

# 30. Caracterización cinética de la fosfatasa alcalina

**José Antonio Bárcena Ruiz, Concepción García Alfonso,  
Carmen Alicia Padilla Peña, Emilia Martínez Galisteo,  
Jesús Díez Dapena**

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales,  
Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba*

## RESUMEN

La fosfatasa alcalina es una enzima que cataliza la hidrólisis del enlace éster fosfórico entre un grupo orgánico y un grupo fosforilo a pH alcalino, lo que libera fosfato al medio. En esta práctica se van a estudiar algunos aspectos cinéticos de la fosfatasa alcalina comercial de mucosa intestinal bovina. Para ello se va a emplear un método de ensayo de la actividad de esta enzima que emplea como sustrato un éster de fosfato artificial, el *p*-nitrofenilfosfato, cuya hidrólisis da lugar a fosfato y a *p*-nitrofenol. Éste último adquiere color amarillo a pH alcalino por lo que se puede cuantificar colorimétricamente a 405 nm. Se obtendrá la curva de progreso de la reacción catalizada y se determinará la velocidad inicial y la concentración de enzima. Se comprobará la dependencia de la velocidad de reacción con la concentración de enzima y se calculará gráficamente la  $K_m$  de la enzima.

*Palabras clave:* Eadie Hofstee, Lineweaver-Burk, Unidades Internacionales de actividad enzimática, velocidad máxima.

*Abreviaturas empleadas.* PNPP: *p*-nitrofenilfosfato; PNP: *p*-nitrofenol; UI: Unidades Internacionales de actividad enzimática.

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### 1.1. Cinética enzimática

La cinética enzimática es la parte de la Enzimología que se ocupa del estudio de la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas y las causas de su variación. Los ensayos enzimáticos se emplean rutinariamente en muchos laboratorios clínicos para el diagnóstico de numerosas enfermedades, bien observando velocidades de reacción anormales o bien observando niveles enzimáticos inadecuados en el plasma u otros tejidos.

Un ensayo enzimático se basa en la actuación de la enzima sobre una sustancia, llamada sustrato, catalizando su conversión en otra específica, conocida como producto. Normalmente algún elemento de los que intervienen en la reacción absorbe luz a una longitud de onda determinada, con lo que la reacción puede seguirse por colorimetría o espectrofotometría.

## 1.2. Fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina (Ortofosfórico monoéster fosfohidrolasa, (EC 3.1.3.1) es una enzima ampliamente distribuida que hidroliza (3) el enlace éster (1) fosfórico entre un grupo fosfato y un radical orgánico a pH básico (pH óptimo entre 9 y 10) liberando fosfato inorgánico. Está presente en riñón, hígado, intestino y hueso. La medida de niveles anormales de fosfatasa alcalina en el suero indican la existencia de enfermedades óseas degenerativas (raquitismo, osteomalacia, hiperparatiroidismo secundario, osteosarcoma) o bien daños hepáticos. El aumento fisiológico de los niveles plasmáticos de fosfatasa alcalina se produce en animales en fase de crecimiento (se está formando tejido óseo) o en hembras gestantes (fosfatasa alcalina de la placenta).

Esta enzima, también se utiliza como control de la adecuada pasterización de la leche y crema, dado que la fosfatasa alcalina se inactiva por calentamiento.

## 1.3. Ensayo enzimático

Como sustrato de la fosfatasa alcalina utilizaremos un compuesto artificial: *p*-Nitrofenil-fosfato que, al poseer un resto orgánico con un grupo fosfato unido, puede ser reconocido por la enzima.

El sustrato al ser hidrolizado origina un producto, el *p*-Nitrofenol, compuesto coloreado que en solución alcalina absorbe a una longitud de onda de 405 nm, por lo que su aparición en el transcurso de la reacción (Figura 1) puede seguirse colorimétricamente.

Para detener la reacción se añadirá fosfato, ya que el exceso de este producto de la reacción inhibe la actividad enzimática.

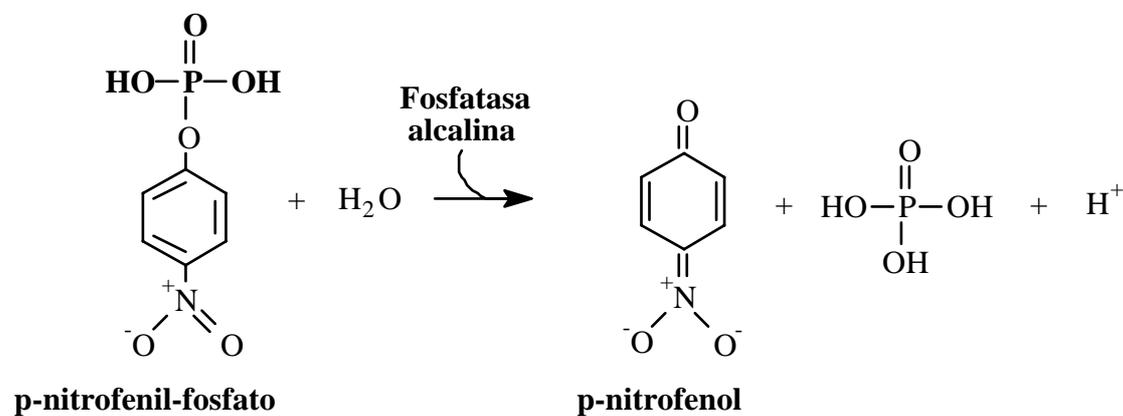


Figura 1. Reacción enzimática

## 1.4. Objetivos

Comprobar la aplicación práctica en el laboratorio de los principios teóricos de la Enzimología, tales como:

Efecto del tiempo de reacción en la aparición de producto.

- Representación de la curva de progreso de la reacción.
- Cálculo de la actividad enzimática a partir de la velocidad inicial de la reacción (*v<sub>i</sub>*).

Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de reacción.

Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción:

- Representación de Eadie-Hofstee.
- Representación de Lineweaver-Burk.
- Cálculo de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y de la velocidad máxima ( $V_m$ ) a partir de las citadas representaciones.

## 2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO

### 2.1. Equipamiento

Baño termostatzado a 30°C.

Colorímetro ajustado a 405 nm (fototubo normal).

### 2.2. Material

Pipetas de vidrio (5,0 ml).

Pipeta automática P-1000 (puntas).

Propipeta.

Rotulador para vidrio.

Tubos de ensayo de vidrio (1,5x 16 cm) 16 en una gradilla.

Cronómetro.

Tubos especiales para medir en el colorímetro.

### 2.3. Reactivos

Tampón de ensayo.

Solución sustrato.

Enzima: fosfatasa alcalina de mucosa intestinal bovina.

Solución para detener la reacción.

## 3. PROTOCOLOS A REALIZAR

### 3.1. Efecto del tiempo de reacción en la aparición de producto.

3.1.1. A 5 tubos de ensayo y se añaden los reactivos que se detallan en la Tabla 1. Se agitan suavemente e incuban en baño termostatzado a 30 °C los tiempos indicados.

Tubo (nº)	1	2	3	4	5
Tampón (ml)	2	1	1	1	1
Sustrato (ml)	1	1	1	1	1
Enzima (ml)	---	1	1	1	1
AGITAR SUAVEMENTE E INCUBAR A 30 °C					
Tiempo (min)	5	5	10	15	20

3.1.2. A medida que se cumplen estos tiempos, se retira el tubo correspondiente del baño a 30 °C y se le añade inmediatamente 1 ml de fosfato mezclando las soluciones para detener la reacción.

3.1.3. A continuación se mide la absorbancia a los distintos tubos a 405 nm usando el nº 1 como blanco.

### 3.2. Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de reacción

**3.2.1.** A una serie de 5 tubos de ensayo se les añade los distintos reactivos según se indica en la Tabla 2, obteniéndose así concentraciones crecientes de enzima en los mismos. Tras agitar suavemente se incuban en baño termostatzado el tiempo indicado:

<b>Tabla 2. Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de la reacción.</b>					
<b>Tubo (nº)</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Tampón (ml)	2,5	2,3	2,1	1,9	1,7
Sustrato (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Enzima (ml)	---	0,2	0,4	0,6	0,8
AGITAR SUAVEMENTE E INCUBAR A 30 °C 10 minutos					

**3.2.2.** Cuando se cumplan los 10 minutos de reacción, se retiran los tubos del baño y se les añade inmediatamente 0,5 ml de fosfato a cada uno de ellos mezclando las soluciones para detener la reacción.

**3.2.3.** Se mide la absorbancia a los distintos tubos a 405 nm usando el nº 1 como blanco

### **3.3. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de la reacción. Determinación de Km Y Vm**

**3.3.1.** A una serie de tubos de ensayo se les añade los reactivos que se detallan en la Tabla 3 y se agitan suavemente, obteniéndose de esta manera concentraciones crecientes de sustrato en los mismos. Se introducen los tubos en el baño termostatzado a 30 °C el tiempo indicado para que se desarrolle la reacción.

<b>Tabla 3. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de la reacción.</b>						
<b>Tubo (nº)</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
Tampón (ml)	3,0	2,7	2,4	2,0	1,0	---
Sustrato (ml)	0,0	0,3	0,6	1,0	2,0	3,0
Enzima (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
AGITAR SUAVEMENTE E INCUBAR A 30 °C 10 minutos						

**3.3.2.** Al finalizar los 10 minutos de reacción, retirar los tubos del baño y añadir inmediatamente 0,5 ml de la solución de fosfato mezclando para detener la reacción.

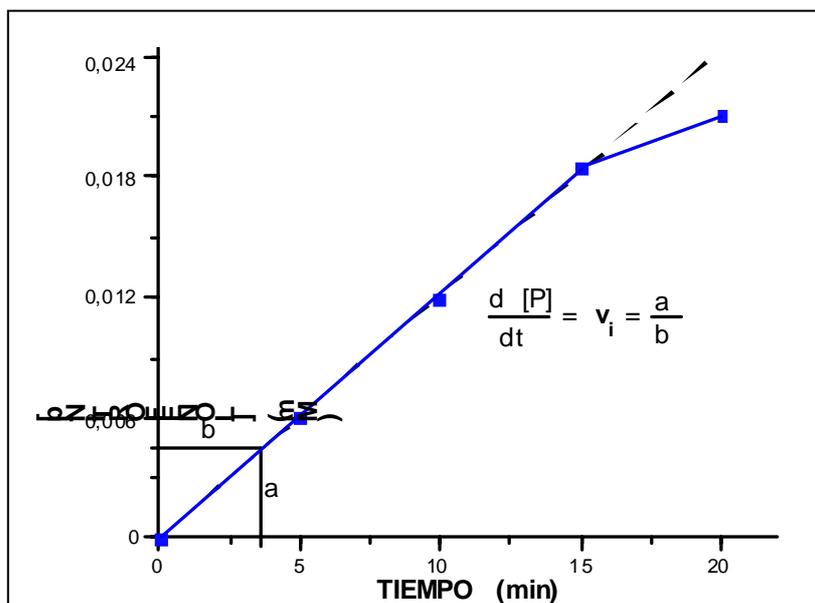
**3.3.3.** Medir la absorbancia a los distintos tubos a 405 nm; usando como blanco el nº 1.

## **4. RESULTADOS ESPERADOS**

### **4.1. Efecto del tiempo de reacción en la aparición de producto.**

La actividad de una enzima se determina conociendo la velocidad de la reacción que cataliza. La velocidad de reacción se define como la cantidad de sustrato consumido o de producto formado por unidad de tiempo. En nuestro caso representaremos la aparición de producto frente al tiempo (Figura 2), obteniendo la curva de progreso de la reacción. El cálculo de la concentración

de producto (*p*-nitrofenol) se basa en la ley de Lambert-Beer:  $A = \epsilon \cdot C \cdot l$ ; en este caso  $l = 1 \text{ cm}$  y  $\epsilon$  (coeficiente de extinción milimolar) es  $18,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 2.** Representación del efecto del tiempo de reacción en la aparición de producto.

A partir de esta curva se calcula la velocidad inicial ( $v_i$ ) de la reacción como la pendiente de la parte lineal de la curva de progreso.

Conociendo la  $v_i$  se podrá determinar la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina en mU/ml, sabiendo que 1 UI de actividad es la cantidad de enzima que cataliza la aparición de 1 micromol de producto por minuto.

#### 4.1.1. Curva de progreso de la reacción.

Cálculo de la concentración de producto

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l$$

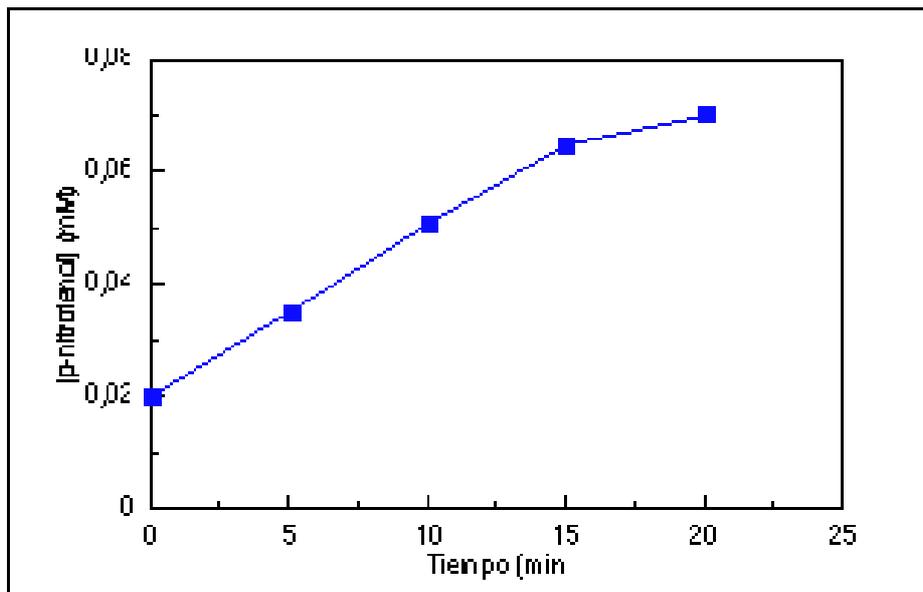
$$C = \frac{A}{\epsilon \cdot l}$$

Aplicando esta ecuación a las absorbancias obtenidas para cada uno de los tubos, teniendo en cuenta que  $l = 1 \text{ cm}$  y  $\epsilon = 18,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , se obtiene la concentración producto formado en cada uno de ellos.

Para representar la curva de progreso de la reacción (Figura 3), se trasladan los datos obtenidos de los cálculos correspondientes de la Tabla 4

Tabla 4. Curva de progreso de la reacción			
Tubo (n)º	Tiempo (min)	Absorbancia (405 nm)	[Producto] (mM)
1	5	0,00	0,00
2	5	0,644	0,035
3	10	0,943	0,051

4	15	1,203	0,065
5	20	1,300	0,07

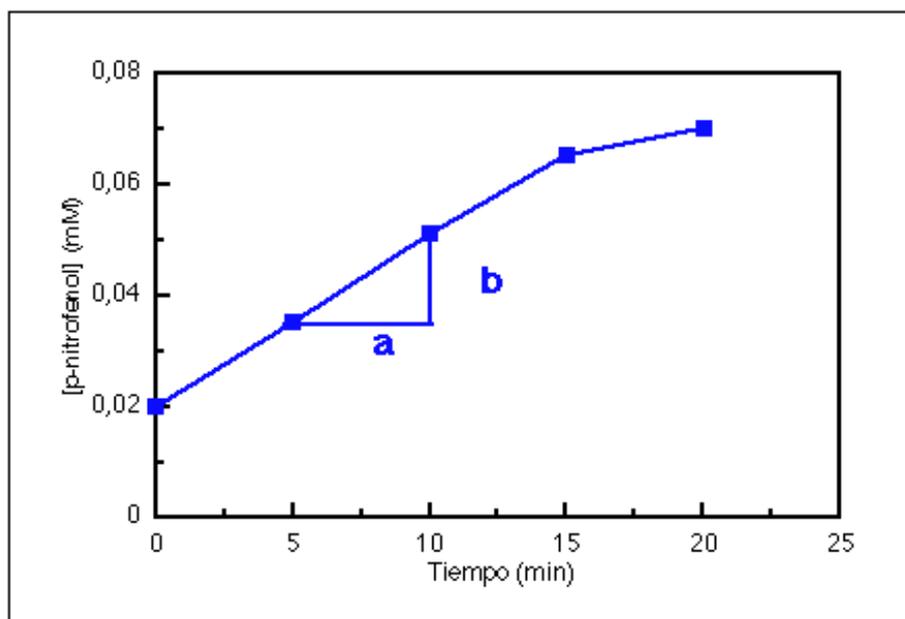


**Figura 3.** Representación del progreso de reacción: aparición de producto frente al tiempo de reacción

#### 4.1.2. Cálculo de la velocidad inicial.

Como se describe en el apartado 4.1.

$$V_i = \operatorname{tg} \alpha = \frac{b}{a}$$



**Figura 4.** Cálculo de velocidad inicial:  $\operatorname{tg} \alpha$

Aplicando la ecuación:

$$V_i = \frac{b}{a} = \frac{0,05-0,035}{10-5} = 0,003 \text{ mM min}^{-1}$$

#### 4.1.3. Determinación de la concentración de enzima en mU/ml.

Para determinar las mU/ml de fosfatasa alcalina utilizadas en la reacción se realizan los cálculos apropiados (apartado 4.1).

Concentración de fosfatasa alcalina = 12 mU/ml

#### 4.2. Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de la reacción.

En la mayoría de los experimentos cinéticos la concentración de enzima es mucho menor que la de sustrato, pues éste suele encontrarse en condiciones de saturación, por lo que el factor limitante de la reacción es la cantidad de enzima presente en el ensayo. Así la velocidad de reacción será proporcional a la concentración total de enzima.

##### 4.2.1. Representación de la velocidad de la reacción frente a la cantidad de enzima añadida.

Para ello en primer lugar se hace un cálculo de la concentración de producto aparecido aplicando la misma expresión que en el apartado anterior: ( $A = \epsilon C l$ )

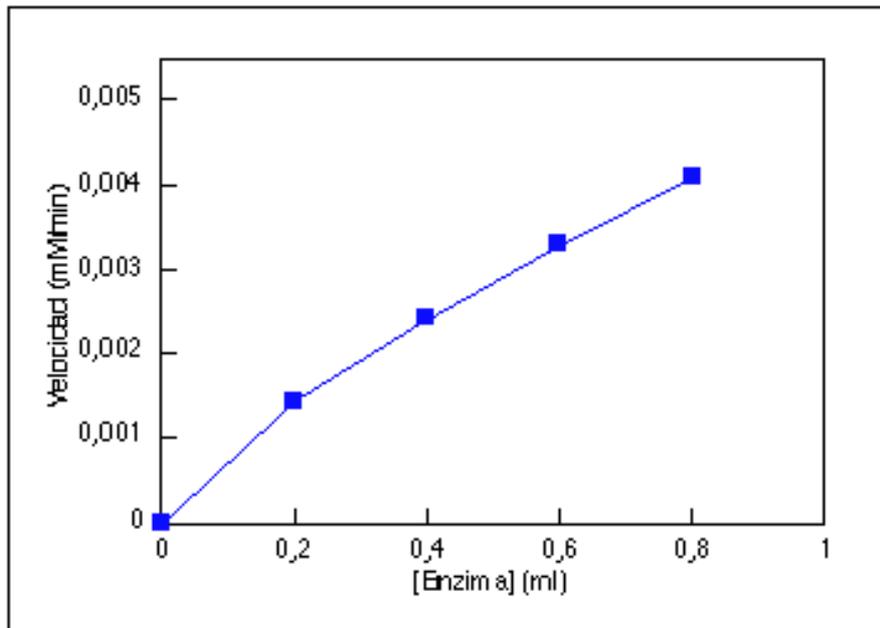
A continuación se calcula la velocidad de la reacción en cada uno de los tubos (mM/min) por el aumento de producto en función del tiempo de incubación:

$$V = \frac{\Delta [P]}{t}$$

Trasladar los datos obtenidos de los correspondientes cálculos a la Tabla 5:

Tubo (nº)	Enzima (ml)	Absorbancia (405 nm)	[producto] (mM)	Velocidad (mM/min)
1	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,2	0,264	0,0143	0,00143
3	0,4	0,460	0,0240	0,00240
4	0,6	0,617	0,0330	0,00330
5	0,8	0,774	0,0410	0,00410

Representación gráfica los datos de la Tabla 5.



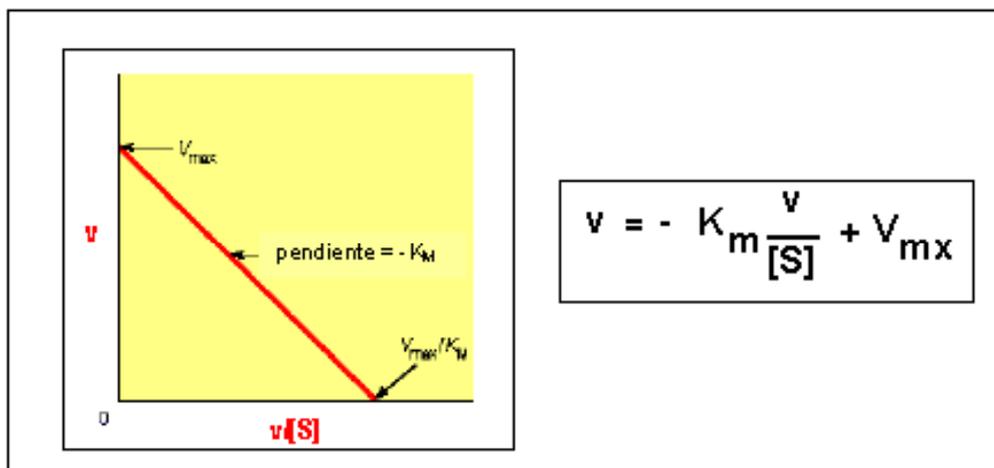
**Figura 5.** Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de la reacción.

### 4.3. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de la reacción. Determinación de $K_m$ y $V_m$ .

Si se representa la velocidad de reacción frente a la concentración de sustrato se obtiene una hipérbola rectangular cuya expresión matemática se conoce como Ecuación de Michaelis-Menten.

A bajas concentraciones de sustrato la velocidad inicial es proporcional a dicha concentración. Cuando la concentración de sustrato es muy elevada, la velocidad de reacción se aproxima a un límite superior conocido como velocidad máxima ( $V_m$ ). El parámetro  $K_m$  se denomina constante de Michaelis-Menten y es la concentración de sustrato a la cual la enzima funciona a la mitad de su velocidad máxima.

La representación de Eadie-Hofstee (Figura 6), como transformación lineal de la ecuación de Michaelis-Menten y la de Lineweaver-Burk o de los dobles inversos (Figura 7), también como transformación lineal de la ecuación de Michaelis-Menten, permiten obtener de manera fiable la  $V_m$  y la  $K_m$ .



**Figura 6.** Representación de Eadie-Hofstee

En la representación de Eadie-Hofsteese se presentan los valores de las velocidades enzimáticas obtenidas frente a los cocientes de las velocidades entre las respectivas concentraciones de sustrato y se obtiene una recta cuyo corte con el eje de abscisas corresponde a la  $V_m/K_m$  y con el eje de ordenadas equivale a la  $V_m$ , siendo la pendiente  $-K_m$ .

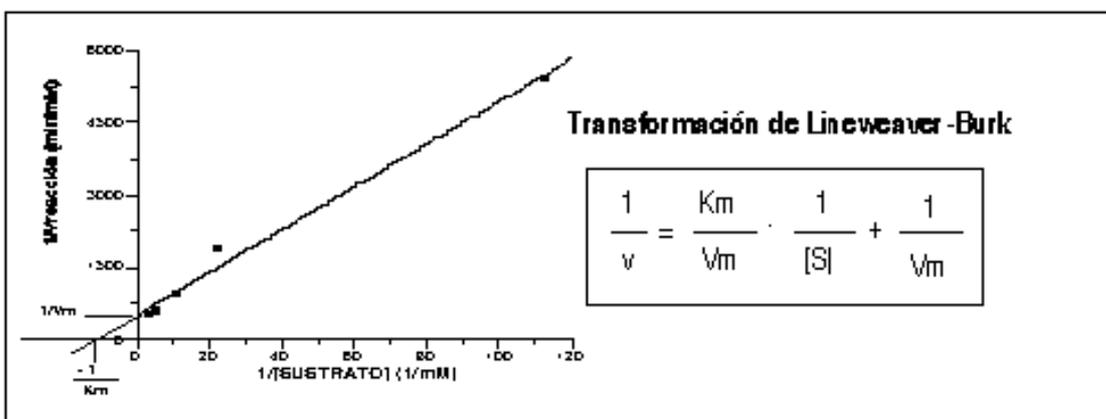


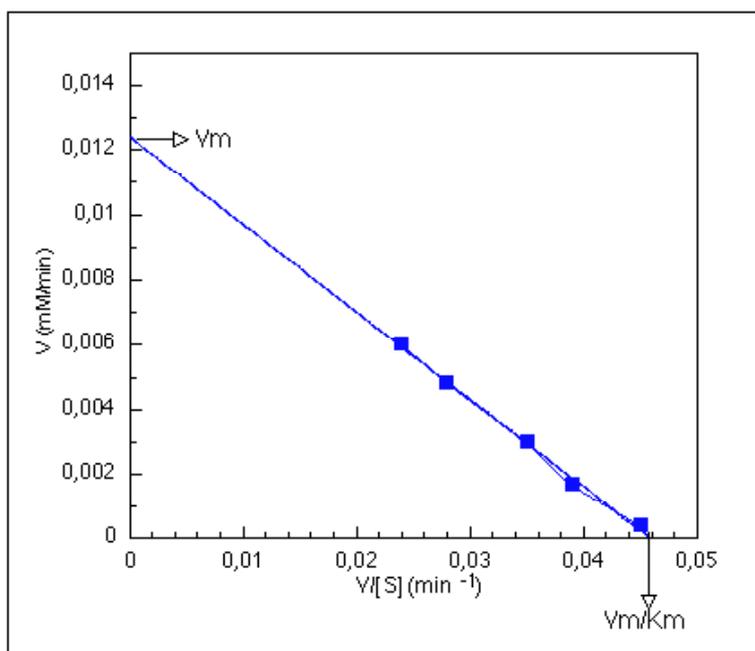
Figura 7. Representación de Lineweaver-Burk

En la representación de Lineweaver-Burk se presentan los inversos de las velocidades enzimáticas obtenidas frente a los inversos de las respectivas concentraciones de sustrato. Se obtiene así una recta cuyo corte con el eje de abscisas equivale a vale  $-1/K_m$  y con el eje de ordenadas a  $1/V_m$

#### 4.3.1. Representación de la velocidad frente al cociente $v/[S]$ . (Representación de Eadie-Hofstee)

Se trasladan los datos experimentales obtenidos y los cálculos correspondientes efectuados a la Tabla 6 y se representa gráficamente los parámetros adecuados (Figura 8):

Tabla 6. Representación de la velocidad frente al cociente $V/[S]$						
Tubo (nº)	Sustrato (ml)	[Sustrato] (mM)	Absorbancia (405 nm)	[Producto] (mM)	Velocidad (mM/min)	Velocidad/[S] ( $\text{min}^{-1}$ )
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,1	0,0085	0,068	0,0038	0,00038	0,045
3	0,5	0,0489	0,328	0,0170	0,0017	0,039
4	1,0	0,0850	0,558	0,0300	0,003	0,035
5	2,0	0,1710	0,889	0,0480	0,0048	0,028
6	3,0	0,2570	1,124	0,0620	0,006	0,024

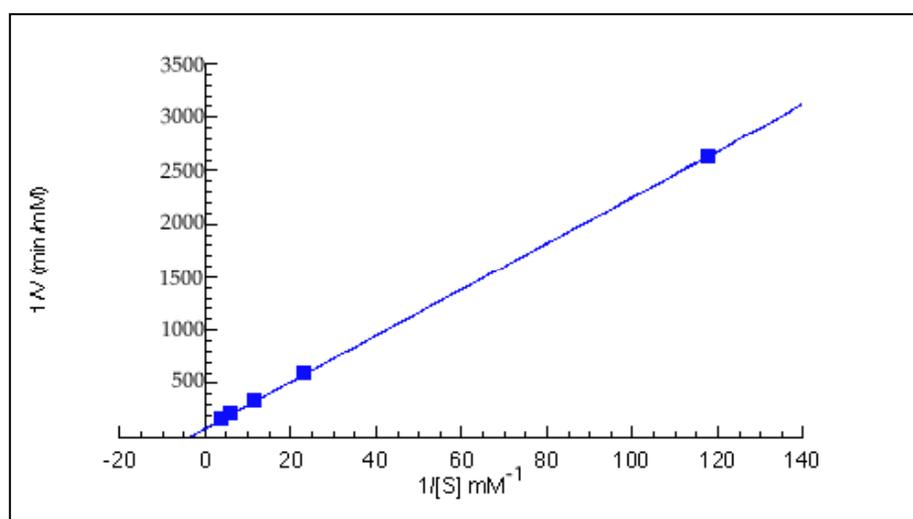


**Figura 8.** Representación de Eadie-Hofstee: Velocidad frente al cociente  $V/[S]$

#### 4.3.2. Representación de $1/V$ frente a $1/[S]$ (Representación de Lineweaver-Burk).

Se trasladan los valores experimentales obtenidos y los cálculos correspondientes efectuados a la Tabla 7, representándose gráficamente los parámetros adecuados (Figura 9).

Tubo (nº)	Sustrato (ml)	[Sustrato] (mM)	Absorbancia (405 nm)	[Producto] (mM)	Velocidad (mM/min)	$1/V$ (min/mM)	$1/[S]$ (mM <sup>-1</sup> )
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,1	0,0085	0,068	0,0038	0,00038	2631,5	117,76
3	0,5	0,0489	0,328	0,0170	0,0017	588,2	23,31
4	1,0	0,0850	0,558	0,0300	0,003	333,3	11,76
5	2,0	0,1710	0,889	0,0480	0,0048	208,3	5,84
6	3,0	0,2570	1,124	0,0620	0,006	166,6	3,89



**Figura 9.** Representación de Lineweaver-Burk: Inversos de las velocidades enzimáticas frente a los inversos de las concentraciones de sustrato.

### 3.3.2. Cálculo de $V_m$ y $K_m$ mediante las representaciones de Eadie-Hofstee y de Lineweaver-Burk.

La  $K_m$  y  $V_m$  se determinan en ambas presentaciones por los puntos de corte de la recta:

#### Eadie- Hofstee (Figura 10)

- en abscisas corresponde a la relación  $V_m/K_m$ ,
- en ordenadas directamente indica la  $V_m$  de la reacción.

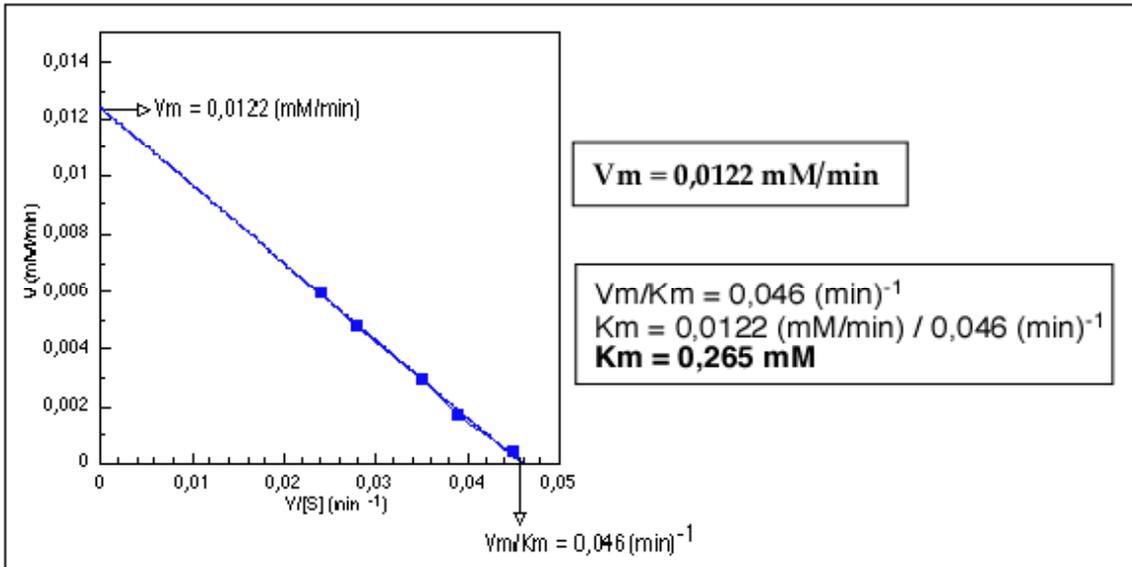


Figura 10. Cálculo de  $K_m$  y  $V_m$  (Eadie-Hofstee)

#### Lineweaver-Burk (Figura 11)

- en abscisas corresponde a  $-1/K_m$
- en ordenadas corresponde a  $1/V_m$

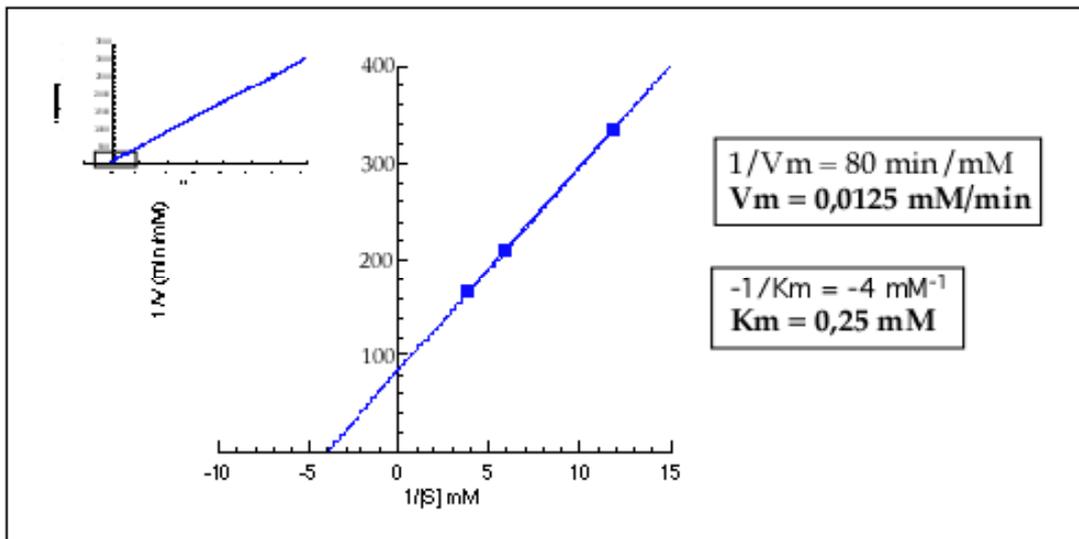


Figura 11. Cálculo de  $K_m$  y  $V_m$  (Lineweaver y Burk)

## 5. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

Los resultados obtenidos, se fijan a los objetivos planteados en el desarrollo de la práctica.

Existe, en las condiciones de trabajo empleadas, una relación (Figuras 3 y 4) entre el tiempo en que transcurre la reacción con la aparición de producto, o lo que es lo mismo con la desaparición de sustrato, que indica la  $v_i$  de la misma, a partir de la cual se puede determinar la concentración de la enzima (mU/mL) necesaria para que transcurra la reacción en esas condiciones.

Cuando se estudia el progreso de la reacción utilizando concentraciones variables de enzima, se puede comprobar (Figura 5) como ésta es factor limitante de la velocidad, siendo dicha velocidad proporcional a la concentración de enzima siempre que el sustrato se encuentre en condiciones de saturación tal y como ocurre en las condiciones de trabajo utilizadas.

Ante la disyuntiva de seleccionar un método fiable para la determinación a partir de una gráfica de la  $K_m$  y  $V_m$  de la reacción se han utilizado dos, la de Eadie–Hofstee como transformación lineal de la ecuación de Michaelis y Menten, y la de Lineweaver y Burk o de los dobles inversos también como transformación lineal de la ecuación de Michaelis y Menten. Como se puede observar (Figuras 10 y 11), en ambos casos los valores obtenidos para la  $K_m$  y  $V_m$  son muy similares y por lo tanto los dos métodos son válidos para determinar estos parámetros.

Al finalizar la práctica, se le suministra a los alumnos el material necesario para que presenten los resultados obtenidos.

## 6. BIBLIOGRAFÍA COMENTADA

Nelson DL, Cox MM (2001): “Principios de Bioquímica”, 3ª ed. Editorial Omega (Barcelona, España), pp 304-305.

Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL (2003): “Bioquímica”, 5ª ed. Editorial Reverté (Barcelona, España), pp 577-580.

## ANEXO 1: MEDIOS, SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO

Tampón glicina 100 mM pH 10,4

<b>Tabla 7. Tampón glicina 100 mM pH 10,4.</b>	
Glicina	7,507 g
Agua destilada	Hasta 1 litro

Ajustar el pH con HCl a 10,4

Tampón de ensayo: glicina 100 mM pH 10,4; 1mM  $MgCl_2$ ; 1mM  $ZnCl_2$

<b>Tabla 8. Tampón de ensayo.</b>	
$MgCl_2$	0,203 g
$ZnCl_2$	0,136 g
Tampón glicina 100 mM pH 10,4	Hasta 1 litro

Solución sustrato: *p*-nitrofenil-fosfato 0,3 mM

<b>Tabla 9. Sustrato.</b>	
<i>p</i> -nitrofenilfosfato	0,026 g
Tampón de ensayo	Hasta 200 ml

Solución para detener la reacción:  $K_2HPO_4$  1 M

<b>Tabla 10. Solución de paro</b>	
$K_2HPO_4 \cdot x 3H_2O$	228,2 g
Agua destilada	Hasta 1 litro

Solución enzimática: fosfatasa alcalina 10  $\mu$ g/200 ml

<b>Tabla 11. Solución enzimática</b>	
Fosfatasa alcalina	10 $\mu$ g
Tampón de ensayo	Hasta 200 ml