



Colegio de
San Francisco de Paula

Tema 1. Biología Molecular

1.6 Enzimas^{DP/PAU}



Germán Tenorio
Biología NS-Diploma BI



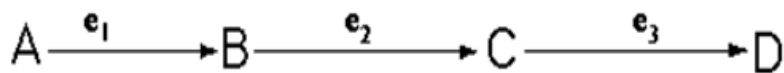
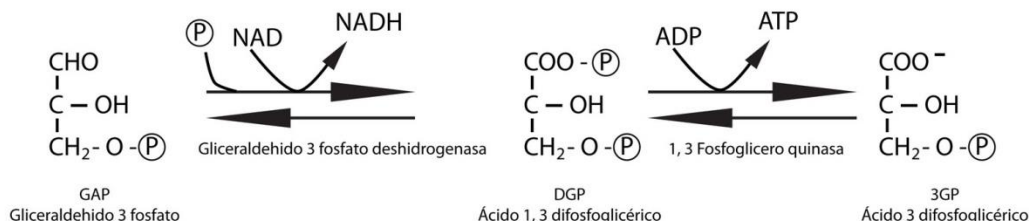
Idea Fundamental: Las enzimas controlan el metabolismo de la célula.



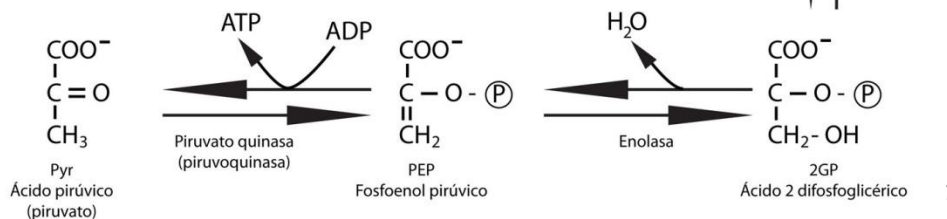


Rutas metabólicas^{DP/PAU}

- Casi todas las reacciones metabólicas en los organismos están catalizadas por **enzimas**. Muchas de estas reacciones ocurren en un determinado orden o secuencia, denominadas **rutas bioquímicas** o **metabólicas**.
- Una ruta metabólica sencilla está constituida por una **cadena de reacciones secuenciales**, donde el producto de una reacción catalizada por un enzima, es el sustrato de la reacción catalizada por la enzima siguiente.



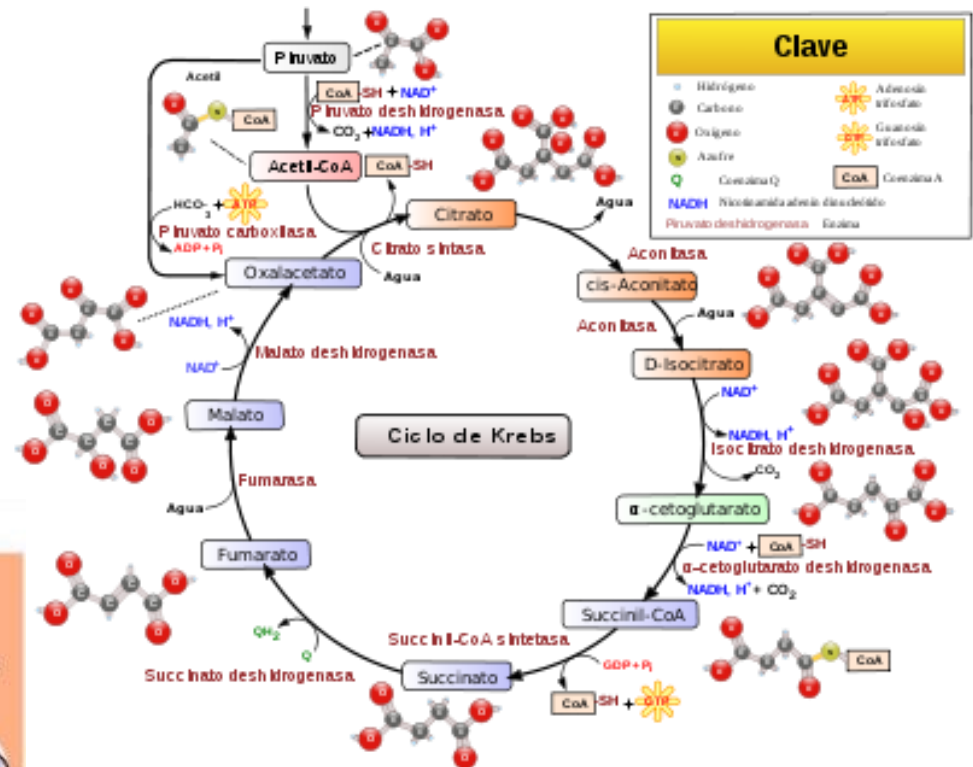
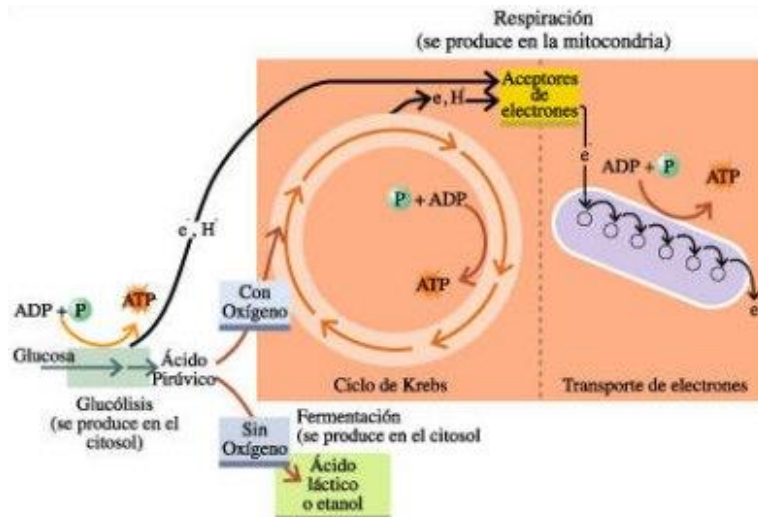
Animación1





Rutas metabólicas^{DP/PAU}

- Algunas rutas metabólicas consisten de **ciclos de reacciones**, y otras de tanto ciclos como de cadenas de reacciones (fotosíntesis y respiración celular).



- Las rutas metabólicas se llevan a cabo en compartimentos concretos de la célula donde se encuentran disponibles las enzimas necesarias.

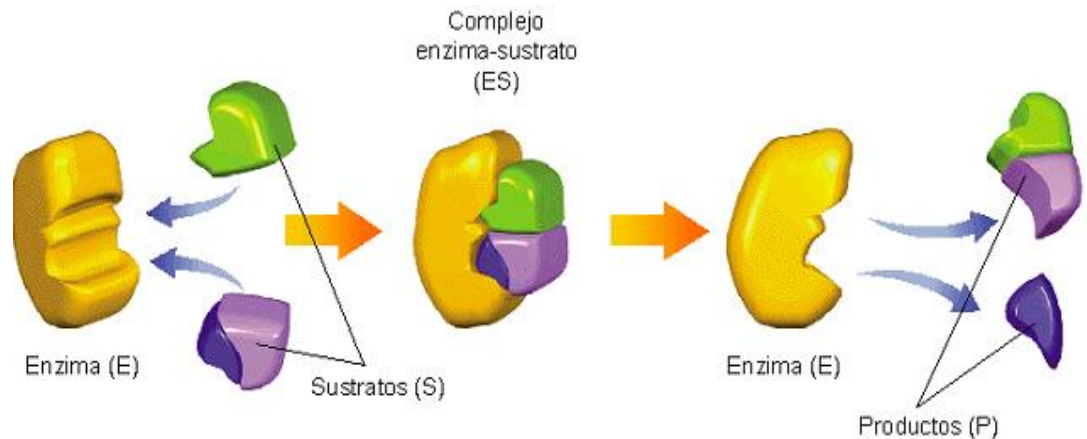
XXXXXXXXXX



Enzimas^{DP/PAU}

- **Las enzimas** se definen como **biocatalizadores** de naturaleza proteica (excepto los ribozimas) que ejercen su acción biológica uniéndose **específicamente** a determinadas moléculas (sustratos), sobre las que inducen cambios químicos, de forma que los convierten en moléculas diferentes (productos).

- Intervienen a muy bajas concentraciones y aceleran las reacciones en las que participan sin sufrir modificación alguna.



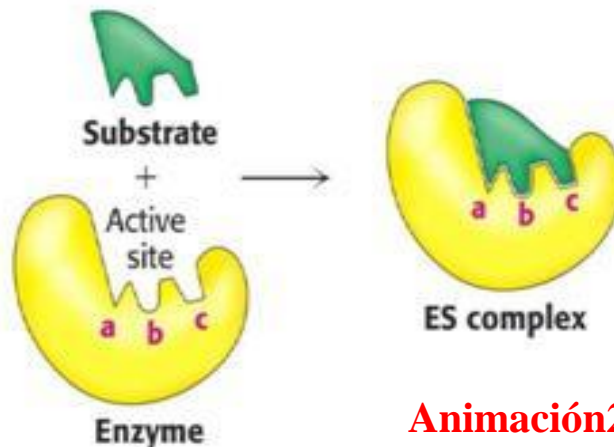
- Un **catalizador** es una sustancia que acelera un determinado proceso químico o una reacción química concreta. Como no se modifican en el curso de la catálisis, pueden utilizarse muchas veces.

Handwritten notes:
m m m m
x x x x x x x x

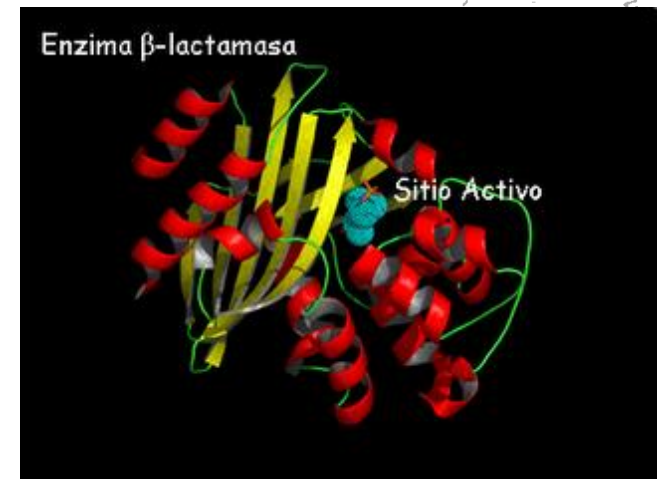


Especificidad enzimática-sustrato^{DP/PAU}

- En el interior celular se encuentran un gran número de moléculas diferentes, posibilitando infinitas reacciones entre ellas.
- Sin embargo, a **temperatura fisiológica**, la mayoría de dichas reacciones **no pueden ocurrir** sin ayuda. Las enzimas multiplican la velocidad de la reacción que catalizan, determinando qué reacciones ocurren en cada tipo celular.
- La **especificidad** de las enzimas se debe a que poseen en su superficie una zona **tridimensional** activa, denominado **sitio** o **centro activo**, al cual se adapta perfectamente la molécula de sustrato específica, que debe tener una geometría complementaria.



Animación2



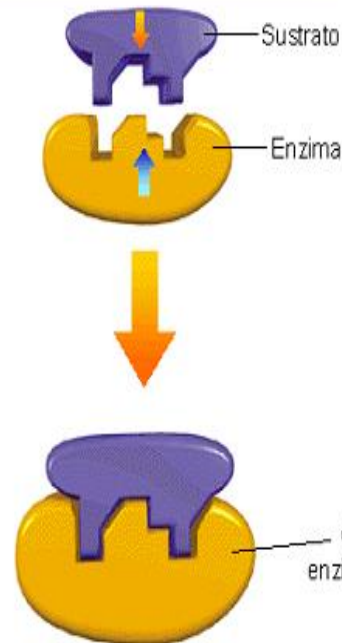


Especificidad enzimática-sustrato^{DP/PAU}

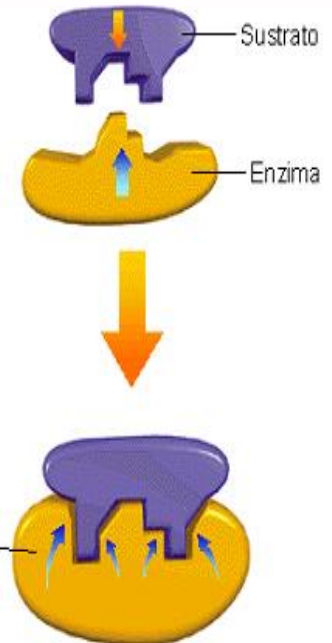
- La unión del enzima con su sustrato puede seguir dos modelos:
 - Modelo de **llave-cerradura**: cada enzima (cerradura) sólo puede unirse (abrirse) con su correspondiente sustrato (llave).

- Modelo del **acoplamiento inducido**: muchos enzimas no presentan el centro activo tan rígido como propone el anterior modelo. Se parece más bien a un guante (centro activo) que adopta la forma de la mano (sustrato) al ponerlo.

MODELO DE LLAVE-CERRADURA



MODELO DE ACOPLAMIENTO INDUCIDO

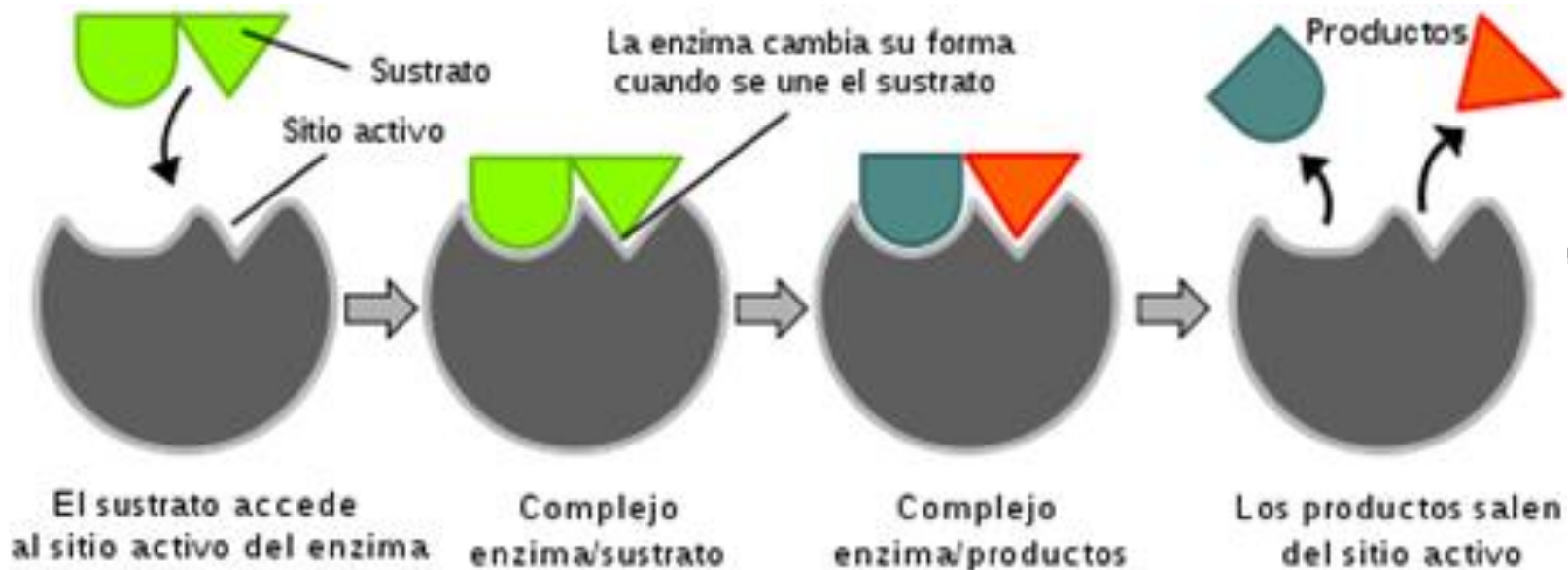


Handwritten signature and scribbles.



Especificidad enzimática-sustrato^{DP/PAU}

- En el modelo del **acoplamiento inducido**, es el propio sustrato el que induce el cambio conformacional del centro activo, el cual sólo adopta la forma totalmente complementaria a la del sustrato después de unirse a él.
- Este modelo, a diferencia del de llave-cerradura, donde cada sustrato es específico para cada enzima, podría explicar la **capacidad de algunas enzimas para unirse a más de un sustrato**.

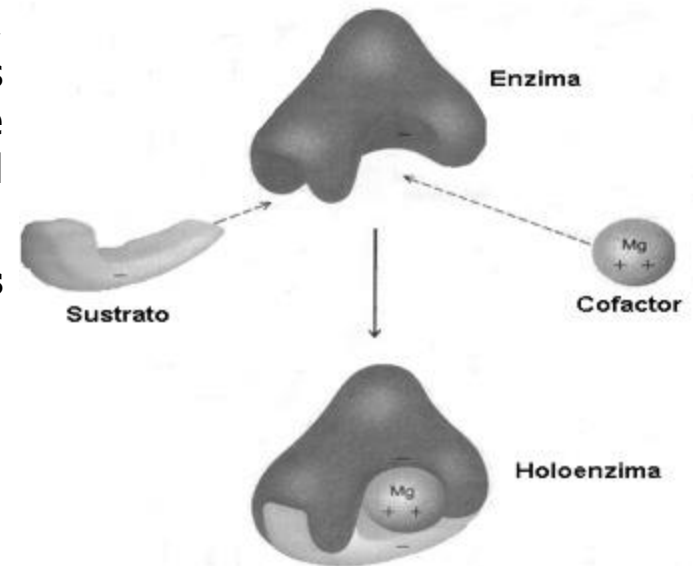


in Lamm
XXXXXXXXXX



Holoenzimas^{PAU}

- Muchos enzimas están formados sólo por aminoácidos, pero otros, denominados **holoenzimas**, carecen en su centro activo de algún componente químico necesario para la catálisis, por lo que necesitan de la ayuda de determinadas sustancias no proteicas denominadas **cofactores**. En estos casos, la parte proteica de la holoenzima se denomina **apoenzima**, que se activa al unirse al cofactor.
- El cofactor puede ser una molécula orgánica, en cuyo caso se denomina **coenzima**. Muchas **vitaminas** son coenzimas o precursoras de coenzimas. Otros coenzimas son el NAD^+ , el FAD, el coenzima A, Q, etc.
- En otras ocasiones los cofactores son **iones minerales** (Mg, Zn, Cu, etc.)



ENZIMAS	Enzimas proteicas		
	HOLOENZIMAS	APOENZIMA	Parte proteica
		Inorgánico	Cationes metálicos Mg^{++} , Fe^{++} , Zn^{++}
		Orgánico	COENZIMA HAD^+ , FAD <hr/> GRUPO PROSTÉTICO Grupo hemo de hemoglobina y citocromos

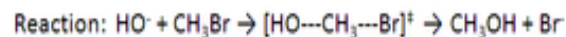
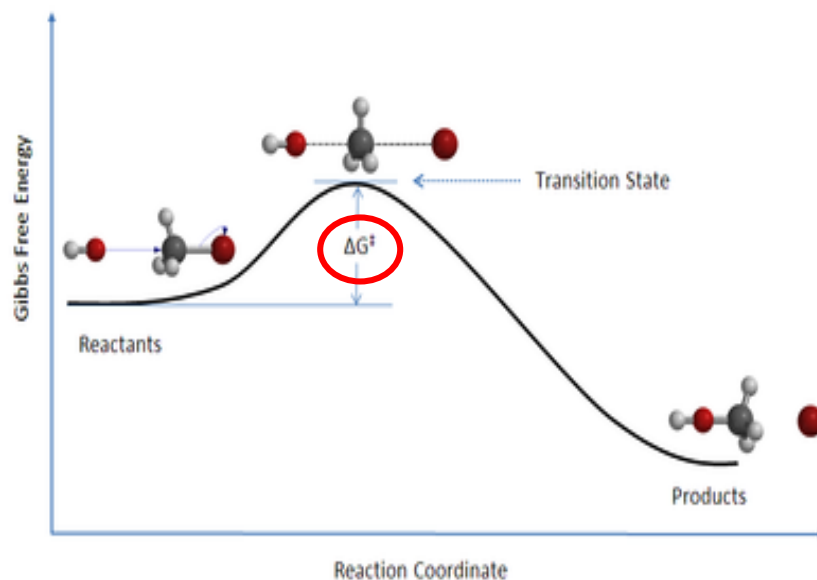
→ Cuando el cofactor se encuentra fuertemente unido.

Handwritten signature



Mecanismo de acción enzimática^{DP/PAU}

- Cualquier reacción química se inicia con la rotura de ciertos enlaces entre los átomos que constituyen las moléculas de los reactivos para formar, posteriormente, los nuevos enlaces que originan las moléculas de los productos.
- Este estado, en el que los enlaces de los reactivos se encuentran debilitados o rotos, pero aún no se han formado los nuevos, se denomina **estado de transición** o **estado activado**.
- Para alcanzar el estado de transición y que la reacción tenga lugar, es preciso comunicar a los reactivos cierta energía, denominada **energía de activación**.
- Esto ocurre tanto en reacciones endotérmicas como en exotérmicas.
- En las reacciones espontáneas esta energía de activación es tan baja que se obtiene de la propia energía cinética de las moléculas o de la luz incidente.



Video1

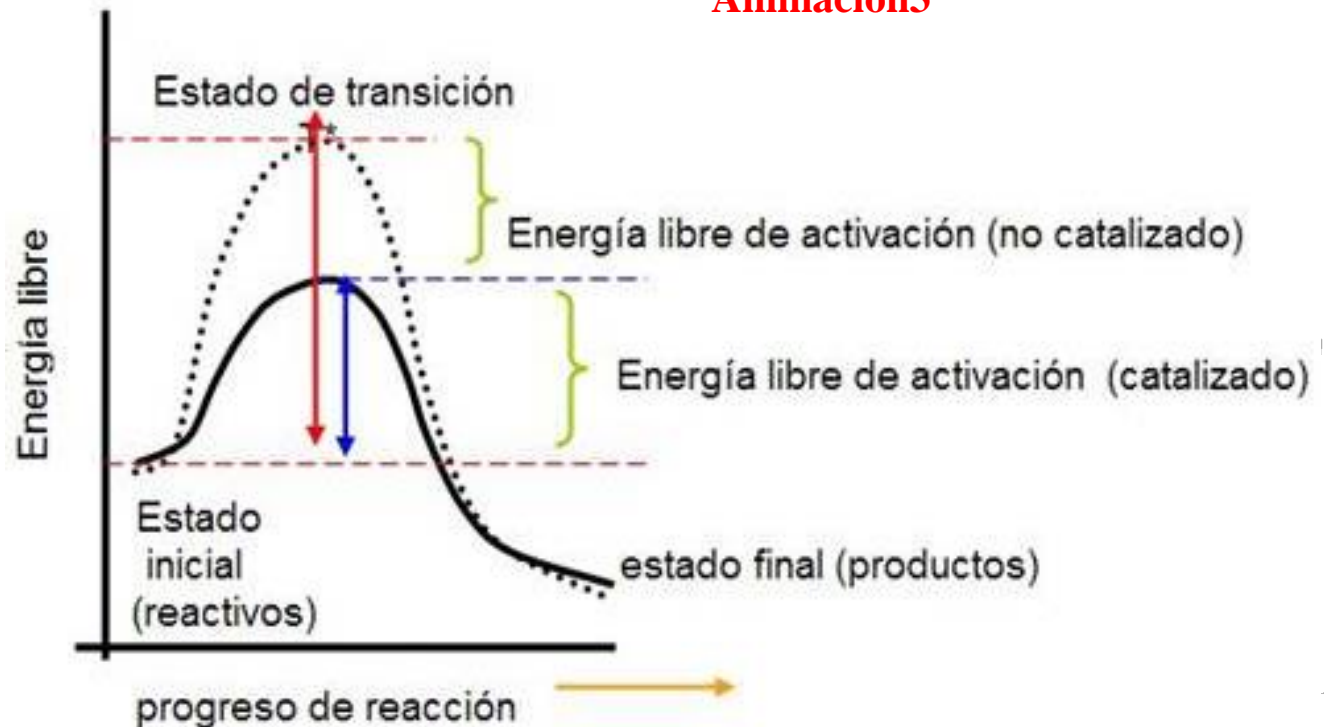
XXXXXXXXXX



Mecanismo de acción enzimática^{DP/PAU}

- La acción catalizadora de las enzimas consiste en debilitar los enlaces de los sustratos, **disminuyendo la energía de activación para alcanzar fácilmente el estado de transición** y permitir que la reacción se lleve a cabo. Sin la presencia de la enzima no es posible alcanzar el estado de transición espontáneamente.

Animación3



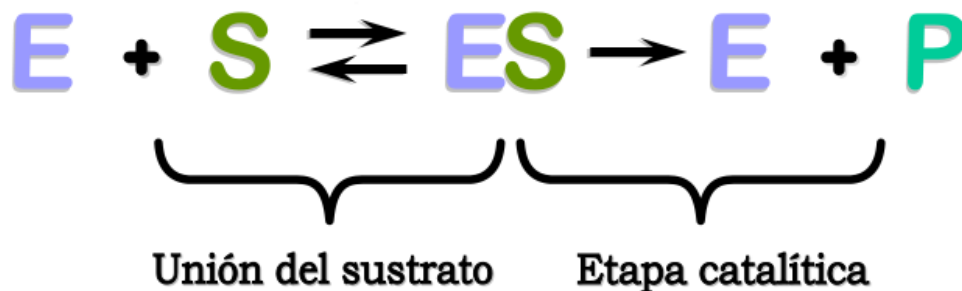
Web2

XXXXXXXXXX



Mecanismo de acción enzimática^{DP/PAU}

- Las enzimas realizan su acción favoreciendo la aproximación de las moléculas de los reactivos, pero no actúan como tales.
- El centro activo de la enzima está formado por ciertos Aa, cuyas cadenas laterales R aportan determinados grupos funcionales activos capaces de **crear las condiciones físicoquímicas óptimas para que el sustrato se transforme en producto**. Así, algunos enzimas aportan en su centro activo un ambiente iónico, otras generan un ambiente apolar, etc.
- Una reacción catalizada enzimáticamente consta de dos reacciones elementales:
 - En primer lugar el S se une al E en una reacción reversible para formar el **complejo ES**.
 - Posteriormente, dicho complejo se descompone y da lugar al P y se regenera el E libre.





Mecanismo de acción enzimática^{DP/PAU}

- Una molécula de sustrato solo puede unirse al sitio activo del enzima si se desplacea muy cerca de él. A este contacto entre una molécula de sustrato y el sitio activo del enzima se denomina **colisión**.
- La mayoría de las reacciones ocurren en un medio acuoso, donde las tanto los sustratos como los enzimas se encuentran en disolución rodeadas de moléculas de agua y en continuo movimiento.
- Este movimiento es al azar y puede ser en cualquier dirección, moviéndose más rápidamente los sustratos que las enzimas, debido a su menor tamaño.

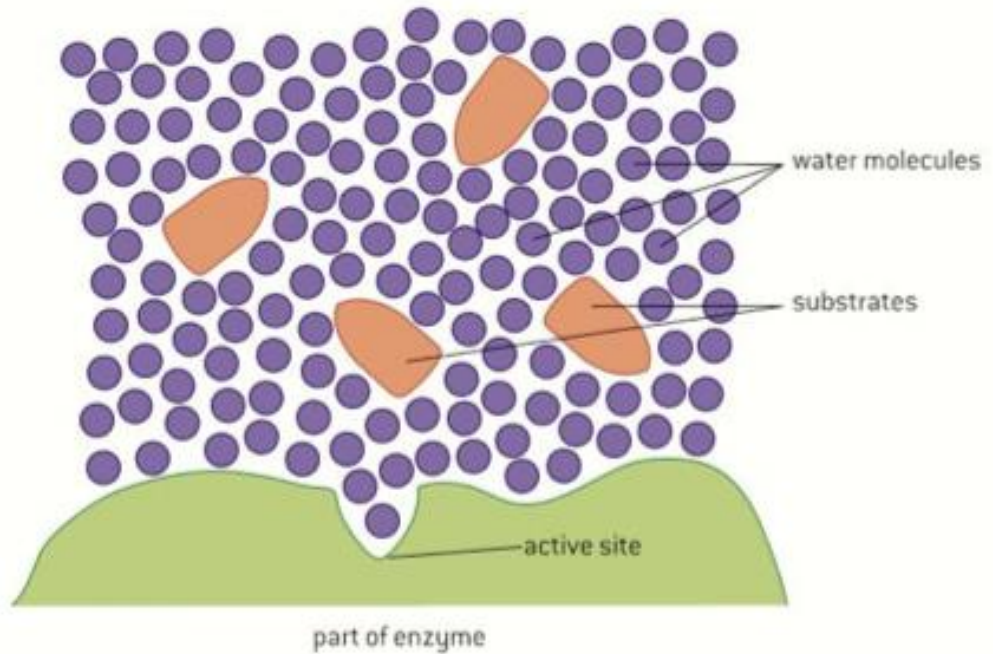


IMAGEN: blog.canacad.ac.jp

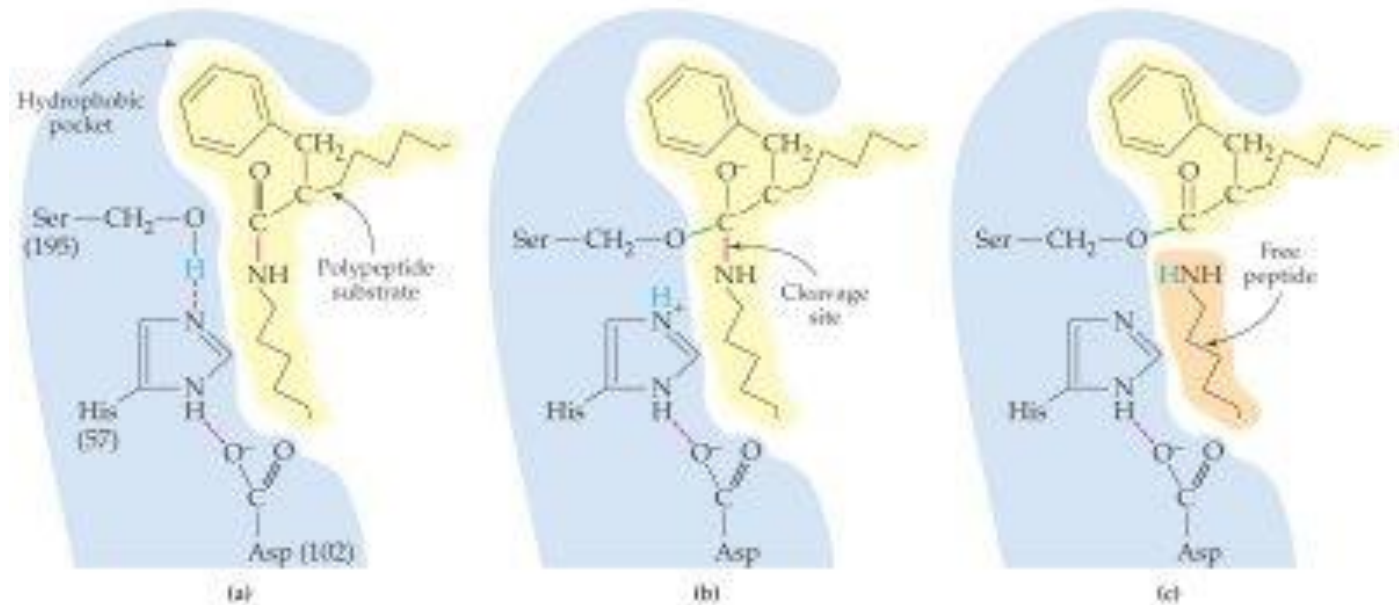
Handwritten signature and scribbles.



Mecanismo de acción enzimática^{DP/PAU}

- Por tanto, aunque muchas colisiones tiene lugar entre las enzimas y sus sustratos, solo aquellas en las que el sustrato interacciona con la geometría complementaria para el sitio activo, permitirá la formación de enlaces entre ambos.

IMAGEN: gleesonbiology.pbworks.com

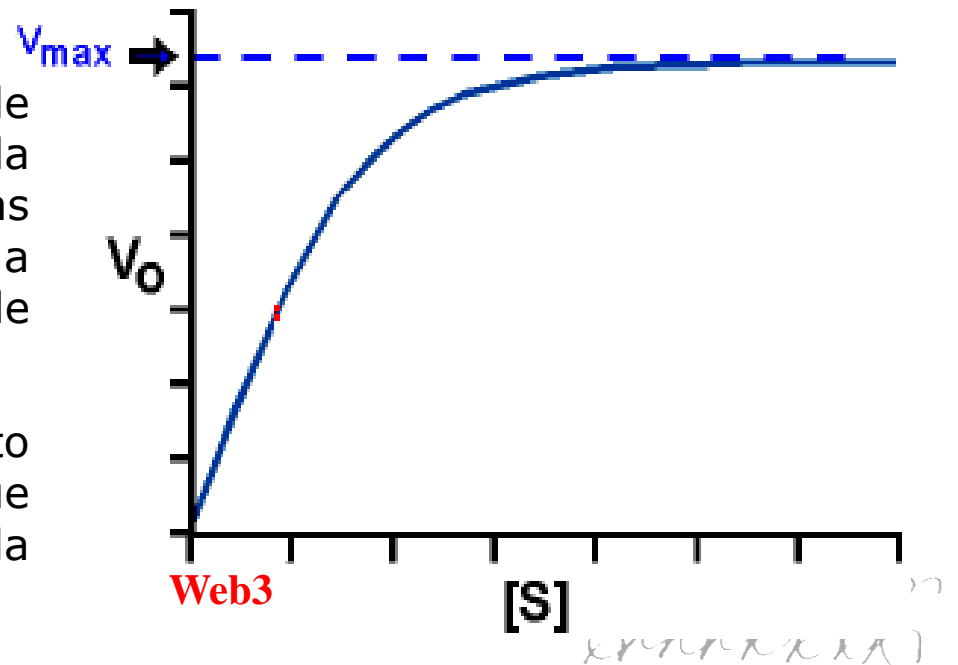


- En resumen, **la catálisis enzimática implica desplazamientos de moléculas y la colisión de los sustratos con el sitio activo.**



Cinética enzimática^{PAU}

- La cinética enzimática estudia la **velocidad o tasa** a la que transcurren las reacciones catalizadas por enzimas y deduce la actividad del E, su afinidad por el S y los mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo la catálisis.
- Si se representa la velocidad con que aparece el P (moles de P por unidad de tiempo) de una determinada reacción enzimática, en función de la concentración de S inicial, para una cantidad constante de enzima, se obtiene el siguiente gráfico:
- Al aumentar la concentración de S, aumenta la velocidad de la reacción, ya que mientras existan moléculas libres de E, a mayor número de moléculas de S más P aparecerá.
- Sin embargo, llega un momento en el que por más sustrato que se añada, la velocidad de la reacción no aumenta ($V_{\text{máx}}$).





Cinética enzimática^{PAU}

- La $V_{m\acute{a}x}$ se alcanza cuando todas las enzimas están trabajando, es decir, tienen sus centros activos ocupados y forman complejos ES.
- Para aumentar dicha velocidad habra que aumentar la concentración de E, que se ha mantenido constante.
- Por tanto, la velocidad de una reacción enzimática es función de ambos parámetros: la cantidad de enzima y la concentración de sustrato.

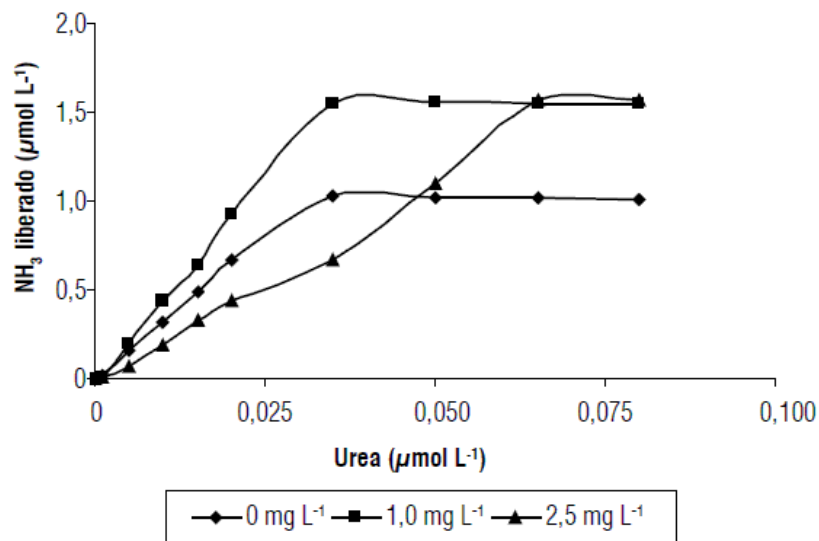


FIGURA 4. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática de la ureasa.

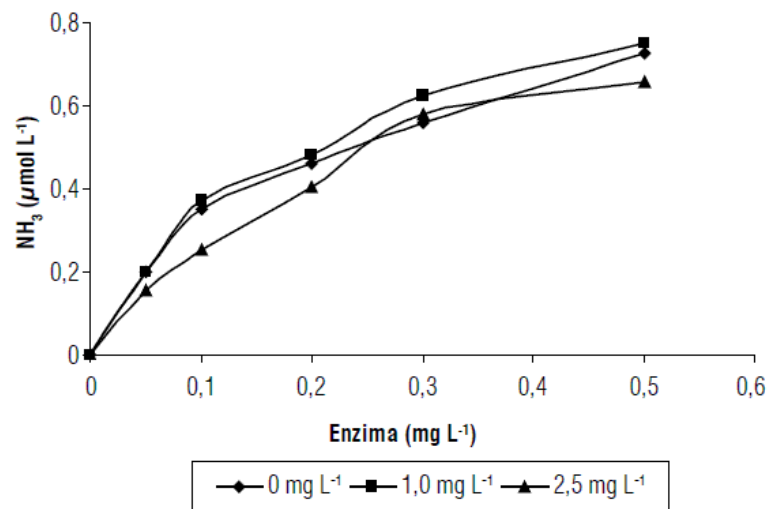


FIGURA 3. Efecto de la concentración de enzima sobre la actividad enzimática de la ureasa.

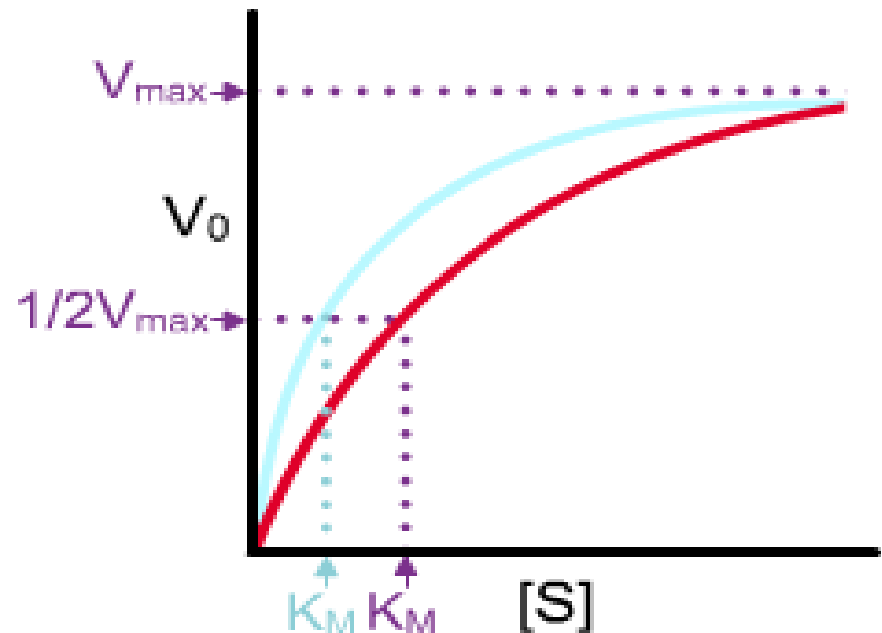
XXXXXXXXXX



Cinética enzimática^{PAU}

- La cinética de una reacción catalizada enzimáticamente responde a la **ecuación de Michaelis-Menten**:
- La **constante de Michaelis (Km)** se define como la concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la velocidad máxima.
- Esta constante es específica para cada enzima y hace referencia a la **afinidad** del enzima por el sustrato, y por tanto, su eficacia catalítica.
- Cuando un E tiene un **valor bajo de Km** significa que consigue una **alta eficacia** catalítica incluso a bajas concentraciones de S.

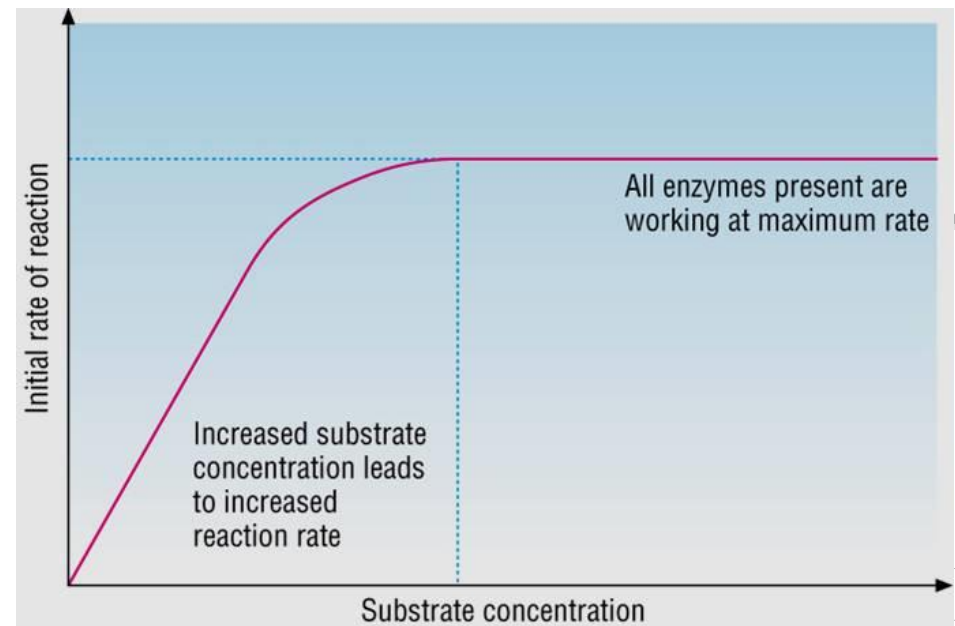
$$V_0 = \frac{V_{\max} (S)}{K_m + (S)}$$





Regulación de la actividad enzimática: Sustrato^{DP/PAU}

- **La temperatura, el pH y la concentración de sustrato afectan a la tasa de actividad de las enzimas.**
- El movimiento aleatorio de las moléculas en una disolución acuosa, hace que las moléculas de sustrato colisionen con el enzima. La enzima no catalizará la reacción hasta que el sustrato no colisione con el sitio activo.
- Si aumenta la concentración de sustrato, estas colisiones tendrán lugar más frecuentemente, aumentando la tasa de actividad enzimática.
- Sin embargo, este aumento de la actividad tendrá lugar hasta que se alcanza una determinada concentración en la que todos los sitios activos están ocupados, e incrementos posteriores de sustrato no tienen efecto sobre la actividad.

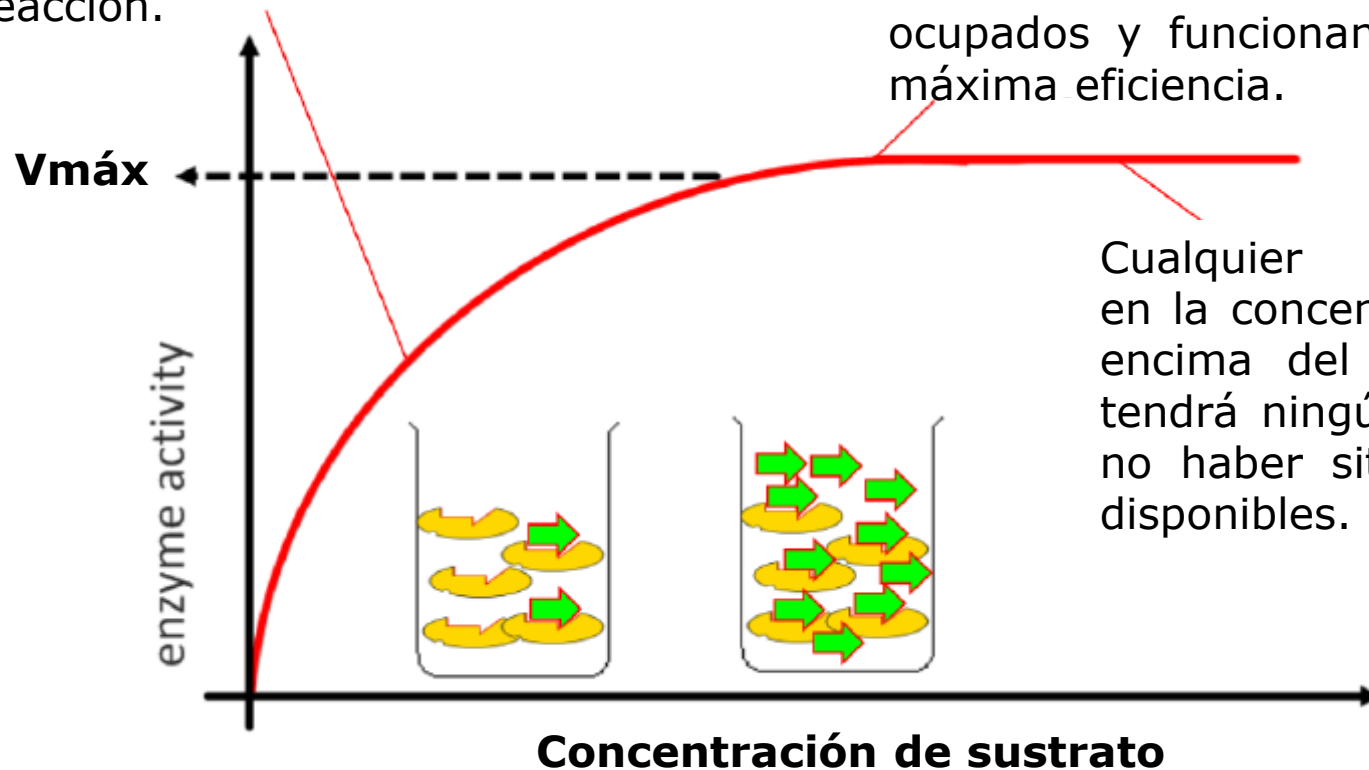




Regulación de la actividad enzimática: Sustrato^{DP/PAU}

Un incremento en la concentración de sustrato conlleva un incremento en la velocidad de la reacción.

A la **concentración óptima** de moléculas de sustrato, todos los sitios activos están ocupados y funcionando a su máxima eficiencia.



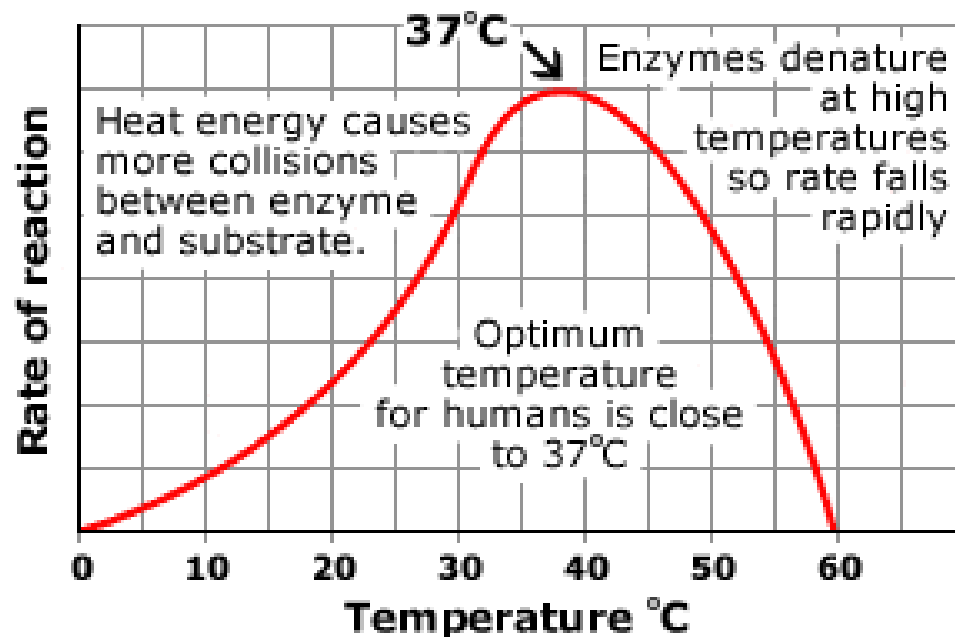
Cualquier incremento en la concentración por encima del óptimo no tendrá ningún efecto al no haber sitios activos disponibles.

mm
XXXXXXXXXX



Regulación de la actividad enzimática: Temperatura^{DP/PAU}

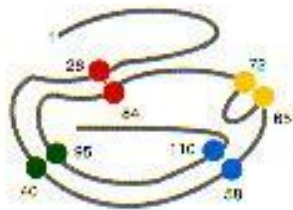
- Como se ha comentado, las moléculas en disolución acuosa poseen una determinada energía cinética, debida al movimiento aleatorio que poseen.
- Al aumentar una disolución, aumenta la energía cinética de las moléculas, por lo que las moléculas de sustrato colisionarán con el sitio activo del enzima con mayor probabilidad. Por tanto, si aumenta la temperatura, aumenta la tasa de actividad enzimática.





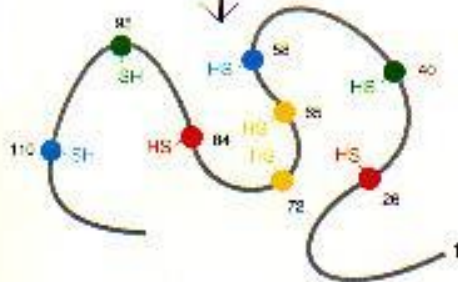
Regulación de la actividad enzimática: Temperatura^{DP/PAU}

- Los enzimas son proteínas y como tales, su estructura, y por tanto, su actividad, se ve influida por los mismos parámetros que afectan al resto de proteínas.



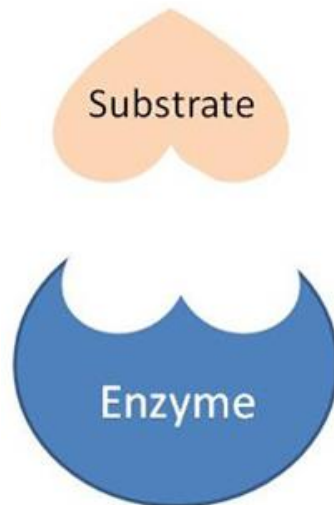
Ribonuclease
nativa

Urea, 6M
 β -mercaptoetanol



Ribonuclease reducida
y desnaturalizada

- Como la función de los enzimas depende de la estructura terciaria (o cuaternaria), la actividad puede llegar a desaparecer si se producen cambios importantes de temperatura que desnaturalicen al enzima, al romperse por vibración los enlaces que mantienen la estructura terciaria y de sitio activo.



Heat
Above 40°C

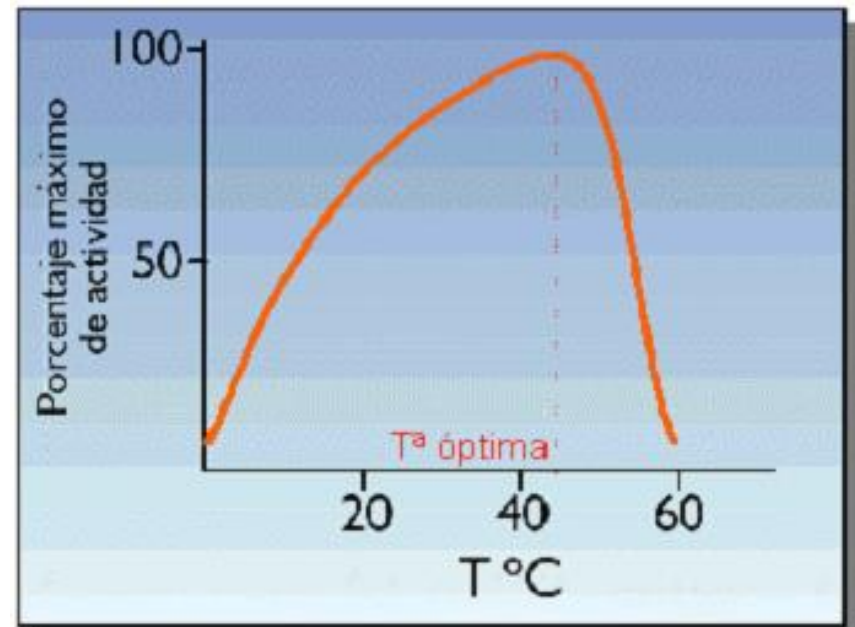


The active site of the enzyme changes shape and can no longer bind to the substrate. It has been **denatured**.



Regulación de la actividad enzimática: Temperatura^{DP/PAU}

- La mayoría de las enzimas se inactivan, al **desnaturalizarse**, a temperaturas superiores a los 50 °C, excepto las que se encuentran en bacterias **termófilas**.
- El descenso de Tª disminuye o anula la actividad enzimática, pero las enzimas no se desnaturalizan, por lo que el proceso es reversible. Por ello, los animales poiquiloterms se ven obligados a hibernar en la estación fría.
- Los demás animales **homeotermos** controlan su temperatura mediante mecanismos homeostáticos, por lo que no necesitan hibernar. Existe una **temperatura óptima** en que la actividad es máxima, a partir de la cual, la actividad decae, conforme más y más enzimas se desnaturalicen.

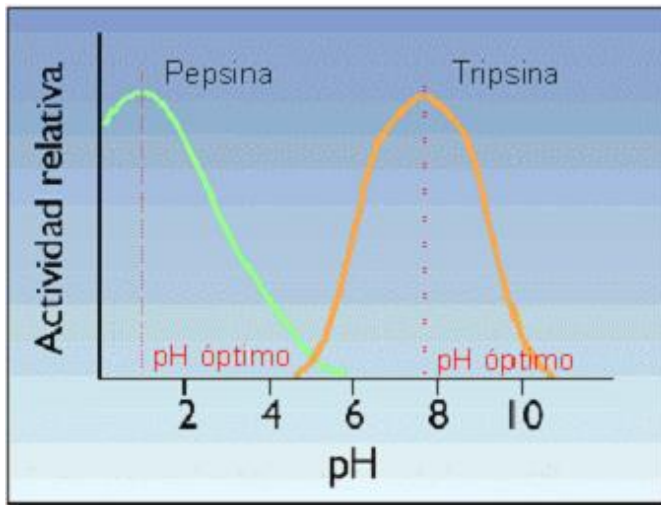


XXXXXXXXXX



Regulación de la actividad enzimática: $pH^{DP/PAU}$

- Las enzimas poseen grupos químicos ionizables (carboxilos, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, tiol, $-\text{SH}$, etc.) en las cadenas R laterales de sus aminoácidos, que según el pH del medio pueden tener carga negativa, positiva o neutra.
- Variaciones en el pH del medio interno ocasionan grandes cambios en la actividad de los enzimas, pues se modifican las cargas superficiales y se altera la conformación espacial de los enzimas, **desnaturalizándolos**.

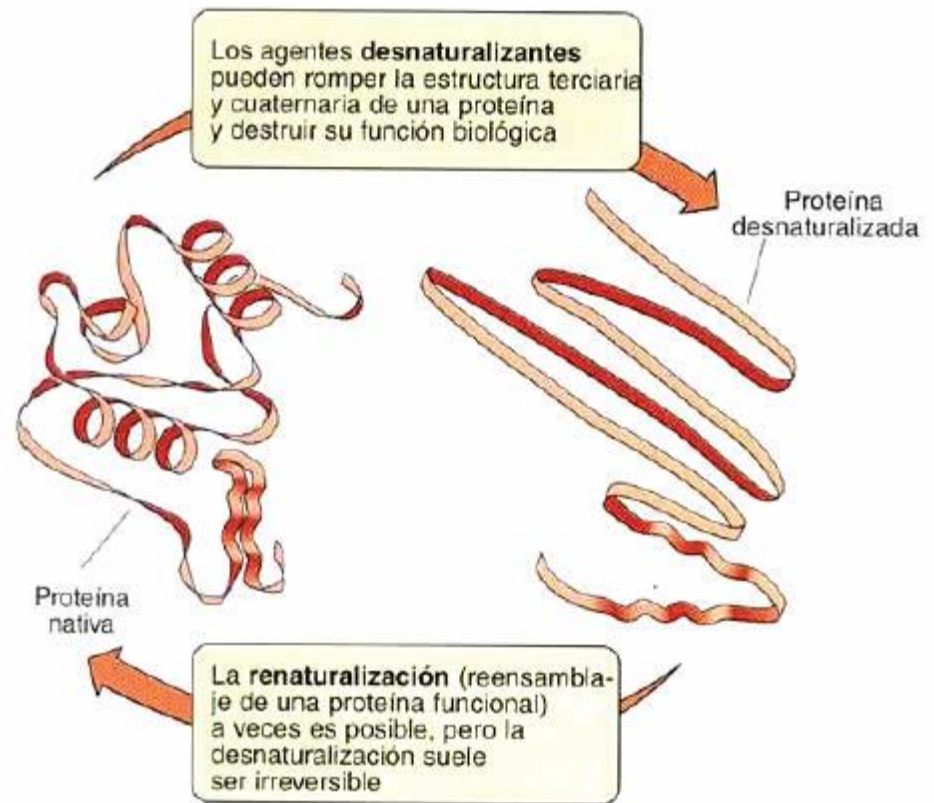


- El **pH óptimo**, en el que la actividad es máxima, varía mucho en los distintos enzimas. Así, la pepsina del estómago está adaptada a un pH ácido, mientras que la tripsina del intestino está adaptada a un pH básico.



Desnaturalización enzimática^{DP/PAU}

- Las enzimas son proteínas, y como tales, su conformación o estructura nativa o tridimensional puede verse afectada de forma irreversible bajo ciertas circunstancias. Es decir, se **desnaturalizan**.
- Las enzimas se desnaturalizan por altas temperaturas o pH ácidos o básicos, perdiendo su estructura terciaria, y por tanto actividad biológica, en este caso, su actividad.
- Cuando un enzima se desnaturaliza, se modifica su sitio activo, de manera que el sustrato no puede volver a unirse.
- En alguno casos, dicha desnaturalización de la enzima, que se encuentra en estado soluble, se vuelva insoluble, precipitando.





NATURALEZA CIENCIAS: Diseño experimental^{DP}

- Todo lo que se conoce acerca de la actividad enzimática, se basa en evidencias experimentales. Para que estas evidencias sean sólidas, dichos experimentos deben diseñarse cuidadosamente siguiendo unos principios básicos, como los siguientes.
 - Los resultados de los experimentos deben ser **cuantitativos** y no sólo descriptivos.
 - Las mediciones deben ser **precisas**, es decir, muy próximas al valor verdadero.
 - Los experimentos deben repetirse para comparar los resultados y evaluar si éstos son **fiables** o no.
 - Los **datos pueden presentarse** en varios formatos, como gráficos lineales y logarítmicos que se pueden analizar para, por ejemplo, averiguar la proporción directa o inversa.

IMAGEN: www.scielo.org.co

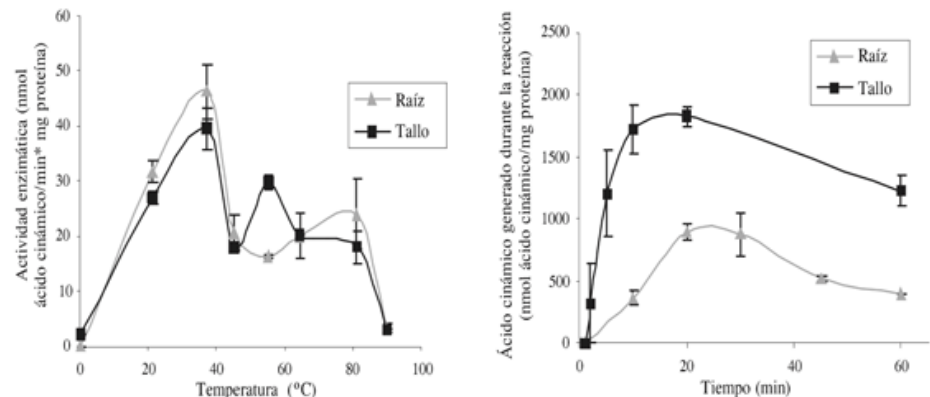


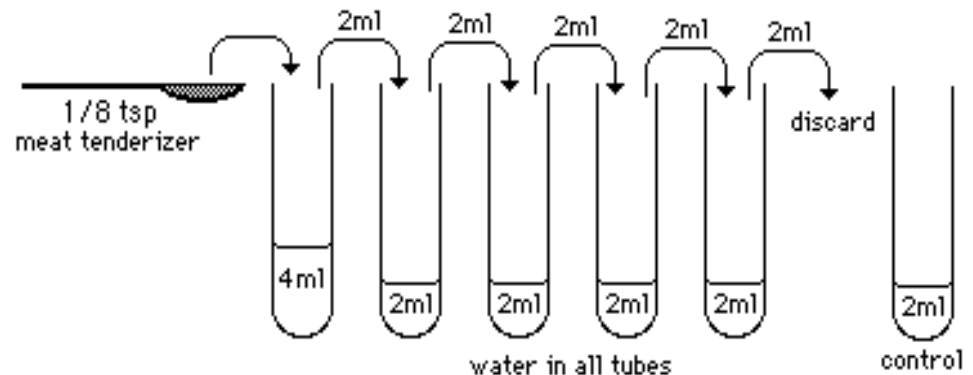
Figura 5. Selección de condiciones para la cuantificación de la actividad de PAL en tallos y raíces de clavel.



HABILIDAD: Diseño de experimentos para comprobar el efecto del pH, temperatura y sustrato sobre la actividad^{DP}

- Algunas recomendaciones que se deben tener en cuenta al diseñar este tipo de experimentos científicos:
- Respecto al factor que se va a investigar, la **variable independiente**, se necesita decidir:

- Cómo conseguir que varíe; por ejemplo, si fuera la concentración de sustrato se debería obtener una disolución con la concentración más alta e ir diluyéndola para obtener concentraciones más bajas.



- En qué unidades se ha de medir, por ejemplo, la temperatura en grados Celsius.
- Cuál sería el rango escogido, incluyendo el valor máximo y el mínimo y los niveles intermedios entre ambos.

Handwritten notes and scribbles at the bottom right of the page.



HABILIDAD: Diseño de experimentos para comprobar el efecto del pH, temperatura y sustrato sobre la actividad^{DP}

- La variable que se va a medir para averiguar cómo el enzima cataliza la reacción es la **variable dependiente**. Se necesita decidir:
 - Cómo se va a medir, incluyendo la elección del dispositivo de medida; por ejemplo, un cronómetro para determinar el tiempo que tarda en cambiar de color un indicador.
 - En qué unidades se medirá la; por ejemplo, en segundos mejor que en minutos u horas para medir un cambio que es rápido.
 - Cuántas repeticiones son necesarias para obtener suficientes datos fiables.



IMAGEN: <http://2.bp.blogspot.com>

XXXXXX



HABILIDAD: Diseño de experimentos para comprobar el efecto del pH, temperatura y sustrato sobre la actividad^{DP}

- Otros factores que pudieran afectar a la variable dependiente son las **variables controladas**. Se necesita decidir:

- ¿Cuáles son todas las variables controladas?
- ¿Cómo se pueden mantener constantes cada una de dichas variables? Es aconsejable utilizar una tabla para ello.
- En qué nivel deben de mantenerse. Por ejemplo, si estamos investigando el pH, la temperatura debería controlarse en el nivel óptimo para la actividad del enzima. Pero los posibles inhibidores del enzima deberían mantenerse en un nivel mínimo.

IMAGEN: <http://hferrier.co.uk/>

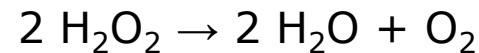


XXXXXX



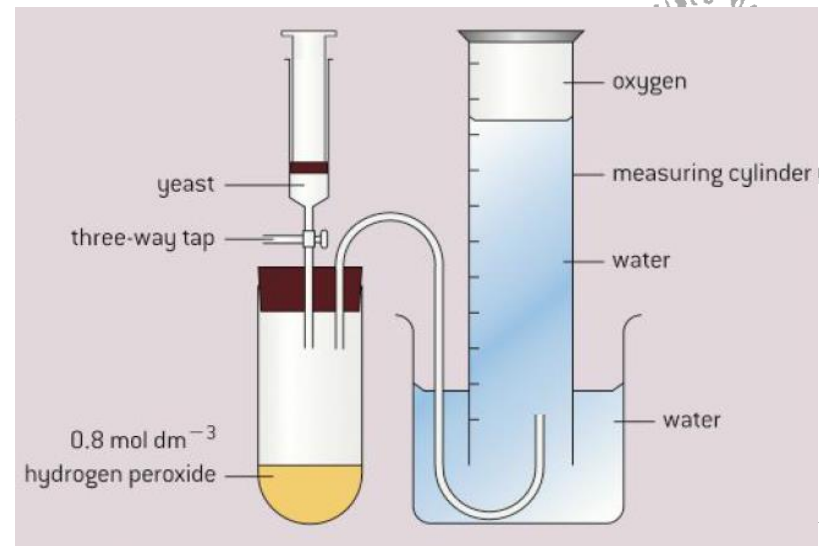
HABILIDAD: Investigación experimental de un factor que afecte la actividad enzimática^{DP}

- Hay muchos experimentos diferentes sobre la actividad de las enzimas. La **catalasa**, por ejemplo, es una enzima muy extendida, presente en células animales y vegetales, que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (agua oxigenada), un subproducto tóxico del metabolismo, en agua y oxígeno molecular:



- Posibles cuestiones que se podrían investigar:

- ¿Cuál es el efecto de la concentración de sustrato sobre su actividad enzimática?
- ¿Cuál es el efecto de la temperatura?
- ¿Cuál es el efecto del pH?
- ¿Qué tipos de células (del hígado, riñón o de semillas en germinación) tiene mayor concentración de catalasa?

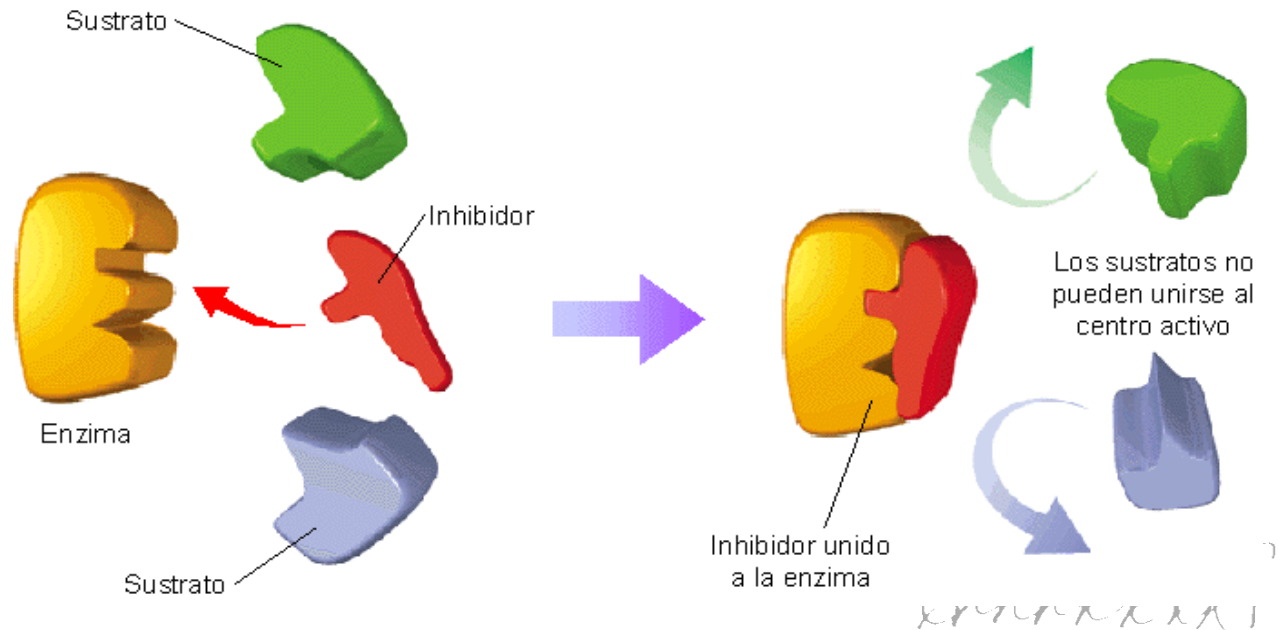




Regulación de la actividad enzimática: Inhibidores^{DP/PAU}

- Determinadas sustancias se comportan como **inhibidores** de la actividad enzimática, ya que disminuyen, o incluso anulan, la velocidad de la reacción catalizada. Pueden ser inhibidores reversibles o irreversibles.

1) Inhibidores reversibles. Es la inhibición más común, donde el enzima vuelve a tener actividad una vez eliminada la sustancia inhibidora. La unión enzima-inhibidor se realiza por enlaces no covalentes, fáciles de romper. **Hay dos tipos**, según el lugar de unión del inhibidor: **Competitiva y No competitiva.**

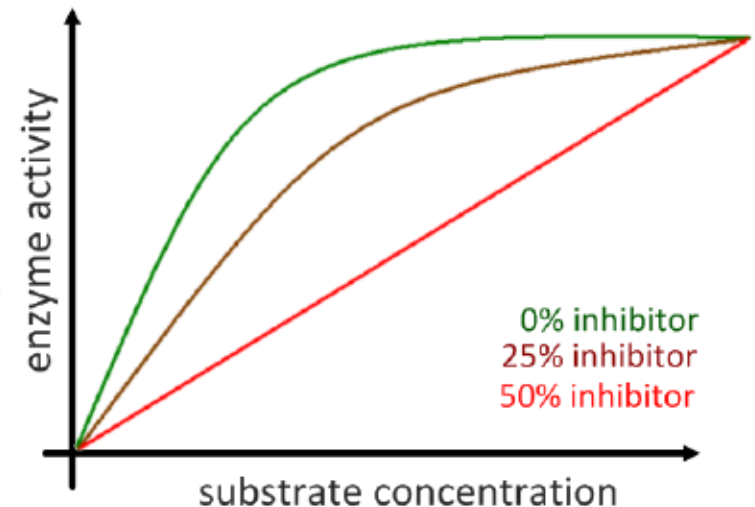
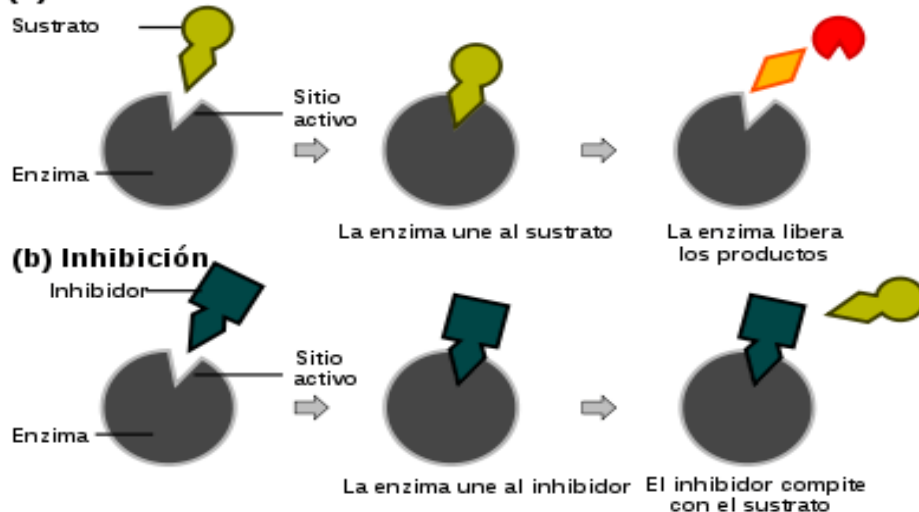




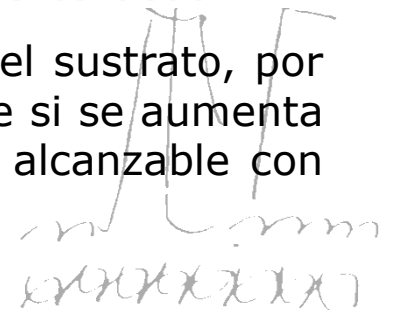
Regulación de la actividad enzimática: Inhibidores^{DP/PAU}

- **Competitiva:** El inhibidor es una sustancia muy parecida al sustrato, por lo que compite con él para entrar en el sitio activo. Si entra el sustrato (a), se produce la reacción, y si entra el inhibidor (b) no hay reacción, hasta que salga y pueda entrar un sustrato.

(a) Reacción



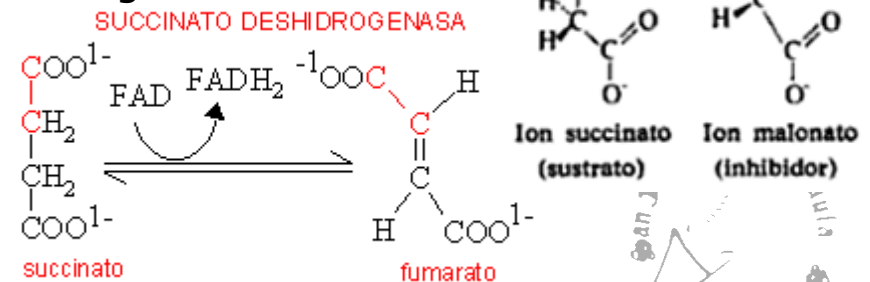
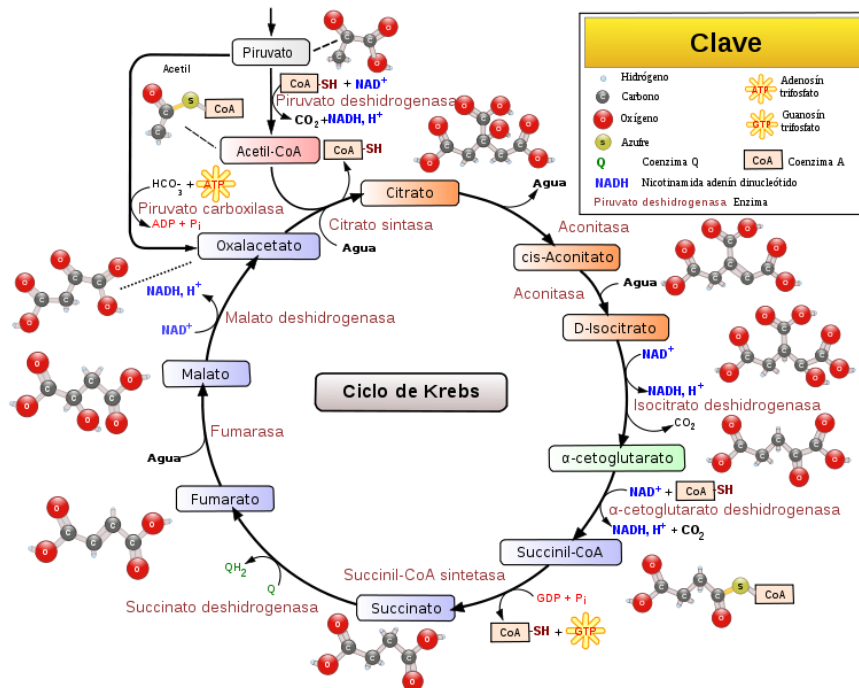
A mayor concentración de inhibidor, mayor competencia con el sustrato, por lo que la tasa de reacción disminuye. Esta inhibición se reduce si se aumenta la cantidad de sustrato (cuestión de probabilidad). La $V_{\text{máx}}$ alcanzable con inhibidor es la misma que sin él.





Ejemplo de Inhibidor Reversible Competitivo^{DP/PAU}

- Un ejemplo clásico de inhibición competitiva es la del **enzima succinato deshidrogenasa por el ión malonato**, al ser estructuralmente similar al ión succinato, que es el sustrato específico de dicha enzima.
- La enzima succinato deshidrogenasa forma parte del **ciclo Krebs**, ruta metabólica mitocondrial que forma parte de la respiración celular para la obtención de energía.

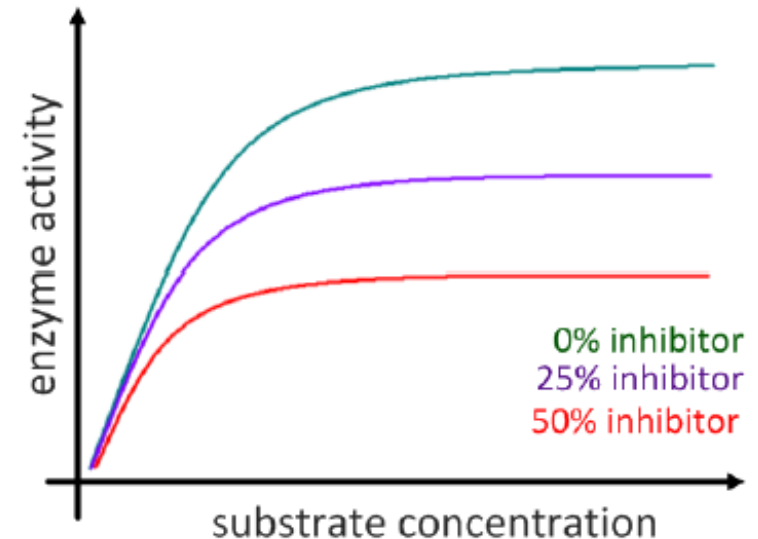
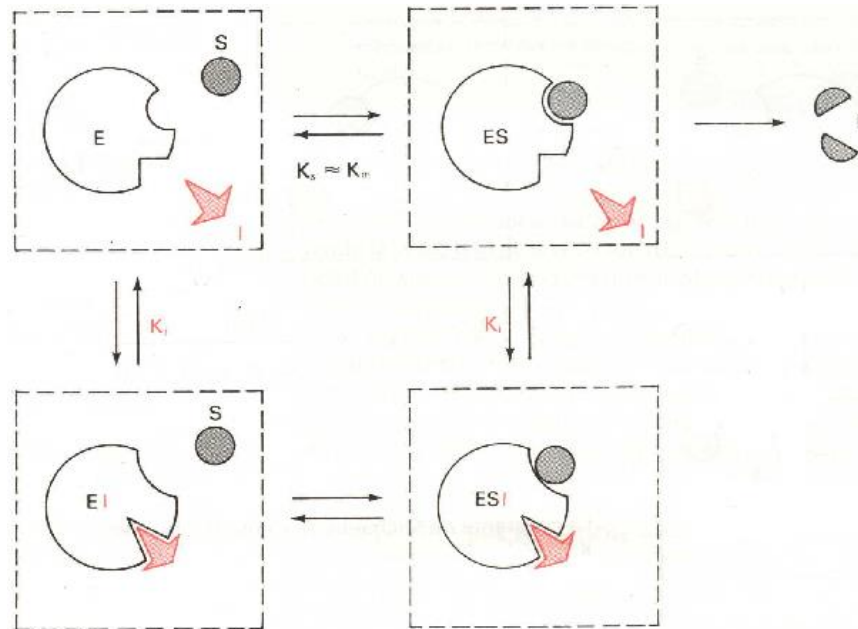


El malonato es un **inhibidor de la respiración celular**, al unirse al sitio activo de la succinato deshidrogenasa en el ciclo de Krebs, compitiendo con el succinato. En la reacción de fosforilación oxidativa (**fotosíntesis**), el malonato es un inhibidor del complejo II que, nuevamente, contiene esta enzima.



Regulación de la actividad enzimática: Inhibidores^{DP/PAU}

- **No competitiva:** El inhibidor se une al enzima por una zona distinta (**sitio alostérico**) al centro activo, por lo que no compete con el sustrato. La unión del inhibidor provoca en el enzima tal alteración de su estructura que dificulta el acoplamiento del sustrato.



Independientemente de la concentración de sustrato, a medida que la concentración de inhibidor aumenta, la velocidad de la reacción disminuye. La V_{máx} alcanzable con inhibidor es menor que sin él, al haber menos sitios activos funcionales.



Ejemplo de Inhibidor Reversible NO competitivo^{DP/PAU}

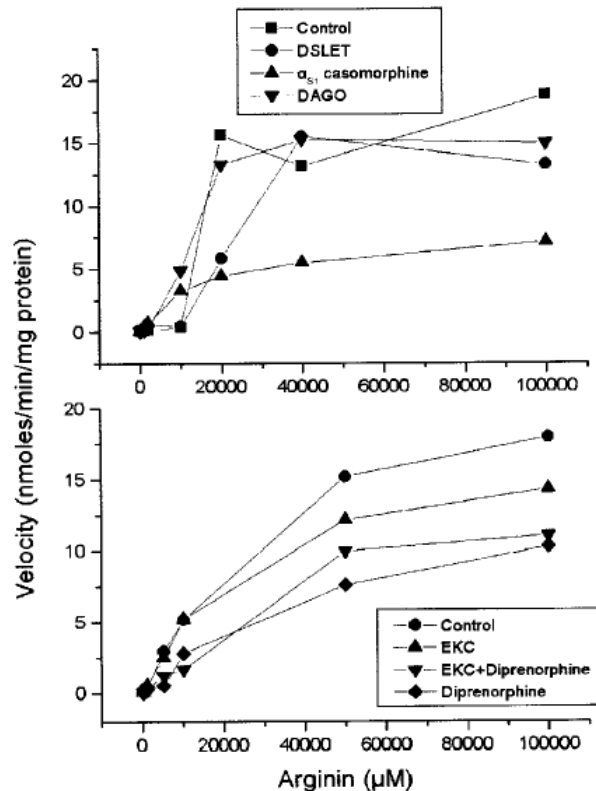
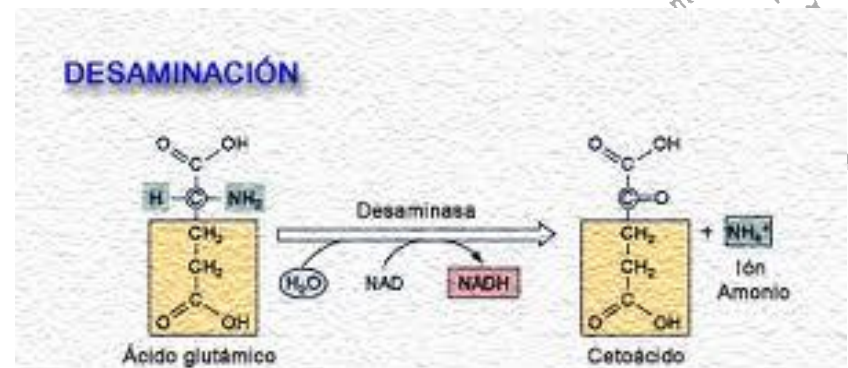


Figure 5 Effect of opioids on NOS reaction rate as a function of substrate (arginin) concentrations. T47D cells were harvested, nuclei and unbroken cells were eliminated as described in the legend of Figure 4, and NOS assay was performed as described in Material and Methods, in the presence of a constant concentration of labeled and increasing concentrations of unlabeled arginin, in the absence (control), or in the presence of 10^{-8} M of the different opioid agonists. The opioid antagonist diprenorphine was added at 10^{-6} M. Results of a typical experiment, repeated three times with similar results

- A finales del siglo XX el óxido nítrico (NO) fue reconocido como una importante molécula mensajera en mamíferos, siendo un importante regulador de muchas funciones, incluyendo la vasodilatación y la neurotransmisión.
- El NO es una molécula gaseosa producida por la desaminación de la arginina a citrulina por la enzima **óxido nítrico sintasa** (NOS).



Los **opioides actúan como inhibidores reversibles no competitivos** de esta enzima, modificando su actividad enzimática.



Comparación inhibición Reversible Competitiva y NO competitiva^{DP/PAU}

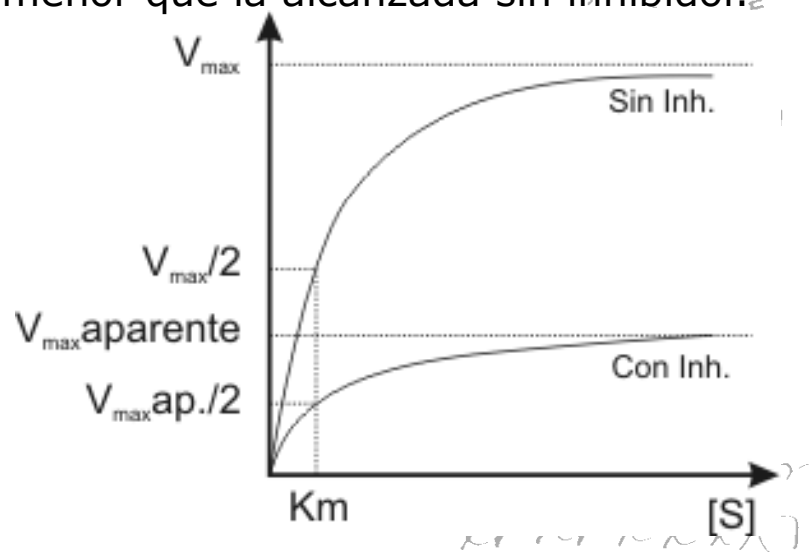
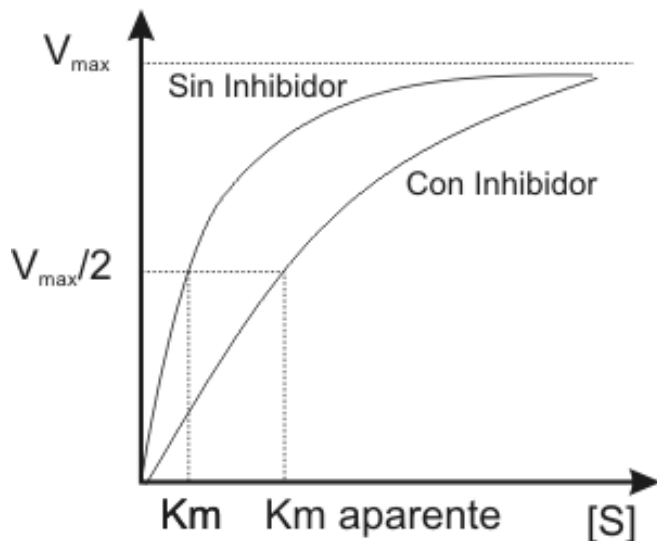
Competitiva	NO competitiva
Inhibidor se une al sitio activo.	Inhibidor se une a otro lugar distinto (sitio alostérico) del sitio activo.
Inhibidor similar estructuralmente al sustrato.	Inhibidor no similar estructuralmente al sustrato.
El inhibidor no cambia la forma del sitio activo del enzima.	El inhibidor cambia la forma del sitio activo del enzima.
Un incremento de la concentración de sustrato reduce la inhibición (aumenta la tasa de reacción).	Un incremento de la concentración de sustrato no afecta a la inhibición (no afecta a la tasa de reacción).
Un ejemplo es la succinato deshidrogenasa que es inhibida por el malonato.	Un ejemplo es la piruvato kinasa que es inhibida por la alanina.
Ambos tipos de inhibidores reducen la actividad enzimática.	
Ambos tipos de inhibidores se unen al enzima.	
Ambos tipos de inhibidores previenen que el sustrato se una al sitio activo del enzima.	





HABILIDAD: Distinción tipos inhibición en gráficas^{DP/PAU}

- Se puede **distinguir entre diferentes tipos de inhibición en gráficas con una concentración de sustrato especificada.**
- En la **inhibición competitiva**, cuando la concentración de sustrato comienza a superar a la de inhibidor, puede alcanzarse la tasa máxima de la enzima sin inhibir, sin embargo, se necesitan concentraciones mayores de sustrato.
- En la **inhibición no competitiva**, aquellos enzimas que no se han unido al inhibidor actuarán como la enzima sin inhibidor, mientras que aquellos que sí se hayan unido, no podrán unirse al sustrato y no tendrán actividad alguna. Se alcanza por tanto la tasa máxima a la misma concentración de sustrato, pero esta tasa es menor que la alcanzada sin inhibidor.

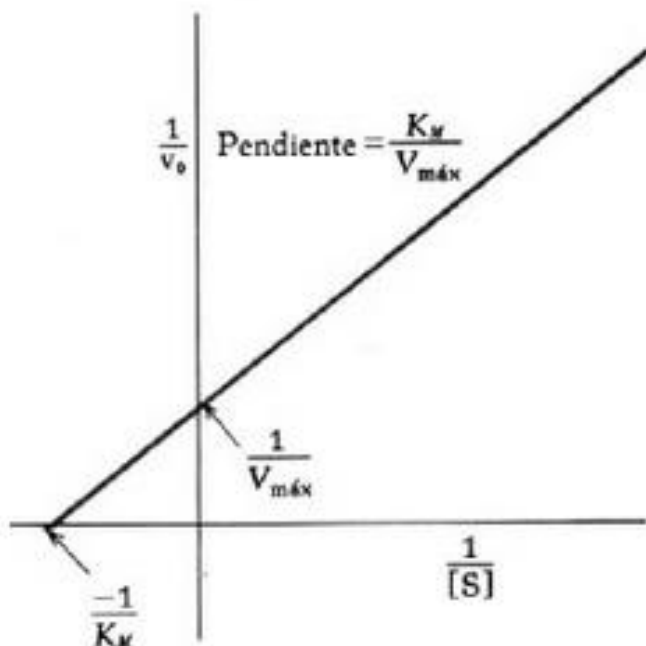




Ecuación de Lineweaver-Burk: Determinación K_m y $V_{m\acute{a}x}$ ^{PAU}

- Esta ecuación es la recíproca a la de Michaelis-Menten, y se emplea como herramienta gráfica para calcular los parámetros cinéticos de una enzima, al ser fácilmente representable.

$$V_0 = \frac{V_{\max} (S)}{K_m + (S)}$$



Ecuación de una recta:

$$y = ax + b$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

a = pendiente = K_M/V_{\max}

corte en abcisas ($y = 0$): $-1/K_M$

corte en ordenadas ($x = 0$): $1/V_{\max}$

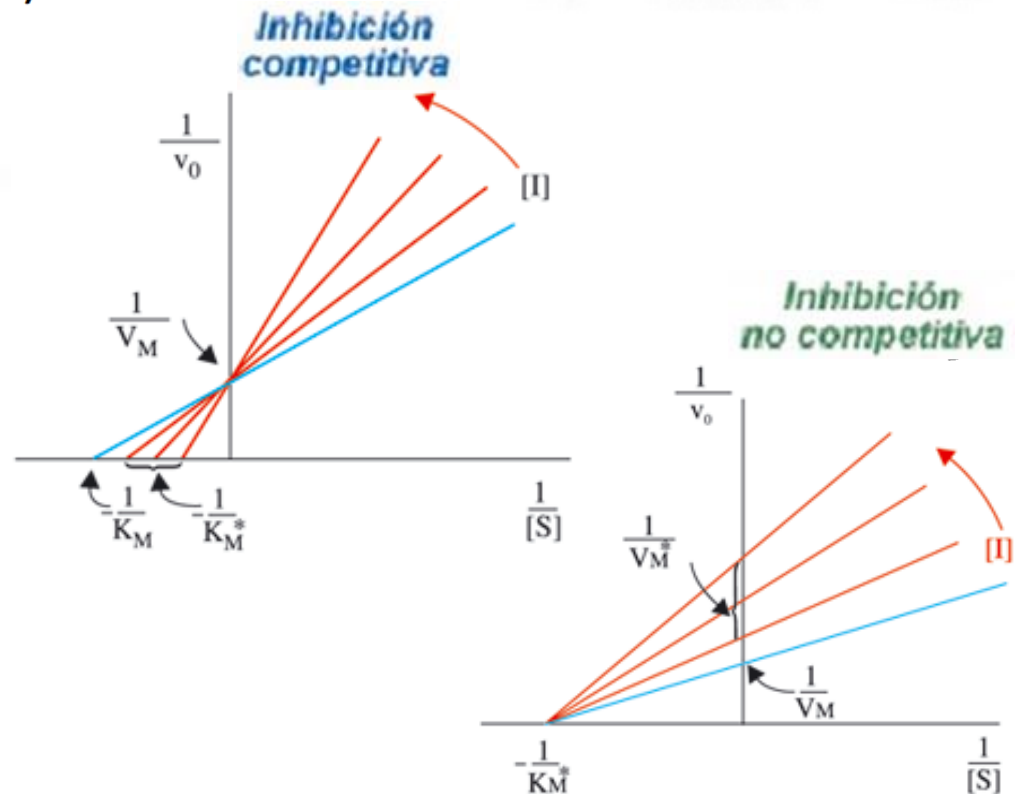
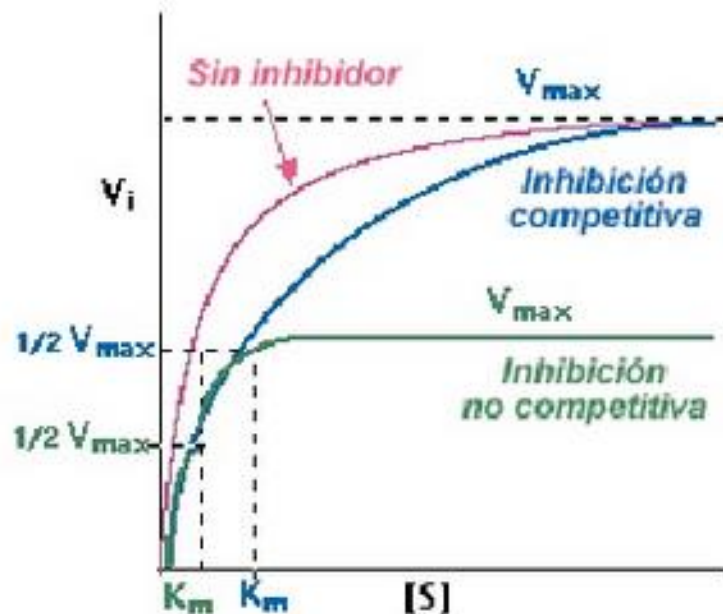
XXXXXXXXXX



Ecuación de Lineweaver-Burk: Inhibición reversible^{PAU}

Michaelis-Menten:
$$V_o = \frac{V_{\max} (S)}{K_m + (S)}$$

Lineweaver-Burk:
$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

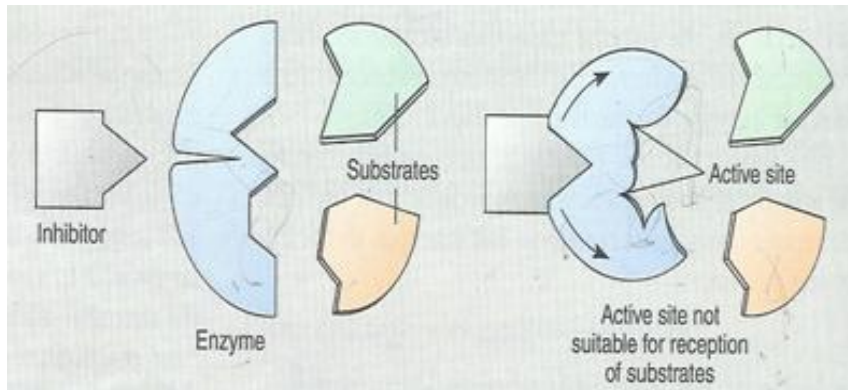


XXXXXXXXXXXX



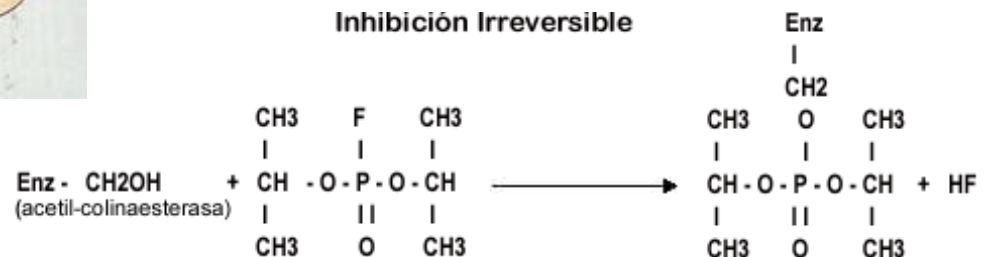
Regulación de la actividad enzimática: Inhibidores^{DP/PAU}

2) Inhibidores irreversibles. Los inhibidores irreversibles son generalmente específicos para un tipo de enzima y no inactivan a cualquier proteína. Funcionan uniéndose covalentemente (enlace fuerte) al enzima de manera que alteran específicamente la estructura tridimensional del sitio activo e inhabilita al enzima.



Los inhibidores irreversibles dan lugar a una inhibición dependiente del tiempo. La cantidad de enzima activa a una concentración dada de inhibidor será diferente dependiendo del tiempo de preincubación del inhibidor con la enzima.

Actividad1

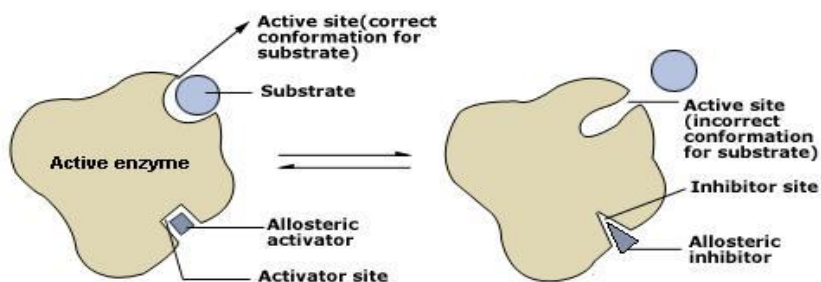


Un ejemplo son los gases nerviosos, como el fluorofosfato de diisopropilo (DFP) que forma un complejo con la **enzima acetilcolinesterasa**, encargada de sintetizar el neurotransmisor acetilcolina. Los animales envenenados con este gas quedan paralizados, debido a la imposibilidad de transmitir adecuadamente los impulsos nerviosos.



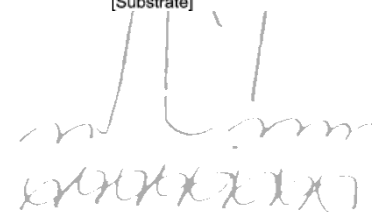
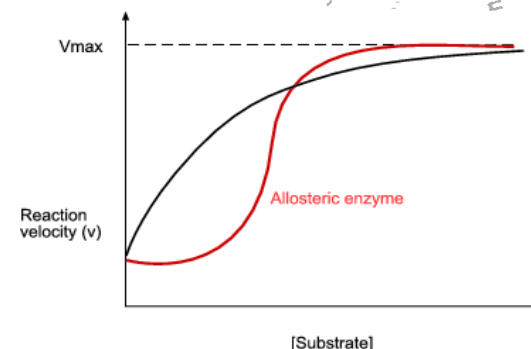
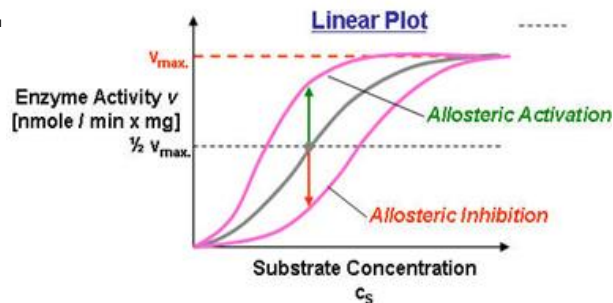
Enzimas alostéricos^{PAU}

- Son enzimas que, además del sitio activo, poseen un sitio o **centro alostérico** (regulador). Este segundo lugar es distinto al centro activo, y cuando se une a él la sustancia adecuada, inhibe o acelera la reacción catalizada por la enzima.



Schematic representation of allosteric enzyme activity

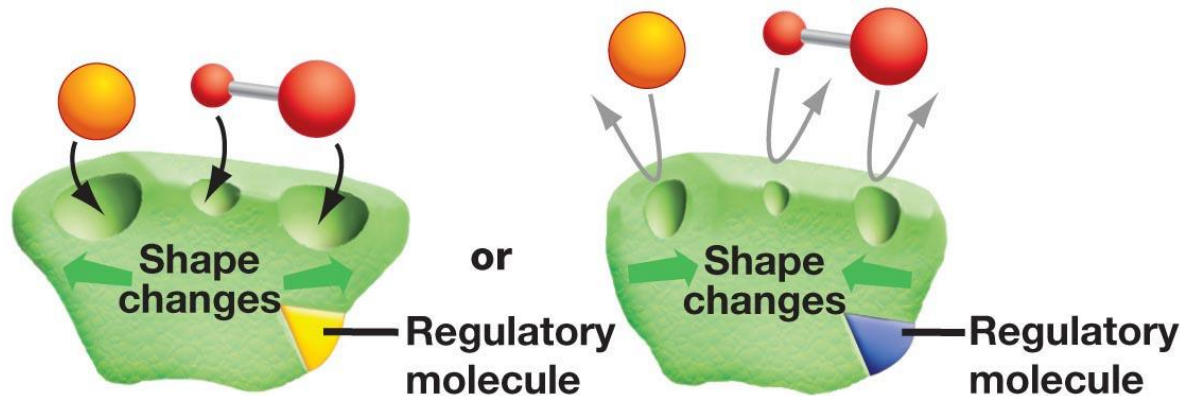
- Estas enzimas suelen contar con más de una cadena polipeptídica, presentando estructura 4^a.
- Estas enzimas presentan curvas diferentes a la hiperbólica de Michaelis-Menten, teniendo en la mayoría de los casos un aspecto sigmoidal.
- La regulación alostérica se basa en cambios en la conformación de la enzima, debidos a la unión no covalente de efectores al centro alostérico, determinando cambios en la actividad catalítica. Hay **2 posibilidades**.





Enzimas alostéricos^{PAU}

- **Activación.** Se debería decir hiperactivación, ya que en este caso la unión del sustrato al centro alostérico modifica de tal forma al enzima que aumenta su afinidad por el sustrato, con lo que aumenta la velocidad de catálisis del enzima.



Allosteric activation

The active site becomes available to the substrates when a regulatory molecule binds to a different site on the enzyme.

Allosteric deactivation

The active site becomes unavailable to the substrates when a regulatory molecule binds to a different site on the enzyme.

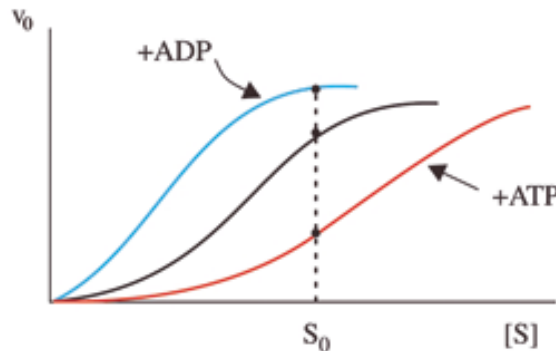
© 2011 Pearson Education, Inc.



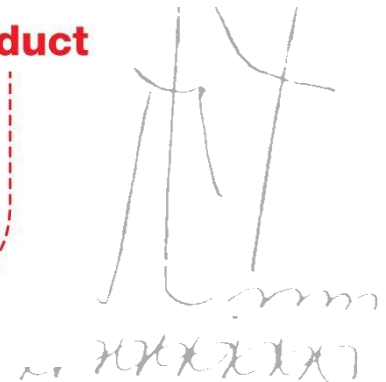
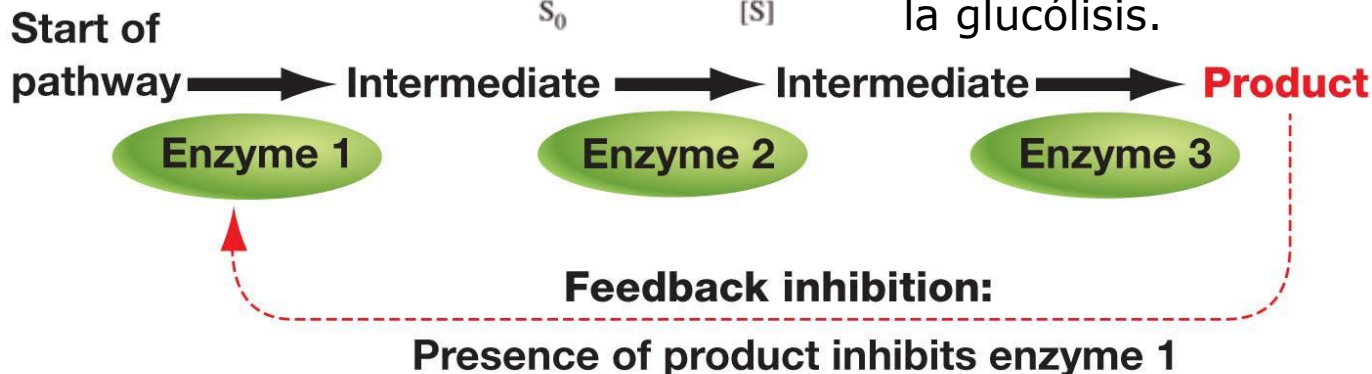


Enzimas alostéricos^{PAU}

- **Inhibición reversible no competitiva por el producto final (feed-back negativo o retroinhibición).** Cuando el producto final de una determinada cadena metabólica se encuentra en exceso, es capaz de unirse al centro alostérico de un enzima (generalmente al 1^{er} enzima de la cadena) y le produce un cambio en la conformación tal que, al cambiar el centro activo, el enzima queda inhibido.



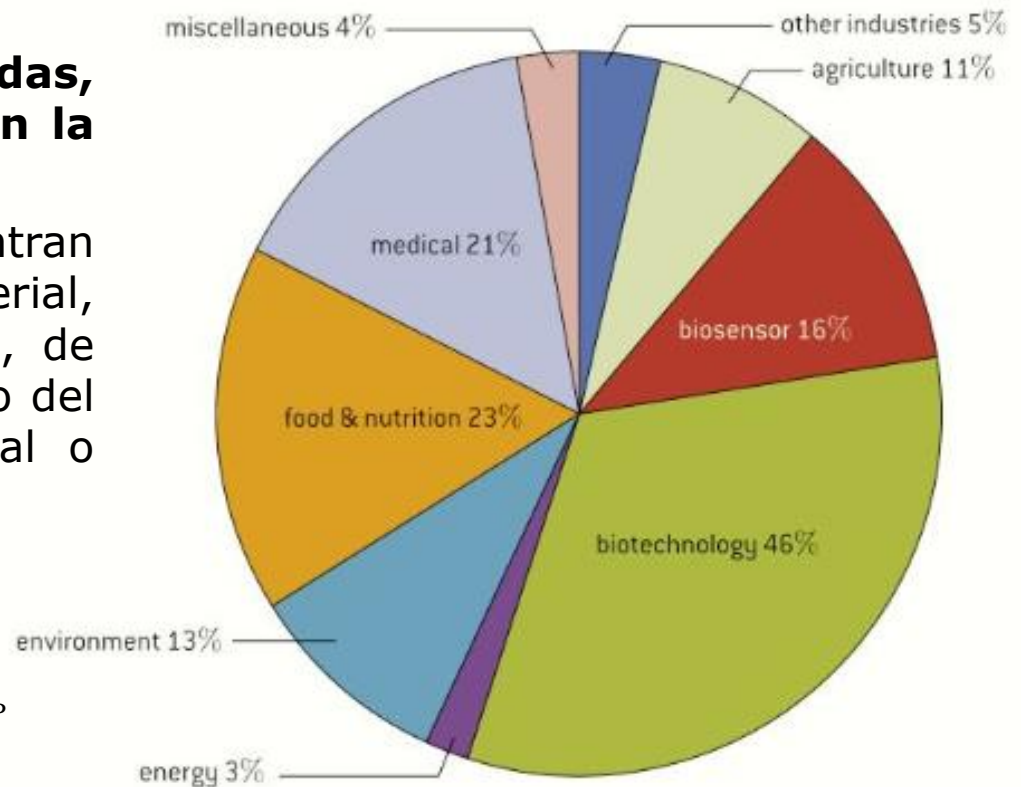
Ejemplo en la glucólisis. El sustrato de la reacción es la glucosa, y el producto el ATP. Si hay demasiado ATP, actúa como un inhibidor alostérico de la fosfofructoquinasa, inhibiendo la glucólisis.





Enzimas inmovilizadas^{DP}

- En 1897 se consiguió por primera vez catalizar una reacción enzimática en el exterior celular, usándose un extracto de levadura para realizar una fermentación alcohólica.
- En la actualidad. Se comercializan más de 500 enzimas diferentes, para fines muy diversos.
- **Las enzimas inmovilizadas, se usan ampliamente en la industria.**
- Estas enzimas se encuentran unidas/sujetas a otro material, o bien forman agregados, de manera que el movimiento del enzima se encuentre total o parcialmente restringido.

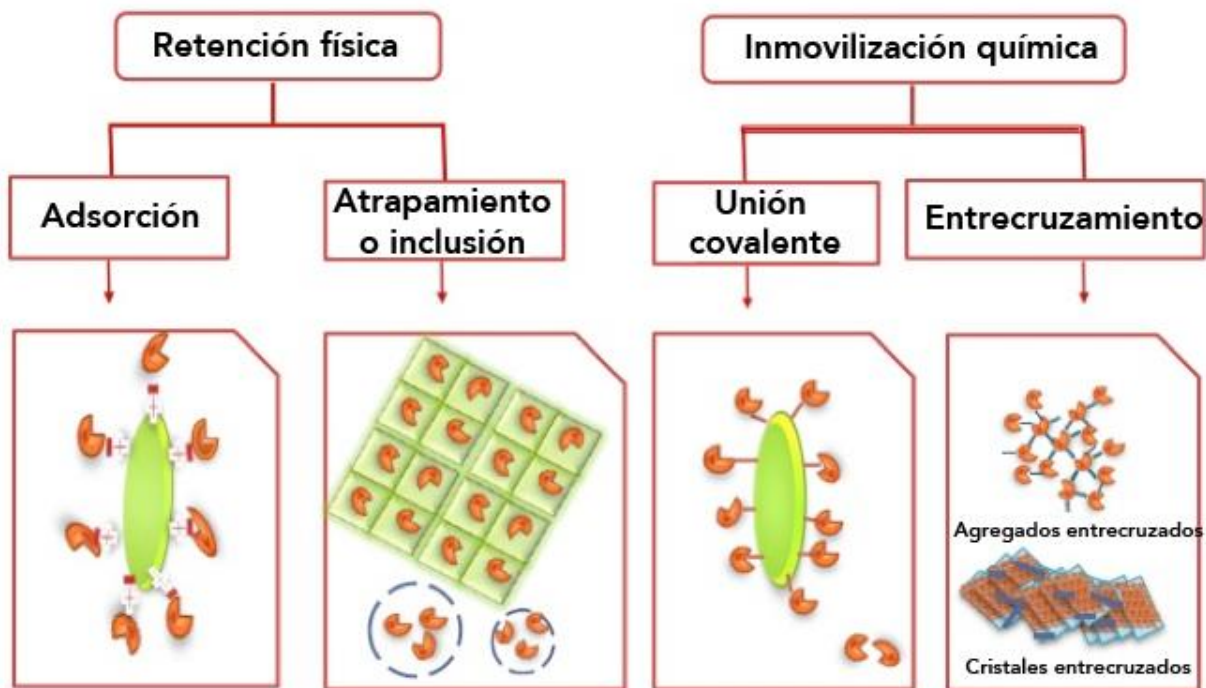




Enzimas inmovilizadas^{DP}

- La inmovilización se consigue por procesos físicos o químicos, como uniendo la enzima a una superficie de cristal, atrapándola en un gel de alginato o uniéndolas para formar un agregado de enzimas de no más de $0.1 \mu\text{m}$.

Métodos de inmovilización de enzimas





Enzimas inmovilizadas^{DP}

- El uso de enzimas inmovilizadas tiene varias **ventajas**:
 - Los sustratos pueden ser expuestos a una mayor cantidad de enzima que cuando estos se encuentran en estado solubilizado.
 - La inmovilización incrementa la estabilidad de las enzimas frente a cambios de pH o temperatura, lo que disminuye la tasa de degradación de las mismas (y por tanto de su recambio)
 - Las enzimas pueden ser fácilmente separadas de los productos, lo que permite no tener que separarlos posteriormente.
 - La fácil separación de la enzima de la mezcla de reacción, permite su reciclado posterior.

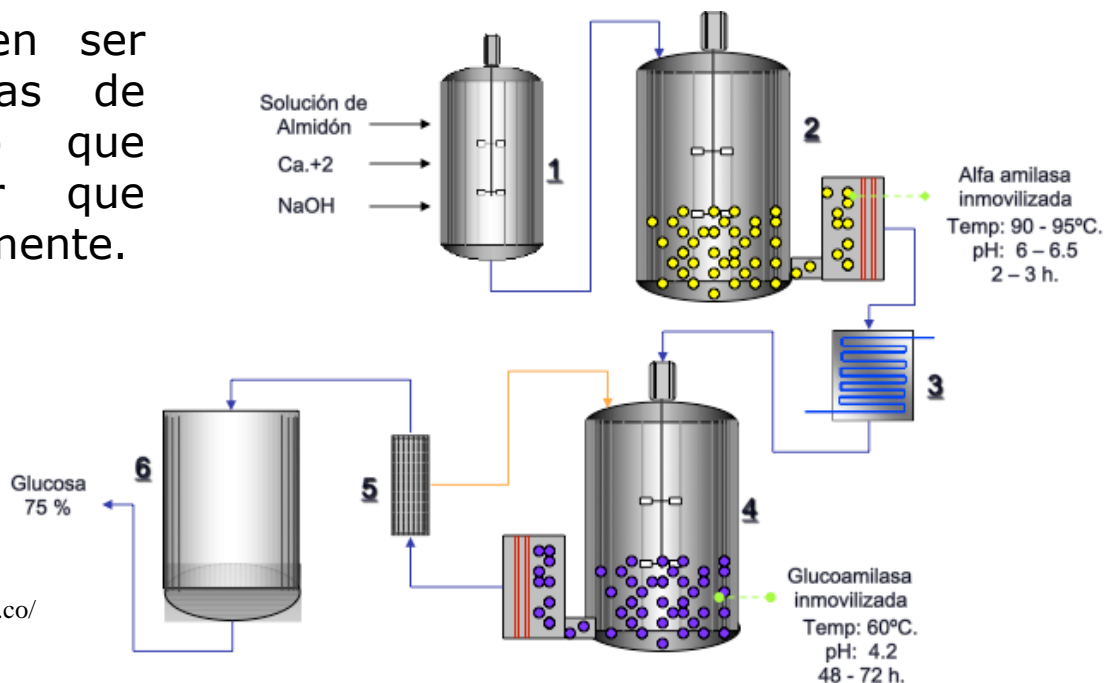
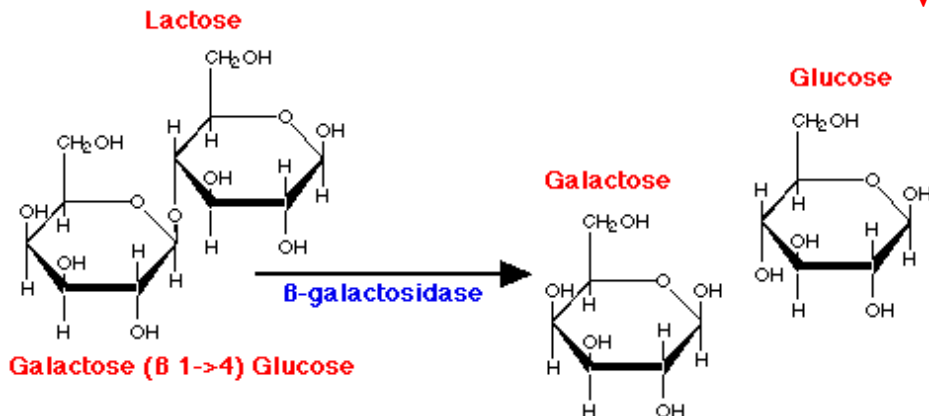


IMAGEN: datateca.unad.edu.co/



APLICACIÓN: Métodos de producción de leche sin lactosa^{DP}

- La lactosa es un disacárido compuesto por una molécula de glucosa y otra de galactosa, y constituye el principal carbohidrato presente en la leche.
- Para poder digerirlo es necesaria la enzima **lactasa**, presente en los mamíferos durante la lactancia, y que hidroliza el enlace glucosídico entre ambos monosacáridos.
- A medida que un mamífero se va desarrollando, la producción de lactasa en el organismo se va haciendo menos abundante, hasta desaparecer.



Video3





APLICACIÓN: Métodos de producción de leche sin lactosa^{DP}

- En general, a los mamíferos adultos les sienta mal la lactosa, ya que si no es digerida, se fermenta por bacteria intestinales provocando una serie de problemas digestivos, relativamente leves, pero lo bastante molestos como para hacer muy difícil el consumo de leche.

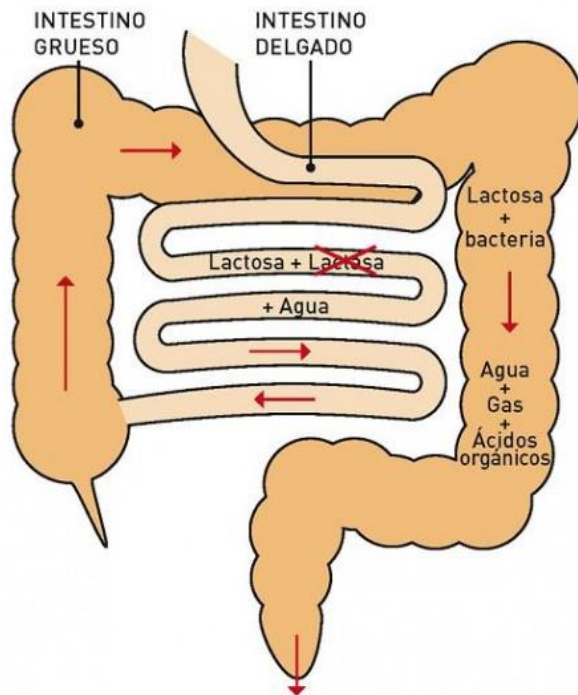


IMAGEN: salamanca24hora.com

- Estos síntomas (diarrea, flatulencia) es lo que se conoce como **intolerancia a la lactosa**.

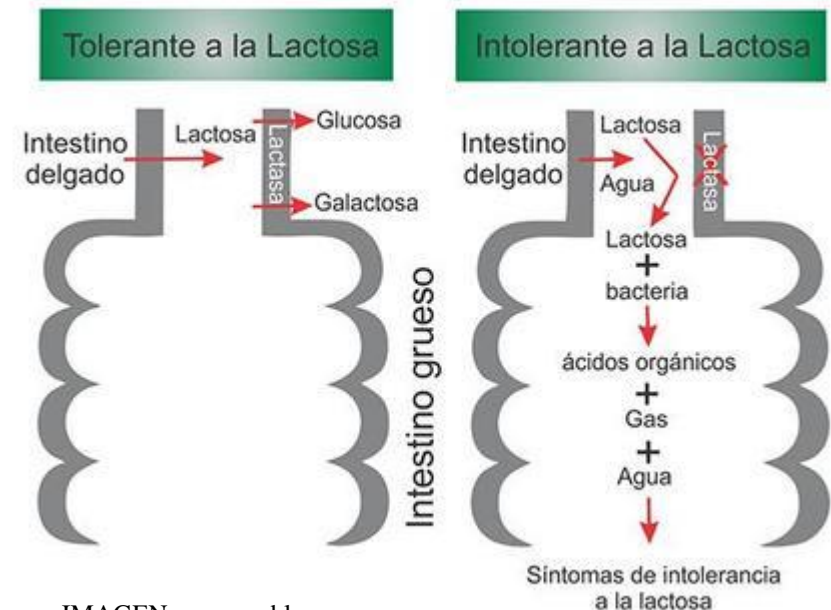


IMAGEN: es.paperblog.com

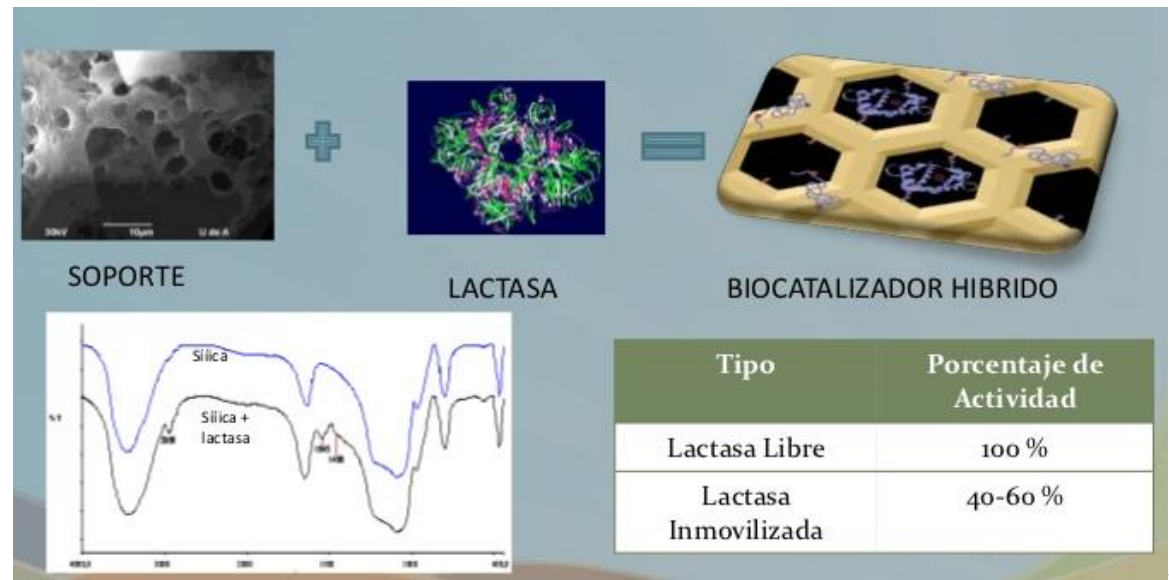
XXXXXXXXXX



APLICACIÓN: Métodos de producción de leche sin lactosa^{DP}

- Las personas con **intolerancia a la lactosa** no pueden consumir leche ni ninguno de los productos lácteos.
- Sin embargo, sí pueden consumir leche sin lactosa, obtenida gracias a la utilización de la **enzima lactasa inmovilizada**.
- La enzima lactasa es producida de forma natural por la **levadura *Kluyveromyces fragilis***, por lo que es aislada por compañías biotecnológicas para su uso en el procesamiento de alimentos.
- La leche se pasa a través de filtros con la enzima lactasa inmovilizada en gel de alginato o soportes de sílice, **obteniéndose leche sin lactosa**.

IMAGEN: es.slideshare.net





APLICACIÓN: Métodos de producción de leche sin lactosa^{DP}

- Además de posibilitar el consumo de leche y sus derivados por las personas con intolerancia a la lactosa, la producción de leche sin lactosa tiene una serie de **ventajas**:

1. Los monosacáridos glucosa y galactosa son más dulces que la lactosa, por lo que hay que añadir menos azúcar en la producción de lácteos.

2. Las bacterias lácticas fermentan estos monosacáridos más rápidamente que la lactosa, por lo que la producción de yogur y requesón es más rápida, con el consiguiente beneficio económico.

3. Glucosa y galactosa, son monosacáridos, y más solubles que la lactosa, un disacárido, lo que mejora la textura de los helados, ya que la lactosa tiende a cristalizar durante su producción.



IMAGEN: supermercadoelcorteeingles.com





Intolerancia a la lactosa y TdC^{DP}

- Hasta hace poco tiempo se pensaba que la capacidad de producir lactasa en la edad adulta era una capacidad única de los humanos. Sin embargo, algunos estudios han puesto de manifiesto que, en realidad, **sólo algunos humanos adultos son tolerantes**.
- Sin embargo, esta característica presenta **gran variabilidad entre las distintas poblaciones**. La tolerancia es muy frecuente en Europa Central y en regiones cuya población procede de esta zona. En Holanda, prácticamente todo el mundo es tolerante y en Japón, prácticamente nadie.
- Se presupone que las antiguas poblaciones de Europa septentrional han usado productos lácteos como fuente de energía para sobrevivir a los gélidos y oscuros inviernos.



IMAGEN: 4.bp.blogspot.com



Intolerancia a la lactosa y TdC^{DP}



Intolerancia a la lactosa y TdC^{DP}

- **El desarrollo de algunas técnicas beneficia a algunas poblaciones humanas concretas más que a otras.**
- Por ejemplo, el desarrollo de leche sin lactosa disponible en Europa y Norteamérica sería más beneficiosa en África y Asia, donde la intolerancia a la lactosa tiene una mayor prevalencia.
- El desarrollo de las técnicas requiere inversiones financieras. **¿Deberían compartirse los conocimientos cuando las técnicas desarrolladas en una parte del mundo son más aplicables en otra?**

Worldwide prevalence of lactose intolerance in recent populations (schematic)

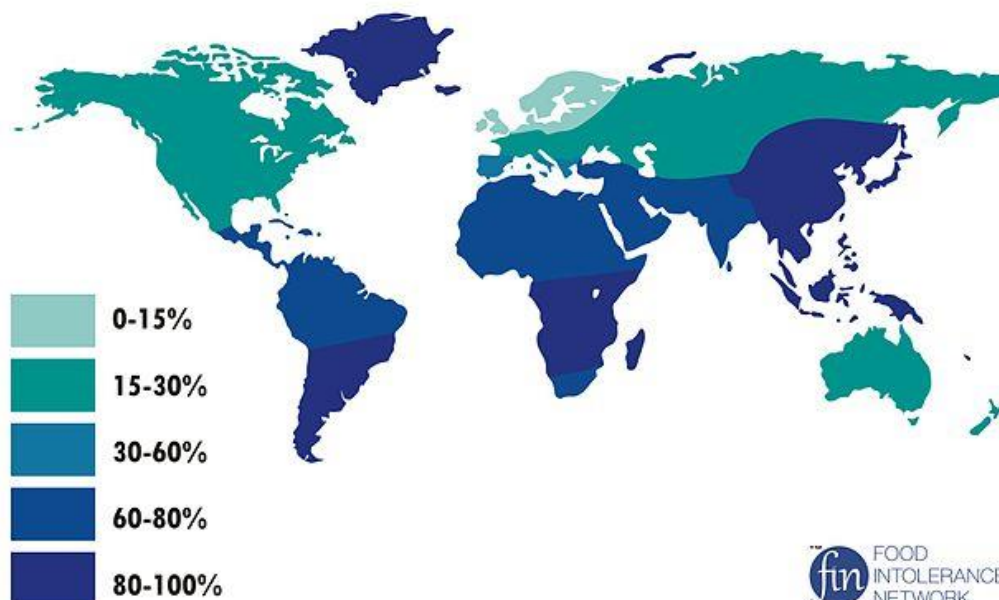
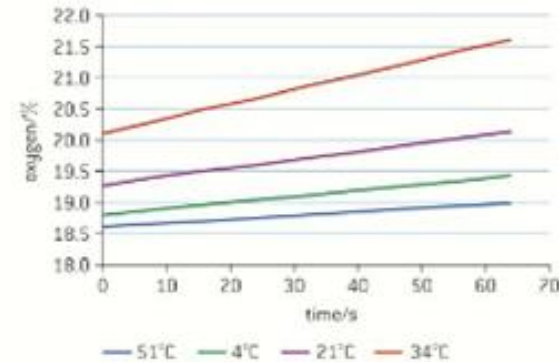


IMAGEN: edualimentaria.com



HABILIDAD: Cálculo de tasa de reacción enzimática^{DP}

- Una habilidad que será examinada en el P3 es el **cálculo y dibujo de tasas de reacción a partir de resultados experimentales brutos**.
- Para determinar la tasa de una reacción catalizada por un enzima, hay que medir la desaparición de sustrato, o bien la aparición de producto, en la unidad de tiempo.
- Observa la gráfica adjunta y responde:
 - a) Explica la variación observada en el % de O_2 a tiempo cero.
 - b) Determina la tasa de reacción de cada temperatura a partir dle gráfico.
 - c) Construye un gráfico de puntos de la tasa de reacción frente a la temperatura.



▲ Figure 9 Percentage of oxygen concentration over time at various temperatures after adding catalase to a 1.5% hydrogen peroxide solution

Ten drops of a commercial catalase solution were added to four reaction vessels containing a 1.5% hydrogen peroxide solution. Each of the solutions had been kept at a different temperature. The % oxygen in the reaction vessel was determined using a data logger in a set-up similar to figure 10.



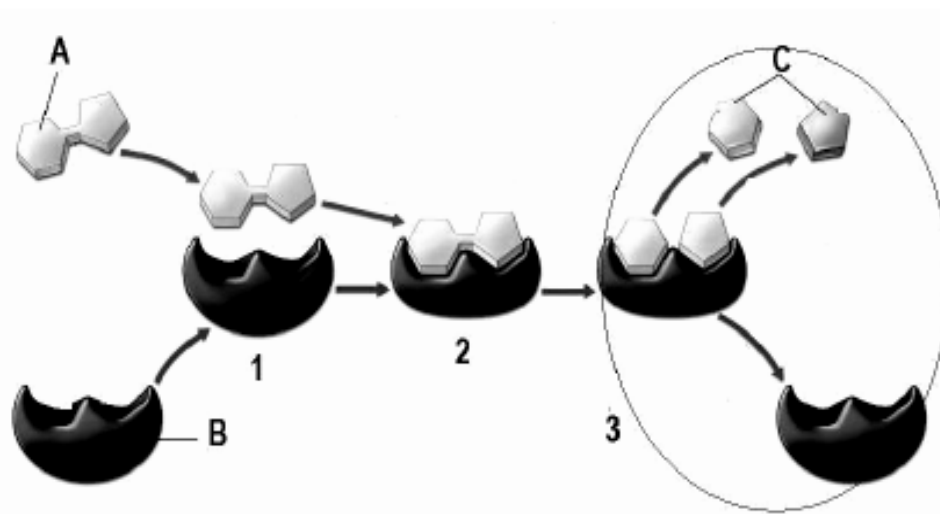


PREGUNTAS PAU

6.- La imagen representa el mecanismo de acción de una enzima en una célula de mamífero. En relación con ella responda las siguientes preguntas:

a).- ¿Qué representan las figuras señaladas con las letras A, B y C? [0,3]. Explique qué sucede en la figura señalada con el número 2 [0,4]. Indique lo que ocurre en el área señalada con el número 3 [0,3].

b).- Explique cómo se realiza la reacción a las siguientes temperaturas: 25 °C, 37 °C y 60 °C [0,6]. Defina pH óptimo para una enzima [0,4].



Handwritten signature and text at the bottom right of the page.