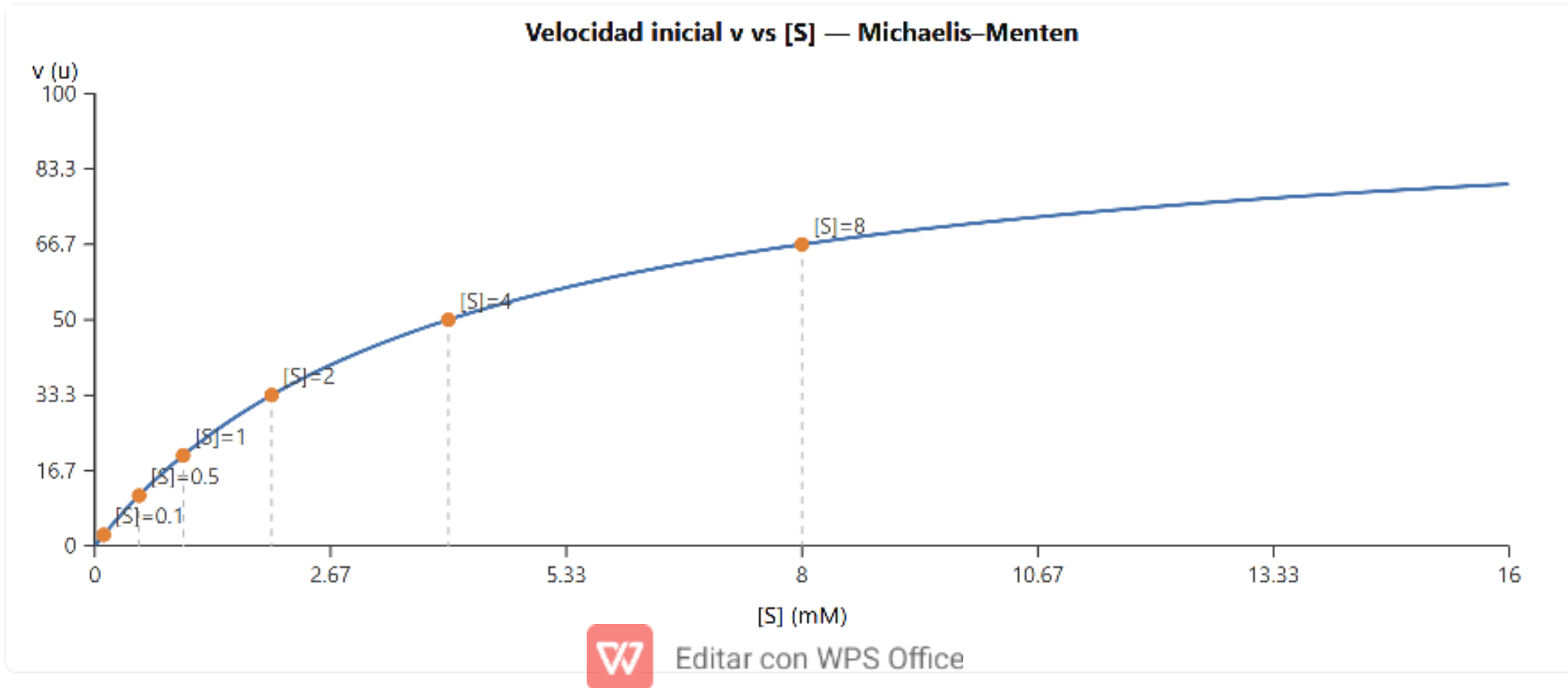
$$v = V_{\max} \cdot [S] / (K_m + [S])$$

Ecuación de Michaelis–Menten — para reacciones catalizadas por una enzima en condiciones de estado inicial

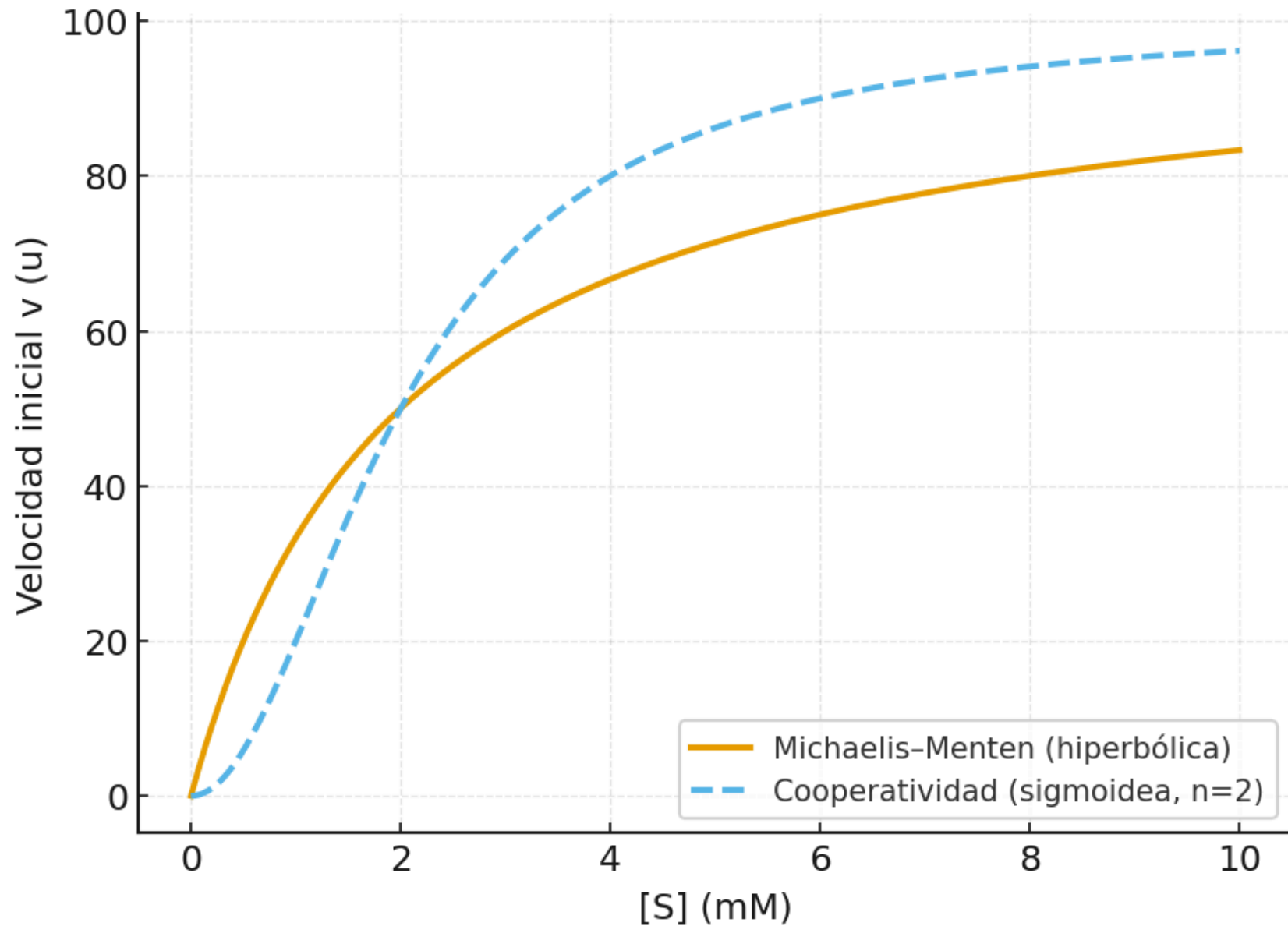
$$v = V_{\max} * [S] / (K_m + [S])$$

(para copiarlo en excel)

Gráfica: velocidad inicial (v) vs concentración de sustrato [S]



Curvas de saturación enzimática



Práctica 8: Estudio de inhibición enzimática

Introducción: importancia biomédica y biotecnológica de inhibición enzimática



Objetivos



- Determinar mecanismos de inhibición enzimática



- Analizar parámetros cinéticos bajo presencia de inhibidores



Materiales y reactivos



- Extracto de fosfatasa ácida



- 4-nitrofenil fosfato (4-NPP)



- Inhibidores: fosfato y fluoruro (5 mM)



- Espectrofotómetro (405 nm),
incubador 37 °C



- Pipetas, tubos, gradillas



Procedimiento experimental



- Serie sin inhibidor: A–H con diferentes [S]



- Serie con fosfato: mismas [S] + inhibidor



- Serie con fluoruro: mismas [S] + inhibidor



- Incubar, iniciar reacción con extracto, detener con KOH



- Medir Abs a 405 nm



Análisis de datos



- Calcular velocidades iniciales



- Graficar v vs $[S]$ (comparar condiciones)



- Construir gráficos de Lineweaver–Burk



- Identificar patrón de inhibición



Resultados esperados



- Fosfato y fluoruro producen diferentes patrones cinéticos



- Identificación del tipo de inhibición (competitiva, no competitiva, etc.)

