

## DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA CON EL pH

Brønsted : un ácido es una especie con tendencia a perder un protón, mientras que una base es una especie con tendencia a ganar un protón.

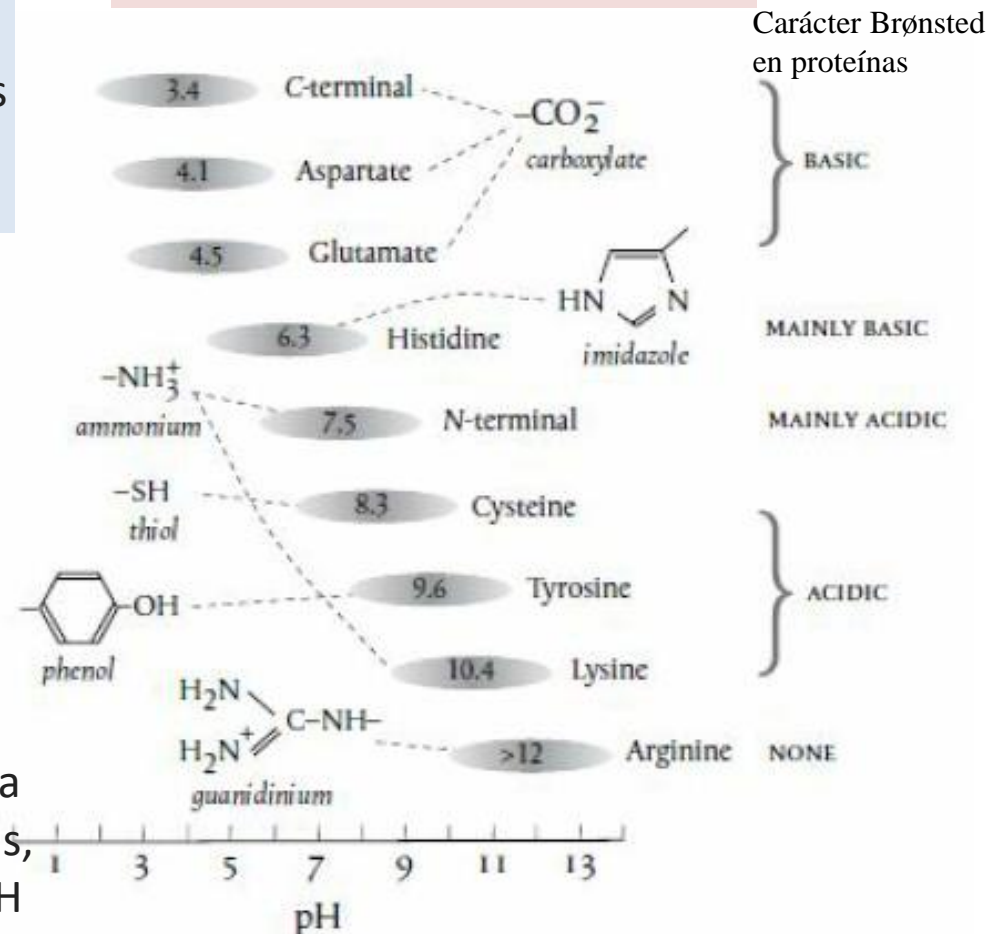
Conceptualmente, la protonación de un grupo básico en una enzima es simplemente un ejemplo de la unión de un modificador en un sitio específico y por lo tanto no hay necesidad de repetir el álgebra. Sin embargo, existen varias diferencias entre los protones y otros modificadores.

- ❑ En primer lugar, todas las enzimas se ven afectadas por los protones, por lo que el protón es mucho más importante que cualquier otro modificador.
- ❑ Es mucho más pequeño que cualquier otra especie química y no tiene efecto estérico; esto significa que ciertos fenómenos, tales como la inhibición no competitiva pura, son comunes con el protón como inhibidor, pero infrecuentes para otros químicos.
- ❑ La concentración de protones se puede medir y controlar en un rango mucho mayor que el disponible para cualquier otro modificador y, por lo tanto, se puede esperar poder observar los efectos que puedan existir en un rango amplio.
- ❑ Finalmente, los protones normalmente se unen a muchos sitios en una enzima, por lo que a menudo es insuficiente considerar unión a un único sitio. En primer lugar, todas las enzimas se ven afectadas por los protones, por lo que el protón es mucho más importante que cualquier otro modificador.

Desafortunadamente, se ha clasificado convencionalmente a los grupos ionizables que se encuentran en las proteínas según las propiedades de los aminoácidos en estado puro sin carga. En consecuencia....

- ❑ el aspartato y el glutamato, que son en gran parte responsables de las propiedades básicas de las proteínas en condiciones fisiológicas, son comúnmente referidos como "ácido".
- ❑ De los llamados aminoácidos "básicos", la histidina puede actuar como ácido o como base en condiciones fisiológicas, la lisina actúa principalmente como un ácido, y la arginina es en gran medida irrelevante para las propiedades ácido-base de las proteínas, porque no pierde su protón a valores de pH inferiores a 12.
- ❑ Por otro lado, dos de los llamados aminoácidos "neutros", la cisteína y la tirosina, hacen contribuciones apreciables a las propiedades ácido-base de las proteínas ...

## Grupos ionizables en proteínas



Aunque...en contextos proteicos los pKa de estos residuos pueden variar

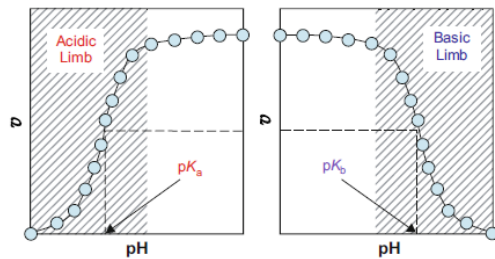
Y a veces mucho...  
Anomalos...

**TABLE 7.6** Comparison of Solution-Phase  $pK_a$  Values with Intrinsic  $pK_a$  Values Determined for Various Enzymes

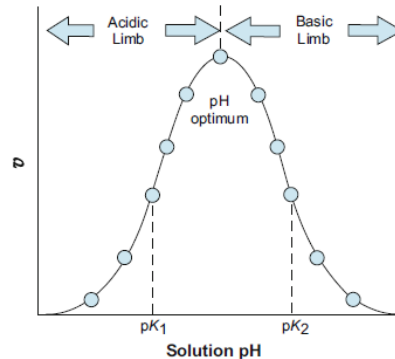
Acid/Base Group	$pK_a$ in Protein	$pK_a$ in Free Amino Acid
$\alpha$ -Carboxyl group (all amino acids)	2–7.2	1.8–2.5
$\beta/\gamma$ -Carboxyl group (Asp and Glu)	3.0–7.0	3.9–4.1
Imidazole (His)	5.2–7.5	6.0
Thiol (Cys)	7–9	8.4
Phenol (Tyr)	9–11	10.5
$\alpha$ -Amino group (all amino acids)	7–10	8.7–10.7
$\epsilon$ -Amino group (Lys)	6.5–11	10.5
Guanidinium group (Arg)	11.5–12.5	12.5

Mas allá de lo muchos aa ionizables que constituyen las proteínas....

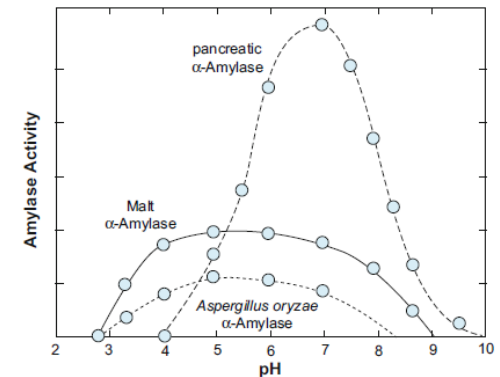
1-la dependencia de actividad con pH presenta características que sugieren que pocos grupos participan (gráficos campana o S)



**FIGURE 7.11** Determination of  $pK_a$  values from pH-rate plots. A, pH-rate profile for an enzyme having one ionizable group that must be deprotonated for optimal enzyme activity (mid-point of ascending acid-limb allows the experimenter to estimate  $pK_1$ ). B, pH-rate profile for an enzyme having one ionizable group that must be protonated for optimal enzyme activity (mid-point of ascending acid-limb allows one to estimate  $pK_2$ ).



**FIGURE 7.9** Bell-shaped pH-rate profile for an enzyme requiring two ionizable groups for activity. The rate is directly proportional to the degree of ionization of the first group (determined by  $pK_1$ ) and inversely proportional to the degree of ionization of the second group (governed by  $pK_2$ ).



**FIGURE 7.10** pH dependence of  $\alpha$ -amylases. As determined by Sherman, Thomas and Baldwin (1919), the malt and *Aspergillus oryzae* amylases are most active at a pH of 4.5 to 5.0, whereas pancreatic amylase is optimally active at pH 7.0. See text for explanation.

2-una misma reacción catalizada por dos enzimas distintas puede tener distintos pH óptimos.

**TABLE 7.4** Optimal pH Values for Several Well-Known Hydrolases

Enzyme	Substrate	Optimal pH
$\alpha$ -Amylase (pancreatic)	Starch	6.7
$\beta$ -Amylase (malt)	Starch	4.5
Arginase	Arginine	9.5–9.9
Acid Phosphatase	$\alpha$ -Glycerophosphate	4.5–5
Alkaline Phosphatase	$\alpha$ -Glycerophosphate	9–10
Catalase	Hydrogen Peroxide	7.0
Carboxypeptidase	Various Proteins	7.5
$\alpha$ -Glucosidase	$\alpha$ -Methylglucoside Maltose	5.4–7.0
Pepsin	Egg Albumin	1.5
	Casein	1.8
	Hemoglobin	2.2
Trypsin	Various Proteins	7.4–7.8
Urease	Urea	6.4–6.9

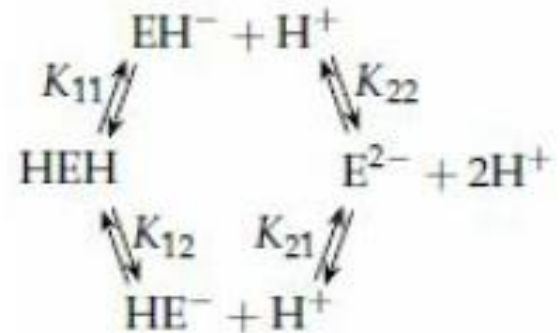
El comportamiento vs. pH de muchas enzimas se puede interpretar como una primera aproximación, en términos de un modelo simple debido a Michaelis, en el que sólo dos grupos ionizables se consideran.

Así, la enzima se puede representar como un ácido dibásico, HEH, con dos grupos ácidos no idénticos.

$$[EH^-] = [HEH] \cdot \frac{K_{11}}{h}$$

$$[HE^-] = [HEH] \cdot \frac{K_{12}}{h}$$

$$[E^{2-}] = [HEH] \cdot \frac{K_{11}K_{22}}{h^2} = [HEH] \cdot \frac{K_{12}K_{21}}{h^2}$$



[Figure 10.2.](#) Dissociation of a dibasic acid

Aunque  $K_{11}$  y  $K_{21}$  definen la disociación de un protón del mismo grupo,  $HE^-$  es más negativo que  $HEH$  por una unidad de carga, por lo que debería ser menos ácido, con  $K_{11} > K_{21}$ , no  $K_{11} = K_{21}$ ; por la misma razón deberíamos esperar que  $K_{12} > K_{22}$ .

En segundo lugar, la concentración de  $E^{2-}$  debe ser la misma si se deriva de  $HEH$  a través de  $EH^-$  o vía  $HE^-$ ; las dos expresiones para  $[E^{2-}]$  en la ecuación 9.3 deben ser equivalentes, con  $K_{11}K_{22} = K_{12}K_{21}$ .

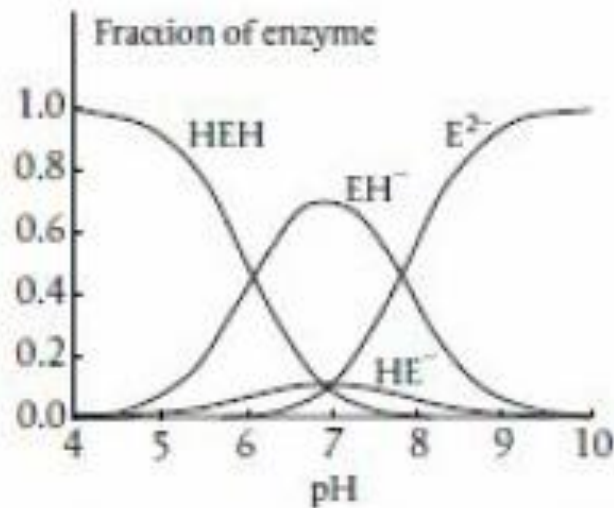
If the total enzyme concentration is  $e_0 = [\text{HEH}] + [\text{EH}^-] + [\text{HE}^-] + [\text{E}^{2-}]$ , then

$$[\text{HEH}] = \frac{e_0}{1 + \frac{K_{11} + K_{12}}{h} + \frac{K_{11}K_{22}}{h^2}}$$

$$[\text{HE}^-] = \frac{e_0 \cdot \frac{K_{12}}{h}}{1 + \frac{K_{11} + K_{12}}{h} + \frac{K_{11}K_{22}}{h^2}}$$

$$[\text{EH}^-] = \frac{e_0 \cdot \frac{K_{11}}{h}}{1 + \frac{K_{11} + K_{12}}{h} + \frac{K_{11}K_{22}}{h^2}}$$

$$[\text{E}^{2-}] = \frac{e_0 \cdot \frac{K_{11}K_{22}}{h^2}}{1 + \frac{K_{11} + K_{12}}{h} + \frac{K_{11}K_{22}}{h^2}}$$



Concentraciones relativas de las distintas formas enzimáticas en función del pH. Las curvas se calculan para una enzima HEH con dos grupos ionizables, con las siguientes constantes de disociación de grupo:  $\text{p}K_{11} = 6.1$ ,  $\text{p}K_{12} = 6.9$ ,  $\text{p}K_{21} = 7.0$ ,  $\text{p}K_{22} = 7.8$

En un experimento real, las curvas nunca se pueden definir con tanta precisión como las que se utilizaron en la simulación.

$[EH^-] / [HE^-] = K_{11} / K_{12}$  es una constante independiente de  $h$ .

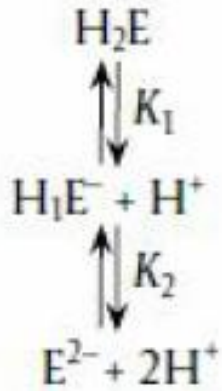
Por lo tanto, ninguna cantidad de variación en  $h$  producirá un cambio en  $[EH^-]$  que no esté acompañado por un valor exactamente proporcional cambio en  $[HE^-]$ . En consecuencia, es imposible saber cuánto de una propiedad dada contribuye  $EH^-$  y cuánto  $HE^-$ , y para la mayoría de los propósitos prácticos debemos, por tanto, tratar a  $EH^-$  y  $HE^-$  como una sola especie, y volver a simular, por lo que ya no se distinguen. La concentración de  $H_1E^-$  ahora viene dada por

$$\begin{aligned}
 [H_1E^-] &= [EH^-] + [HE^-] \\
 &= \frac{e_0 \cdot \frac{K_{11} + K_{12}}{h}}{1 + \frac{K_{11} + K_{12}}{h} + \frac{K_{11}K_{22}}{h^2}} \\
 &= \frac{e_0}{\frac{h}{K_{11} + K_{12}} + 1 + \frac{K_{11}K_{22}}{(K_{11} + K_{12})h}}
 \end{aligned}$$

[Figure 10.4](#). Dissociation of a dibasic acid drawn in terms of molecules rather than groups, as in [Figure 10.2](#).



Planteamos un eq. en términos moleculares



$$[\text{H}_1\text{E}^-] = \frac{e_0}{\frac{h}{K_1} + 1 + \frac{K_2}{h}}$$

in which the new constants  $K_1$  and  $K_2$  are defined as follows:

$$K_1 = K_{11} + K_{12} = \frac{([\text{EH}^-] + [\text{HE}^-])h}{[\text{H}_2\text{E}]}$$

$$K_2 = \frac{K_{11}K_{12}}{K_{11} + K_{12}} = \frac{([\text{E}^{2-}]h)}{[\text{EH}^-] + [\text{HE}^-]}$$

Son constantes de disociación moleculares , las anteriores eran de grupo

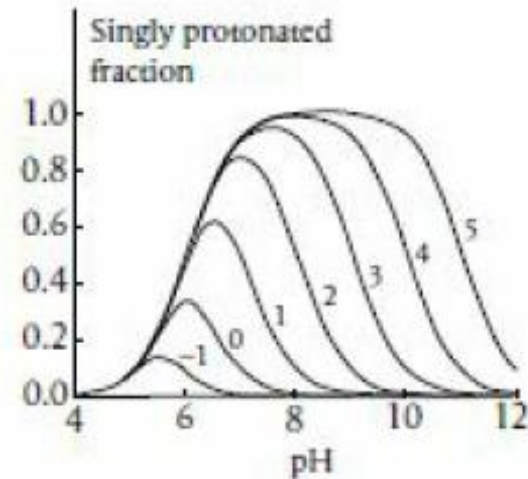
The expressions for  $[\text{H}_2\text{E}]$  and  $[\text{E}^{2-}]$  can also be written in terms of molecular dissociation constants, as follows:

$$[\text{H}_2\text{E}] = \frac{e_0}{1 + \frac{K_1}{h} + \frac{K_1K_2}{h^2}}$$

$$[\text{E}^{2-}] = \frac{e_0}{\frac{h^2}{K_1K_2} + \frac{h}{K_2} + 1}$$



Curvas en forma de campana. Las curvas se calcularon a partir de la ecuación con  $pK_1 = 6.0$  y  $pK_2 = 5.0-11.0$ . Cada curva está etiquetada con el valor de  $pK_2 - pK_1$ , la cantidad que determina su forma. (Observe que la meseta alrededor del máximo se vuelve más plana a medida que aumenta esta diferencia).



Si la forma activa es la que tiene un protón, entonces:

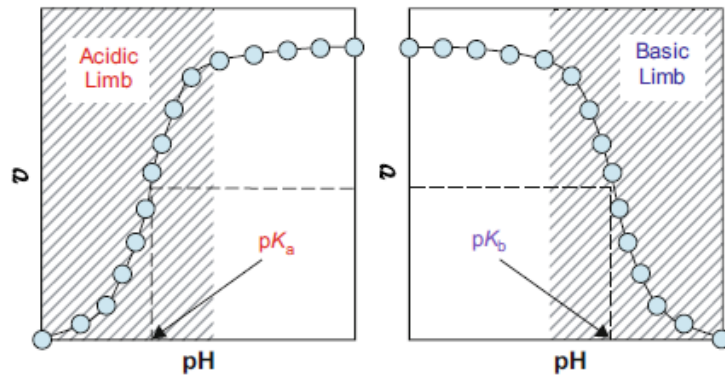
$$[H_1E^-] = \frac{e_0}{\frac{h}{K_1} + 1 + \frac{K_2}{h}}$$

$$v = k^* [H_1E^-]$$

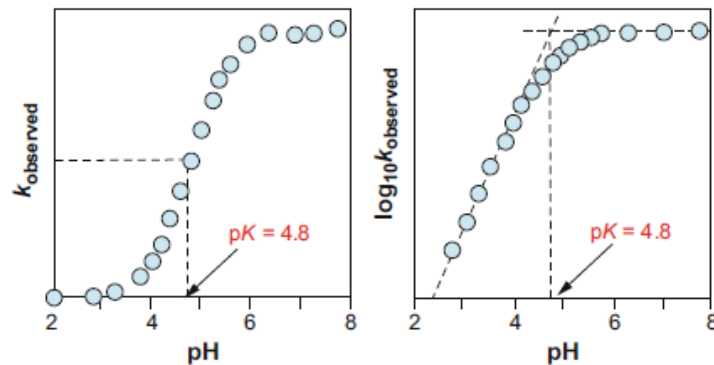
El máximo es notablemente menor que 1 a menos que  $(pK_2 - pK_1)$  sea mayor que aproximadamente 3.

En consecuencia los valores del pH al que  $[EH^-] + [HE^-]$  tiene la mitad de su valor máximo no son iguales a  $pK_1$  y  $pK_2$ . Sin embargo, la media de estos dos valores de pH es igual a  $(pK_1 + pK_2) / 2$ , y es también el pH al que se produce el máximo.

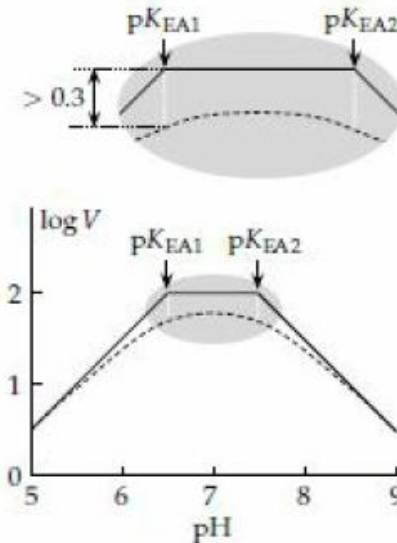
Prestemos atención a los gráficos...



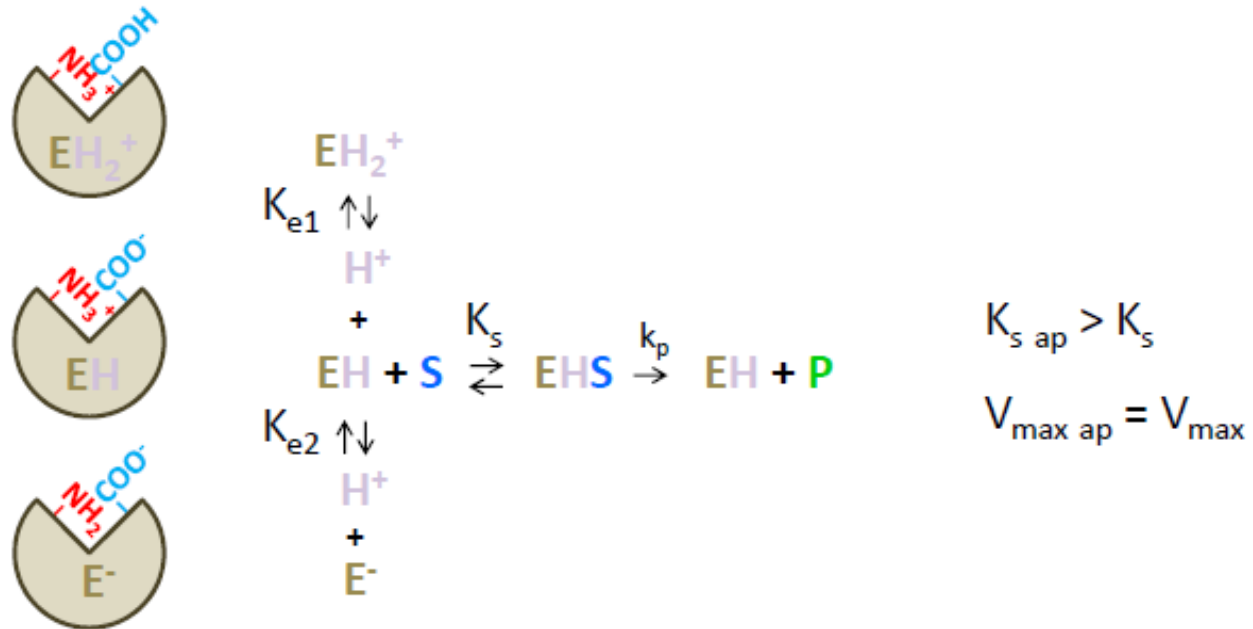
**FIGURE 7.11** Determination of  $pK_a$  values from pH-rate plots. A, pH-rate profile for an enzyme having one ionizable group that must be deprotonated for optimal enzyme activity (mid-point of ascendent acid-limb allows the experimenter to estimate  $pK_1$ ). B, pH-rate profile for an enzyme having one ionizable group that must be protonated for optimal enzyme activity (mid-point of ascending acid-limb allows one to estimate  $pK_2$ ).



**FIGURE 7.13** pH-dependence of an observed rate constant  $k_{obs}$ . In the left-hand panel, the value of the observed rate constant is plotted *versus* pH, and the pH that yields the half-maximal change in the value of  $k_{obs}$  corresponds to the  $pK_a$ . In the right-hand panel,  $\log_{10}(k_{obs})$  is plotted *versus* pH, and the  $pK_a$  corresponds to the pH at the intersection of straight tangent line drawn at the linear segments.



Repasando de la clase de QB....



Ec. 1: Constantes de disociación:

$$K_s = \frac{[\text{EH}] \cdot [\text{S}]}{[\text{EHS}]} \quad K_{e1} = \frac{[\text{EH}] \cdot [\text{H}]}{[\text{EH}_2^+]} \quad K_{e2} = \frac{[\text{E}] \cdot [\text{H}]}{[\text{EH}]}$$

Ec. 2: Ecuación de velocidad:

$$v = k_p \cdot [\text{EHS}]$$

Ec. 3: Balance de conservación de masa:

$$[\text{Et}] = [\text{EH}_2^+] + [\text{EH}] + [\text{E}] + [\text{EHS}]$$

Reemplazar [todas especies enzimáticas] en función de [EHS] según Ec. 1

$$(Et) = \frac{[H]}{K_{e1}} \frac{K_s(EHS)}{[S]} + \frac{K_s(EHS)}{[S]} + \frac{K_{e2}}{[H]} \frac{K_s(EHS)}{[S]} + (EHS)$$

$$(Et) = (EHS) \left( \frac{[H]}{[S]} \frac{K_s}{K_{e1}} + \frac{K_s}{[S]} + \frac{K_{e2} K_s}{[H][S]} + 1 \right)$$

Despejamos [EHS]

$$(EHS) = \frac{(Et)}{\left( \frac{[H]}{[S]} \frac{K_s}{K_{e1}} + \frac{K_s}{[S]} + \frac{K_{e2} K_s}{[H][S]} + 1 \right)}$$

Reemplazar [EHS] en Ec. 2

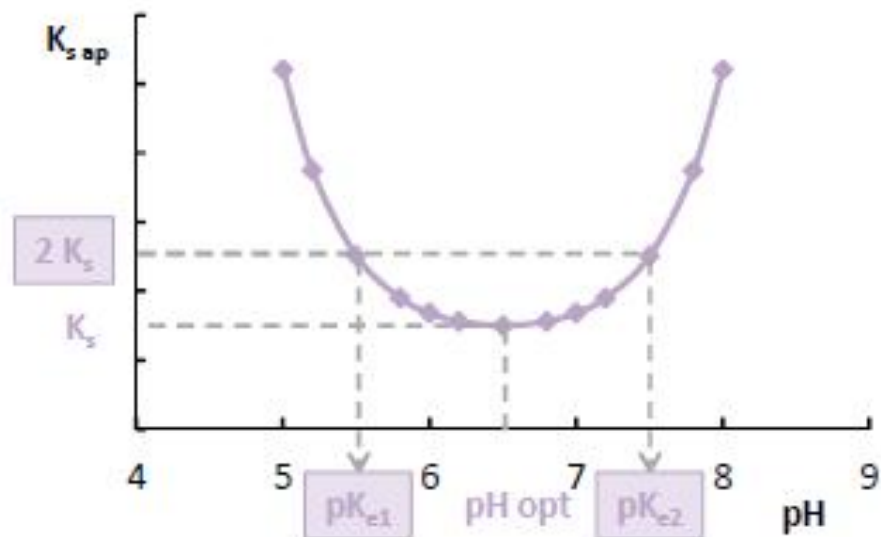
$$v = \frac{k_{ep} \cdot (Et)}{\frac{[H]}{K_{e1}} \frac{K_s}{[S]} + \frac{K_s}{[S]} + \frac{K_{e2} K_s}{[H][S]} + 1}$$

Multiplicar numerador  
y denominador x [S]

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{\frac{[H]}{K_{e1}} \cdot K_s + K_s + \frac{K_{e2} K_s}{[H]} + [S]}$$

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_s \left( 1 + \frac{[H]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H]} \right) + [S]}$$

$$K_{s_{ap}} = K_s \left( 1 + \frac{[H]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H]} \right)$$



$$K_{sap} = K_s \left( 1 + \frac{[H]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H]} \right) = 2 \cdot K_s$$

$$K_{sap} = 2 \cdot K_s = K_s \left( 1 + \frac{[H]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H]} \right)$$

$$1 = \frac{[H]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H]}$$

②  $\uparrow H^+$ ,  $\downarrow pH$

$$1 = \frac{[H]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H]}$$

$(H) = K_{e1}$   
 $pH = pK_{e1}$

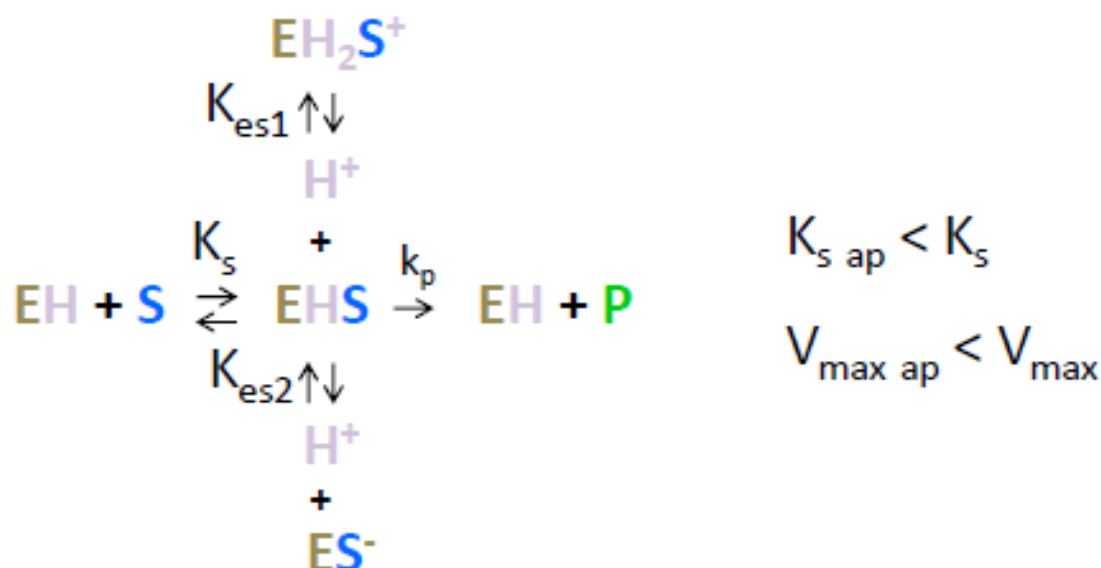
③  $\downarrow H^+$ ,  $\uparrow pH$

$$1 = \frac{[H]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H]}$$

$(H) = K_{e2}$   
 $pH = pK_{e2}$

# EFFECTO del pH sobre la ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

## IONIZACIÓN del COMPLEJO ES



Ec. 1: Constantes de disociación:

$$K_s = \frac{[\text{EH}] \cdot [\text{S}]}{[\text{EHS}]} \quad K_{es1} = \frac{[\text{EHS}] \cdot [\text{H}]}{[\text{EH}_2\text{S}^+]} \quad K_{es2} = \frac{[\text{ES}^-] \cdot [\text{H}]}{[\text{EHS}]}$$

Ec. 2: Ecuación de velocidad:

$$v = k_p \cdot [\text{EHS}]$$

Ec. 3: Balance de conservación de masa:

$$[\text{Et}] = [\text{EH}] + [\text{EH}_2\text{S}^+] + [\text{EHS}] + [\text{ES}^-]$$



Reemplazar [todas especies enzimáticas] en función de [EHS] según Ec. 1

$$\begin{aligned}
 (E_t) &= \frac{k_5 \cdot (EHS)}{(S)} + \frac{(EHS)(H)}{k_{es1}} + (EHS) + \frac{k_{es2} \cdot (EHS)}{(H)} \\
 (E_t) &= (EHS) \left( \frac{k_5}{(S)} + \frac{(H)}{k_{es1}} + 1 + \frac{k_{es2}}{(H)} \right) \\
 (EHS) &= \frac{(E_t)}{\frac{k_5}{(S)} + \frac{(H)}{k_{es1}} + 1 + \frac{k_{es2}}{(H)}}
 \end{aligned}$$

Despejamos [EHS]

Reemplazar [EHS] en Ec. 2

$$\begin{aligned}
 v &= \frac{v_{max} \cdot (S)}{k_5 + \frac{(H)}{k_{es1}} (S) + (S) + \frac{k_{es2} (S)}{(H)}} \\
 v &= \frac{v_{max} \cdot (S)}{k_5 + (S) \left( 1 + \frac{(H)}{k_{es1}} + \frac{k_{es2}}{(H)} \right)}
 \end{aligned}$$

Sacar factor común

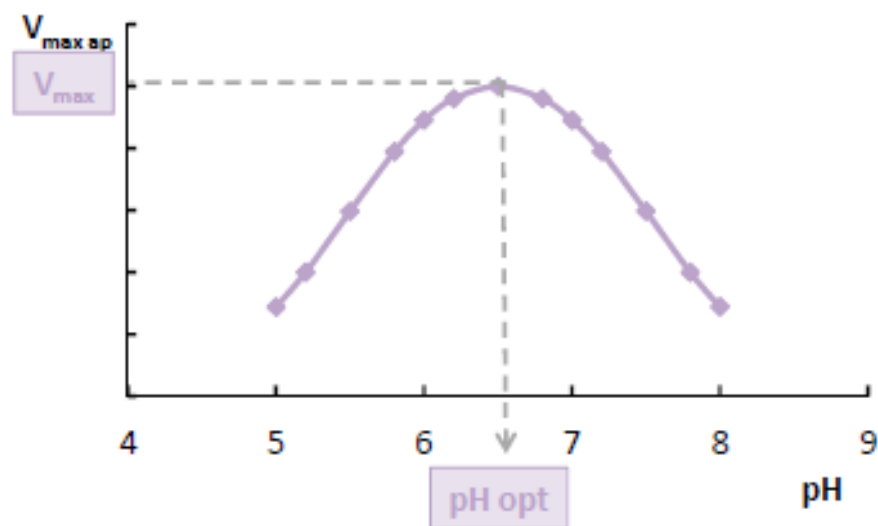
Dividir numerador y denominador x  $(1 + [H]/K_{es1} + K_{es2}/[H])$

$$v = \frac{\frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[H]}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{[H]}\right)} \times [S]}{\frac{K_s}{\left(1 + \frac{[H]}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{[H]}\right)} + [S]}$$

$$V_{max\ ap} = \frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[H]}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{[H]}\right)}$$

$$K_{s\ ap} = \frac{K_s}{\left(1 + \frac{[H]}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{[H]}\right)}$$

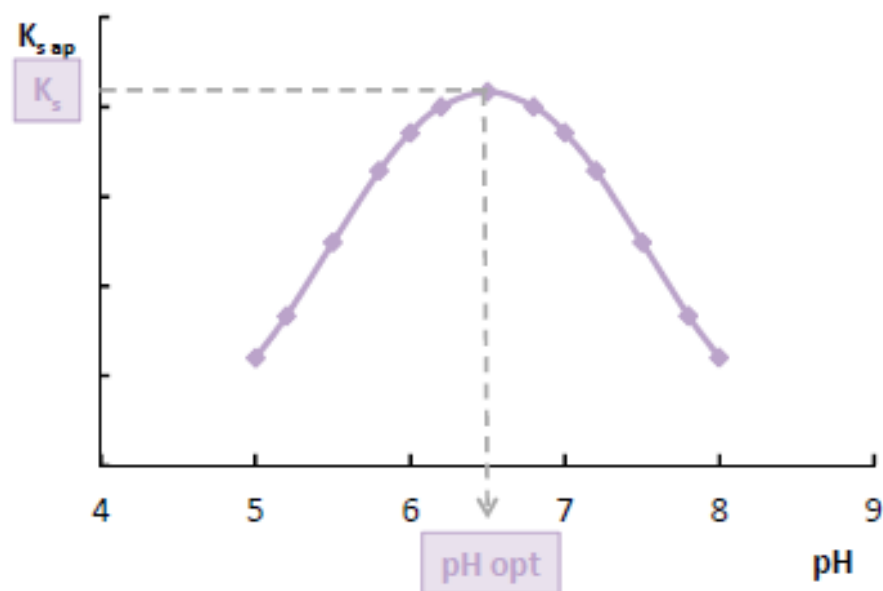




$$V_{max\ ap} = \frac{V_{max}}{\underbrace{\left(1 + \frac{[H]}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{[H]}\right)}_1}$$

$$\frac{[H]}{K_{es1}} = \frac{K_{es2}}{[H]}$$

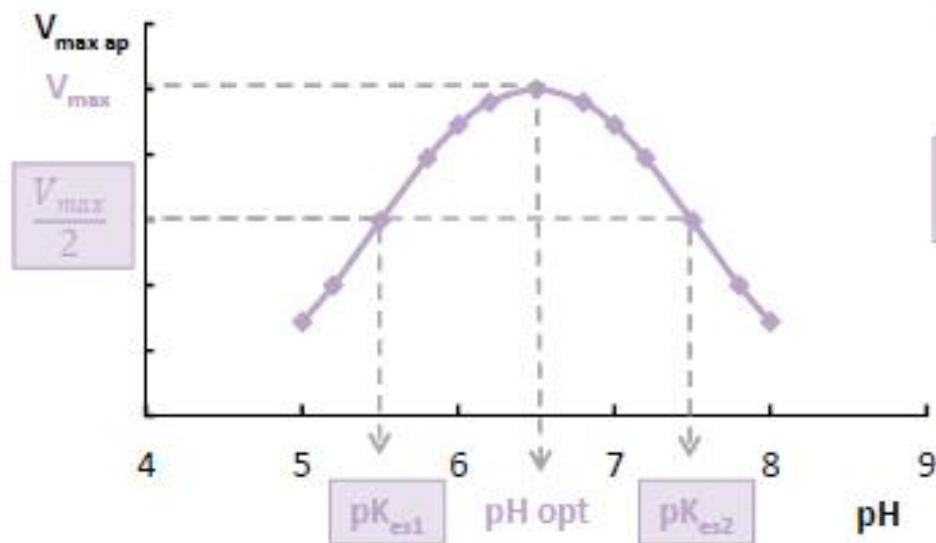
$$pH_{opt} = \frac{pK_{es1} + pK_{es2}}{2}$$



$$K_{s\ ap} = \frac{K_s}{\underbrace{\left(1 + \frac{[H]}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{[H]}\right)}_1}$$

$$\frac{[H]}{K_{es1}} = \frac{K_{es2}}{[H]}$$

$$pH_{opt} = \frac{pK_{es1} + pK_{es2}}{2}$$



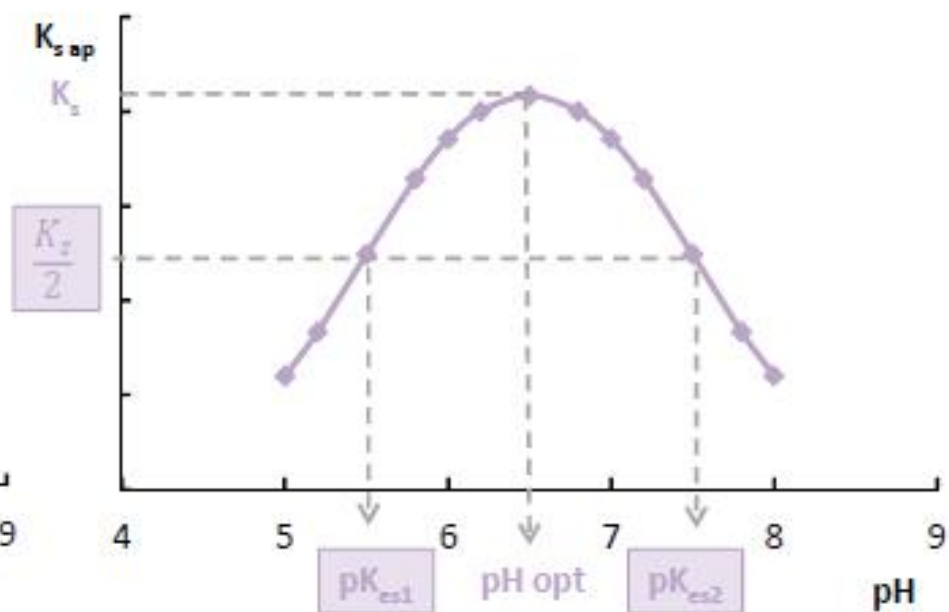
$$V_{max\ ap} = \frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[H]}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{[H]}\right)} = \frac{V_{max}}{2}$$

$$V_{max\ ap} = \frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_{es2}}{[H]} + \frac{[H]}{K_{es1}}}$$

$$\frac{K_{es2}}{[H]} + \frac{[H]}{K_{es1}} = 1$$

①  $\downarrow pH, \uparrow H^+ \Rightarrow [H] = K_{es1}$   
 $pH = pK_{es1}$

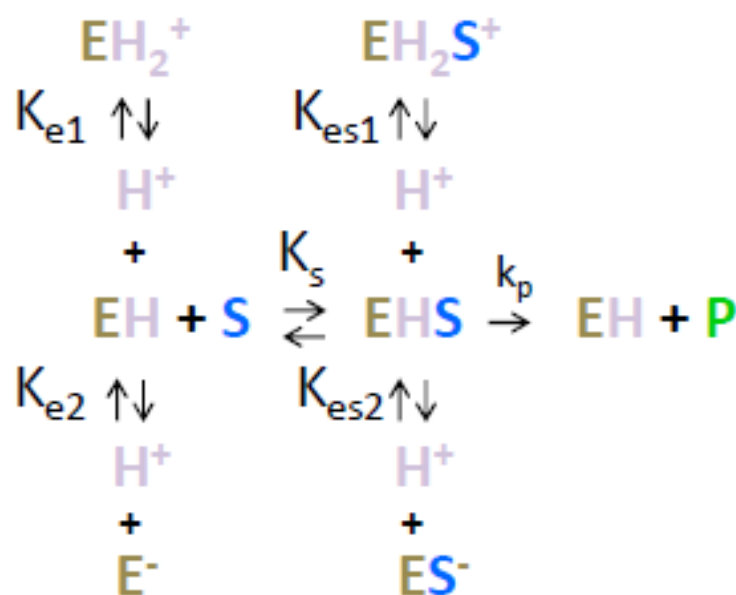
②  $\uparrow pH, \downarrow H^+ \Rightarrow [H] = K_{es2}$   
 $pH = pK_{es2}$



$$K_{s\ ap} = \frac{K_s}{\left(1 + \frac{[H]}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{[H]}\right)} = \frac{K_s}{2}$$

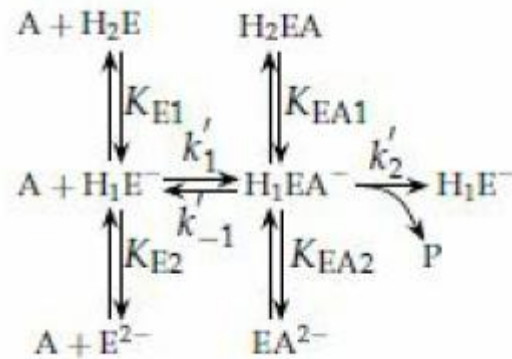
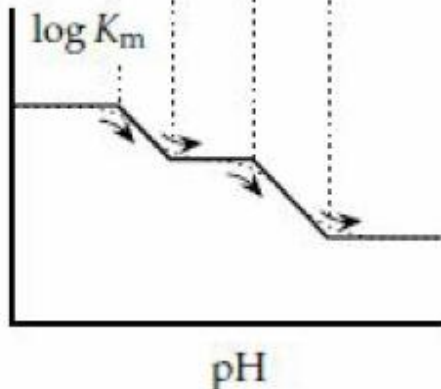
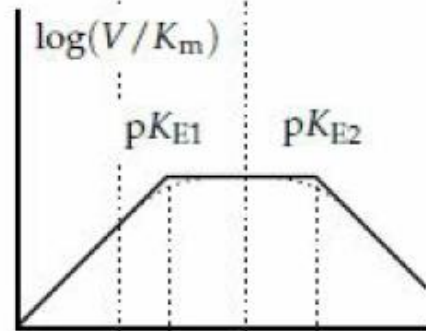
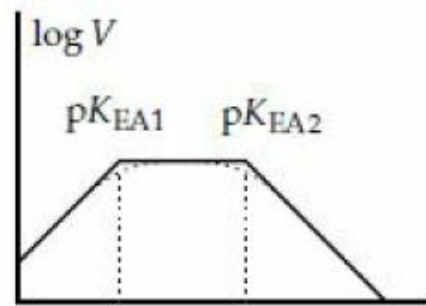
# EFFECTO del pH sobre la ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

## IONIZACIÓN de la E y del COMPLEJO ES



$$K_{s\ ap} = K_s \times \frac{\left(1 + \frac{[H]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H]}\right)}{\left(1 + \frac{[H]}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{[H]}\right)}$$

$$V_{max\ ap} = \frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[H]}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{[H]}\right)}$$



$$V = \frac{\tilde{V}}{\frac{h}{K_{\text{EA}1}} + 1 + \frac{K_{\text{EA}2}}{h}}$$

$$\frac{V}{K_m} = \frac{\tilde{V}/\tilde{K}_m}{\frac{h}{K_{\text{E}1}} + 1 + \frac{K_{\text{E}2}}{h}}$$

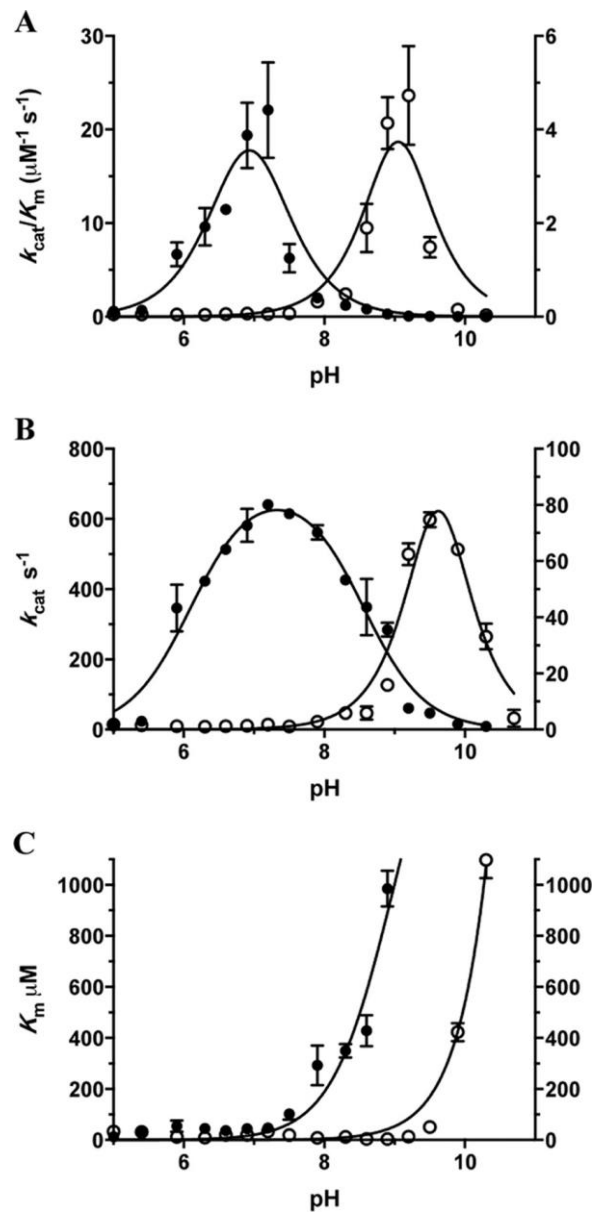
The variation of  $K_m$  with  $\text{pH}$  is more complicated than that of the other parameters, as it depends on all four  $\text{pK}_a$  values:

$$K_m = \frac{\tilde{K}_m \left( \frac{h}{K_{\text{E}1}} + 1 + \frac{K_{\text{E}2}}{h} \right)}{\frac{h}{K_{\text{EA}1}} + 1 + \frac{K_{\text{EA}2}}{h}}$$

(10.5)

# oligopeptidasa

## B-lactamase



## Urease

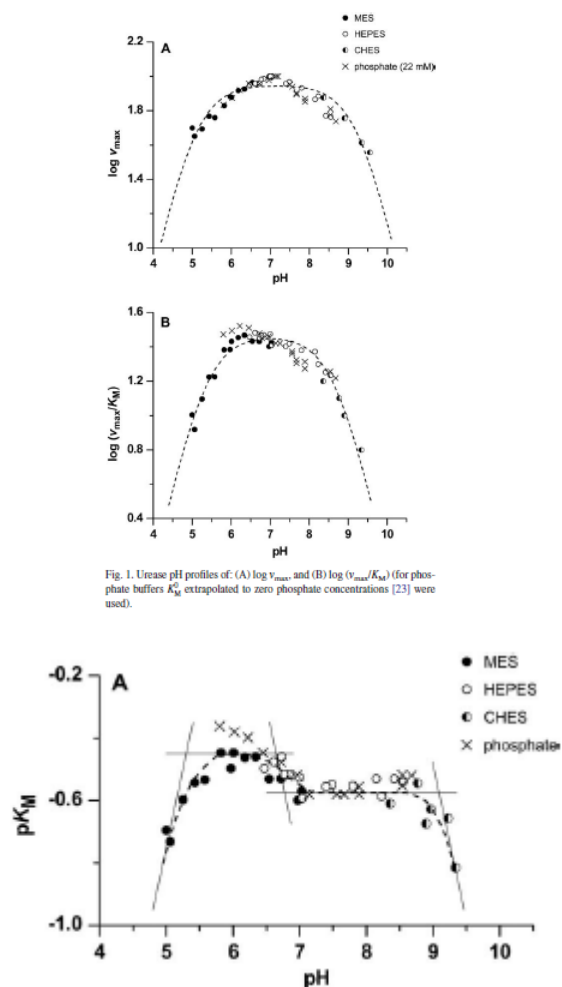
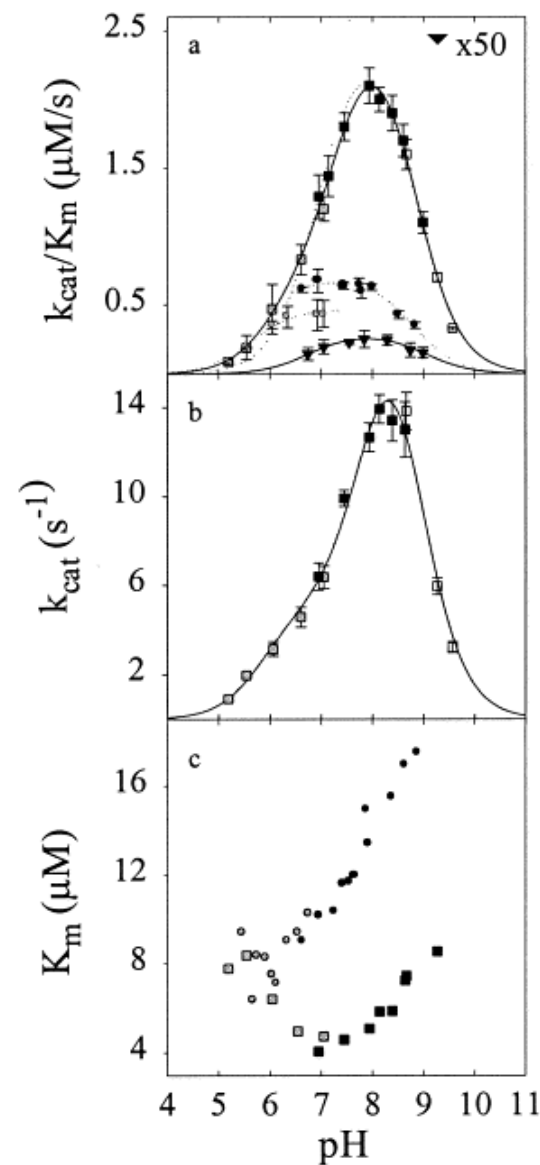


Fig. 1. Urease pH profiles of: (A)  $\log v_{\max}$ , and (B)  $\log (v_{\max}/K_m)$  (for phosphate buffers  $K_m^0$  extrapolated to zero phosphate concentrations [23] were used).



## CONSIDERACIONES EXP....

La determinación de los valores de  $pK_a$  de los grupos funcionales en enzimas es central para la interpretación de los datos de dependencia de la actividad con pH.

Si se dispone de la estructura 3D hay algoritmos que estiman estos valores....siempre y cuando consideremos que la estructura 3D representa la enzima activa en su medio de origen.

**TABLE 7.7** Techniques for Determining Equilibrium  $pK_a$  Values of Enzyme Functional Groups

Technique	Comments
Chemical Modification	The degree of protonation of active-site functional groups can be determined by measuring the rate or extent of chemical modification by reactive electrophiles as a function of pH.
Fluorescence Spectroscopy	A high-sensitivity method, based on protein's intrinsic fluorescence (mainly due to tryptophan and less so on tyrosine content) extrinsic fluorescence (resulting from covalently attached reporter group). This technique is especially valuable for evaluating $pK_a$ values associated with conformational changes.
Infrared Spectroscopy	A relatively low-sensitivity and low-resolution, method limited by the intense IR absorption of water. Useful for detecting pH-dependent changes in carboxyl, imine, and histidine groups.
NMR Spectroscopy	A highly reliable, but relatively low-sensitivity, method capitalizing on the high resolution of changes in the chemical shift of $^1H$ , $^2H$ , $^{13}C$ , $^{15}N$ , $^{17}O$ , $^{19}F$ , and $^{31}P$ resonances.
UV/Visible Spectroscopy	Traditionally the most widely applied technique, now largely replaced by fluorescence and NMR spectroscopy. The technique is based on protein's UV-absorbing groups (tryptophan, tyrosine, phenylalanine, and disulfide content) or substrates, cofactors, and inhibitors.

## CONSIDERACIONES EXP....

### Buffers....

No son inocuos....

- A veces participan en la catálisis además de afectar a las enzimas (bicarbonato, imidazol...)
- Su capacidad buffer se afecta con la temperatura
- Pueden tener impurezas (metales pesados....)
- En general se requiere cubrir rangos amplios de pH...y entonces? Como hacemos.... Si usamos varios buffers...como hacemos con la fuerza iónica?

TABLE 7.8  $pK_a$  Values and Temperature Dependencies for Selected Buffers

$pK_a$	Buffer	$d(pK_a)/dT$ pH Unit/ $^{\circ}C$	Charge
4.64	Acetic Acid	0.0002	-1
5.28	Succinic Acid ( $pK_2$ )	0	-2
5.80	Citric Acid ( $pK_1$ )	0	-3
5.90	2-( <i>N</i> -Morpholino)ethanesulfonic Acid (MES)	-0.011	-1
6.01	3,3-Dimethylglutaric Acid	0.006	-2
6.63	Arsenic Acid ( $pK_2$ )	-0.0001	-2
6.67	<i>N</i> -(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic Acid (ACES)	-0.02	-1
6.84	Phosphoric Acid ( $pK_2$ )	-0.0028	-2
6.86	Piperazine- <i>N,N'</i> -bis(2-ethanesulfonic) Acid (PIPES)	-0.0085	-2
6.97	Imidazole	-0.020	0
6.98	<i>N,N</i> -Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic Acid (BES)	-0.016	-1
7.02	3-( <i>N</i> -Morpholino)propanesulfonic Acid (MOPS)	-0.015	-1
7.27	<i>N</i> -Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic Acid (TES)	-0.020	-1
7.39	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazine- <i>N'</i> -2-ethanesulfonic Acid (HEPES)	-0.014	-1
7.68	<i>N</i> -Ethylmorpholine	-0.022	0
7.78	Triethanolamine	-0.02	0
8.00	Tris- <i>l</i> -hydroxymethylaminomethane (Tris)	-0.031	0
8.09	Glycylglycine	-0.028	-1
10.05	3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonic Acid (CAPS)	-0.032	-1

Sources: Ellis and Morrison (1982); Perrin and Dempsey (1974).

Una pregunta no menor....cuanto tiempo es estable nuestra enzima en el medio seleccionado?

ENSAYOS DE ESTABILIDAD



TABLE 7.9 Three-Component Buffer Mixtures with Virtually Constant Ionic Strength

Useful pH Range	Components	Charge on Conjugate Base	$pK_a$ at $I = 0.1$ , and $T = 30^\circ\text{C}$	Concentration Yielding $I = 0.1$
4.2–7.9	Acetic Acid	–1	4.64	0.05
	MES	–1	6.02	0.05
	<i>N</i> -Ethylmorpholine	0	7.68	0.10
4.2–8.0	Acetic Acid	–1	4.64	0.05
	MES	–1	6.02	0.05
	Triethanolamine	0	7.78	0.10
4.2–8.2	Acetic Acid	–1	4.64	0.05
	MES	–1	6.02	0.05
	Tris(hydroxymethyl)amino-methane	0	8.00	0.10
5.8–9.1	MES	–1	6.02	0.05
	TAPSO	–1	7.49	0.05
	Diethanolamine	0	8.88	0.10
4.2–7.9	Acetic Acid	–1	4.64	0.10
	Bis-Tris	0	6.32	0.05
	Triethanolamine	0	7.76	0.05
5.7–9.1	MES	–1	6.02	0.10
	<i>N</i> -Ethylmorpholine	0	7.68	0.051
	Diethanolamine	0	8.88	0.051
6.25–9.7	ACES	–1	6.65	0.10
	Tris	0	8.00	0.052
	Ethanolamine	0	9.47	0.052
5.0–9.1	Succinic Acid	–1	5.28	0.033
	Imidazole	0	6.97	0.044
	Diethanolamine	0	8.88	0.044

The ionic strength varies by  $\pm 8\%$  over the indicated pH range. All buffer systems (except that containing succinate) are likely to be suitable for experiments on metal ion-nucleotide complexes. From Ellis and Morrison (1995).

## BIBLIOGRAFIA

CAPITULO 7. Fundamentals of Enzyme Kinetics .ATHEL CORNISH-BOWDEN

CAPITULO 7. Enzyme Kinetics: Catalysis & Control. DANIEL I. PURICH