ANALES DE CIENCIAS. VOL. XLVI. NÚMS. 1 - 4, 1987: 35-40
SECRETARIADO DE PUBLICACIONES - UNIVERSIDAD DE MURCIA

Estudio cinético de la fase de transición del mecanismo trisustrato hexa uni ping-pong

M. García Moreno[a], F. García Cánovas[b,*], R. Varón Castellanos[a], F. García Carmona[b], J. Tudela Serrano[b], A. Román Gil[b]

[a] Cátedra de Química I (Industrial). Escuela Universitaria Politécnica. Universidad de Castilla La Mancha.
[b] Departamento de Bioquímica. Universidad de Murcia.
[*] Autor a quien debe ser dirigida la correspondencia.

Recibido: 4-7-86
Aceptado: 30-12-87

Kinetic study of the transient phase of three-substrate enzyme reactions with hexa Uni Ping-Pong mechanism

Summary. In this paper the transient phase of the Hexa Uni Ping-Pong mechanism is studied, obtaining the equations which related the products concentration with the time. Likewise, a method for determination of all rate constants of the mechanism is proposed if rapid equilibrium conditions of reversible steps takes place.

Key-words: three-substrate reactions, ping-pong mechanisms, hexa-uni mechanisms, enzyme kinetics, transient phase.

INTRODUCCIÓN

El estudio cinético de las reacciones enzimáticas trisustrato se ha llevado a cabo bajo la aproximación del estado estacionario, la expresión de la ecuación de velocidad y sus distintas representaciones gráficas permiten distinguir entre los posibles mecanismos y obtener los parámetros cinéticos (K_M y V_{max}) que caracterizan al enzima actuando sobre los distintos sustratos (1-4). Sin embargo el enfoque en fase de transición, consigue una información más profunda sobre las distintas etapas del ciclo catalítico que tiene lugar en la transformación de los sustratos a productos. Estudios cinéticos en fase de transición, se han realizado fundamentalmente con reacciones enzimáticas monosustrato y bisustrato (5) y también se ha aplicado a un mecanismo trisustrato ordenado tipo Theorell-Chance (6).

El grupo de mecanismos tipo Ping-Pong en reacciones trisustrato es muy amplio (4, 7). Respecto a enzimas que siguen un mecanismo Hexa Uni Ping-Pong,

$$E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1[A]}{\rightleftarrows}} EA \xrightarrow[P]{k_2} F \underset{k_{-3}}{\overset{k_3[B]}{\rightleftarrows}} FB \xrightarrow[Q]{k_4} G \underset{k_{-5}}{\overset{k_5[C]}{\rightleftarrows}} GC \xrightarrow[R]{k_6} E \quad (I)$$

el mejor estudiado en estado estacionario es piruvato-fosfato diquinasa de Propionibacterium shermanii (8) y de Bacillus symbiosus (9) que cataliza la conversión de piruvato, ATP y Pi a fosfoenolpiruvato, AMP y PPi.

El objetivo de nuestro trabajo es obtener las ecuaciones cinéticas de formación de los productos, válidas tanto para la fase de transición como para el estado estacionario correspondientes al mecanismo (I), y establecer un método para la determinación de todas las constantes de velocidad implicadas en él, a partir de los perfiles concentración-tiempo de los productos, en el caso bastante frecuente de que en el sistema se den las condiciones de equilibrio rápido en la unión de los distintos sustratos (4).

TEORIA

NOTACIÓN Y SÍMBOLOS

$\lambda_h (h=1,2,3,4,5)$: Raíces de la ecuación

$$\sum_{i=1}^{5} F_i \lambda^{5-i}=0 \qquad (1)$$

$F_i (i=1,2,3,4,5)$: Coeficientes de la ecuación (1) que son funciones de las constantes de velocidad y de las concentraciones iniciales de los sustratos y vienen dados en el Apéndice.

f_i: Orden del infinito F_i.

α: Velocidad de formación de los productos en el estado estacionario.

a_0: Concentración inicial del sustrato A.

b_0: Concentración inicial del sustrato B.

c_0: Concentración inicial del sustrato C.

e_0: Concentración inicial del enzima E.

$\tau_x (X \equiv P,\ Q \text{ o } R)$: Período de inducción del producto $X (X \equiv P,\ Q \text{ o } R)$

$$T_h = 1/\prod_{\substack{p=1\\ p\neq h}}^{5} \lambda_h^2 (\lambda_p - \lambda_h) \qquad (2)$$

$$K_A = k_{-1}/k_1 \qquad (3)$$

$$K_B = k_{-3}/k_3 \qquad (4)$$

$$K_C = k_{-5}/k_5 \qquad (5)$$

$$c_i = k_i \quad (i=-1,-3,-5,2,4,6) \qquad (6)$$

$$c_1 = k_1 a_0 \qquad (7)$$

$$c_3 = k_3 b_0 \qquad (8)$$

$$c_5 = k_5 c_0 \qquad (9)$$

$$u = \tau_R e_0/\alpha \qquad (10)$$

ANÁLISIS DE DATOS CINÉTICOS

Si al comienzo de la reacción las únicas especies presentes son los sustratos A, B y C y el enzima libre, E, estando aquéllos en exceso con respecto a éste, la aplicación de los métodos descritos en las referencias (10-11), al mecanismo mostrado en el esquema I, conduce a:

$$[X] = \beta_X + \alpha t + \sum_{h=1}^{5} \gamma_{X_h} \exp(\lambda_h t) \quad (X \equiv P,\ Q \text{ o } R) \qquad (11)$$

Las raíces λ_h pueden ser reales o complejas dependiendo de los valores relativos de los coeficientes F_i, pero si son reales, son negativas y si son complejas, tienen negativa la parte real y no son nunca, por lo tanto, imaginarias puras (5, 11). Por otra parte, α, β_P, β_Q, β_R, γ_{Ph}, γ_{Qh} y γ_{Rh} (h=1, 2, 3, 4, 5) vienen dados por:

$$\alpha = k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 k_6 a_0 b_0 c_0 e_0/F_5 \qquad (12)$$

$$\beta_P = \alpha [(1/k_4)+(1/k_6)+(1/k_3 b_0)+(1/k_5 c_0)+ +(k_{-3}/k_3 k_4 b_0)+(k_{-5}/k_5 k_6 c_0)-(F_4/F_5)] \qquad (13)$$

$$\beta_Q = \alpha [(1/k_6)+(1/k_5 c_0)+(k_{-5}/k_5 k_6 c_0)-(F_4/F_5)] \qquad (14)$$

$$\beta_R = -\alpha F_4/F_5 \qquad (15)$$

$$\gamma_{Ph} = k_1 k_2 \{k_3 k_4 k_5 k_6 b_0 c_0 + [k_3 k_4 (k_{-5}+k_6+k_5 c_0) b_0 + +(k_{-3}+k_4+k_3 b_0) k_5 k_6 c_0] \lambda_h + [(k_{-3}+k_4+ +k_3 b_0)(k_{-5}+k_6+k_5 c_0)+k_3 k_4 b_0 + k_5 k_6 c_0] \lambda_h^2 + +(k_{-3}+k_4+k_{-5}+k_6+k_3 b_0+k_5 c_0) \lambda_h^3 + +\lambda_h^4\} T_h a_0 e_0 \quad (h=1,2,\ldots,5) \qquad (16)$$

$$\gamma_{Qh} = k_1 k_2 k_3 k_4 [k_5 k_6 c_0 + (k_{-5}+k_6+k_5 c_0) \lambda_h + +\lambda_h^2] T_h a_0 b_0 e_0 \quad (h=1,2,\ldots,5) \qquad (17)$$

$$\gamma_{Rh} = k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 k_6 T_h a_0 b_0 c_0 e_0 \quad (h=1,2,\ldots,5) \qquad (18)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La ecuación (11) relaciona la concentración de los productos con el tiempo y es válida, por lo tanto, para la fase de transición y para el estado estacionario. No obstante, para este último estado $t>>1$, los términos exponenciales de la mencionada ecuación pueden despreciarse con respecto a los demás del segundo miembro, pudiendo simplificarse ésta a:

$$[X] = \beta_X + \alpha t \qquad (X \equiv P,\ Q \text{ o } R) \qquad (19)$$

que son ecuaciones de rectas cuyas pendientes son las velocidades de estado estacionario de formación de los correspondientes productos. Obsérvese que, en el estado estacionario, los tres productos se forman a la misma velocidad, α.

A su vez, de las ecuaciones (19) y (12)-(15) se deduce que los períodos de inducción de los productos P, Q y R, es decir la intersección con el eje de abcisas de la recta de ecuación (17) que denotaremos por τ, toman las siguientes expresiones

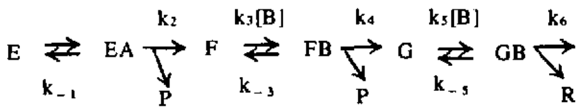
$$\tau_P = -[(1/k_4)+(1/k_6)+(1k_3 b_0)+(1k_5 c_0)+ +(k_{-3}/k_3 k_4 b_0)+(k_{-5}/k_5 k_6 c_0)]+(F_4/F_5) \qquad (20)$$

$$\tau_Q = -[(1/k_6)+(1/k_5 c_0)+(k_{-5}/k_5 k_6 c_0)]+(F_4-/F_5) \qquad (21)$$

$$\tau_R = F_4/F_5 \qquad (22)$$

Obsérvese que siempre es $\tau_P<\tau_Q<\tau_R$ y que τ_R es positivo, mientras que τ_P y τ_Q pueden ser positivos o negativos. En la figura 1 se indica esquemáticamente una forma posible de variación de la concentración de los productos con el tiempo.

Naturalmente, si dos o más de los sustratos A, B y C o de los productos P, Q y R, son iguales o si se dan ambas situaciones simultáneamente, resultan mecanismos Hexa Uni Ping-Pong que son casos particulares del (I) y a los que pueden aplicarse las ecuaciones anteriormente deducidas efectuando en ellas los cambios correspondientes. Por ejemplo, si es $C \equiv B$ y $Q \equiv P$, el mecanismo (I) queda reducido al mecanismo (II).



(II)

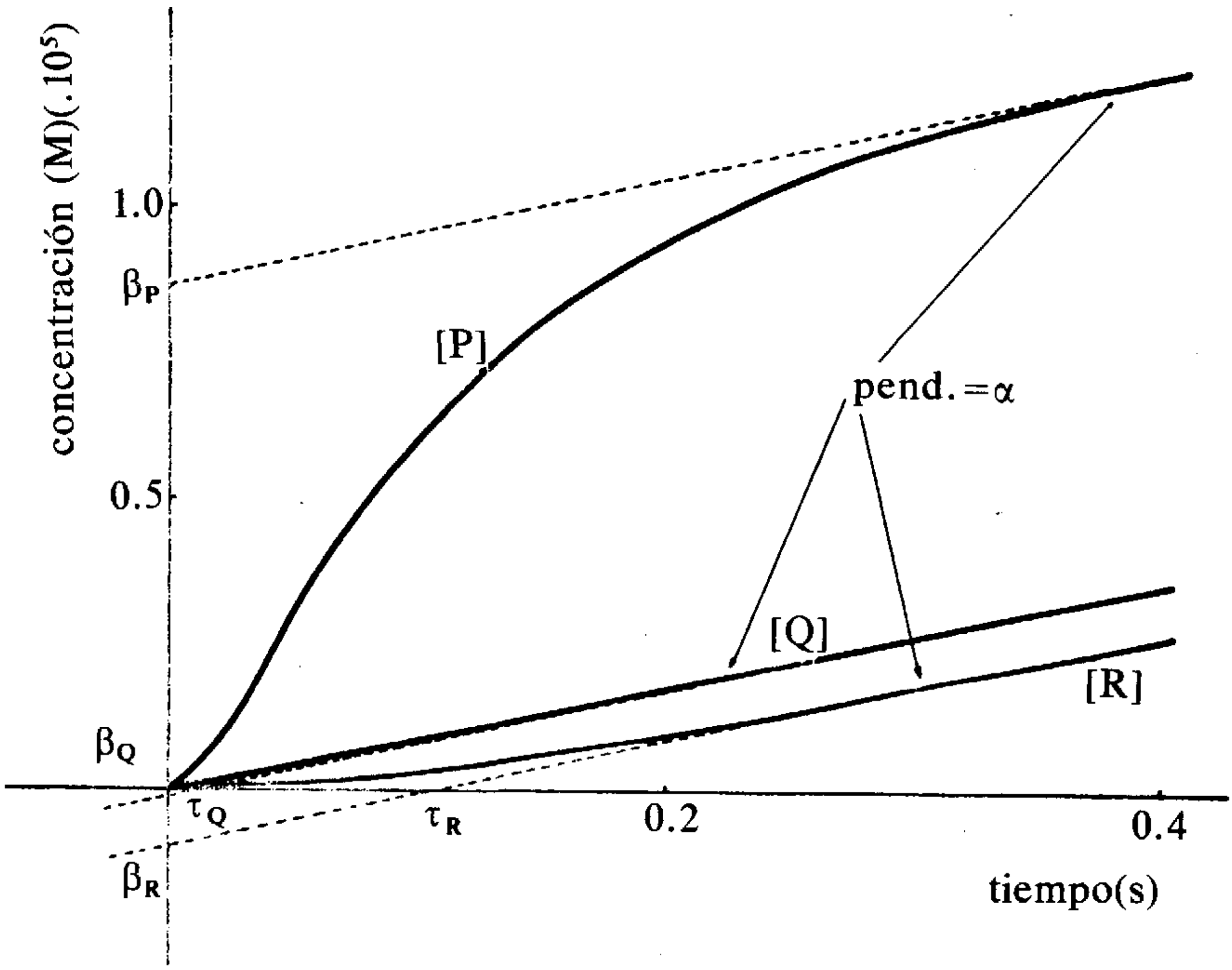


FIGURA 1. Representación de la variación de la concentración de los productos P, Q y R con el tiempo para los siguientes valores de las constantes de velocidad y de equilibrio y de las concentraciones iniciales: $K_A=10^{-3}$ M, $k_2=100\ s^{-1}$, $K_B=10^{-5}$ M, $k_4=1s^{-1}$, $K_C=10^{-5}$ M, $k_6=10\ s^{-1}$, $a_0=10^{-3}$ M, $b_0=3\cdot10^{-3}$ M, $c_0=2\cdot10^{-3}$ M y $e_0=10^{-5}$ M. En todos los casos los tres productos se forman, en el estado estacionario, a la misma velocidad.

y basta sustituir en todas las ecuaciones c_0 por b_0 y tener en cuenta que la concentración de P es ahora igual a [P]+[Q]. Ello conduce a las siguientes ecuaciones para [P]:

$$[P]=\beta_P+\beta_Q+2\alpha t+\sum_{h=1}^{5}(\gamma_{Ph}+\gamma_{Qh})\exp(\lambda_h t) \qquad (23)$$

$$[P]=\beta_P+\beta_Q+2\alpha t \qquad \text{(para el estado estacionario)} \qquad (24)$$

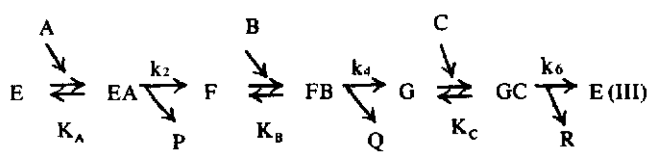
A partir de las ecuaciones (24) y (12)-(14) se obtiene que el período de inducción del producto P es ahora

$$\tau_P=-[(1/2k_4)+(1/k_6)+(1/2k_3b_0)+(1k_5c_0)+ +(k_{-3}/2k_3k_4b_0)+(k_{-5}/k_5k_6c_0)]+(F_4/F_5) \qquad (25)$$

viniendo dados α, β_P, β_Q, γ_{Ph}, γ_{Qh}, F_4 y F_5 por las ecuaciones (12), (13), (14), (16), (17), (A5) y (A6), respectivamente después de sustituir en ellas c_0 por b_0. Por su parte, las λ_h siguen siendo las raíces de la ecuación (1) después de hacer en los coeficientes $F_i(i=0,1,...,5)$ el cambio indicado. A su vez, las ecuaciones correspondientes al producto R no sufren ninguna variación, excepto la ya mencionada de cambiar c_0 por b_0.

Otros mecanismos también pueden ser considerados como casos particulares del (I), si en este último hay una o más constantes de primer (k_i; i=–1, –3, –5, 2, 4, 6) o pseudo primer orden (k_1a_0, k_3b_0, k_5c_0), con valores altos y no muy diferentes, lo que expresamos, en términos matemáticos, estableciendo que estas constantes tienden a infinito y tienen el mismo orden de infinitud (12).

Un ejemplo de estos mecanismos derivados es



el cual resulta si en el mecanismo (I) se verifica:

$$c_i \rightarrow \infty \quad (i=-1,-3,-5,1,3,5) \tag{26}$$

$$c_i/c_j = \begin{cases} 0 \\ \infty \end{cases} \quad (i,j=-1,-3,-5,1,3,5) \tag{27}$$

$$\Rightarrow c_i/c_j \rightarrow 0 \quad (i=2,4,6;\ j=-1,-3,-5,1,3,5) \tag{28}$$

En el mecanismo III se supone que se dan las condiciones de equilibrio rápido, y por tanto, las constantes c_i $(i = -1, -3, -5, 1, 3, 5)$ involucradas en estas etapas tenderán a infinito (12).

Las ecuaciones cinéticas para el mecanismo (III) pueden ser obtenidas de las correspondientes al mecanismo (I) teniendo en cuenta las condiciones (26) – (28). Si en las ecuaciones (A2) – (A6), se procede de esta forma, se obtiene:

$$F_1=k_{-1}+k_{-3}+k_{-5}k_1a_0+k_3b_0+k_5c_0 \tag{29}$$

$$\begin{aligned} F_2={}&k_{-1}(k_{-3}+k_{-5})+k_{-3}k_{-5}+k_1(k_{-3}+k_{-5})a_0+\\ &+k_3(k_{-1}+k_{-5})b_0+k_5(k_{-1}+k_{-3})c_0+\\ &+k_1k_3a_0b_0+k_1k_5a_0c_0+k_3k_5b_0c_0 \end{aligned} \tag{30}$$

$$\begin{aligned} F_3={}&k_{-1}k_{-3}k_{-5}+k_1k_{-3}k_{-5}a_0+k_{-1}k_3k_{-5}b_0+\\ &+k_{-1}k_{-3}k_5c_0+k_1k_3k_{-5}a_0b_0+k_1k_{-3}k_5a_0c_0+\\ &+k_{-1}k_3k_5b_0c_0+k_1k_3k_5a_0b_0c_0 \end{aligned} \tag{31}$$

$$\begin{aligned} F_4={}&k_1k_2k_{-3}k_{-5}a_0+k_{-1}k_3k_4k_{-5}b_0+k_{-1}k_{-3}k_5k_6c_0+\\ &+k_1k_3k_{-5}(k_2+k_4)a_0b_0+k_1k_{-3}k_5(k_2+k_6)a_0c_0+\\ &+k_{-1}k_3k_5(k_4+k_6)b_0c_0+k_1k_3k_5\\ &(k_2+k_4+k_6)a_0b_0c_0 \end{aligned} \tag{32}$$

$$\begin{aligned} F_5={}&k_1k_2k_3k_4k_{-5}a_0b_0+k_1k_2k_{-3}k_5k_6a_0c_0+\\ &+k_{-1}k_3k_4k_5k_6b_0c_0+k_1k_3k_5[k_4(k_2+k_6)+\\ &+k_2k_6]a_0b_0c_0 \end{aligned} \tag{33}$$

Obsérvese que $F_i(i=1,2,\ldots,5)$ tienden a infinito y que

$$f_5 = f_4 = f_3 > f_2 > f_1 \tag{34}$$

Dividiendo los miembros de la ecuación (11) por F_5 y teniendo en cuenta (34), resulta que si intentamos obtener en estas condiciones sus raíces finitas, podemos despreciar los términos $(F_i/F_5)\ \lambda^{5-i}$ $(i=0,1,2)$ frente a los demás, así la ecuación (1) se transforma en la ecuación:

$$(F_3/F_5)\lambda^2+(F_4/F_5)\lambda+1=0 \tag{35}$$

siendo ahora, según las ecuaciones (31)-(33) y (35)

$$\begin{aligned} \lambda_1+\lambda_2={}&-F_4/F_3=-\{[K_BK_Ck_2a_0+K_AK_Ck_4b_0+K_AK_Bk_6c_0+\\ &+K_C(k_2+k_4)a_0b_0+K_B(k_2+k_6)a_0c_0+K_A(k_4+\\ &+k_6)b_0c_0+(k_2+k_4+k_6)a_0b_0c_0]/[K_AK_BK_C+\\ &+K_BK_Ca_0+K_AK_Cb_0+K_AK_Bc_0+K_Ca_0b_0+K_Ba_0c_0+\\ &+K_Ab_0c_0+a_0b_0c_0] \end{aligned} \tag{36}$$

$$\begin{aligned} \lambda_1\lambda_2={}&F_5/F_3=[K_Ck_2k_4a_0b_0+K_Bk_2k_6a_0c_0+K_Ak_4k_6b_0c_0+\\ &+(k_2k_4+k_2k_6+k_4k_6)a_0b_0c_0]/[K_AK_BK_C+K_BK_Ca_0+\\ &+K_AK_Cb_0+K_AK_Bc_0+K_Ca_0b_0+K_Ba_0c_0+K_Ab_0c_0+\\ &+a_0b_0c_0] \end{aligned} \tag{37}$$

En resumen, la ecuación (1) tiene dos raíces finitas, λ_1 y λ_2, que coinciden con las de la ecuación (35), siendo las otras tres raíces, λ_3, λ_4 y λ_5, infinitas, es decir:

$$\lambda_i \rightarrow \infty \quad (i=3,4,5) \tag{38}$$

El resultado (38) permite despreciar los términos exponenciales $\gamma_3\exp(\lambda_3 t)$, $\gamma_4\exp(\lambda_4 t)$ y $\gamma_5\exp(\lambda_5 t)$ de la ecuación (11) frente a los demás, con lo que la acumulación de los productos viene ahora dada por la ecuación

$$[X]=\beta_X+\alpha t+\sum_{h=1}^{2}\gamma_{Xh}\exp(\lambda_h t) \qquad (X \equiv P,\ Q \text{ o } R) \tag{39}$$

Teniendo en cuenta la ecuación (33) la ecuación (12) se transforma, después de simplificar en:

$$\begin{aligned} \alpha={}&k_2k_4k_6a_0b_0c_0e_0/\{K_Ck_2k_4a_0b_0+K_Bk_2k_6a_0c_0+\\ &+K_Ak_4k_6b_0c_0+[k_4(k_2+k_6)+k_2k_6]a_0b_0c_0\} \end{aligned} \tag{40}$$

$$\begin{aligned} \beta_P={}&\alpha[(1/k_4)+(1/k_6)+(K_B/k_4b_0)+(K_C/k_6c_0)-\\ &-(F_4/F_5)] \end{aligned} \tag{41}$$

$$\beta_Q=\alpha[(1/k_6)+(K_C/k_6c_0)-(F_4/F_5)] \tag{42}$$

$$\beta_R=-\alpha F_4/F_5 \tag{43}$$

La ecuación (2) puede escribirse ahora como:

$$T_h=1/[\lambda_h^2(\lambda_p-\lambda_h)\lambda_3\lambda_4\lambda_5] \qquad (h,p=1,2;\ p=h) \tag{44}$$

ya que, debido al resultado (38), $\lambda_i-\lambda_h=\lambda_i$ $(i=3,4,5;\ h=1,2)$. Teniendo en cuenta que $\lambda_3\lambda_4\lambda_5=-F_5/\lambda_1\lambda_2$ y que $\lambda_1\lambda_2=$ $=F_5/F_3$, T_h puede expresarse, después de simplificar, mediante:

$$T_h=1/[\lambda_h^2(\lambda_h-\lambda_p)F_3] \tag{45}$$

donde F_3 viene dado por la ecuación (31).

Si se tienen en cuenta las condiciones (26)-(28) y la ecuación (45) las ecuaciones (16)-(18) se transforman en:

$$\begin{aligned} \gamma_{Ph}={}&k_2\{k_4k_6b_0c_0+[k_4(K_C+c_0)b_0+(K_B+b_0)k_6c_0]\lambda_h+\\ &+(K_B+b_0)(K_C+c_0)\lambda_h^2\}a_0e_0/[\lambda_h^2(\lambda_h-\lambda_p)D]\\ &(h,p=1,2;\ p\neq h) \end{aligned} \tag{46}$$

$$\begin{aligned} \gamma_{Qh}={}&k_2[k_4k_6c_0+(K_C+c_0)\lambda_h]a_0b_0e_0/[\lambda_h^2(\lambda_h-\lambda_p)D]\\ &(h,p=1,2;\ p\neq h) \end{aligned} \tag{47}$$

$$\begin{aligned} \gamma_{Rh}={}&k_2k_4k_6a_0b_0c_0e_0/[\lambda_h^2(\lambda_h-\lambda_p)D]\\ &(h,p=1,2;\ p\neq h) \end{aligned} \tag{48}$$

En las ecuaciones (46)-(48) D es igual a:

$$\begin{aligned} D={}&K_AK_BK_C+K_BK_Ca_0+K_AK_Cb_0+K_AK_Bc_0+K_Ca_0b_0+\\ &+K_Ba_0c_0+K_Ab_0c_0+a_0b_0c_0 \end{aligned} \tag{49}$$

A su vez, las ecuaciones (20)-(22) se transforman, en las condiciones de equilibrio rápido, en:

$$\tau_P = -[(1/k_4)+(1/k_6)+(K_B/k_4b_0)+(K_C/k_6c_0)]+ +(F_4/F_5) \tag{50}$$

$$\tau_Q = -[(1/k_6)+(K_C/k_6c_0)]+(F_4/F_5) \tag{51}$$

$$\tau_R = F_4/F_5 \tag{52}$$

En las ecuaciones (50)-(52) F_4/F_5 es, teniendo en cuenta las ecuaciones (32) y (33),

$$F_4/F_5 = K_BK_Ck_2a_0+K_AK_Ck_4b_0+K_AK_Bk_6c_0+K_C(k_2+ +k_4)a_0b_0+K_B(k_2+k_6)a_0c_0+K_A(k_4+k_6)b_0c_0+ +(k_2+k_4+k_6)a_0b_0c_0/K_Ck_2k_4a_0b_0+K_Bk_2k_6a_0c_0+ +K_Ak_4k_6b_0c_0+[k_4(k_2+k_6)+k_2k_6]a_0b_0c_0 \tag{53}$$

DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE VELOCIDAD

Proponemos a continuación un método para calcular todas las constantes de velocidad del mecanismo (III) basado en el perfil concentración-tiempo del producto R. Si en la ecuación (10) tenemos en cuenta la expresión de α y τ_R dadas por las ecuaciones (40) y (52) resulta:

$$u = p_0(1/b_0c_0)+p_1(1/a_0c_0)+p_2(1/a_0b_0)+ +p_3(1/c_0)+p_4(1/b_0)+p_5(1/a_0)+p_6 \tag{54}$$

estando definidos en el Apéndice los parámetros $p_j(j=0,1,\ldots,6)$.

Una representación de u vs. a_0 manteniendo constante b_0 y c_0 es una recta de pendiente, m, igual a $p_1(1/c_0)+p_2(1/b_0)+p_5$ y de ordenada en el origen, n, igual a $p_0(1/b_0c_0)+p_3(1/c_0)+p_4(1/b_0)+p_6$.

A su vez, una representación de m vs. b_0, permaneciendo constante c_0, es una recta de pendiente, m', igual a p_2 y de ordenada en el origen, n', igual a $p_1(1/c_0)+p_5$. A partir de n', mediante representación vs. c_0, se obtiene p_1 y p_5. Si se procede con n análogamente a como se ha hecho con m, se obtiene p_0, p_3, p_4 y p_6. A partir del conocimiento experimental de p_0, p_1, p_2, p_3, p_4 y p_5 y de las ecuaciones (A7)-(A12) se pueden determinar K_A, K_B, K_C, k_2, k_4 y k_6. Un método alternativo surge a partir de las soluciones de la ecuación (35). Determinando los valores de λ_1 y λ_2 de acuerdo al método descrito en (13) y teniendo en cuenta las ecuaciones (31)-(33).

BIBLIOGRAFÍA

1 FROMM, H. J.: *Biochim. Biophys.* Acta 139, 221-230 (1967).
2 CLELAND, W. W.: *Biochim. Biophys.* Acta 67, 104-137 (1963).
3 DALZIEL, K.: *Biochem. 114,* 547-556 (1969).
4 SEGEL, I. H.: *Enzyme Kinetics*, John Wiley & Sons, New York, pp. 727-735 (1975).
5 GÁLVEZ, J.; VARÓN, R. & GARCÍA CÁNOVAS, F.: *J. Theor. Biol. 89,* 1-17 (1981).
6 VARÓN, R.; GARCÍA MORENO, M.; GARCÍA CÁNOVAS, F. & GARCÍA CARMONA, F.: *Afinidad, 408,* 151-153 (1987).
7 FROMM, H. J.: *Methods in Enzymology 63,* 42-53 (1979).
8 MILNER, Y. & WOOD, H. G.: *J. Biol. Chem. 251,* 7.920-7.927 (1976).
9 MILNER, Y.; MICHAELS, G. & WOOD, H. G.: *J. Biol. Chem. 253,* 878-893 (1978).
10 DARVEY, I. G.: *Theor. Biol. 65,* 465-472 (1977).
11 HEARON, J. Z.: *Ann. N. Y. Acad. Sci. 108,* 36-40 (1963).
12 VARÓN, R.; ROMÁN, A.; GARCÍA CÁNOVAS, F. & GARCÍA CARMONA, F.: *Bull. Math. Biol. 48,* 149-166 (1986).
13 GÁLVEZ, J.; VARÓN, R.; GARCÍA CÁNOVAS, F. & GARCÍA CARMONA, F.: *An. Quim. 79,* 521-527 (1983).

APÉNDICE

Dependencia de los coeficientes $F_i(i=0,1,\ldots,5)$ y pj $(j=0,1,\ldots,6)$ de las concentraciones iniciales de los sustratos y de las constantes de velocidad.

$$F_0 = 1 \tag{A1}$$

$$F_1 = k_{-1}+k_2+k_{-3}+k_4+k_{-5}+k_6+k_1a_0+k_3b_0+k_5c_0 \tag{A2}$$

$$F_2 = (k_{-1}+k_2)(k_{-3}+k_4+k_{-5}+k_6)+(k_{-3}+k_4)(k_{-5}+k_6)+ +k_1(k_2+k_{-3}+k_4+k_{-5}+k_6)a_0+k_3(k_{-1}+k_2+k_4+ +k_{-5}+k_6)b_0+k_5(k_{-1}+k_2+k_{-3}+k_4+k_6)c_0+ +k_1k_3a_0b_0+k_1k_5a_0c_0+k_3k_5b_0c_0 \tag{A3}$$

$$F_3 = (k_{-1}+k_2)(k_{-3}+k_4)(k_{-5}+k_6)+k_1[k_2(k_{-5}+k_6)+ +(k_{-3}+k_4)(k_2+k_{-5}+k_6)]a_0+k_3[(k_{-1}+k_2)(k_4+k_{-5}+ +k_6)+k_4(k_{-5}+k_6)]b_0+k_5[(k_{-1}+k_2)(k_{-3}+k_4+k_6)+ +(k_{-3}+k_4)k_6]c_0+k_1k_3(k_2+k_4+k_{-5}+k_6)a_0b_0+ +k_1k_5(k_2+k_{-3}+k_4+k_6)a_0c_0+k_3k_5(k_{-1}+k_2+k_4+ +k_6)b_0c_0+k_1k_3k_5a_0b_0c_0 \tag{A4}$$

$$F_4 = k_1k_2(k_{-3}+k_4)(k_{-5}+k_6)a_0+k_3(k_{-1}+k_2)k_4(k_{-5}+ +k_6)b_0+k_5(k_{-1}+k_2)(k_{-3}+k_4)k_6c_0+k_1k_3[(k_2+ +k_4)(k_{-5}+k_6)+k_2k_4]a_0b_0+k_1k_5[(k_2+k_6)(k_{-3}+ +k_4)+k_2k_6]a_0c_0+k_3k_5[(k_{-1}+k_2)(k_4+k_6)+ +k_4k_6]b_0c_0+k_1k_3k_5(k_2+k_4+k_6)a_0b_0c_0 \tag{A5}$$

$$F_5 = k_1k_2k_3k_4(k_{-5}+k_6)a_0b_0+k_1k_2(k_{-3}+k_4)k_5k_6a_0c_0+ +(k_{-1}+k_2)k_3k_4k_5k_6b_0c_0+k_1k_3k_5[(k_2+k_6)k_4+ +k_2k_6]a_0b_0c_0 \tag{A6}$$

$$P_0 = K_BK_C/k_4k_6 \tag{A7}$$

$$p_1 = K_AK_C/k_2k_6 \tag{A8}$$

$$p_2 = K_AK_B/k_2k_4 \tag{A9}$$

$$p_3 = (K_C/k_6)[(1/k_2)+(1/k_4)] \tag{A10}$$

$$p_4 = (K_B/k_4)[(1/k_2)+(1/k_6)] \tag{A11}$$

$$p_5 = (K_A/k_2)[(1/k_4)+(1/k_6)] \tag{A12}$$

$$p_6 = (k_2+k_4+k_6)/k_2k_4k_6 \tag{A13}$$