



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**
Unidad Mérida

DEPARTAMENTO DE FÍSICA APLICADA

**“Estudio cinético y termodinámico de la reacción
catalizada por la enzima
glucosa-6-fosfato deshidrogenasa con NAD”**

Tesis que presenta

Julia Jazmin Sánchez Martín del Campo

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

En la especialidad de

Fisicoquímica

Dirigida por:

Dr. Rodrigo T. Patiño Díaz

Mérida, Yucatán, México, Agosto de 2009.

Agradecimientos

Al CONACYT por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de posgrado.

Resumen

Las propiedades cinéticas y termodinámicas de una reacción enzimática proporcionan la herramienta fundamental para el estudio del flujo de energía y la predicción de eventos a nivel celular. La enzima glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa cataliza la oxidación de glucosa-6-fosfato (G6P) para dar 6-fosfo-D-glucono-lactona (6PDGL). En este estudio se presenta un análisis cinético y termodinámico de la reacción catalizada por la enzima G6PD de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* con NAD_{ox} como coenzima en buffer de fosfatos (50 mmol/L). Para el estudio se empleó una técnica espectrofotométrica basada en la detección del producto NAD_{red} . Se determinó el efecto de la concentración de enzima y de las concentraciones relativas de sustratos. El efecto de la temperatura fue evaluado en el intervalo de 19 a 43°C a pH 7 y el efecto del pH en el intervalo de 5.4 a 8.6 a 25°C, ambos a diferentes concentraciones relativas de $\text{G6P}:\text{NAD}_{\text{ox}}$. Con base en el modelo cinético de Michaelis-Menten se encontró que los valores de velocidad máxima (V_{max}) y de la constante de Michaelis (K_{M}) a pH 7 alcanzan su extremo superior a 37°C, a 25°C K_{M} tiene un máximo a pH 7.8 y los mayores valores de V_{max} se obtuvieron en la región básica de la escala de pH. Los valores obtenidos para las constantes de Michaelis-Menten no son comparables con lo reportado anteriormente, debido a la naturaleza del buffer empleado. Con los resultados de V_{max} y K_{M} en función del valor del pH, se calculó la constante de disociación de la enzima (pK^{E}) que concuerda con lo reportado en la literatura. Con las constantes de equilibrio aparentes se obtuvieron la energía de Gibbs, la entalpía y la entropía transformadas estándar de reacción y se propusieron valores para la energía de Gibbs, la entalpía y la entropía estándar de formación para la 6PDGL en el intervalo de temperatura 19-43°C (pH = 7). Las propiedades termodinámicas de la 6PDGL son independientes de la temperatura en el intervalo estudiado. De acuerdo con los cálculos de entropía de formación estándar se confirma que la 6PDGL tiene una estructura más ordenada que la G6P.

Abstract

The thermodynamic and kinetic properties in biochemical reactions give the fundamental tools to study the energy exchange and to predict events at the cellular level. The enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) catalyzes the oxidation of glucose-6-phosphate (G6P) to 6-phospho-glucono-D-lactone (6PDGL). In this study, a kinetic and thermodynamic analysis is presented for the reaction catalyzed by the G6PD from the bacteria *Leuconostoc mesenteroides* with NAD_{ox} as coenzyme in a phosphate buffer (50 mmol/L). For this work, a spectrophotometric technique based on the detection of product NAD_{red} was employed. The effect of enzyme concentration and relative substrates concentrations was determined. The influence of temperature was analyzed in the range from 19 to 43°C at pH 7 as well as the effect of pH in the range from 5.4 to 8.6 at 25°C, both at different G6P: NAD_{ox} relative concentrations. Based on the Michaelis-Menten model, it was found that the maximum reaction rate value (V_{max}) and the Michaelis constant (K_{M}) at pH 7 reach their highest point at 37°C; at 25°C, K_{M} has a maximum at pH 8.6 and the maximum values of V_{max} were obtained in the basic region of the pH scale. The Michaelis-Menten values obtained are not comparable with previous reports, due to the employed buffer. With the results of V_{max} and K_{M} as function of pH, the enzyme dissociation constant (pK^{E}) was determined and it agrees with literature reports. With the apparent equilibrium constants, the values for the standard transformed Gibbs energy, enthalpy and entropy of reaction were obtained, and values for the standard Gibbs energy, enthalpy and entropy of formation for the 6PDGL were proposed in the temperature range from 19 to 43°C (pH 7). The thermodynamic properties of 6PDGL are independent of temperature in the range of study. In accord with the obtained standard entropy of formation, it is confirmed that G6PD has a structure more orderly than G6P.

Índice general

AGRADECIMIENTOS	- II -
RESUMEN	- III -
ABSTRACT	- IV -
ÍNDICE GENERAL	- V -
ÍNDICE DE FIGURAS	- VII -
ÍNDICE DE TABLAS	- IX -
1 ANTECEDENTES	- 1 -
1.1 ENZIMAS	- 2 -
1.1.1 <i>Proteínas y enzimas</i>	- 2 -
1.1.2 <i>Sitio activo y catálisis enzimática</i>	- 4 -
1.1.3 <i>Clasificación de las enzimas</i>	- 5 -
1.2 CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	- 6 -
1.2.1 <i>Cinética química</i>	- 7 -
1.2.2 <i>Modelo de Michaelis-Menten</i>	- 9 -
1.2.3 <i>Factores que afectan la velocidad de las reacciones enzimáticas</i>	- 12 -
1.2.3.1 Concentración de sustrato	- 12 -
1.2.3.2 Concentración de enzima	- 13 -
1.2.3.3 Temperatura	- 13 -
1.2.3.4 Efecto del pH	- 13 -
1.2.3.5 Otros factores	- 14 -
1.2.4 <i>Inhibidores enzimáticos</i>	- 15 -
1.3 TERMODINÁMICA DE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS.....	- 15 -
1.3.1 <i>Equilibrio químico</i>	- 16 -
1.3.2 <i>Termodinámica de reacciones bioquímicas a pH específico</i>	- 17 -
1.4 GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA	- 19 -
1.4.1 <i>Clasificación</i>	- 19 -
1.4.2 <i>Importancia biológica</i>	- 21 -
1.4.3 <i>Actividad enzimática de la G6PD</i>	- 23 -
2 SECCIÓN EXPERIMENTAL	- 26 -
2.1 METODOLOGÍAS	- 27 -
2.1.1 <i>Preparación de las disoluciones de reacción</i>	- 27 -
2.1.2 <i>Montaje del reactor y sonda de medición</i>	- 28 -
2.1.3 <i>Variación de condiciones experimentales</i>	- 29 -
2.2 RESULTADOS EXPERIMENTALES	- 31 -

2.2.1	<i>Curva típica</i>	- 31 -
2.2.2	<i>Efecto de la variación de la concentración de enzima</i>	- 32 -
2.2.3	<i>Concentración de sustratos</i>	- 34 -
2.2.4	<i>Experimentos a diferentes temperaturas</i>	- 36 -
2.2.5	<i>Efecto del pH del buffer en la actividad enzimática</i>	- 42 -
2.2.5.1	Constantes de ionización de la Enzima y del complejo Enzima-Sustrato	- 44 -
2.2.5.2	Cálculo de los potenciales aparentes de óxido-reducción de la 6PDGL	- 47 -
2.2.5.3	Cálculo de los valores de $\Delta_r N_{H^+}$ y $\bar{N}_{H^+}(6PDGL)$ como función del pH	- 49 -
2.3	CONCLUSIONES	- 52 -
BIBLIOGRAFÍA		- 53 -
3	APÉNDICE	- 56 -
3.1	TABLAS DE REFERENCIA	- 57 -
3.2	UNIÓN DE IONES HIDRÓGENO Y ESPECIES DE LA G6P	- 58 -
3.3	POTENCIALES DE REDUCCIÓN APARENTES ESTÁNDAR DEL NAD_{ox}	- 61 -

Índice de Figuras

Figura 1-1. Estructura general de los aminoácidos.	- 2 -
Figura 1-2. Formación de enlace peptídico.	- 3 -
Figura 1-3. Niveles de organización en una proteína.	- 3 -
Figura 1-4. Energía de activación de una reacción con catalizador y sin catalizador.	- 8 -
Figura 1-5. Cinéticas enzimáticas Michaeliana y no Michaeliana.	- 11 -
Figura 1-6. Disociaciones de los grupos ionizables del sitio activo de la enzima.	- 14 -
Figura 1-7. Estructura del NAD y el NADP.	- 20 -
Figura 1-8. Reacción catalizada por G6PD con NADP ó NAD.	- 21 -
Figura 1-9. Mecanismo de reacción de la enzima G6PD.	- 22 -
Figura 2-1. Montaje del reactor y sonda de medición.	- 28 -
Figura 2-2. Espectro de absorbancia durante la oxidación enzimática de G6P.	- 31 -
Figura 2-3. Evolución de la señal de NAD _{red} a 340 nm con el tiempo.	- 32 -
Figura 2-4. Velocidad inicial de reacción en función de la concentración de enzima.	- 33 -
Figura 2-5. Saturación de la enzima.	- 33 -
Figura 2-6. Efecto de la variación de [G6P] y [NAD _{ox}] en la velocidad inicial de reacción.	- 34 -
Figura 2-7. [NAD _{red}] en función de la concentración de NAD _{ox} y de G6P a 25°C y pH 7.	- 35 -
Figura 2-8. Cinética de Michaelis-Menten de la G6P y NAD _{ox}	- 35 -
Figura 2-9. Estimación de los parámetros de Michaelis-Menten.	- 36 -
Figura 2-10. Variación de K_M y V_{max} con la temperatura.	- 37 -
Figura 2-11. Determinación de la $\Delta_r H^\circ$	- 39 -
Figura 2-12. Variación de la $\Delta_r H^\circ$ en función de las concentraciones de G6P y NAD _{ox}	- 39 -
Figura 2-13. Variación de la energía de activación en función de la concentración.	- 41 -
Figura 2-14. Variación de K_M y V_{max} con el pH.	- 43 -
Figura 2-15. Estimación de pK^{ES} gráficamente.	- 44 -
Figura 2-16. Cálculo de la V_{max} absoluta y de K^{ES}	- 45 -
Figura 2-17. Determinación de K_M a partir del cociente V_{max}/K_M	- 45 -
Figura 2-18. Estimación de K^E	- 46 -
Figura 2-19. Efecto del pH en la ionización de grupos prototrópicos.	- 47 -
Figura 2-20. Potenciales de oxidación de la G6P a 6PDGL en función del pH.	- 48 -
Figura 2-21. Relación de $\Delta_r G^\circ$ con el pH.	- 49 -
Figura 2-22. $\Delta_r G^\circ_{6PDGL}$ en función del pH.	- 50 -
Figura 3-1. Especies de G6P en función del pH.	- 59 -
Figura 3-2. Ionización de la G6P.	- 59 -

Figura 3-3. Variación de la $\Delta_r G^\circ$ de la G6P en función del pH..... - 60 -
Figura 3-4. Correlación existente entre E° y el pH. Grafica obtenida a partir de los datos de la
tabla 3-4..... - 61 -

Índice de Tablas

Tabla 1-1. Clasificación general de enzimas según la EC de la IUPAC	- 6 -
Tabla 2-1. Resumen de variables a determinar en este estudio.	- 30 -
Tabla 2-2. Efecto de la concentración de enzima.....	- 32 -
Tabla 2-3. Constantes de Michaelis-Menten a pH 7 y diferentes temperaturas.....	- 36 -
Tabla 2-4. Energía de Gibbs, entalpía y entropía transformada estándar de reacción	- 38 -
Tabla 2-5. Energía de activación.	- 40 -
Tabla 2-6. Propiedades termodinámicas estándar de formación de la 6PDGL.....	- 42 -
Tabla 2-7. Constantes de Michaelis-Menten a 25°C y diferentes valores de pH	- 43 -
Tabla 2-8. Energía de Gibbs de reacción y potenciales de óxido-reducción.....	- 47 -
Tabla 2-9. Potenciales de oxidación aparentes de G6P a 6PDGL en función del pH	- 48 -
Tabla 2-10. Valores del cambio en la unión de iones de hidrógeno.....	- 50 -
Tabla 2-11. Energía de Gibbs transformada estándar de formación de la 6PDGL.....	- 51 -
Tabla 3-1 Nomenclatura.....	- 57 -
Tabla 3-2. Constantes de Debye-Hückel para $\Delta_f G_i^\circ$ y $\Delta_f H_i^\circ$ en función de la temperatura	- 58 -
Tabla 3-3. Variación de la $\Delta_f G^\circ$ de la G6P en función del pH.....	- 60 -
Tabla 3-4. Potenciales aparentes de reducción estándar para el NAD_{ox}	- 61 -
Tabla 3-5. Potenciales de reducción aparentes de la reducción de NAD_{ox}	- 62 -

1 Antecedentes

1.1 Enzimas

1.1.1 Proteínas y enzimas

Las proteínas son unidades poliméricas sintetizadas en las células y están formadas por aminoácidos. La mayoría de los aminoácidos contienen solo carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. En la naturaleza existen cerca de 300 aminoácidos diferentes, de los cuales, solo 20 son empleados como monómeros para la síntesis de proteínas [1]. Todos los aminoácidos constan de dos grupos funcionales importantes, un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo amino (-NH₂), como se observa en la figura 1-1. Los aminoácidos se diferencian en la naturaleza por el grupo funcional R unido al carbono α . El carbono α es el átomo de carbono que está inmediatamente adyacente al grupo carboxílico [2].

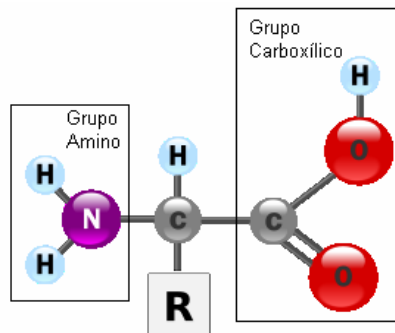


Figura 1-1. Estructura general de los aminoácidos, el grupo R es el que los distingue.

Las características químicas de los aminoácidos están determinadas por los grupos funcionales que poseen: el grupo amino, el grupo carboxílico y los grupos funcionales presentes en los grupos R. La reacción más importante de los aminoácidos es la formación del enlace peptídico. Las proteínas son polímeros de longitud variable que contienen secuencias definidas de aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. En principio, la formación de un enlace peptídico involucra la eliminación de una molécula de agua por la condensación del grupo α -amino de un aminoácido y el grupo α -

carboxílico de un segundo aminoácido (figura 1-2). La unión covalente de muchos aminoácidos por medio de enlaces peptídicos constituye un polipéptido, y las proteínas estas formadas por uno o mas polipéptidos.

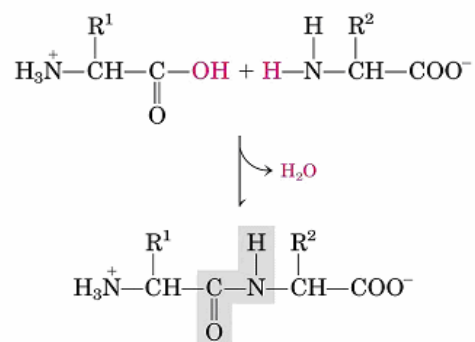


Figura 1-2. Formación de enlace peptídico.

La disposición lineal de los aminoácidos en una proteína, se conoce como estructura primaria. La estructura secundaria se refiere a las relaciones conformacionales entre aminoácidos vecinos. Dos disposiciones destacan como unidades de estructura secundaria, la hélice α y la hoja plegada β , estas conformaciones son las mas estables y abundantes. Cuando un polipéptido ha adoptado una estructura secundaria determinada se pliega sobre si mismo para formar una molécula aun más estable, esta disposición corresponde a la estructura terciaria de las proteínas. Muchas proteínas incorporan cationes divalentes o iones de metales de transición dentro de su estructura para estabilizar la estructura terciaria. La estructura cuaternaria se refiere al acoplamiento de unidades polipeptídicas.

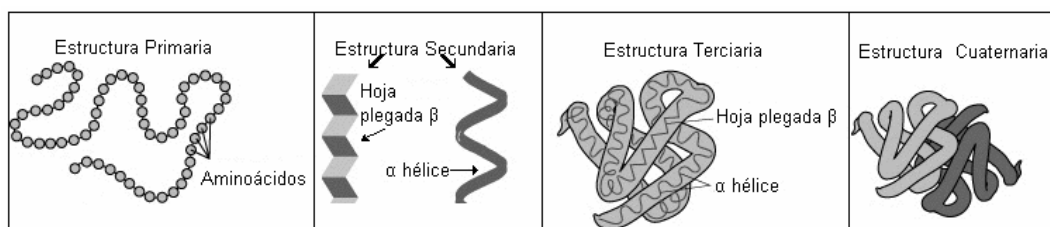


Figura 1-3. Niveles de organización en una proteína [3].

Las proteínas llevan a cabo funciones de importancia crítica para las células. Existen dos clases principales de proteínas: las estructurales y las catalíticas (enzimas). La palabra enzima se deriva del griego y significa “en la levadura”, nombre designado por Kühne en 1878. La mayoría de las reacciones químicas en los organismos vivos no ocurrirían a velocidad apreciable sin catalisis. Un sustrato es una molécula que, después de combinarse con la enzima, es convertida catalíticamente en un producto [4].

Las enzimas naturales se obtienen de las células que forman parte de un tejido o de organismos unicelulares. Para cuantificar la enzima extraída se mide la velocidad de la reacción catalizada; la velocidad medida es proporcional a la cantidad de enzima presente y, debido a que es difícil determinar la cantidad de moléculas o la masa de dicha enzima, los resultados se expresan en unidades enzimáticas. La International Union of Biochemistry, define una unidad de actividad enzimática (U) como un micromol ($1\mu\text{mol} = 10^{-6}\text{ mol}$) de sustrato transformado o de producto formado por minuto [1]. Según el Sistema Internacional, la unidad de actividad enzimática es el katal (abreviación: kat) y es la conversión de un mol de sustrato por segundo [5].

1.1.2 Sitio activo y catálisis enzimática

Las enzimas son muy específicas para las reacciones que catalizan. Esta especificidad esta relacionada con su estructura tridimensional que da origen al sitio activo, lugar donde se lleva a cabo la reacción. Debido a que el sitio activo de cada enzima es único, se pueden hacer algunas generalizaciones [6]:

1. El sitio activo es relativamente pequeño comparado con el tamaño de la proteína.
2. El sitio activo es tridimensional, como resultado de la estructura terciaria de la enzima.

3. En muchos casos las interacciones entre el sitio activo y los sustratos no son covalentes, sino puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, hidrofóbicas o fuerzas de Van der Waals.
4. El sitio activo generalmente se encuentra en huecos o grietas de la proteína, de modo que la solvatación del agua es remplazada por interacciones con átomos específicos de la enzima.
5. La especificidad en la utilización del sustrato depende del arreglo de átomos en el sitio activo de la enzima que, de alguna manera, complementa la estructura del sustrato.

Con frecuencia, las reacciones catalizadas por enzimas requieren la incorporación de grupos químicos adicionales no proteicos en su estructura (específicamente en el sitio activo), que se conocen como coenzimas o cofactores. Las enzimas que requieren un cofactor para realizar la catálisis son llamadas apoenzimas, y el complejo entre la apoenzima (proteína) y el cofactor es llamado holoenzima [4].

1.1.3 Clasificación de las enzimas

La Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), formó una comisión de enzimas (Enzyme Commission, EC), para desarrollar una nomenclatura numérica sistemática para enzimas. La clasificación EC se basa en los tipos de reacciones catalizadas y a cada enzima corresponde un código específico con cuatro números. Un primero número indica a cual de los seis grupos principales pertenece la enzima en particular, con base en el tipo de reacción que cataliza (tabla 1-1).

Tabla 1-1. Clasificación general de enzimas según la EC de la IUPAC de acuerdo a la reacción catalizada [4].

Primer número	Clase de enzima	Reacción catalizada
1	Oxido-reductasas	Oxidación-Reducción
2	Transferasas	Transferencia de grupos químicos
3	Hidrolasas	Ruptura hidrolítica de enlaces
4	Liasas	Ruptura no hidrolítica de enlaces
5	Isomerasas	Cambio en el arreglo de átomos en una molécula
6	Ligasas	Unión de dos o mas moléculas

El segundo número indica la subclase, la cual usualmente especifica el tipo de sustrato o de enlace que se rompe. El tercer número indica la sub-subclase, dando una definición mas precisa de la reacción catalizada en términos del tipo de aceptor de electrones o del tipo de grupo removido. El cuarto número del código, es el numero serial de la enzima en su sub-subclase, denotando el tipo específico de sustrato y coenzima involucrados [5].

1.2 Cinética enzimática

La cinética enzimática se define por el análisis cuantitativo de cada uno de los factores que intervienen en la tasa de una reacción catalizada enzimáticamente [5]. Las enzimas son responsables de catalizar la síntesis de gran cantidad de compuestos en las células, incrementando la velocidad de reacción entre 10^8 y 10^{20} veces [2]. Para estudiar las propiedades catalíticas de una enzima hay que mezclarla con sus cofactores (en caso de requerirlos) y sustratos bajo condiciones controladas de presión, temperatura, pH y fuerza iónica, entre otros factores.

1.2.1 Cinética química

Las velocidades de las reacciones químicas constituyen el campo de estudio de la cinética química. Por experimentación se encuentra que la velocidad de una reacción depende de la temperatura, la presión y las concentraciones de las especies implicadas. La presencia de un catalizador o un inhibidor puede cambiar la velocidad de reacción significativamente. A partir del estudio de la velocidad de una reacción y de su dependencia de todos estos factores, se pueden conocer el mecanismo de reacción con las etapas por las cuales los reactivos se convierten en productos [7]. Con frecuencia la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de reactantes.

Las leyes de velocidad son ecuaciones diferenciales que deben ser integradas numéricamente para su resolución. Para la reacción (1.1) se explican las leyes de reacción de orden cero y uno, que son relevantes en este trabajo.



Las reacciones de orden cero se caracterizan porque la velocidad de aparición del producto v es independiente de la concentración del reactivo:

$$v = \frac{dP}{dt} = -\frac{dA}{dt} = k_0 \quad (1.2)$$

donde k es la constante de velocidad. En una reacción de orden uno, la velocidad de desaparición del reactante es proporcional a su concentración:

$$v = \frac{dP}{dt} = -\frac{dA}{dt} = k_1[A] \quad (1.3)$$

Las reacciones de orden mayor que uno involucran a dos o más reactantes (moléculas iguales o diferentes) y se caracterizan por ser dependientes de la concentración de los reactantes elevados a distintas potencias.

La velocidad total de una reacción depende del mecanismo seguido y de la velocidad específica de cada etapa. La función de un catalizador es suministrar un mecanismo adicional por medio del cual los reactivos son transformados en productos disminuyendo la energía de activación y acelerando la velocidad de reacción. La energía de activación representa la barrera energética que deben superar las moléculas de reactivos para convertirse en productos (Fig. 1-4), y puede ser calculada a partir de la ecuación empírica de Arrhenius (ec. 1.4) que relaciona la constante de velocidad de reacción con la temperatura [7].

$$k = Ae^{-E_a/RT} \quad (1.4)$$

donde k es la constante de velocidad, A se denomina factor de frecuencia, E_a es la energía de activación y T la temperatura.

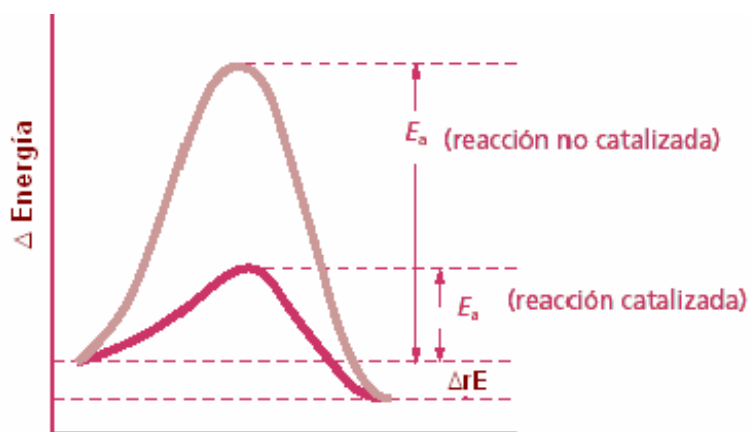


Figura 1-4. Energía de activación de una reacción con catalizador y sin catalizador.

1.2.2 Modelo de Michaelis-Menten

La cinética de Michaelis-Menten es un modelo hipotético para reacciones catalizadas por enzimas [6]. A concentraciones pequeñas de sustrato, la velocidad inicial medida V_0 sigue una cinética de orden uno. Al incrementar la concentración inicial de sustrato $[S]$, manteniendo constantes el resto de las condiciones, V_0 incrementa hasta alcanzar un valor máximo V_{max} que no se modifica por incrementos subsecuentes de la concentración del sustrato (orden cero) [1].

La ecuación (1.5), es la ecuación cinética de Michaelis-Menten. Los valores V_{max} y K_M se determinan a partir de las mediciones de la velocidad inicial de reacción V_0 en función de la concentración inicial de sustrato $[S]$. La constante de Michaelis K_M , puede definirse como la concentración de sustrato a la cual se obtiene una velocidad inicial que corresponde a la mitad de la velocidad máxima V_{max} bajo condiciones de saturación de sustrato [6]. El valor de K_M varía considerablemente de una enzima a otra y para una misma enzima con diferentes sustratos. Muchas enzimas poseen valores de K_M que se aproximan a la concentración fisiológica de sus sustratos [1]. La V_{max} (ec. 1.6) es el producto de la concentración total de enzima por la k_{cat} , conocida como el número de recambio, que es el número neto de moléculas que reaccionan por sitio activo de catalizador por unidad de tiempo [5].

$$V_0 = \frac{V_{max}[S_0]}{K_M + [S_0]} \quad (1.5)$$

$$V_{max} = k_{cat} [E_T] \quad (1.6)$$

A continuación se detallan las bases de este modelo [6].

1. Concentraciones relativas de enzima (E) y sustrato (S): la concentración de sustrato [S], es mucho mayor que la de [E], de tal manera que la cantidad de sustrato unido a la enzima en cualquier momento es muy pequeña.
2. Se asume el estado estacionario: la concentración del complejo enzima-sustrato [ES] no cambia con el tiempo, esto quiere decir que la velocidad de formación de ES es igual a aquella para su desintegración.
3. Velocidad inicial. Para el análisis de reacciones enzimáticas, sólo se utiliza la velocidad inicial de la reacción, que es la velocidad ejercida por la enzima, inmediatamente después de que se ha puesto en contacto con el sustrato y hasta antes de que se haya consumido aproximadamente el 10 % de la concentración inicial del mismo. La razón de lo anterior es que en ese momento, la concentración del producto de la reacción que se ha acumulado, es muy pequeña y, por tanto, la reacción en el sentido inverso, puede ser ignorada.

Las enzimas que no obedecen la ecuación de Michaelis-Menten se denominan no Michaelianas. Esto ocurre con las enzimas alostéricas (aquellas que tienen varias sub-unidades y varios sitios activos). En las enzimas alostéricas la unión de un sustrato a un sitio activo puede afectar las propiedades de otros sitios activos en la misma molécula. Las propiedades catalíticas de las enzimas alostéricas pueden ajustarse para cumplir con las demandas inmediatas de la célula. Debido a ello las enzimas alostéricas son los puntos clave de regulación de las vías metabólicas. Las enzimas alostéricas muestran una cinética sigmoidea. En la cual, pequeñas variaciones en la [S] en una zona crítica (cerca a la K_M), se traduce en grandes variaciones en la velocidad de reacción.

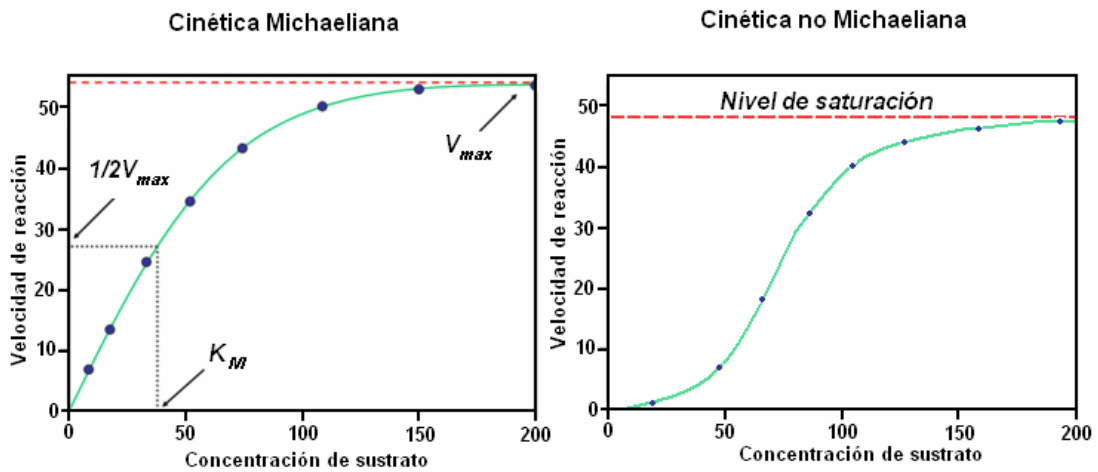


Figura 1-5. Curva representativa de las cinéticas enzimáticas Michaeliana y no Michaeliana.

Para la obtención de los parámetros de Michaelis se han desarrollado diferentes métodos que consisten en el ajuste a una línea recta (linealización) de la ecuación de Michaelis-Menten a partir de mediciones de velocidad inicial obtenida experimentalmente a diferentes concentraciones de sustrato, pero lo más recomendable (en los casos que sea posible), es obtener V_{max} y K_M gráficamente [6]. Dentro de los métodos de linealización, el más empleado es el de Lineweaver-Burk, que consiste en tomar los recíprocos de las velocidades y de las concentraciones de sustrato (1.7). Arreglando la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V_0 = V_{max} \left(\frac{1}{1 + K_M / [S]} \right)$$

tomando los recíprocos se obtiene:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \tag{1.7}$$

La pendiente obtenida es el cociente K_M/V_{max} y la ordenada al origen es el inverso de la velocidad máxima.

1.2.3 Factores que afectan la velocidad de las reacciones enzimáticas

La velocidad de una reacción enzimática es muy sensible a las condiciones del medio de reacción como son la temperatura, el pH, la concentración de sustrato y enzima, la fuerza iónica y la concentración de cationes específicos. Los cambios en la velocidad de reacción observados con la variación de un parámetro manteniendo los demás constantes, proporciona en algunos casos información sobre el mecanismo de reacción [6].

1.2.3.1 Concentración de sustrato

Cuando todos los parámetros, incluyendo la concentración de enzima se mantienen constantes en un experimento y la concentración inicial de sustrato es variada en un intervalo amplio se observan cambios en la velocidad de reacción. Al graficar la velocidad inicial de reacción como función de la concentración de sustrato se obtiene una curva bifásica que es descrita por la cinética de Michaelis-Menten. La naturaleza de esta cinética fue estudiada por primera vez por Henri y Brown en 1902 para la hidrólisis de sacarosa por la enzima invertasa [4].

La explicación dada por Henri y Brown a este comportamiento fue que, a bajas concentraciones de sustrato no todas las moléculas de enzima están combinadas con su sustrato; conforme se incrementa la concentración de sustrato aumenta el número de enzimas combinadas con sustrato dando origen a una reacción de orden uno, de modo que cuando todas las moléculas de enzima están combinadas con su sustrato la velocidad es independiente de la concentración de sustrato y se llega a la V_{max} , como consecuencia se tiene un orden de reacción cero. Entre la región de orden cero y orden uno, existe una región intermedia de concentraciones en que se da el cambio de velocidades. En algunos casos puede presentarse una inhibición por producto.

1.2.3.2 Concentración de enzima

En el desarrollo de la cinética de Michaelis-Menten se definió V_{\max} como el producto k_{cat} por $[E_T]$ (ec. 1.6). De esta ecuación se puede ver que la velocidad de una reacción catalizada por una enzima es linealmente proporcional a la concentración de enzima presente a una concentración de sustrato inicial constante. En todo momento hay que tener en cuenta los límites del sistema de medición, debido a que se pueden observar desviaciones (curvaturas, principalmente), en la región de altas concentraciones de enzima debido a una saturación en la medición [6].

1.2.3.3 Temperatura

Muchos catalizadores químicos, muestran un incremento en la actividad al aumentar la temperatura, y las enzimas no son la excepción. Sin embargo, las enzimas son proteínas y se desnaturalizan a temperaturas elevadas. La actividad típica de una enzima incrementa con la temperatura en un intervalo finito, y después disminuye significativamente por encima de su temperatura crítica, que es característica de la desnaturalización [6].

1.2.3.4 Efecto del pH

El pH afecta la actividad enzimática de diferentes formas, tiene efecto en la estabilidad de la enzima y sobre la actividad catalítica. La estructura del sitio activo de una enzima se debe a su estructura terciaria, la cual es sensible al pH. En general, la desnaturalización de enzimas ocurre con valores de pH extremadamente ácidos o alcalinos [4]. El intervalo de pH en el cual la enzima es estable, varía de una proteína a otra. La mayoría de enzimas son estables en pH cercanos al fisiológico (~7.4). El intervalo apropiado para una enzima en específico se determina experimentalmente.

El efecto del pH en la estabilidad de una enzima se ve modificado por otros factores, como el tipo y concentración de la solución amortiguadora o buffer. Un buffer es una solución acuosa que consiste en una mezcla de un ácido débil y su base conjugada, o una base débil y su ácido conjugado. Un buffer tiene la propiedad de mantener el pH constante, al adicionar un ácido o una base. En las células, el pH está regulado por la presencia de fosfatos (citoplasma), carbonatos, proteínas, entre otros, que actúan como solución amortiguadora, es muy difícil definir con exactitud un buffer “fisiológico”, ya que varía en función de las especies y las condiciones prevalecientes [8].

El efecto del pH en la actividad catalítica puede ser claramente distinguido del efecto en la estabilidad. La actividad catalítica se ve modificada por la ionización de aminoácidos del sitio activo, o bien por la ionización del sustrato o el producto de la reacción. Las constantes de ionización de la enzima o del complejo enzima-sustrato pueden ser calculadas a partir de los valores de V_{max} y K_M en función del pH con base en el modelo siguiente.

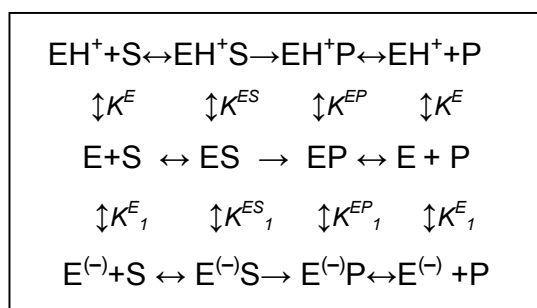


Figura 1-6. Esquema de las disociaciones de los grupos ionizables del sitio activo de la enzima (grupos prototrópicos). EH^+ corresponde a la enzima con un grupo prototrópico protonado y se obtiene en valores ácidos de pH. La especie E corresponde al grupo prototrópico sin ionizar. La especie $E^{(-)}$ corresponde a la forma desprotonada del grupo prototrópico [4].

1.2.3.5 Otros factores

La viscosidad de la solución tiene efecto sobre la actividad enzimática, cuando un efecto difusivo, como el encuentro colisional entre E y S, para formar

el complejo ES o la disociación del producto del complejo EP son pasos limitantes[6]. La fuerza iónica es un parámetro que se debe tener en cuenta ya que modifica las constantes de disociación de las sustancias, lo cual puede afectar la velocidad de una reacción al modificar la afinidad de una enzima por su sustrato.

1.2.4 Inhibidores enzimáticos

Las sustancias que reducen la velocidad de una reacción catalizada se consideran inhibidores. La inhibición de la actividad enzimática es uno de los principales mecanismos reguladores de las células vivas. Los inhibidores enzimáticos son empleados como drogas, antibióticos, preservativos, venenos y toxinas [5].

La actividad de una enzima puede ser inhibida de diferentes formas, ya sea que el inhibidor se una al sitio activo, impidiendo la formación del complejo ES y la consecuente conversión a producto, o bien, que desestabilice la estructura del sitio activo al unirse a un grupo esencial en el mantenimiento de la conformación del mismo. En algunos casos, las concentraciones de sustrato, coenzima y producto, entre otros (como los iones metálicos), son responsables de la inhibición enzimática.

1.3 Termodinámica de las reacciones enzimáticas

Las enzimas son catalizadores, de modo que afectan la velocidad de reacción disminuyendo la energía de activación, pero no modifican la termodinámica del sistema. Para estudiar la termodinámica de las reacciones bioquímicas, es necesario tener en cuenta que la concentración de cada reactivo corresponderá a la suma de las concentraciones de las especies ionizadas (o pseudoisómeros), especies que difieren únicamente en el

contenido de átomos de hidrogeno en el pH de estudio [9]. Algunas de estas especies pueden unirse iones a metálicos como el de magnesio (II), dando origen a nuevas especies ionizables.

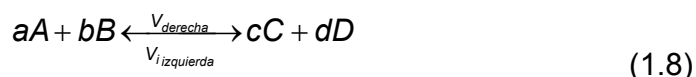
Por otra parte, la actividad de cada especie está en función de la fuerza iónica y la fuerza iónica es a su vez una función de la temperatura. De modo que la termodinámica del sistema debe considerar cada uno de estos equilibrios. En 1994, la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), junto con la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), establecieron una serie de recomendaciones para la nomenclatura y presentación de datos termodinámicos de reacciones bioquímicas [10], las cuales son empleadas en este trabajo (apéndice, tabla 3-1) .

1.3.1 Equilibrio químico

El equilibrio químico en una reacción reversible es el estado alcanzado, al igualarse las velocidades de reacción en ambos sentidos, o bien, cuando la velocidad de formación de producto y de regeneración de reactivo, tienen la misma magnitud. El estado de equilibrio de una reacción química, a una temperatura dada, se define en términos de la composición de la mezcla en equilibrio mediante la denominada constante de equilibrio (K). La expresión matemática que representa al Equilibrio Químico, se conoce como Ley de Acción de Masas.

Para la reacción química representada en la ec. 1.8, se indican en mayúsculas las especies químicas participantes y en minúsculas los coeficientes estequiométricos correspondientes. K se calcula con la concentración en equilibrio de las especies en caso de ser una disolución diluida, o con las actividades en caso de que no se traten especies diluidas. En la ecuación 1.9, el denominador c° representa la concentración estándar (e. g. 1

molar, o 1 molal), y es introducido con la finalidad de mantener adimensional el valor de K [10].



$$K = \frac{K_{derecha}}{K_{izquierda}} = \frac{([C]/c^{\circ})^c ([D]/c^{\circ})^d}{([A]/c^{\circ})^a ([B]/c^{\circ})^b} \quad (1.9)$$

Las reacciones bioquímicas se realizan en disoluciones amortiguadoras a un pH constante, por lo cual, en el cálculo de K , no debe considerarse la producción o consumo de especies H^+ u OH^- , como consecuencia no deben balancearse las cargas eléctricas [9]. La constante de equilibrio que se obtiene es referida como constante de equilibrio aparente K' , que está en función de la temperatura (T), la presión (P), el pH, el pX (X es un ión metálico) y la fuerza iónica (I), contemplando el equilibrio de los pseudo-isómeros como se indica más adelante.

1.3.2 Termodinámica de reacciones bioquímicas a pH específico.

A partir de la constante de equilibrio aparente puede calcularse la correspondiente energía de Gibbs transformada estándar de *reacción* $\Delta_r G^{\circ}$:

$$\Delta_r G^{\circ} = -RT \ln(K') \quad (1.10)$$

La entalpía transformada estándar de reacción puede ser calculada con la ecuación de Gibbs-Helmholtz utilizando los valores de K' a diferentes temperaturas:

$$\left(\frac{\partial \ln K'}{\partial T} \right)_P = \frac{\Delta_r H^{\circ}}{RT^2} \quad (1.11)$$

Conociendo la entalpía y la energía de Gibbs correspondientes, el valor de las entropías transformada estándar de reacción $\Delta_r S^\circ$, se puede obtener de la siguiente ecuación.

$$\Delta_r G^\circ = \Delta_r H^\circ - T\Delta_r S^\circ \quad (1.12)$$

Es posible conocer la energía de Gibbs y la entalpía de formación estándar, de una sustancia en función del pH y la fuerza iónica aplicando las ecuaciones empíricas 1.13 y 1.14, respectivamente. Estas ecuaciones fueron obtenidas aplicando transformadas de Legendre a las ecuaciones originales de la energía de Gibbs y de la entalpía considerando la contribución del pH, la temperatura y la fuerza iónica dada por la ley extendida de Debye-Hückel y que es multiplicada por el factor de corrección experimental (α) que depende de la temperatura [9].

$$\Delta_f G_i^\circ(I) = \Delta_f G_i^\circ(I=0) + N_H(i)RT \ln(10)pH - \frac{\alpha RT(z_i^2 - N_{H_j})I^{1/2}}{1 + 1.6I^{1/2}} \quad (1.13)$$

$$\Delta_f H_i^\circ(I) = \Delta_f H_i^\circ(I=0) + \frac{\alpha RT^2(z_i^2 - N_{H_j})I^{1/2}}{1 + 1.6I^{1/2}} \quad (1.14)$$

donde

$$I = \left(\frac{1}{2}\right) \sum_i z_i^2 c_i$$

En estas ecuaciones z_i es la carga de la molécula y el término $N_H(i)$ se refiere al número de átomos de hidrógeno unidos a la molécula en disolución con un pH específico. Algunos valores del parámetro α en función de la temperatura se muestran en el apéndice (tabla 3-2). Las ecuaciones 1.15 y 1.16 hacen posible el cálculo de $\Delta_r G^\circ$ y $\Delta_r H^\circ$ a partir de los datos existentes a fuerza iónica cero y viceversa.

La glucosa-6-fosfato, por ejemplo, es un sustrato ionizable, por lo cual es necesario conocer la especie pseudoisomérica presente y su concentración a determinado pH. En el apéndice se presentan las ecuaciones y metodología a seguir para conocer las concentraciones relativas de pseudoisómeros así como el promedio de átomos de hidrógeno (\bar{N}_{H^+}) unidos a la molécula en función del pH. La energía de formación transformada estándar de Gibbs para un grupo pseudoisómero se calcula a partir de la siguiente ecuación.

$$\Delta_f G_i^{\circ}(I) = \Delta_f G_1^{\circ} - RT \ln \rho \quad (1.15)$$

donde:

$$\rho = 1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{[H^+]^2}{K_1 K_2} + \dots$$

El $\Delta_r G^{\circ}$ es la energía de Gibbs transformada estándar de formación de la especie con el menor número de átomos de hidrógeno dissociables y K_1, K_2, \dots , son las constantes de disociación correspondientes a la molécula. Los potenciales de reducción y oxidación aparentes se calculan a partir de la $\Delta_r G^{\circ}$ mediante la ecuación (1.16), en la cual v_e representa el número de electrones transferidos y F es la constante de Faraday.

$$\Delta_r G^{\circ} = |v_e| F E^{\circ} \quad (1.16)$$

1.4 Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

1.4.1 Clasificación

La glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD) es una enzima del grupo de las óxido-reductasas que cataliza la oxidación de la glucosa-6-fosfato (G6P) a 6-fosfo-D-glucono-1,5-lactona, usando NAD^+ o $NADP^+$, lo cual la hace

especialmente interesante. De acuerdo con la IUPAC tiene el número EC 1.1.1.49:

1. Óxido-reductasa

1.1 Actúa con el grupo CH-OH de donadores

1.1.1 Funciona con NAD^+ ó NADP^+ como aceptor

1.1.1.49 Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

Los dinucleótidos de nicotinamida adenina (NAD) y nicotinamida adenina fosfato (NADP) son coenzimas que tienen la función principal de intercambio de electrones y de iones de hidrógeno para la producción de energía de todas las células.

El NAD en su forma oxidada ($\text{NAD}^+ = \text{NAD}_{\text{ox}}$, $\text{pK}_a = 3.88 \pm 0.02$ [11]), interviene en múltiples reacciones metabólicas de óxido-reducción. Cuando una enzima oxida un sustrato por deshidrogenación, los átomos de hidrógeno arrancados a dicho sustrato son cedidos por la enzima al NAD_{ox} o al NADP_{ox} ($\text{NADP}^+ = \text{NADP}_{\text{ox}}$) que actúan como agentes oxidantes al aceptar dos electrones y un protón, quedando libre en el medio otro protón. En su forma reducida, el NAD_{red} (NADH) y el NADP_{red} (NADPH) actúan como transportadores de estos dos electrones y el átomo de hidrógeno para cederlos en otra reacción. Estas coenzimas solo difieren estructuralmente por un grupo fosfato (figura 1-7).

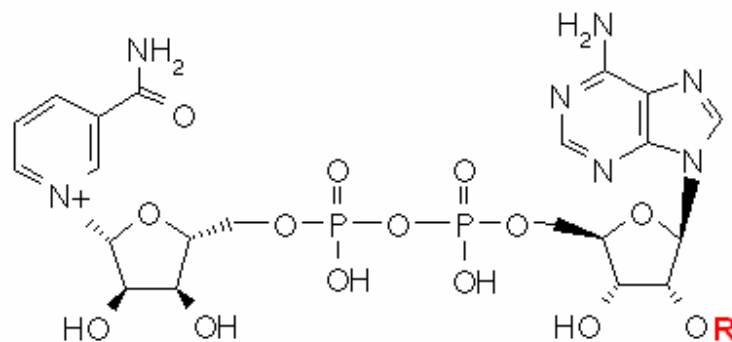


Figura 1-7. Estructura del NAD y el NADP. En NAD el grupo R es H y en NADP es $\text{PO}(\text{OH})_2$.

1.4.2 Importancia biológica

La G6PD es la primera enzima en el ciclo de las pentosas fosfato, el cual sirve para generar NADP_{red} , una sustancia que es utilizada como coenzima por otras enzimas. En animales representa un punto clave en el suministro de equivalentes reductores en los eritrocitos y otras células como hepatocitos. Ha sido identificada como la única enzima productora de NADP_{red} activa durante un estrés oxidativo [12].

En humanos, la G6PD es la principal fuente intracelular NADP_{red} , compuesto comprometido en diversos procesos fisiológicos. Por ejemplo, actúa como defensa antioxidante (sobre todo células como los eritrocitos), en la modulación del crecimiento endotelial, la eritropoyesis, la vascularización y la fagocitosis [1]

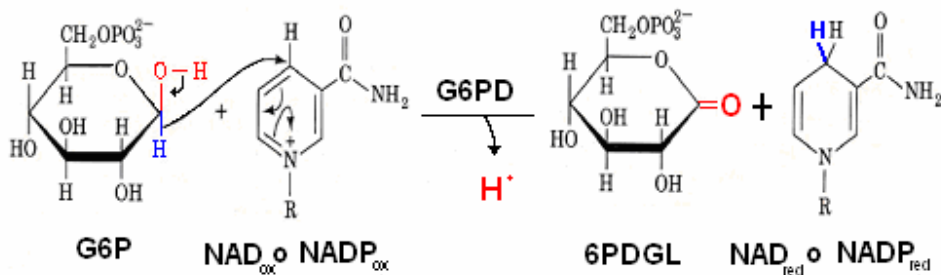


Figura 1-8. Reacción catalizada por G6PD con NADP ó NAD.

La deficiencia de G6PD constituye una enzimopatía ligada al cromosoma X y es muy común en el ser humano. Si bien se puede presentar en cualquier tipo de célula, su carencia absoluta es incompatible con la vida. El trastorno que resulta de la deficiencia de G6PD se conoce como anemia hemolítica. El consumo de habas (*Vicia faba*) por individuos que ya muestran una actividad deficiente de la enzima puede precipitar un ataque de anemia hemolítica debido a que esas leguminosas contienen poderosos oxidantes [1].

La G6PD del microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* es una enzima con peso molecular de 109,632 Dalton que cataliza la oxidación de glucosa-6-fosfato (G6P) a 6-fosfo-D-glucono-1,5-lactona utilizando NADP_{ox} o NAD_{red} como coenzimas [13]. Esta enzima ha sido estudiada con detalle debido a que presenta una especificidad dual de coenzima [14]. En ambos casos, cuando reacciona con NAD_{ox} o NADP_{red} , reduce las coenzimas mediante la adición de un átomo de hidrógeno (Fig. 1-9). Estas coenzimas toman parte en diferentes rutas metabólicas: NADP_{red} es utilizado en biosíntesis de ácidos grasos y NAD_{red} es utilizado en fermentación heteroláctica [15].

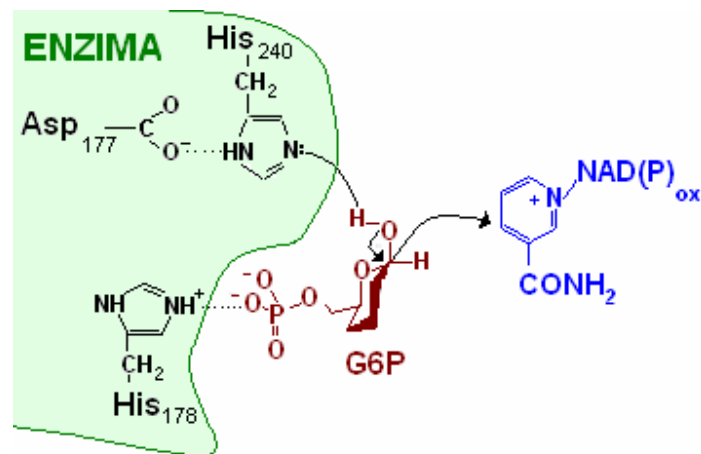


Figura 1-9. Mecanismo de reacción de la enzima G6PD. El átomo Nδ1 del residuo His-240 es unido mediante un puente de hidrógeno al átomo Oδ1 de Asp-177, formando un dúo catalítico. El Nε2 de His-240 es posicionado para actuar como una base sustrayendo un protón del enlace C1-OH de la G6P, permitiendo la transferencia del hidruro del C1 al C4 del anillo del NAD_{ox} ó NADP_{ox} [14].

Existen pocas deshidrogenasas en las que la elección de NAD_{ox} y NADP_{ox} depende de las condiciones fisiológicas. G6PD (E.C. 1.1.1.49) de *L. mesenteroides* es una de ellas. Estudios cinéticos y de unión de las coenzimas coinciden con que se trata de un mismo sitio de la enzima para ambas coenzimas. Además, existe evidencia experimental que refuerza la idea de que la unión de NAD_{ox} produce un mejor cambio conformacional, el cual no es visto con NADP_{ox} [16].

1.4.3 Actividad enzimática de la G6PD

La glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa ha sido purificada de diversas fuentes. Fue descubierta en la levadura por Warburg y Christian [17], quienes mostraron que la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) es la coenzima específica. En 1952, DeMoss [18] reportó, la parcial purificación y estudio de las propiedades de G6PD de *L. mesenteroides* haciendo notar que la enzima no presenta especificidad con respecto al requerimiento de la coenzima piridina nucleótido (NADP o NAD), encontró un pH óptimo de 7.8 para la oxidación de G6P con NAD_{ox} en buffer de veronal y en sus experimentos observó inhibición significativa por ortofosfato (sal inorgánica del ácido fosfórico).

En 1955, Glaser y Brown [19], reportaron la obtención de la G6PD purificada a partir de levadura de cerveza. En 1961 se reportó la extracción y cristalización de G6PD de glándula mamaria bovina [20]. Se analizó la actividad de la G6PD con NADP_{ox} en buffer de Tris-HCl a 25°C. En 1969, Engel [21], reportó la extracción y purificación de la G6PD del microorganismo *Candida utilis* y analizó sus propiedades cinéticas y termodinámicas siendo NADP_{ox} la coenzima empleada, se encontró una energía de activación de 29.58 kJ/mol a pH = 7.40, entre 20 y 37 °C, además reportó inhibición de la enzima por iones fosfato.

Levy realizó ensayos con la enzima extraída de glándula mamaria de rata [22] con ambas coenzimas (NADP_{ox} y NAD_{ox}), en disoluciones como función del buffer y del pH. Concluyó que la reacción con NAD_{ox} es fuertemente dependiente del pH y que el buffer de carbonato-bicarbonato estimula la actividad, lo cual no sucede cuando la coenzima empleada es NADP_{ox}. Reportó un valor de K_M para G6P de 4.9×10^{-4} mol/L y para NAD de 1.5×10^{-2} mol/L a pH 8.6 y temperatura de 25°C en buffer de Tris-HCl, remarcando que la K_M no

es alterada en presencia de bicarbonatos y que concentraciones bajas de NADP inhiben la reducción de NAD.

En 1967, Olive [23] reportó el aislamiento y la cristalización de la G6PD de *L. mesenteroides*, describió a la enzima como una proteína simple con especificidad dual por los dinucleótidos de nicotinamida adenina. No encontró evidencias de interconversión entre dos formas de enzima diferentes, por lo cual propuso que la enzima cuenta con un sitio activo único en el cual une a las dos coenzimas. En este estudio reportó los valores de K_M para ambas coenzimas y para G6P en cada caso. Estudios cinéticos de la G6PD de *L. mesenteroides* mostraron que, a concentraciones saturantes o no saturantes de G6P, se presenta una inhibición no competitiva lineal con NAD_{red} cuando la glucosa es el sustrato que se varía [24].

En 1998 se reportó un estudio de G6PD de eritrocitos en un medio “fisiológico” con osmolaridad de 290 mO y fuerza iónica de 0.188 y 3 mM $MgCl_2$ a pH 7.34 y 37°C de temperatura en buffer Tris-HCl. Se obtuvieron valores de K_M , para G6P con $NADP_{ox}$ como sustrato, los cuales son menores a los reportados, atribuyendo estos resultados a las condiciones fisiológicas [25].

Filosa [12] realizó un estudio en embriones de rata, y encontró que la G6PD parece jugar un papel crítico cuando la célula necesita responder rápidamente a estímulos oxidativos exógenos participando en la generación de glutatión reducido, siendo la única enzima productora de $NADP_{red}$ activada en respuesta al estrés oxidativo.

Se ha estudiado el mecanismo cinético y termodinámico de síntesis e inactivación térmica para G6PD de *L. mesenteroides* expresada en *Saccharomyces cerevisiae* en un intervalo de 20 a 43°C con $NADP_{ox}$ como coenzima [26]. Kotaka [27], reportó un análisis estructural y de unión de $NADP_{ox}$ y NAD_{ox} de G6PD humana dando a conocer que la G6PD participa en un rápido

equilibrio dímero-tetrámero que es afectado por la fuerza iónica y el pH. El reporte mas reciente de las propiedades termodinámicas de G6PD fue hecho por Hasmann en el año 2006 [28], la enzima empleada es extraída de *S. cerevisiae*, siendo NADP_{ox} la coenzima. Se analizó la inactivación térmica de la enzima y se calculó el cambio de energía asociado a este proceso.

Los estudios más recientes acerca de G6PD de *L. mesenteroides*, se han enfocado en el estudio de la estructura del sitio activo [13], el papel de los aminoácidos en la catálisis [14] y sus implicaciones en la doble especificidad mediante técnicas de mutagénesis puntual dirigida [16].

En este trabajo se estudió el desempeño de la enzima G6PD con la coenzima NAD_{ox} en buffer de fosfatos, debido a que en las células vivas esta enzima realiza su función catalítica en el citosol [1], en el cual predomina la actividad amortiguadora de los fosfatos. El estudio cinético se realizó con base en el modelo de Michaelis-Menten a diferentes temperaturas y valores de pH. De los experimentos a diferentes temperaturas se obtuvieron las propiedades termodinámicas transformadas estándar de reacción y haciendo uso de las ecuaciones específicas para las reacciones bioquímicas [10] se calcularon las propiedades termodinámicas estándar de formación a fuerza iónica cero para la 6PDGL. Los ensayos realizados a diferentes valores de pH permitieron calcular la constante de disociación del grupo ionizable de la enzima en el intervalo de pH en estudio, así como las constantes de Michaelis-Menten absolutas, la energía de Gibbs transformada de reacción estándar, los potenciales aparentes de óxido-reducción de la reacción y de la semi-reacción de oxidación además de la energía de Gibbs estándar de formación de la 6PDGL a diferentes valores de pH.

2 SECCIÓN EXPERIMENTAL

2.1 Metodologías

2.1.1 Preparación de las disoluciones de reacción

El medio de reacción consistió en soluciones molares de G6P y NAD_{ox} en buffer de fosfatos 50.0 ± 0.1 mmol/L. El buffer de fosfatos se preparó en agua desionizada con las masas correspondientes de fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄ 99.8%), y fosfato dibásico de potasio (K₂HPO₄, 99.7%), calculadas a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \left(\frac{\text{A}^-}{\text{AH}} \right) \quad (2.1)$$

El valor de pK_a utilizado fue de 6.86 para el par de fosfatos. El pH de cada buffer preparado fue ajustado con HCl 1.0 N o NaOH 1.0 N y verificado con un potenciómetro (Senslon 3).

La enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), proveniente de *Leuconostoc mesenteroides*, fue adquirida en forma de polvo liofilizado (Sigma), que se diluyó en buffer de fosfatos con pH = 7.00 ± 0.01 y se almacenó a -4°C. Como sustratos se emplearon la sal sódica de glucosa-6-fosfato (G6P) cristalizada, (Sigma, C₆H₁₂NaO₉P, 98%), y la coenzima β-nicotinamida adenina dinucleótido en forma oxidada (NAD_{ox}), que fue adquirida en forma de sal sódica (Sigma, C₂₁H₂₆N₇NaO₁₄P₂, 95% de pureza), proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*. Se prepararon disoluciones 75.0 ± 0.1 mmol/L de NAD_{ox} y 10.0 ± 0.1 mmol/L de G6P en el buffer de fosfatos 50 mmol/L al pH de trabajo, y para cada experimento fueron diluidas en el mismo buffer para alcanzar la concentración deseada.

2.1.2 Montaje del reactor y sonda de medición

El reactor consistió de un matraz de bola de 50 mL con tres bocas sumergido en un baño recirculador (Isotemp 3016, Fisher) a la temperatura de trabajo. En el matraz se depositaba la mezcla de reacción en el siguiente orden: primero se agregaba la G6P, después el NAD_{ox} y finalmente la enzima para dar inicio a la reacción. Para mantener la homogeneidad del sistema se empleó un agitador de vidrio con paletas, a una velocidad de 100 rpm impulsado por un motor mecánico mediante un chicote. El diseño experimental se muestra en la figura 2-1.

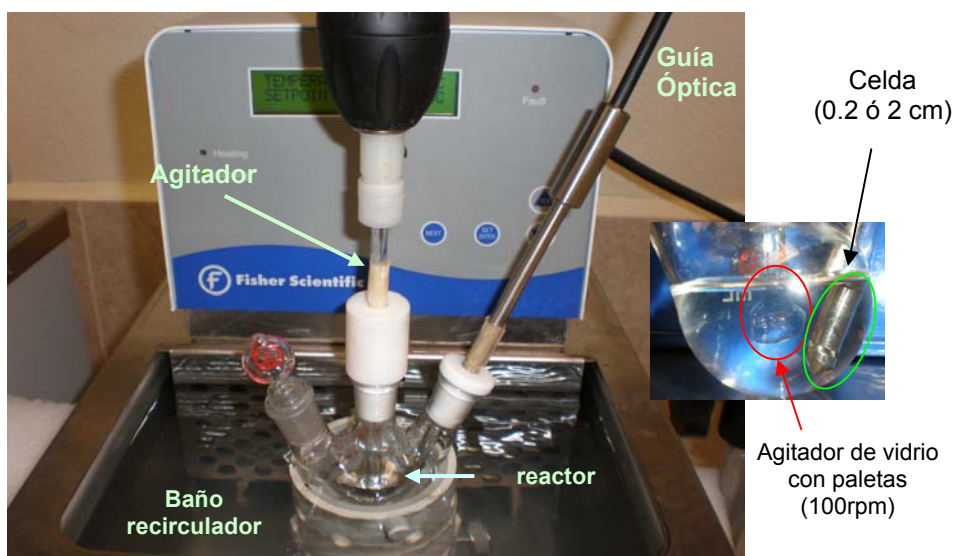


Figura 2-1. Montaje del reactor y sonda de medición.

La evolución de la reacción fue seguida en tiempo real por la formación de NAD_{red}, el cual presenta un máximo de absorción a 340 nm, mediante un espectrofotómetro (EPP2000, StellarNet) de guía óptica con una celda de longitud 0.2 cm ó 2 cm. La sonda óptica está conectada al espectrofotómetro y éste a una computadora a través de un puerto USB. Mediante el software SpectraWiz® se recopilaron los datos de absorbancia de NAD_{red} en el intervalo de longitud de onda de 200 a 850 nm. El tiempo durante el cual fue seguida la reacción varió de 1000 a 3000 s en función de las concentraciones de enzima,

sustratos, pH y temperatura, en todos los casos se tomaron 200 episodios y la duración de cada episodio está en función del tiempo de monitorizado.

2.1.3 Variación de condiciones experimentales

Concentración de enzima

El primer parámetro a variar fue la concentración de enzima en disolución con pH 7.00 ± 0.01 y temperatura de 25.00 ± 0.05 °C con 10 mmol/L de G6P y 1.0 mmol/L de NAD_{ox} para las concentraciones de enzima: 0.10, 0.20, 0.53, 1.0 y 2.0 U/mL. Para el intervalo de concentración 0.10 a 1.0 U/mL, el tiempo del experimento fue de 2000 s, y para la concentración de 2.0 U/mL fue de 1000 s. Todos los experimentos se realizaron al menos dos veces. Se encontró que la concentración adecuada de enzima para el rango de concentraciones a emplear era de 0.20 U/mL, de modo que con esta concentración se realizaron el resto de los experimentos.

Concentración de sustratos

El efecto de la concentración de sustratos fue analizado con detalle a 25.00 ± 0.05 °C y pH 7.00 ± 0.01 en buffer de fosfatos con las concentraciones relativas de G6P:NAD_{ox} en mmol/L: 0.10:1.0, 0.25:1.0, 0.5:1.0, 1.0:0.10, 1.0:0.25, 1.0:0.50, 1.0:1.0, 1.0:3.0, 1.0:5.0, 1.0:7.5, 1.0:12, 3.0:1.0, 5.0:1.0, 7.5:1.0 y 12:1.0. Cada experimento fue realizado al menos por duplicado.

Temperatura

Se analizaron las temperaturas siguientes: 19.0, 25.0, 31.0, 37.0 y 43.0°C manteniendo un pH de 7.00 ± 0.01 en buffer de fosfatos. Para cada temperatura se emplearon las relaciones de concentración G6P:NAD_{ox}: 0.10:1.0, 1.0:0.10,

1.0:1.0, 1.0:7.5 y 7.5:1.0 mmol/L. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

pH del buffer

La variación del pH se realizó a 25.00 ± 0.05 °C, con buffer de fosfatos de concentración 50 mmol/L. Los valores de pH estudiados fueron: 5.40, 6.20, 7.00, 7.80 y 8.60. En esta serie de experimentos se analizaron las mismas relaciones de concentración G6P:NAD_{ox}, que en los experimentos a temperatura variable.

Con la finalidad de ubicar al lector en la tabla 2-1 se resume la metodología para la obtención de cada parámetro.

Tabla 2-1. Resumen de variables a determinar en este estudio.

[G6P]:[NAD _{ox}] en mmol/L	Condiciones experimentales	Parámetros calculados		
Para cada temperatura y valor de pH: 0.1:1.0 1.0:0.1 1.0:1.0 1.0:7.5 7.5:1.0	pH = 7.0 Temperaturas: 19, 25, 31, 37 y 43°C	$V_o = d [NAD_{red}]/dt$	V_{max} , K_M , k y E_a	
		$K' = \frac{[NAD_{red}]_{eq}^2}{([G6P]_0 - [NAD_{red}]_{eq})([NAD_{ox}]_0 - [NAD_{red}]_{eq})}$	$\Delta_r G^\circ$, $\Delta_r H^\circ$ y $\Delta_r S^\circ$ $\Delta_f G^\circ_{6PDGL}$, $\Delta_f H^\circ_{6PDGL}$ y $\Delta_f S^\circ_{6PDGL}$	
	T = 25°C	$V_o = d[NAD_{red}]/dt$	V_{max} y K_M	K^E
	pH del buffer: 5.4, 6.2, 7.0, 7.8 y 8.6	$K' = \frac{[NAD_{red}]_{eq}^2}{([G6P]_0 - [NAD_{red}]_{eq})([NAD_{ox}]_0 - [NAD_{red}]_{eq})}$	$\Delta_r G^\circ$ $\Delta_f G^\circ_{6PDGL}$	E°

2.2 Resultados experimentales

2.2.1 Curva típica

La cuantificación de las velocidades de reacción estuvo basada en la evolución de la absorbancia (A) del NAD_{red} formado a 340 nm de longitud de onda (Figura 2-2).

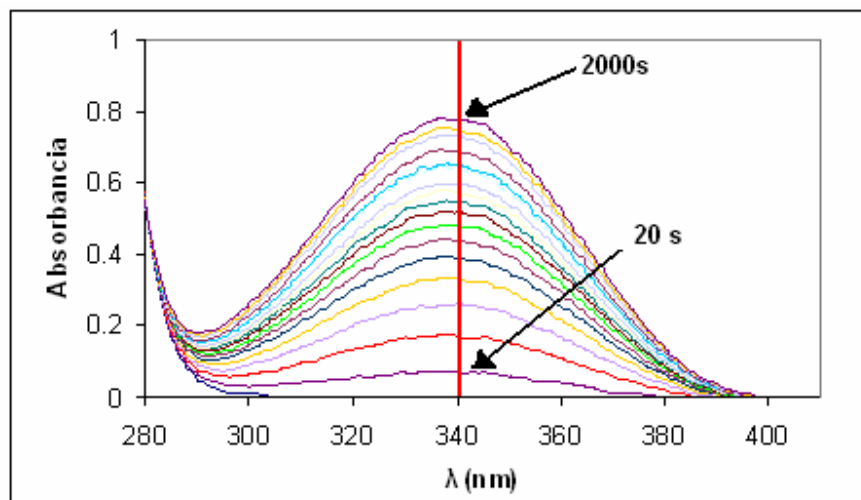


Figura 2-2. Espectro de absorción durante la oxidación enzimática de G6P. La señal alrededor de 340 nm corresponde al NAD_{red} . Condiciones experimentales: 25°C, pH 7.0 en buffer de fosfatos de concentración 50 mmol/L con una concentración de $[\text{G6P}] = [\text{NADox}] = 1 \text{ mmol/L}$, $[\text{E}] = 0.2 \text{ U/mL}$ y un tiempo de reacción de 2000s.

El avance de reacción se obtuvo a partir de la ley de Lambert-Beer, $A = \epsilon lc$, siendo c la concentración del NAD_{red} , l la longitud de la celda óptica y el coeficiente de exclusión para el NAD_{red} $\epsilon(\lambda = 340 \text{ nm}) = 6.220 \text{ mmol/Lcm}$ [1]. En la figura 2-3 se muestra la curva característica del avance de reacción y se señala la localización de V_0 y de la concentración de NAD_{red} cuando se alcanza el equilibrio $[\text{NAD}_{\text{red}}]_{\text{eq}}$.

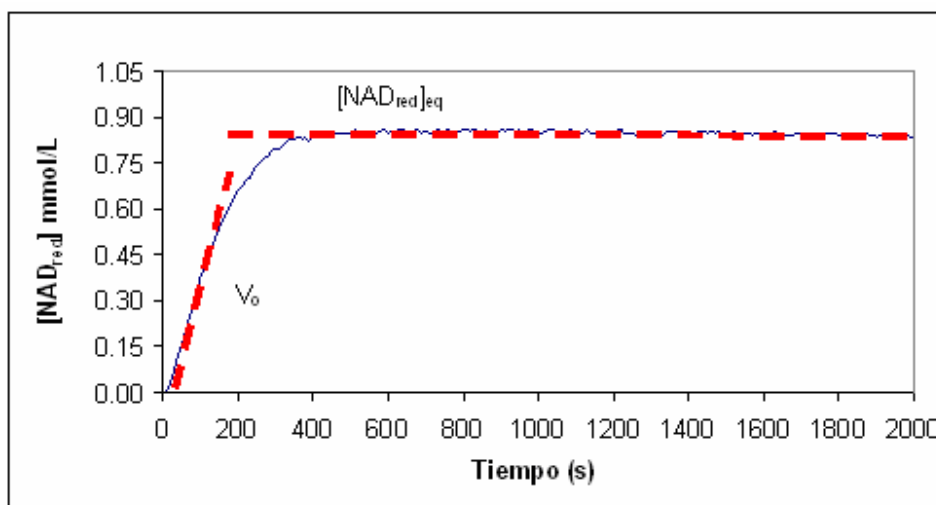


Figura 2-3. Evolución de la señal de NAD_{red} a 340 nm con el tiempo, para una relación de concentraciones 1.0 mmol/L de G6P: NAD_{ox} y 0.2 U/mL de enzima a 25°C en buffer de fosfatos 50mmol/L pH 7.0.

2.2.2 Efecto de la variación de la concentración de enzima

La concentración de enzima y la velocidad inicial guardan una relación lineal cuando se mantienen constantes el pH, la temperatura y la relación de concentración de sustratos [4], lo cual se aprecia en la figura 2-4, construída a partir de los datos de la tabla 2-2, que fueron obtenidos a 25°C (298.15 K) en buffer de fosfatos 50 mmol/L a pH 7.0 con una concentración inicial de G6P de 10 mmol/L y 1.0 mmol/L de NAD_{ox} .

Tabla 2-2. Efecto de la concentración de enzima. Condiciones experimentales: temperatura 25°C en buffer de fosfatos pH 7.0 con $[\text{G6P}] = 10 \text{ mmol/L}$ y $[\text{NAD}_{\text{ox}}] = 1.0 \text{ mmol/L}$

[E] (U/mL)	V_0 ($\mu\text{mol/L}$)
0.10	$(7.9 \pm 0.2) \times 10^{-1}$
0.20	1.2 ± 0.0
0.53	3.7 ± 0.3
1.0	5 ± 2
2.0	11 ± 1

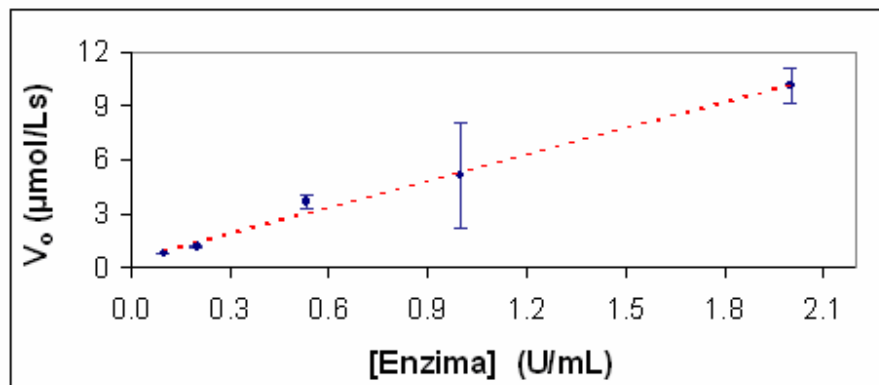


Figura 2-4. Relación de la velocidad inicial de reacción, como una función de la concentración total de enzima. Condiciones experimentales: 25°C de temperatura y pH 7.0 con una relación de concentraciones G6P:NAD_{ox} de 10:1.0 mmol/L.

La concentración de enzima seleccionada corresponde a 0.2 U/mL, debido a que a esta concentración no se observa un efecto significativo de la concentración de sustrato en la velocidad inicial y se puede asegurar que la enzima se encuentra saturada. En la figura 2-5 las velocidades iniciales fueron calculadas con respecto a la variación de la concentración de G6P durante la reacción. Cada punto corresponde a un promedio de dos pendientes adyacentes a un punto central en la curva de avance de reacción.

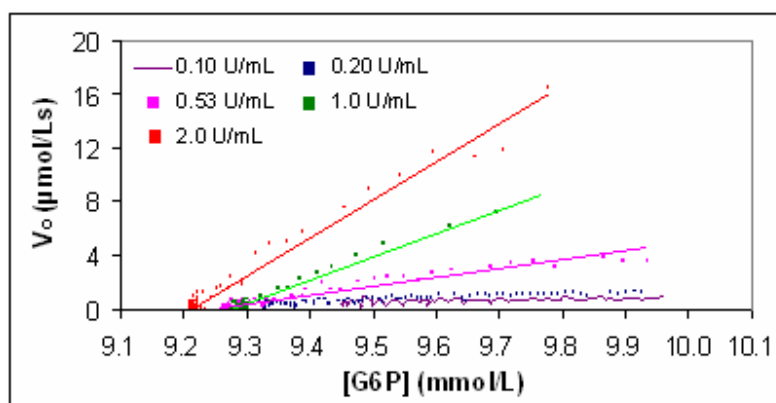


Figura 2-5. Saturación de la enzima con una concentración inicial de G6P de 10 mmol/L y NAD_{ox} 1.0 mmol/L a 25 °C y pH 7.0.

2.2.3 Concentración de sustratos

La variación de las concentraciones de sustrato de manera independiente permite llevar a cabo un análisis cinético basado en el modelo de Michaelis-Menten [5]. Con la finalidad de conocer los parámetros de Michaelis-Menten se analizó el efecto de la concentración de cada sustrato sobre la velocidad inicial (V_0). A concentraciones mayores a 3.0 mmol/L, la saturación de la enzima queda asegurada, debido a que no se observa un cambio significativo en la velocidad inicial (Fig. 2-6).

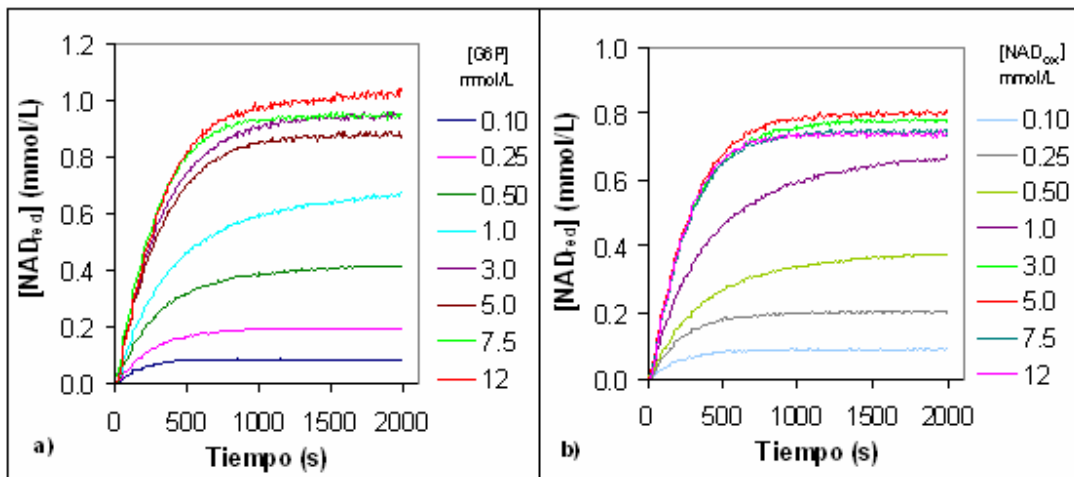


Figura 2-6. Efecto de la variación de $[G6P]$ (a) y $[NAD_{ox}]$ (b) en la velocidad inicial de reacción, para una concentración inicial de NAD_{ox} y de $G6P$ 1.0 mmol/L, a 25°C y pH 7.0.

Las velocidades iniciales son las pendientes de la curva de $[NAD_{red}]$ en función del tiempo, correspondientes a los primeros segundos de reacción y se observa que la velocidad inicial incrementa conforme incrementa la concentración de sustrato (Fig. 2-7) y a concentraciones superiores a 3.0 mmol/L no se observa un cambio significativo o bien la velocidad inicial es independiente de la concentración inicial de sustrato.

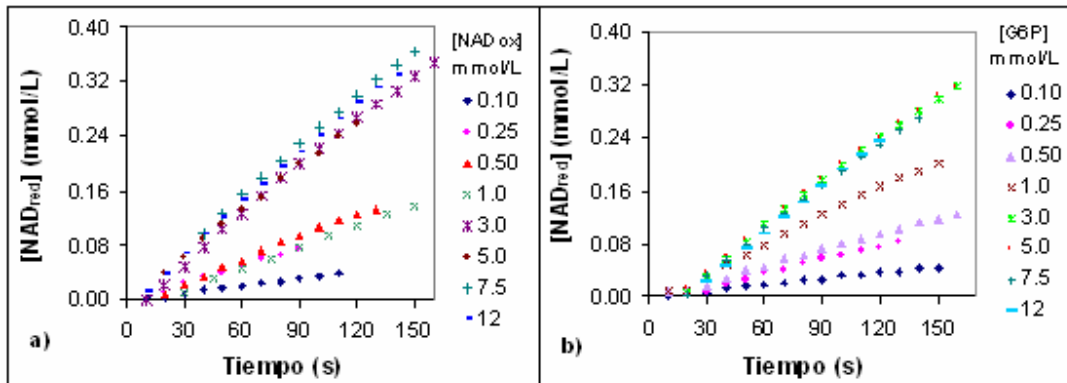


Figura 2-7. (a) $[NAD_{red}]$ en función del tiempo de reacción para una concentración inicial de G6P 1.0 mmol/L en función de la concentración de NAD_{ox} . (b) $[NAD_{red}]$ en función del tiempo de reacción para una concentración inicial de NAD_{ox} 1.0 mmol/L en función de la concentración de G6P a 25°C y pH 7.0.

Al graficar las velocidades iniciales en función de la concentración del sustrato variado (figura 2-8), se obtiene la curva de Michaelis-Menten.

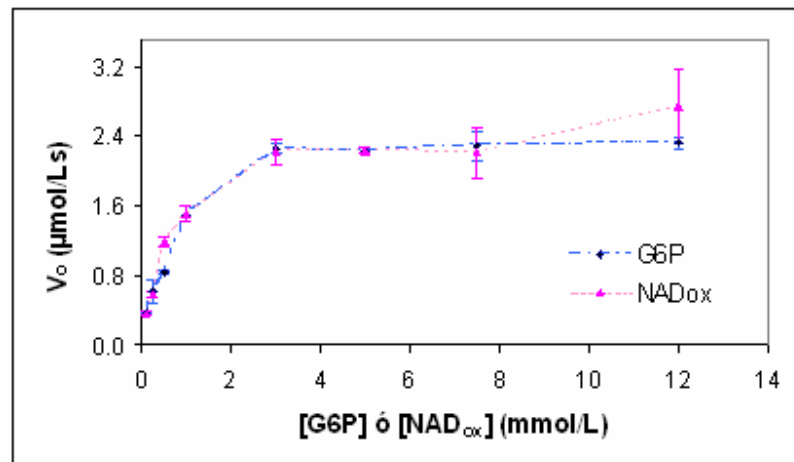


Figura 2-8. Cinética de Michaelis-Menten de la G6P y NAD_{ox} . La serie de datos correspondientes a una concentración inicial de 1.0 mmol/L de G6P dan origen a la cinética de reducción del NAD_{ox} , y cuando la concentración de NAD_{ox} es igual a 1.0 mmol/L se obtiene la cinética de la oxidación de la G6P.

Las constantes de Michaelis-Menten fueron calculadas con la ecuación de Lineweaver-Burk (1.7), graficando los recíprocos de las velocidades iniciales en función de los recíprocos de las concentraciones (Fig. 2-9).

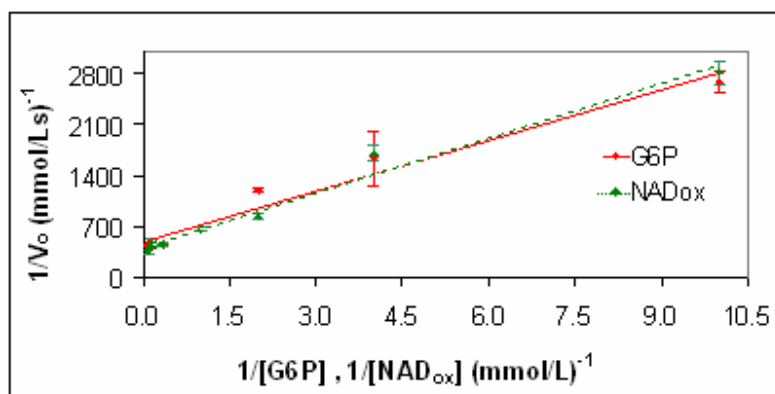


Figura 2-9. Estimación de los parámetros de Michaelis-Menten mediante la linealización de Lineweaver-Burk a 25°C y pH 7.0. La pendiente de la recta corresponde al cociente K_M/V_{max} y la intersección con el eje es el inverso de V_{max} .

Con el procedimiento descrito se obtuvieron las constantes de Michaelis-Menten a diferentes valores de pH y temperatura y los valores se presentan en secciones siguientes.

2.2.4 Experimentos a diferentes temperaturas

En la en la tabla 2-3 se muestran los valores de las constantes de Michaelis-Menten obtenidos a las diferentes temperaturas experimentales.

Tabla 2-3. Constantes de Michaelis-Menten a pH 7.0 y diferentes temperaturas. (a) Parámetros para NAD_{ox} a una concentración inicial de G6P de 1.0 mmol/L. (b) Parámetros para G6P a una concentración inicial de NAD_{ox} 1.0 mmol/L.

T (K)	(a) NAD_{ox}		(b) G6P	
	K_M (mol/L) $\times 10^{-4}$	V_{max} (mol/Ls) $\times 10^{-6}$	K_M (mol/L) $\times 10^{-4}$	V_{max} (mol/Ls) $\times 10^{-6}$
292.15	4.3 ± 0.0	2.2 ± 0.1	3.2 ± 0.1	2.0 ± 0.2
298.15	3.9 ± 0.3	2.3 ± 0.6	5.2 ± 0.2	2.7 ± 0.1
304.15	6.4 ± 0.2	3.0 ± 0.1	7.4 ± 0.2	3.2 ± 0.0
310.15	7.6 ± 0.2	4.6 ± 0.2	11 ± 0.0	5.2 ± 0.0
316.15	6.6 ± 0.0	4.3 ± 0.4	5.6 ± 0.2	3.7 ± 0.7

A partir de los datos de la tabla 2-3 se construyeron las gráficas de la figura 2-10, en las cuales se puede observar que conforme se incrementa la temperatura, desde 19 hasta 37 °C (292.15 - 310.15 K), V_{max} y K_M incrementan y posteriormente disminuyen a 43°C (316.15 K), lo cual se atribuye a la desnaturalización de la enzima. Los valores de K_M y V_{max} del NAD_{ox} son menores debido a que se presenta una inhibición por NAD_{red} [24], además de que la estabilidad del NAD_{red} , se afecta con la temperatura [29].

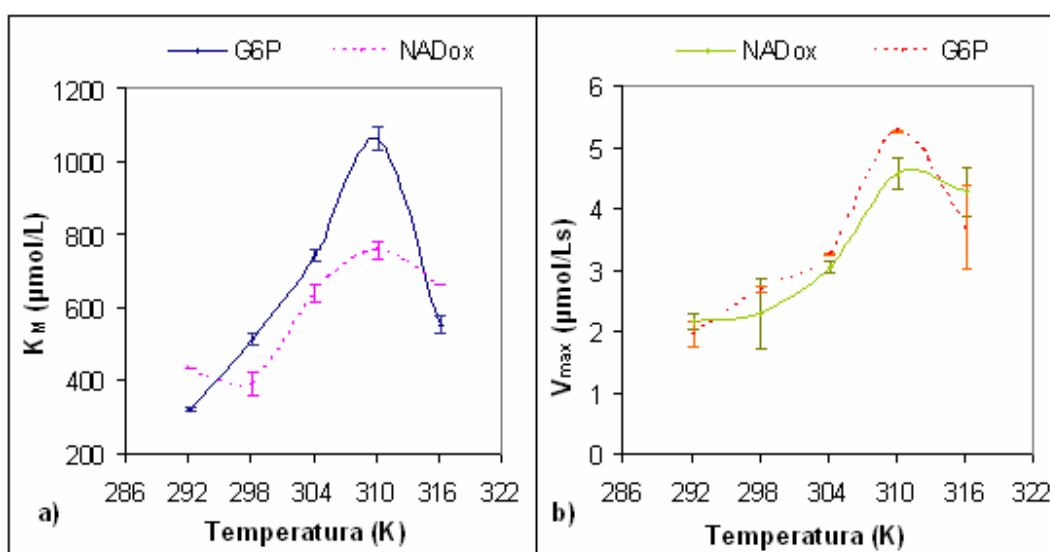


Figura 2-10. Variación de K_M (a) y V_{max} (b) con la temperatura en buffer de fosfatos pH 7.0 y 0.20 U/mL enzima.

A partir de las concentraciones de NAD_{red} en el equilibrio se calcularon las constantes de equilibrio aparentes K' (ec. 2.2), y con los valores obtenidos para la constante de equilibrio aparente se obtuvo la energía de Gibbs transformada estándar de reacción $\Delta_r G'^\circ$ para las diferentes relaciones de concentración G6P: NAD_{ox} y temperaturas (tabla 2-4).

$$K' = \frac{[NAD_{red}]_{eq}[6PDGL]_{eq}}{[G6P]_{eq}[NAD_{ox}]_{eq}} = \frac{[NAD_{red}]_{eq}^2}{([G6P]_0 - [NAD_{red}]_{eq})([NAD_{ox}]_0 - [NAD_{red}]_{eq})} \cdot (2.2)$$

Para conocer la entalpía de reacción se hizo un ajuste lineal de los valores de $\ln(K')$ contra el inverso de la temperatura y la pendiente de la recta obtenida corresponde al valor de $\Delta_r H^\circ$ (Fig. 2-11), el cual se considera constante para el intervalo de temperaturas de 19 a 31 °C (292.15-395.15 K). Para la linealización de los puntos se omitieron los valores correspondientes a 43°C, donde se observa la desnaturalización de la enzima. Con los valores de $\Delta_r G^\circ$ y $\Delta_r H^\circ$ a las correspondientes temperaturas y relaciones relativas mmol/L de G6P:NAD_{ox} se calculó la $\Delta_r S^\circ$ con la ecuación 1.10. Los resultados se muestran en la tabla 2-4.

Tabla 2-4. Energía de Gibbs, entalpía y entropía transformada estándar de reacción a diferentes concentraciones mmol/L de G6P y NAD_{ox} a pH 7.0 y distintas temperaturas.

$\Delta_r G^\circ$ (kJ/mol)	T (K)	0.10 G6P 1.0 NAD _{ox}	1.0 G6P 0.10 NAD _{ox}	1.0 G6P 1.0 NAD _{ox}	1.0 G6P 7.5 NAD _{ox}	7.5 G6P 1.0 NAD _{ox}
		292.15	-6 ± 2	4 ± 1	-3 ± 2	1.8 ± 0.0
	298.15	-0.9 ± 0.2	4.4 ± 0.1	-2.7 ± 0.1	(-3 ± 3) × 10 ⁻²	1.2 ± 0.1
	304.15	-0.2 ± 0.1	4.2 ± 0.1	-4.1 ± 0.1	1.7 ± 0.3	2.8 ± 0.1
	310.15	-1.7 ± 0.2	6.2 ± 0.1	-6.5 ± 0.1	-5 ± 1	1.6 ± 0.1
$\Delta_r H^\circ$ (kJ/mol)	292.15	-70 ± 50	0.6 ± 2.9	-26 ± 15	-107 ± 54	60 ± 58
	a					
	310.15					
$\Delta_r S^\circ$ (kJ/molK)	T (K)	0.10 G6P 1.0 NAD _{ox}	1.0 G6P 0.10 NAD _{ox}	1.0 G6P 1.0 NAD _{ox}	1.0 G6P 7.5 NAD _{ox}	7.5 G6P 1.0 NAD _{ox}
		292.15	(-2 ± 2) × 10 ⁻¹	(-1 ± 9) × 10 ⁻²	(-8 ± 5) × 10 ⁻²	(-4 ± 2) × 10 ⁻¹
	298.15	(-2 ± 2) × 10 ⁻¹	(-1 ± 9) × 10 ⁻²	(-8 ± 5) × 10 ⁻²	(-4 ± 2) × 10 ⁻¹	(2 ± 2) × 10 ⁻²
	304.15	(-2 ± 2) × 10 ⁻¹	(-1 ± 9) × 10 ⁻²	(-7 ± 5) × 10 ⁻²	(-4 ± 2) × 10 ⁻¹	(2 ± 2) × 10 ⁻²
	310.15	(-2 ± 2) × 10 ⁻¹	(-2 ± 9) × 10 ⁻²	(-6 ± 5) × 10 ⁻²	(-3 ± 2) × 10 ⁻¹	(2 ± 2) × 10 ⁻²

Los valores de incertidumbre para la energía de Gibbs se obtuvieron de los valores de desviación estándar para las dos réplicas experimentales; la incertidumbre en la entalpía corresponde al error típico calculado para la regresión lineal de la que se obtuvo; finalmente, para la entropía, la incertidumbre fue calculada por la propagación de los errores anteriores.

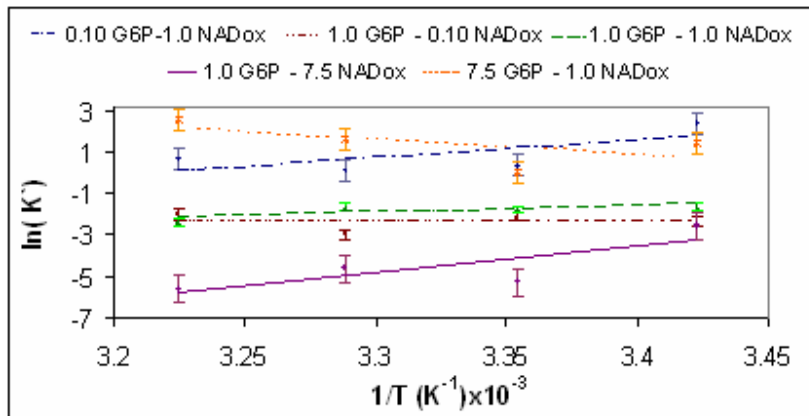


Figura 2-11. Determinación de la $\Delta_r H^\circ$ a partir de las constantes de equilibrio aparentes para las diferentes relaciones concentración mmol/L de G6P:NAD_{ox} a pH 7.0. La pendiente de las líneas rectas que se ajustan a cada serie de datos corresponde a $-\Delta_r H^\circ/R$.

Es notorio el efecto que tienen las concentraciones relativas de G6P y NAD_{ox} en los valores de la energía de Gibbs, la entalpía y la entropía. En la figura 2-12 se observa que la entalpía de reacción aumenta con la concentración de G6P cuando la concentración de NAD_{ox} permanece constante y sucede lo contrario cuando la concentración de G6P se mantiene constante y se varía la concentración de NAD_{ox} la entalpía de reacción disminuye.

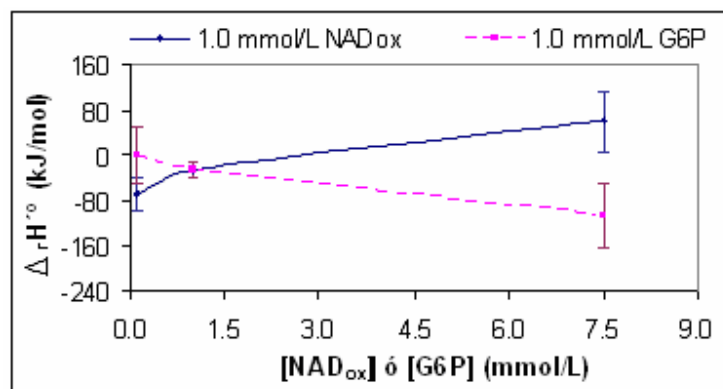


Figura 2-12. Variación de la $\Delta_r H^\circ$ en función de las concentraciones relativas de G6P y NAD_{ox} en buffer de fosfatos 50 mmol/L pH 7.0.

La tabla 2-5, muestra los resultados obtenidos para el cálculo de la constante de velocidad (k) en los experimentos a distintas temperaturas y concentraciones relativas de sustratos. Este valor se obtuvo de dividir la velocidad inicial de la reacción entre la concentración inicial de G6P. En una gráfica de $\ln(k)$ contra el inverso de la temperatura, la pendiente de la recta corresponde al cociente $-E_a/R$. Para el cálculo de la energía de activación se utilizó el intervalo de temperaturas de 19 a 43 °C (292.15 a 316.15 K), dado que aún a esta última temperatura se asume que la desnaturalización de la enzima no se refleja en la velocidad inicial.

Los valores de incertidumbre de las constantes de velocidad se obtuvieron de los valores de desviación estándar para las dos réplicas experimentales; la incertidumbre en la energía de activación corresponde al error típico calculado del ajuste lineal.

Tabla 2-5. Energía de activación para las diferentes relaciones mmol/L de G6P y NAD_{ox} en buffer de fosfatos pH 7.0 calculadas a partir de las constantes de velocidad de reacción de orden uno en s⁻¹ tomando a la G6P como reactivo.

T (K)	0.10 G6P 1.0 NAD _{ox}	1.0 G6P 0.10 NAD _{ox}	1.0 G6P 1.0 NAD _{ox}	1.0 G6P 7.5 NAD _{ox}	7.5 G6P 1.0 NAD _{ox}
	k*10 ³ (s ⁻¹)	k*10 ⁴ (s ⁻¹)	k*10 ⁴ (s ⁻¹)	k*10 ⁴ (s ⁻¹)	k*10 ⁴ (s ⁻¹)
292.15	4.6 ± 0.6	4.1 ± 0.6	1.5 ± 0.2	2.1 ± 0.1	2.4 ± 0.3
298.15	4.4 ± 0.4	4.6 ± 0.2	1.9 ± 0.6	1.9 ± 0.6	3.1 ± 0.1
304.15	3.9 ± 0.7	4 ± 1	2.0 ± 0.1	2.5 ± 0.1	3.6 ± 0.0
310.15	4.5 ± 0.6	5.3 ± 0.6	2.8 ± 0.3	3.7 ± 0.0	5.3 ± 0.0
316.15	5.6 ± 0.8	5.6 ± 0.2	2.6 ± 0.4	3.9 ± 0.8	4.2 ± 0.9
E _a (kJ/mol)	5.2 ± 5.6	9.8 ± 32	19 ± 4	25 ± 5	21 ± 7

En la figura 2-13 se observa el efecto que tienen las concentraciones relativas de los sustratos en el valor de energía de activación de la reacción.

Cuando se mantiene constante la concentración de G6P, la energía de activación aumenta con la concentración de NAD_{ox} , lo que significa que el efecto catalítico disminuye. Lo mismo se aprecia cuando $[\text{NAD}_{\text{ox}}]$ permanece constante y aumenta $[\text{G6P}]$.

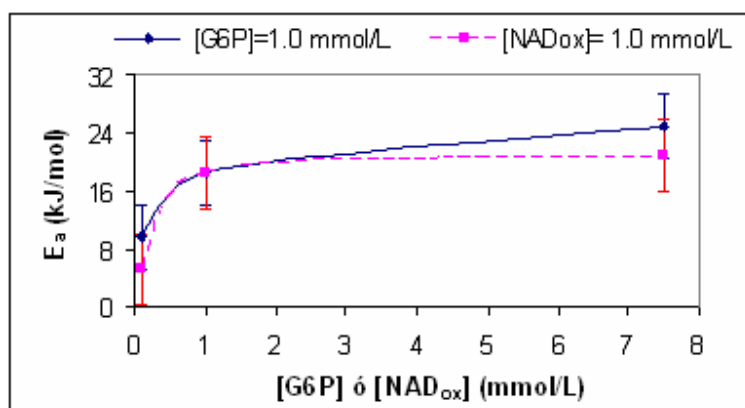


Figura 2-13. Variación de la energía de activación como función de las concentraciones relativas de sustratos en buffer de fosfatos 50 mmol/L pH 7.0.

Finalmente para obtener la $\Delta_r G^\circ$ de la 6PDGL se realizaron las siguientes operaciones:

1. Cálculo de la $\Delta_r G^\circ$ para las diferentes concentraciones de G6P y NAD_{ox} a pH 7.0, 1 bar y temperatura correspondiente, a partir de la constante de equilibrio K' (ec. 2.2).
2. Conversión de las $\Delta_r G^\circ$ de G6P^{2-} (-1763.94 kJ/mol, con $K_1=5.99$ a fuerza iónica 0.10 M), de NAD_{ox} (0 kJ/mol), de NAD_{red} (22.65 kJ/mol) y de H^+ (0 kJ/mol) a las correspondientes $\Delta_r G^\circ(i)$ (ec. 1.13). Estos datos fueron tomados de Alberty [9].
3. Obtención del $\Delta_r G^\circ$ de la 6PDGL, por sustracción de las $\Delta_r G^\circ(i)$ a la $\Delta_r G^\circ$.

4. Conversión de la $\Delta_f G^\circ$ de la 6PDGL a $\Delta_f G^\circ$ considerando que tiene carga -2 a pH 7.

Por último se hizo un promedio de todos los valores obtenidos de $\Delta_f G^\circ$. El mismo procedimiento se siguió para calcular la $\Delta_f H^\circ$ usando los valores correspondientes de $G6P^{2-}$ (-2276.44 kJ/mol, especie presente a pH 7), de NAD_{ox} (0 kJ/mol), de NAD_{red} (-31.94 kJ/mol) y de H^+ (0 kJ/mol), empleando la ecuación 1.14. Estos datos también fueron tomados de Alberty [9]. Para obtener el valor de $\Delta_f S^\circ$ se empleó la ecuación 1.15. La tabla 2-6 resume los valores obtenidos.

Tabla 2-6. Propiedades termodinámicas estándar de formación molar de la 6-fosfo-D-glucono-1,5-lactona (6PDGL), a diferentes temperaturas, fuerza iónica cero, en buffer de fosfatos 50 mmol/L pH 7.0 y 1 bar de presión.

T (K)	$\Delta_f G^\circ_{6PDGL}$ (kJ/mol)	$\Delta_f H^\circ_{6PDGL}$ (kJ/mol)	$\Delta_f S^\circ_{6PDGL}$ (kJ/molK)
292.15	-1785 ± 4	-2274 ± 64	-1.68 ± 0.22
298.15	-1784 ± 3		-1.64 ± 0.22
304.15	-1783 ± 3		-1.61 ± 0.21
310.15	-1785 ± 5		-1.58 ± 0.21
Promedio	-1784 ± 2		-1.63 ± 0.11

2.2.5 Efecto del pH del buffer en la actividad enzimática

Se calcularon los valores de las constantes de Michaelis-Menten para la reacción enzimática en el intervalo de pH 5.4-8.6, así como la energía de Gibbs transformada estándar de reacción para las diferentes concentraciones relativas de sustratos y a partir de éstas se calcularon los potenciales de oxidoreducción, y el promedio de átomos de hidrógeno unidos a la 6PDGL. La tabla siguiente resume los valores de las constantes de Michaelis-Menten y la tendencia de las mismas se observa en la figura 2-14.

Tabla 2-7. Valores de las constantes de Michaelis-Menten obtenidas a 25°C y diferentes valores de pH en buffer de fosfato 50 mmol/L y 0.2U/mL de enzima.

pH	NAD _{ox}		G6P	
	K _M (mol/L)x10 ⁻⁴	V _{max} (mol/Ls)x10 ⁻⁶	K _M (mol/L) x10 ⁻⁴	V _{max} (mol/Ls)x10 ⁻⁶
5.4	3.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	3.2 ± 0.2	0.5 ± 0.0
6.2	3.4 ± 0.0	1.3 ± 0.0	3.2 ± 0.3	1.4 ± 0.2
7.0	3.9 ± 0.1	2.3 ± 0.6	5.2 ± 0.1	2.7 ± 0.1
7.8	4.7 ± 0.3	2.6 ± 0.4	5.9 ± 0.3	2.8 ± 0.1
8.6	4.6 ± 0.0	3.0 ± 0.0	5.0 ± 0.1	3.1 ± 0.2

En la figura 2-14 (a) se observa que a pH 7.8 se obtienen los máximos valores de K_M para ambos sustratos y en la figura 2-14 (b) a partir de este pH, la velocidad alcanza un máximo que se conserva hasta el pH 8.6 (pH límite de este estudio), esto se atribuye a las constantes de disociación del complejo ES y de la enzima. Al igual que en el análisis del efecto de la temperatura en K_M y V_{max} (Fig. 2-10), los valores de las constantes de Michaelis para G6P se ven más afectadas comparadas con las de NAD_{ox}.

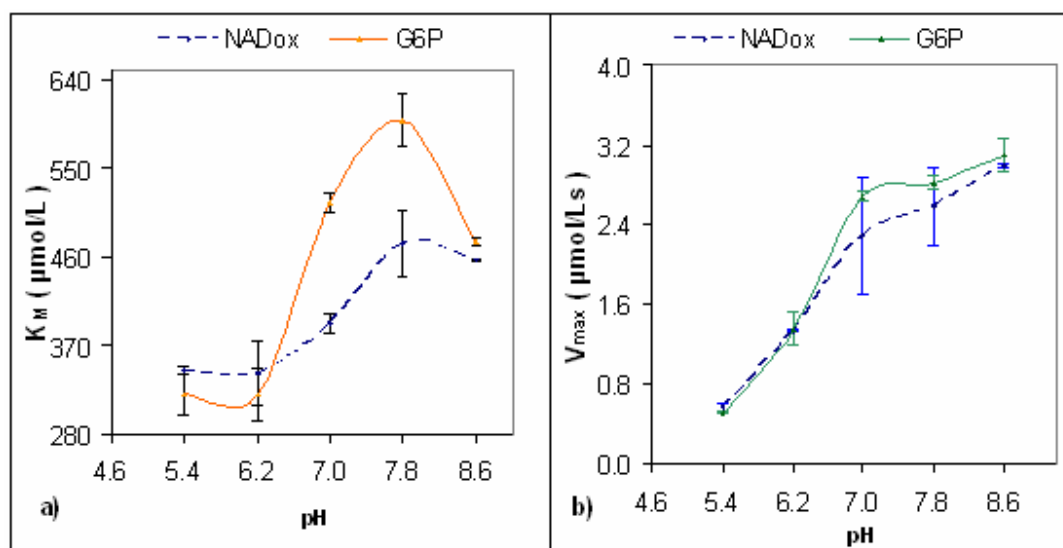


Figura 2-14. Variación de K_M (a) y V_{max} (b) con el pH en buffer de fosfatos de concentración 50 mmol/L a 25°C y con 0.20 U/mL enzima.

2.2.5.1 Constantes de ionización de la Enzima y del complejo Enzima-Sustrato

En esta sección se empleará la abreviación V_{\max} y K_M para la velocidad máxima y la K_M absolutas e independientes del pH, y $V_{\max}^{H^+}$ y $K_M^{H^+}$ para la velocidad máxima y la constante de Michaelis a pH específico. A partir de los resultados mostrados en la figura 2-14 (b) se puede calcular de manera gráfica el valor de la constante de ionización del complejo ES (pK^{ES}). En la figura 2-15 se presentan dos métodos gráficos para la estimación de la constante de disociación del complejo ES.

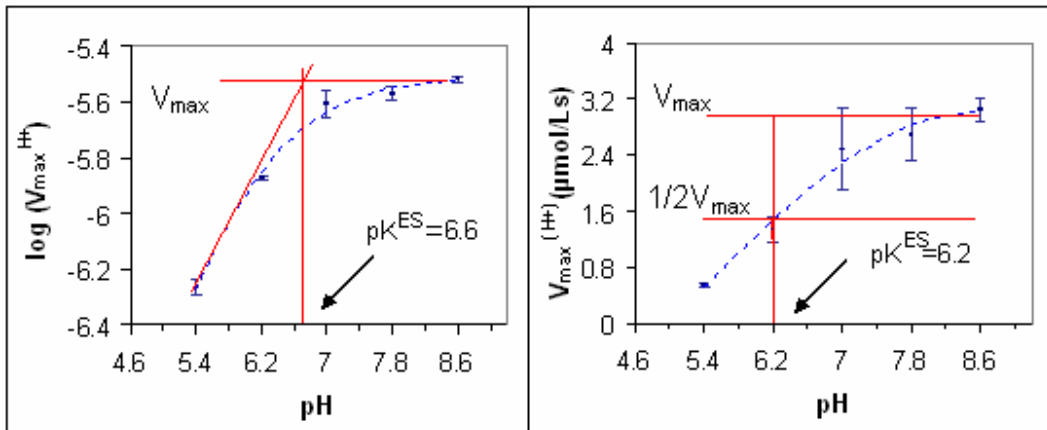


Figura 2-15. Estimación de pK^{ES} gráficamente a partir del promedio de los valores de $V_{\max}^{H^+}$ para G6P y NAD_{ox} en función del pH. Los valores de V_{\max} y $\log(V_{\max})$, se obtuvieron como el promedio pesado de los valores correspondientes al intervalo de pH 7.0-8.6.

La dependencia de la $V_{\max}^{H^+}$ con el pH para el caso en que la V_{\max} se mantiene constante en un intervalo de pH, se debe a que hay un grupo del complejo ES capaz de ionizarse (grupo prototrópico). En este caso, la forma de este grupo puede ser EH^+S dada la tendencia de la gráfica 2-14 b). La velocidad máxima verdadera se observa cuando toda la enzima está combinada con su sustrato y todos los complejos ES están en la forma prototrópica correspondiente. El valor de la constante de ionización del complejo ES (K^{ES}), con la ecuación 2.3 [4].

$$\frac{1}{V_{\max}^{H^+}} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{[H^+]}{V_{\max}K^{ES}} \quad (2.3)$$

Con base en la ecuación 2.3 se obtuvo la línea recta mostrada en la figura 2-16 tomando el promedio de los valores de $V_{\max}^{\text{H}^+}$ de los dos sustratos. De la regresión lineal se obtuvieron una $V_{\max} = 2.6 \pm 0.4 \mu\text{mol/Ls}$ y un valor de $\text{pK}^{\text{ES}} = 6.0 \pm 0.1$.

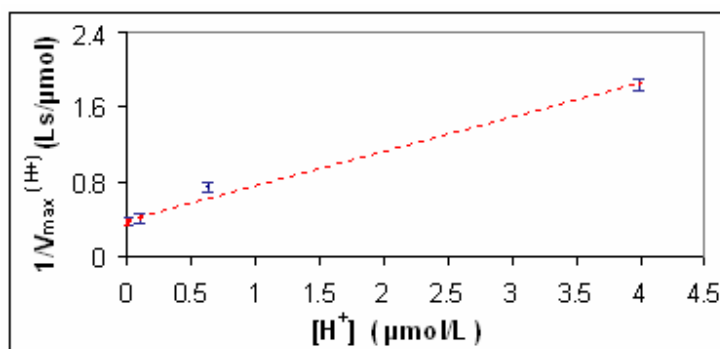


Figura 2-16. Cálculo de la V_{\max} absoluta y de la constante de ionización del complejo ES (K^{ES}). La intersección con el eje corresponde al inverso de la velocidad máxima absoluta y la pendiente es el inverso del producto $V_{\max}K^{\text{ES}}$. Gráfica obtenida con los datos de la tabla 2-7.

Al graficar el cociente $V_{\max}^{\text{H}^+}/K_M^{\text{H}^+}$ en función del pH (Fig. 2-17), el valor máximo obtenido corresponde al valor máximo del cociente V_{\max}/K_M , independiente del valor de la concentración de iones de hidrógeno.

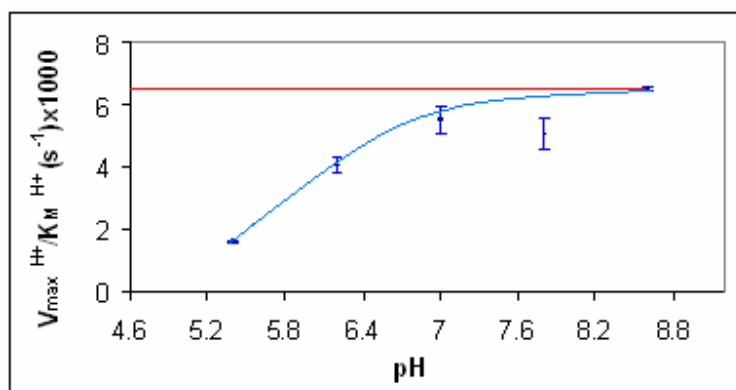


Figura 2-17. Determinación de K_M a partir del cociente V_{\max}/K_M . La línea horizontal es el promedio pesado de los valores $V_{\max}^{\text{H}^+}/K_M^{\text{H}^+} = (6.5 \pm 0.7) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para el intervalo de pH 7.0-8.6.

Cada punto de la gráfica 2-17, fue obtenido como un promedio pesado del cociente de las constantes de Michaelis-Menten para G6P y NAD_{ox} al pH correspondiente. El valor máximo del cociente corresponde al promedio de los valores en el intervalo de pH 7.0 a 8.6, $V_{\max}/K_M = (6.5 \pm 0.7) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y despejando el valor de K_M con el valor de V_{\max} obtenido a partir de la ecuación 2.3 se obtiene $K_M = (4.0 \pm 0.5) \times 10^{-3} \text{ mol/L}$. La tendencia de la curva en la figura 2-17 se debe a la presencia de un grupo prototrópico en el sitio activo de la enzima libre y al considerar a la enzima libre en la forma EH^+ se puede aplicar la siguiente ecuación para determinar la constante de ionización del grupo prototrópico en el sitio activo (K^E) [4].

$$\frac{V_{\max}^{H^+} K_M}{K_M^{H^+} V_{\max} [H^+]} = \frac{1}{[H^+]} + \frac{1}{K^E} \quad (2.4)$$

La constante de ionización para la enzima calculada con la regresión lineal (Fig. 2-18) basada en la ecuación 2.4 tiene el valor $K^E = (2.3 \pm 0.1) \times 10^{-7}$, que es igual al $\text{pK}^E = 6.6 \pm 0.3$. Este valor coincide con el valor de pK_a del residuo His-240 reportado para la apoenzima, con valor de 6.4 ± 0.1 [13].

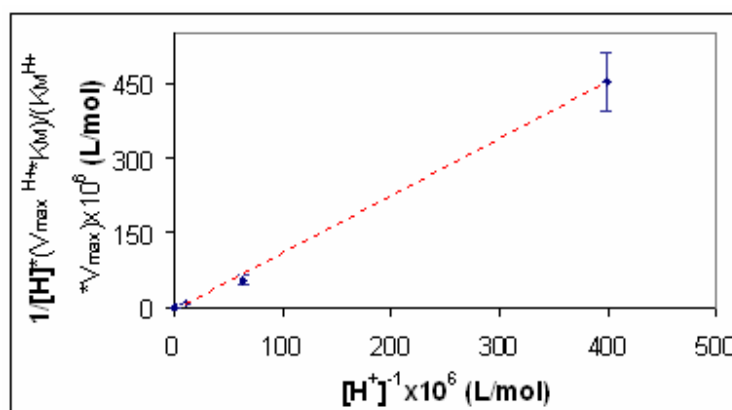


Figura 2-18. Estimación de K^E . La ordenada al origen de la recta corresponde al inverso de K^E . Figura construida con los valores de $V_{\max} = (2.6 \pm 0.4) \times 10^{-6} \text{ mol/Ls}$ y $K_M = (4.0 \pm 0.5) \times 10^{-3} \text{ mol/L}$.

En el siguiente diagrama se proponen una serie de equilibrios involucrados en la ionización de la enzima y del complejo ES con base en los resultados obtenidos y tomando como prototipo la figura 1-6.

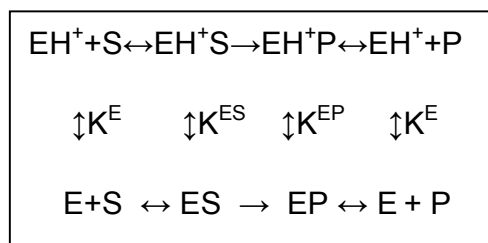


Figura 2-19. Efecto del pH en la ionización de grupos prototrópicos involucrados en la catálisis.

2.2.5.2 Cálculo de los potenciales aparentes de óxido-reducción de la 6PDGL

Se calcularon los potenciales de óxido-reducción aparentes estándar (E'°) para los diferentes valores de pH a partir de la $\Delta_r G'^{\circ}$ tomando en cuenta que durante la reacción de óxido-reducción la G6P transfiere dos electrones al NAD_{ox} (ec. 3.6).

Tabla 2-8. Energía de Gibbs transformada estándar de reacción y potenciales aparentes de óxido-reducción a diferentes valores de pH y 25°C (298.15K).

$\Delta_r G'^{\circ}$ (kJ/mol)					
pH	0.10 G6P 1.0 NAD_{ox}	1.0 G6P 0.10 NAD_{ox}	1.0 G6P 1.0 NAD_{ox}	1.0 G6P 7.5 NAD_{ox}	7.5 G6P 1.0 NAD_{ox}
5.4	5.9 ± 0.3	4 ± 2	6.2 ± 0.1	7.5 ± 0.0	9.2 ± 0.2
6.2	-3 ± 2	2.4 ± 0.2	-0.8 ± 0.4	-7.6 ± 0.4	0.2 ± 0.1
7.0	-0.9 ± 0.2	4.4 ± 0.1	-2.7 ± 0.1	-(3 ± 3) × 10 ⁻²	1.2 ± 0.1
7.8	-1 ± 1	1.1 ± 0.0	-6 ± 2	-3.9 ± 0.5	1.4 ± 0.1
8.6	-2.3 ± 0.4	2.2 ± 0.6	-7.2 ± 0.4	-4.9 ± 0.7	0.5 ± 1.0
E'° (mV)					
pH	0.10 G6P 1.0 NAD_{ox}	1.0 G6P 0.10 NAD_{ox}	1.0 G6P 1.0 NAD_{ox}	1.0 G6P 7.5 NAD_{ox}	7.5 G6P 1.0 NAD_{ox}
5.4	31 ± 1	22 ± 12	32 ± 1	39 ± 1	48 ± 1
6.2	-14 ± 9	13 ± 1	-4 ± 2	-39 ± 2	1.1 ± 0.7
7.0	-5 ± 1	23 ± 0	-14 ± 1	-(14 ± 15) × 10 ⁻²	6.1 ± 0.4
7.8	-4 ± 6	6 ± 0	-33 ± 8	-20 ± 2	7.4 ± 0.4
8.6	-12 ± 2	11 ± 3	-37 ± 2	-25 ± 3	2 ± 6

En la tabla 2-8 se presentan los valores de $\Delta_r G^\circ$ y de E° de reacción a 25°C al pH correspondiente. Los potenciales de oxidación de la G6P a 6PDGL fueron calculados a partir de los potenciales de óxido-reducción aparentes estándar de la reacción total (tabla 2-8) y de los potenciales de reducción aparentes estándar del NAD_{ox} (apéndice tabla 3-5), a los diferentes valores de pH y 25°C, con ayuda de la ecuación 2.5.

$$E^\circ_{ox(G6P)} = E^\circ_{red(NAD_{ox})} - E^\circ \quad (2.5)$$

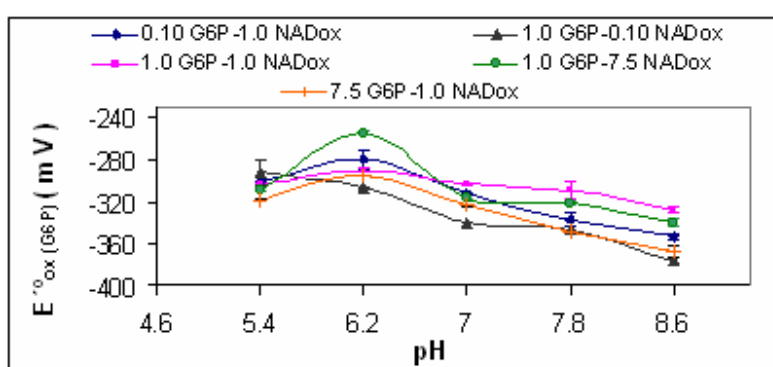


Figura 2-20. Potenciales aparentes estándar de oxidación de la G6P a 6PDGL en función del pH a 25°C (298.15K) en buffer de fosfatos 50mmol/L.

En la tabla 2-9 se presentan los potenciales de oxidación aparentes estándar de la G6P ($E^\circ_{ox(G6P)}$) a 25°C (298.15 K) en buffer de fosfatos 50 mmol/L al valor de pH correspondiente. A partir de estos valores fue construida la gráfica de la figura 2-20.

Tabla 2-9. Potenciales de oxidación aparentes de G6P a 6PDGL en función del pH y de las concentraciones relativas en mmol/L de G6P y NAD_{ox} a 25°C (298.15 K).

pH	$E^\circ_{ox(G6P)} \text{ (mV)}$				
	0.10 G6P 1.0 NAD_{ox}	1.0 G6P 0.10 NAD_{ox}	1.0 G6P 1.0 NAD_{ox}	1.0 G6P 7.5 NAD_{ox}	7.5 G6P 1.0 NAD_{ox}
5.4	-302 ± 1	-292 ± 12	-303 ± 0	-310 ± 0	-318 ± 1
6.2	-280 ± 9	-307 ± 1	-290 ± 2	-253 ± 2	-296 ± 1
7.0	-313 ± 1	-341 ± 0	-304 ± 1	-318 ± 0	-324 ± 0
7.8	-338 ± 6	-348 ± 0	-309 ± 8	-322 ± 2	-349 ± 1
8.6	-354 ± 2	-377 ± 3	-328 ± 2	-340 ± 3	-368 ± 6

2.2.5.3 Cálculo de los valores de $\Delta_r N_{H^+}$ y $\bar{N}_{H^+(6PDGL)}$ como función del pH.

A partir de los potenciales aparentes de óxido-reducción y de los valores de $\Delta_r G^\circ$, se calculó el cambio en la unión de iones de hidrógeno durante la reacción ($\Delta_r N_{H^+}$) como función del pH y el promedio de iones hidrógeno unidos a la 6PDGL ($\bar{N}_{H^+(6PDGL)}$). La metodología se ejemplifica en el apéndice sección 3.2 para la G6P. En la figura 2-21 se observa que la $\Delta_r G^\circ$, disminuye conforme incrementa el pH para todas las relaciones mmol/L de G6P:NAD_{ox} y la pendiente de la recta resultante corresponde al valor $RT \ln(10) \Delta_r N_{H^+}$.

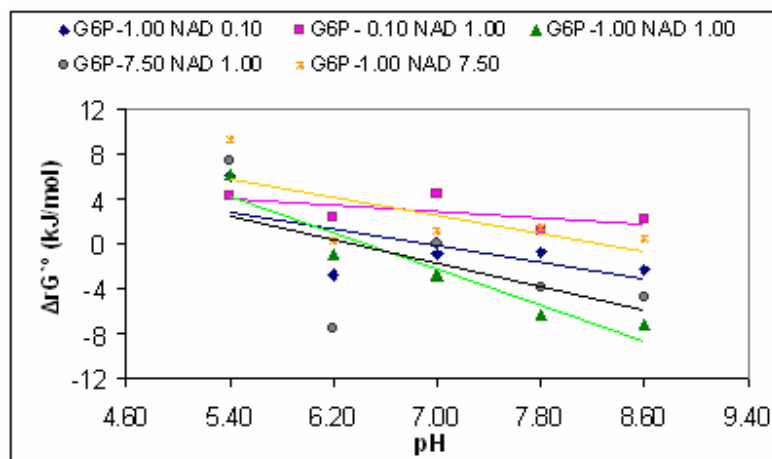


Figura 2-21. Relación de $\Delta_r G^\circ$ con el pH. La pendiente de cada recta corresponde a $RT \ln(10) \Delta_r N_{H^+}$, obtenido a 25°C (298.15 K).

En la tabla 2-10, se presentan los valores del cambio en la unión de iones de hidrógeno durante la reacción ($\Delta_r N_{H^+}$) para las diferentes relaciones mmol/L de G6P:NAD_{ox}, siendo todos los valores menores que cero, lo cual indica que se unen menos iones hidrógeno en los productos que en los reactivos, o bien, se producen iones hidrógeno [9].

Tabla 2-10. Valores del cambio en la unión de iones de hidrógeno como función de las concentraciones relativas en mmol/L de G6P:NAD_{ox}, obtenidos a 25°C, en buffer de fosfatos 50 mmol/L. Para los cálculos ver el apéndice sección 3.2.

[G6P]:[NAD _{ox}] (mmol/L)	$\Delta_r N_{H^+} \times 10^{-1}$
0.10:1.0	-3.2 ± 0.1
1.0:0.10	-1.2 ± 0.8
1.0:1.0	-7.1 ± 0.4
1.0:7.5	-4.6 ± 0.3
7.5:1.0	-3.6 ± 0.4

El número de iones de hidrógeno unidos a la 6PDGL se obtuvo a partir de los valores de $\Delta_f G^\circ_{6PDGL}$ en función del pH siguiendo la misma metodología empleada para la G6P (apéndice, sección 3-2).

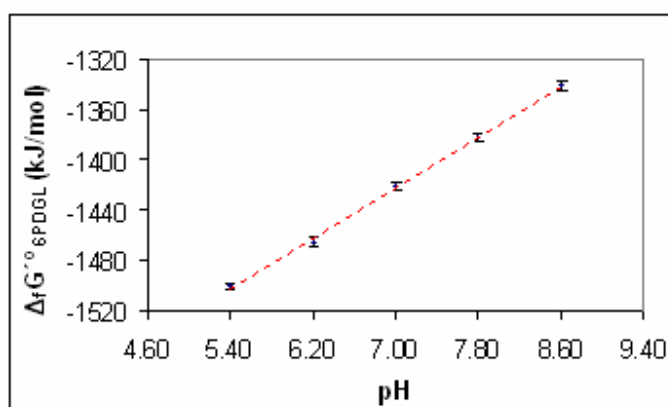


Figura 2-22. $\Delta_f G^\circ_{6PDGL}$ en función del pH a 25°C (298.15 K). La pendiente de la recta corresponde al valor de $RT \ln(10) \bar{N}_{H^+(6PDGL)}$.

La figura 2-22 se obtuvo con los datos de la tabla 2-11 (a). El valor promedio de iones hidrógeno unidos a la 6PDGL es $\bar{N}_{H^+(6PDGL)} = 8.8 \pm 0.1$ para el intervalo de pH estudiado. Siguiendo el procedimiento que se empleó para el cálculo de la $\Delta_f G^\circ$ de la 6PDGL a diferentes temperaturas y fuerza iónica cero, se calculó la energía de Gibbs de formación estándar de la 6PDGL a diferentes valores de pH considerando la carga -2 para la 6PDGL (tabla 2-11 b).

Tabla 2-11. (a)Energía de Gibbs transformada estándar de formación de la 6PDGL en función del pH a 25°C (298.15K). (b) Energía de Gibbs estándar de formación de la 6PDGL a fuerza iónica cero, 25°C (298.15 K) y diferentes valores de pH.

pH	a) $\Delta_f G^\circ_{6PDGL}$ (kJ/mol)	b) $\Delta_f G^\circ_{6PDGL}$ (kJ/mol)
5.4	-1501 ± 2	-1816 ± 2
6.2	-1463 ± 4	-1820 ± 4
7.0	-1421 ± 3	-1784 ± 3
7.8	-1382 ± 3	-1786 ± 3
8.6	-1341 ± 4	-1786 ± 4

2.3 Conclusiones

La relación de concentraciones 10:1.0 mmol/L de G6P:NAD_{ox} asegura la saturación de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa presente en una concentración de 0.20 U/mL en buffer de fosfatos 50 mmol/L con pH 7.00 ± 0.01 y temperatura 25.00 ± 0.05°C. Para la concentración de enzima de 0.20 U/mL las relaciones de concentración de G6P:NAD_{ox}: 1.0:7.5 y 7.5:1.0 mmol/L se encuentran en la región de saturación de la curva de Michaelis-Menten para las diferentes temperaturas y valores de pH estudiados.

En buffer de fosfatos pH 7.00 ± 0.01 y fuerza iónica 0.11 ± 0.01 y 37.0°C (310.15K), se obtienen los máximos valores de K_M y V_{max} para ambos sustratos, siendo la K_M de G6P 1.40 veces el valor de la K_M del NAD_{ox} y la V_{max} de G6P es 1.15 veces el valor de la V_{max} de NAD_{ox}. Los valores de las constantes de Michaelis obtenidos no pueden compararse con lo reportado en la literatura, y esto se debe principalmente al buffer de fosfatos utilizado en este trabajo. La inestabilidad de la enzima se hace visible a 43.0°C, y la disminución de actividad se atribuye a la desnaturalización proteica.

La entalpía de reacción oscila alrededor de cero de modo que para obtener un valor más confiable de la entalpía transformada estándar de reacción, se recomienda realizar un estudio calorimétrico de la reacción. De acuerdo con los valores de entropía de formación estándar de la 6PDGL, se confirma que la 6PDGL tiene una estructura más ordenada que la G6P.

A 25.00 ± 0.05°C el máximo valor de K_M para G6P y NAD_{ox} se obtuvo a pH 7.8, a este valor de pH la K_M de G6P es 1.26 veces la K_M de NAD_{ox}. No se observó variación significativa entre los valores de V_{max} de G6P y NAD_{ox} arriba del pH 7, lo cual se debe a la presencia de un grupo ionizable en el sitio activo de la enzima. Se encontró un valor de pK de 6.6 ± 0.3 para el grupo ionizable del sitio activo de la enzima que corresponde al residuo His-240.

BIBLIOGRAFÍA

1. Murray, R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes y V.W. Rodwell, eds. *Bioquímica de Harper*. 15 ed. 2001, Manual Moderno: México. 1041.
2. Madigan, M.T., J.M. Martinko y J. Parker, *Brock Biología De Los Microorganismos*. 8 ed. 1999, Madrid: Prentice Hall. 1064.
3. Institute, N.H.G.R. *National Educational Resources* 2009 Junio 8, 2009 [cited 2009 Julio 28]; Available from: <http://www.genome.gov/sglossary>.
4. Whitaker, J.R., *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. 2 ed. A series of Monographs, Textbooks, and Reference Books. 1994, New York: Marcel Dekker. 612.
5. Barragán, L.A.P., S.H. Ochoa, G.R. Serrano y G.S. Castañeda, *Avances en Purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología*. Colección de Tópicos en Biotecnología. 1999, México: Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. 367.
6. Copeland, R.A., *Enzymes: A practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*. 2 ed. 2000, New York: Wiley-VCH. 396.
7. Castellán, G.W., *Fisicoquímica*. 2 ed. 1998, México: Addison Wesley Longman de México. 1057.
8. Frensd, J. y R. Kalbitzer, *Physiological buffer for NMR spectroscopy*. *Journal of Biomolecular NMR*, 1995. **5**: p. 321-322.
9. Alberty, R.A., *Thermodynamics of Biochemical Reaction*. 2003, New Jersey: John Wiley & Sons. 397.
10. Alberty, R.A., *Recommendations for nomenclature and tables in biochemical thermodynamics*. *Pure & Appl. Chem.*, 1994. **66**(8): p. 1641-1666.
11. Moore, C.E. y A.L. Underwood, *The ionization Constant of Nicotinamide-Adenine Dinucleotide*. *Analytical Biochemistry*, 1969. **29**: p. 149-153.
12. Filosa, S., A. Fico, F. Paglialunga, M. Balestrieri, A. Crooke, P. Verde, P. Abrescia, J.M. Bautista y G. Martini, *Failure to increase glucose*

- consumption through the pentose-phosphate pathway results in the death of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene-deleted mouse embryonic stem cells subjected to oxidative stress.* Biochem. J., 2003. **370**: p. 935-943.
13. Cosgrove, M.S.,S.N. Loh y H.R.L. Jeung-Hoi Ha, *The Catalytic Mechanism of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenases: Assignment and 1H NMR Spectroscopy pH Titration of the Catalytic Histidine Residue in the 109 kDa Leuconostoc mesenteroides Enzyme.* Biochemistry, 2002. **41**: p. 6939-6945.
 14. Cosgrove, M.S.,C. Naylor,S. Paludan y H.R.L. Margaret J. Adams, *On the Mechanism of the Reaction Catalyzed by Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase.* Biochemistry, 1998. **37**: p. 2759-2767.
 15. Naylor, C.E.,S. Gover,A.K. Basak y H.R.L. Michael S. Cosgrove, Margaret J. Adams, *NADP+ and NAD+ binding to the dual coenzyme specific enzyme Leuconostoc mesenteroides glucose 6-phosphate dehydrogenase: different interdomain hinge angles are seen in different binary and ternary complexes.* Acta Crystallographica Section D, 2001. **57**: p. 635-648.
 16. Adams, M.J.,A.K. Basak,Sheila Gover y H.R.L. Paul Rowland, *Site-directed mutagenesis to facilitate X-ray structural studies of Leuconostoc mesenteroides glucose 6-phosphate dehydrogenase.* Protein Science, 1993. **2**: p. 859-862.
 17. Warburg, O. y W. Christian, Biochem. Z., 1931. **242**.
 18. DeMoss, R.D.,I. C Gunsalus y R.C. Bard, *A Glucose-6-phosphate dehydrogenase in Leuconostoc mesenteroides.* Bacteriol., 1953. **66**(1): p. 10-16.
 19. Glaser, L. y D.H. Brown, *Purification and properties of D-glucose-6-phosphate dehydrogenase.* Biol. Chem., 1955. **67**: p. 335-338.
 20. Julian, G.R.,R.G. Wolfe y F.J. Reithel, *The preparation of glucose 6-phosphate dehydrogenase.* The Journal of Biological Chemistry, 1961. **236**(3): p. 754-758.

21. Engel, H.J.,W. Domschke,Markwart Alberti y G.F. Domagk, *Purification and Properties of a crystalline glucose-6-phosphate dehydrogenase from Candida utilis*. Biochim. Biophys. Acta, 1969. **191**: p. 509-516.
22. Levy, H.R., *The Interaction of Mammary Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase with Pyridine Nucleotides and 3 β -Hydroxyandrost-5-en-17-one*. The Journal of Biological Chemistry, 1963. **238**(2): p. 775-784.
23. Olive, C. y H.R. Levy, *The Preparation and Some Properties of Crystalline Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from Leuconostoc mesenteroides*. Biochemistry, 1967. **6**: p. 730-738.
24. Olive, C.,Mary E. Geroch y H.R. Levy, *Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from Leuconostoc mesenteroides*. The Journal of Biological Chemistry, 1971. **246**: p. 2047-2057.
25. Leite, A.A. y O.C.d.O. Barretto, *Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase activity assay and affinity for its substrate under "physiological" conditions*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 1998. **31**: p. 1533-1535.
26. Rossi, F.G.,M.Z. Ribeiro,A. Converti,M. Vitolo y A. Pessoa, *Kinetic and thermodynamic aspects of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and synthesis*. Enzyme and Microbial Technology, 2003. **32**: p. 107-113.
27. Kotaka, M.,S. Gover,L. Vandeputte-Rutten,S.W. N. y M.J.A. Au Veronica M. S. Lam, *Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP+ binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase*. Acta Crystallographica Section D, 2005. **61**: p. 495-504.
28. Hasmann, F.A.,D.B. Gurpilhares,I.C. Roberto y A.P.J. Attilio Converti, *New combined kinetic and thermodynamic approach to model glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and stability*. Enzyme and Microbial Technology, 2007. **40**: p. 849-858.
29. Anderson, B.M. y C.D. Anderson, *The effect of Buffers on Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrolysis*. The Journal of Biological Chemistry, 1963. **238**(4): p. 1475-1478.

3 Apéndice

3.1 Tablas de referencia

Tabla 3-1 Nomenclatura [1].

Símbolo	Nombre	Unidades
c°	Estado de concertación estándar (1M)	molL^{-1}
E°	Fuerza electromotriz estándar aparente de la celda o media celda a pH específico	V
F	Constante de Faraday (96485.31 Cmol^{-1})	Cmol^{-1}
$\Delta_r G^\circ$	Energía de reacción de Gibbs estándar transformada de una reacción específica en términos de reactantes a específica T, P, pH, pMg y I	kJmol^{-1}
$\Delta_f G^\circ(i)$	Energía de formación estándar de Gibbs transformada de la especie i a específica T, P, pH, pMg y I	kJmol^{-1}
$\Delta_r H^\circ(i)$	Entalpía de reacción estándar transformada de la especie i a específica T, P, pH, pMg y I	kJmol^{-1}
$\Delta_f H^\circ(i)$	Entalpía de formación estándar transformada de la especie i a específica T, P, pH, pMg y I	kJmol^{-1}
I	Fuerza iónica	molL^{-1}
K'	Constante de equilibrio aparente para una reacción específica escrita en términos de reactantes a específica T, P, pH, pMg y I (omitiendo el H_2O)	<i>adimensional</i>
$N_H(i)$	Numero de átomos de hidrogeno en la especie i	<i>adimensional</i>
pH	$-\log_{10}([\text{H}^+]/c^\circ)$	<i>adimensional</i>
pX	$-\log_{10}([\text{X}]/c^\circ)$	<i>adimensional</i>
R	Constante de los gases ($8.31451 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$)	$\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$
$\Delta_r S^\circ$	Entropía de reacción estándar transformada de una reacción específica en términos de reactantes a específica T, P, pH, pMg y I	$\text{Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$
$\Delta_f S^\circ(i)$	Entropía de formación estándar de la especie i a específica T, P, pH, pMg y I	$\text{Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$
T	Temperatura	K
z_i	Carga del ión i con signo	<i>adimensional</i>
ν_e	Numero de electrones en la reacción de celda	<i>adimensional</i>

Tabla 3-2. Constantes de Debye-Hückel para $\Delta_f G_i^\circ$ y $\Delta_f H_i^\circ$ en función de la temperatura [2]. Los datos en las celdas sombreadas fueron calculados por interpolación

T (°C)	T (K)	αRT (kJmol ^{-3/2} Kg ^{1/2})	$\alpha RT^2(\delta\alpha/\delta T)_P$ (kJmol ^{-3/2} Kg ^{1/2})
0	273.15	2.56494	1.075
10	283.15	2.70073	1.213
19	292.15	2.83271	1.388
20	293.15	2.84196	1.385
25	298.15	2.91482	1.478
30	303.15	2.98934	1.578
31	304.15	3.00593	1.605
37	310.15	3.09253	1.713
40	313.15	3.14349	1.800
43	316.15	3.17914	1.821

3.2 Unión de iones hidrógeno y especies de la G6P

La constante de disociación ácida determina la concentración de especies que están presentes es una solución en el equilibrio bajo condiciones específicas y es función de la fuerza iónica. La G6P presenta dos pseudoisómeros en el intervalo del pH de estudio de modo que la concentración total de G6P es la suma de las concentraciones de las especies presentes (ec. 3.1).

$$[G6P] = [G6P^{-2}] + [G6P^{-1}] \quad (3.1)$$

Arreglando la ecuación anterior en función de la constante de disociación de la G6P⁻² (K_1) se obtiene:

$$[G6P] = [G6P^{-2}] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_1} \right) \quad (3.2)$$

De modo que se puede conocer la fracción molar de cada pseudoisómero a determinado pH.

$$[G6P^{-2}] = \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_1}} \dots (3.3) \quad [G6P^{-1}] = \frac{\frac{[H^+]}{K_1}}{1 + \frac{[H^+]}{K_1}} \dots (3.4)$$

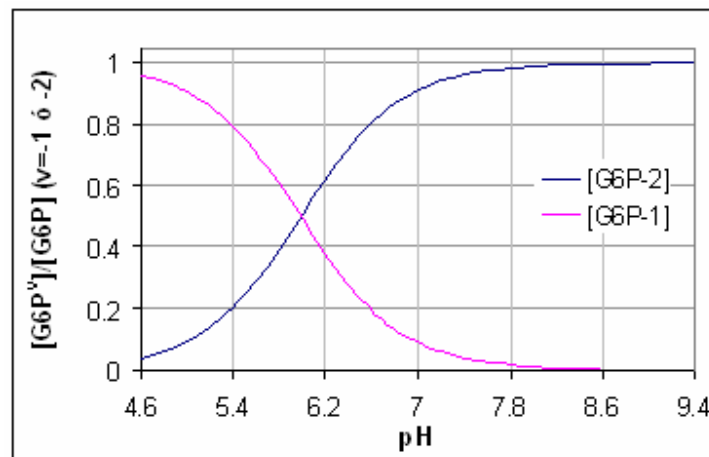


Figura 3-1. Fracción molar de las dos especies de G6P graficadas en función del pH a 298.15 K con $K_1=5.99$ a fuerza iónica 0.10 mol/L.

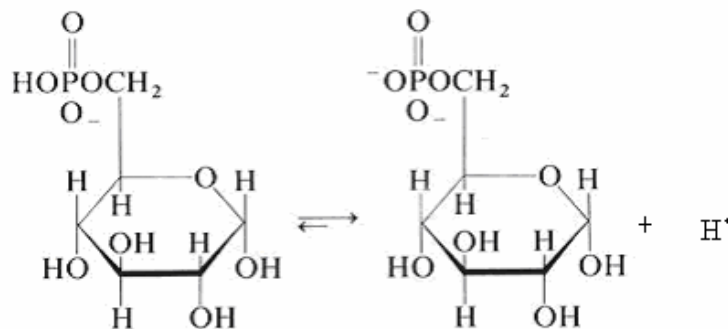


Figura 3-2. Ionización de la G6P. El pK_a de la G6P a fuerza iónica 0.10 es 5.99

El promedio de iones hidrógeno unidos (\bar{N}_{H^+}) a la G6P es función del pH y puede ser obtenido a partir de la energía de Gibbs transformada estándar de

formación (ec. 3.5). Para ello se calculó la $\Delta_f G^{\circ}$ de la G6P con la ecuación 1.15 (tabla 3-2) el valor de la energía de Gibbs a fuerza iónica cero para G6P⁻² es -1763.94 kJ/mol De la regresión lineal de los valores de $\Delta_f G^{\circ}$ en función del pH la pendiente $\bar{N}_{H^+} RT \ln(10)$.

$$\bar{N}_{H^+} = \frac{1}{RT \ln(10)} \left(\frac{\partial \Delta_f G^{\circ}}{\partial pH} \right)_{T,P,n_i} \quad (3.5)$$

Tabla 3-3. Variación de la $\Delta_f G^{\circ}$ de la G6P en función del pH del buffer a 298.15 K y fuerza iónica promedio 0.11 mol/L

pH	$\Delta_f G^{\circ}$
5.4	-1424.36 ± 0.05
6.2	-1371.38 ± 0.05
7.0	-1320.19 ± 0.05
7.8	-1269.77 ± 0.05
8.6	-1219.49 ± 0.05

De la regresión lineal de los datos de la tabla anterior, se calculó el valor de \bar{N}_{H^+} dividiendo la pendiente entre $RT \ln(10)$, y se obtiene que $\bar{N}_{H^+} = 11.20 \pm 0.12$.

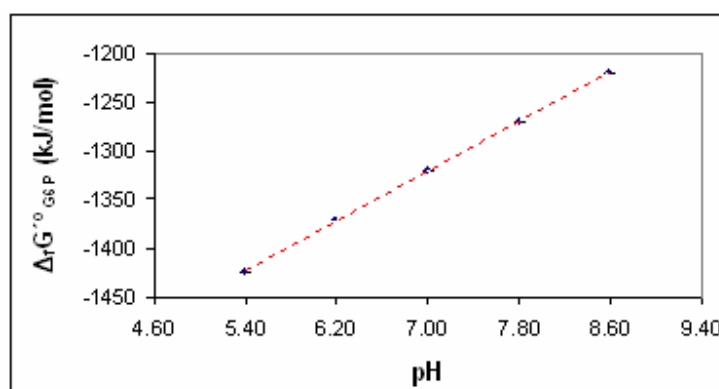


Figura 3-3. Variación de la $\Delta_f G^{\circ}$ de la G6P en función del pH, a $I = 0.11$ mol/L y 298.15 K

3.3 Potenciales de reducción aparentes estándar del NAD_{ox}

La semi-reacción de reducción para el NAD_{ox} se muestra a continuación:



Tabla 3-4. Potenciales aparentes de reducción estándar para el NAD_{ox} a 298.15 K y fuerza iónica 0.10 mol/L [2].

pH	$E^{\circ}_{red(NAD_{ox})}$ (V)
5	-0.2589
6	-0.2885
7	-0.3181
8	-0.3477
9	-0.3773

Haciendo una regresión lineal de los potenciales de reducción de la semi-reacción en función del pH a fuerza iónica 0.10 se obtuvo una recta de los valores del potencial aparente de reducción en función del pH.

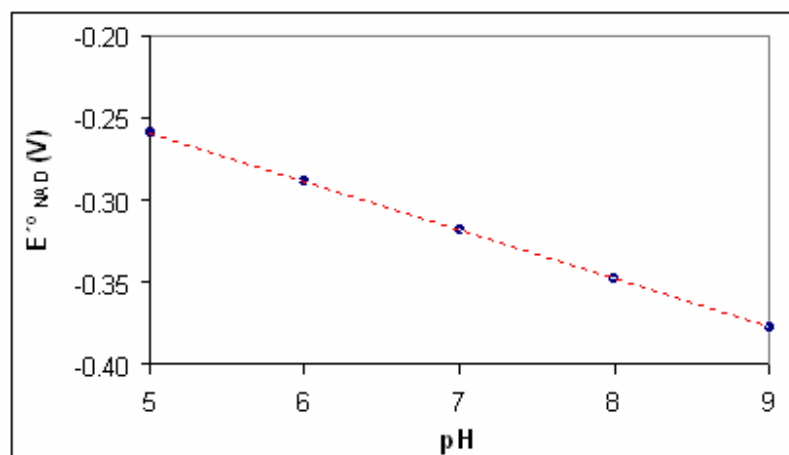


Figura 3-4. Correlación existente entre E° y el pH. Gráfica obtenida a partir de los datos de la tabla 3-4.

La ecuación de regresión fue empleada para calcular los valores de los potenciales de reducción aparentes (E°) a los valores de pH empleados y a partir de estos se calculó la energía de Gibbs transformada estándar ($\Delta_r G^{\circ}_{red}$) de la semi-reacción de reducción.

Tabla 3-5. Potenciales de reducción aparentes y energía de Gibbs transformada estándar para la reducción de NAD_{ox} en función del pH a fuerza iónica 0.10 mol/L y 298.15 K obtenidos por interpolación de los datos de la tabla 3-3.

pH	$E^{\circ}_{red(NADox)}$ (V)	$\Delta_r G^{\circ}_{red(NADox)}$ (kJ/mol)
5.40	-0.2707	-52.24
6.20	-0.2944	-56.81
7.00	-0.3181	-61.38
7.80	-0.3418	-65.95
8.60	-0.3655	-70.52

Bibliografía

1. Alberty, R.A., *Recommendations for nomenclature and tables in biochemical thermodynamics*. Pure & Appl. Chem., 1994. **66**(8): p. 1641-1666.
2. Alberty, R.A., *Thermodynamics of Biochemical Reaction*. 2003, New Jersey: John Wiley & Sons. 397.