



Práctica 4

PROTEÍNAS CATALÍTICAS: ENZIMAS

OBJETIVOS

- Destacar la importancia de las enzimas en el metabolismo de los seres vivos.
- Evidenciar el efecto de factores como la temperatura, el pH y la concentración del sustrato sobre la actividad enzimática.
- Determinar la actividad catalítica de las enzimas polifenol-oxidasa y α -amilasa.

MATERIALES QUE SE DEBEN LLEVAR A CLASE (por grupo)

1. Una papa pequeña (sabanera o pastusa)
2. Guantes
3. Colores
4. Gafas protectoras

MARCO TEÓRICO

1. INTRODUCCION

Las enzimas moléculas catalizadoras de naturaleza proteica, presentes en los sistemas biológicos, intervienen en procesos metabólicos. Las características más sobresalientes de las enzimas son su poder catalítico y especificidad. La catálisis, proceso por el cual aumenta o disminuye la velocidad de la reacción, se lleva a cabo en un lugar específico de la enzima llamado centro activo.

Debido a su capacidad de unirse específicamente a un gran número de moléculas, las proteínas de tipo enzimático, son muy eficaces en catalizar gran diversidad de reacciones químicas (Stryer et al. 2009).

2. CARACTERÍSTICAS DE LA ACCIÓN ENZIMÁTICA

En muchas reacciones bioquímicas, la energía de las sustancias reaccionantes se convierte en una forma de energía diferente con una eficiencia muy elevada. La energía libre es la función termodinámica más adecuada para determinar si se puede producir una reacción y para comprender las bases energéticas de la catálisis (Stryer et al. 2009).

Una enzima no puede modificar las leyes de la termodinámica y por lo tanto no puede alterar el equilibrio de una reacción química. Su función es la de disminuir la energía de activación, con la formación de un complejo sustrato-enzima y acelerar la velocidad de la reacción hasta 10^6 veces, razón por la cual en presencia de una enzima se alcanza el mismo punto de equilibrio que en su ausencia; pero de manera mucho más rápida (Alberts et al. 2009).

En la primera etapa de la catálisis enzimática se forma el complejo enzima-sustrato (ES) (**Figura 1**). En este proceso los sustratos se unen a la región específica denominada centro activo, donde se presenta la interacción entre el sustrato y la enzima y se forma el estado de transición ES (Stryer et al.2009).

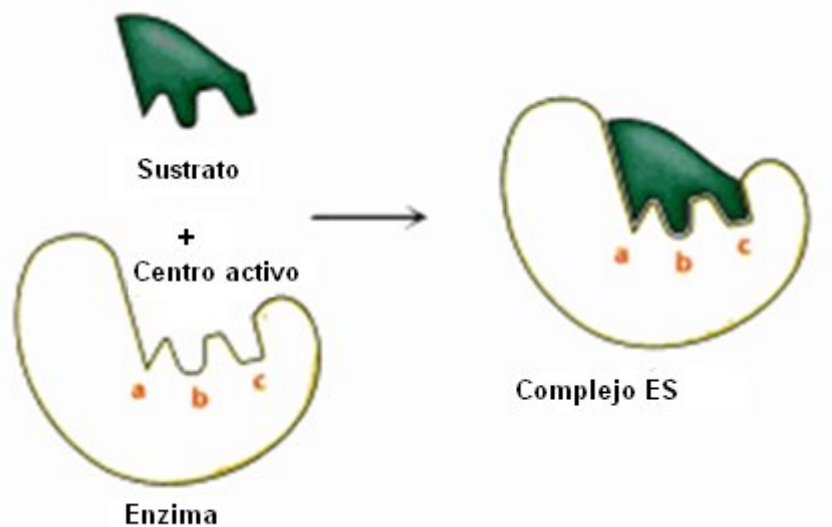


Figura 1. Formación del complejo enzima- sustrato (ES) (Stryer et al.2009).

Por otro lado la especificidad de las interacciones enzima-sustrato provienen fundamentalmente de los puentes de hidrogeno formados, y de la forma del centro activo, que rechaza las moléculas que no presentan una forma complementaria. Finalmente, durante el proceso de formación del complejo, la enzima y el sustrato unidos adquieren una configuración en la que el sustrato se modifica de modo que

después de separarse de la enzima se transforma en un componente nuevo y la enzima adquiere nuevamente su forma original (Lehninger, 2007).

Por lo tanto, la actividad enzimática se puede medir siguiendo el proceso químico que cataliza la enzima. El sustrato se incubaba en condiciones favorables, y se van sacando muestras a intervalos regulares para analizar los productos finales o la disminución en concentración del sustrato (Routh et al. 1990).

3. FACTORES QUE REGULAN LA ACTIVIDAD Y VELOCIDAD ENZIMÁTICA

3.1. Temperatura

En la mayoría de las reacciones químicas, por cada aumento de temperatura de 10°C se produce un incremento de dos o tres veces la velocidad de reacción. Esto también ocurre para las reacciones catalizadas enzimáticamente, aunque en estas el margen de temperatura de trabajo es muy estrecho.

La temperatura óptima de una enzima normalmente está cerca de la temperatura normal del organismo del cual proviene, a la cual actúa con su máxima eficacia. El incremento de actividad que se observa cuando la temperatura está por encima de la temperatura óptima, es de corta duración porque desnaturaliza la enzima, destruyendo así su actividad. (Purves et al. 2010).

3.2. pH

El valor de pH al que la actividad de una enzima es máxima se denomina pH óptimo y varía considerablemente según la enzima. Al igual que la temperatura, los cambios de pH ejercen sobre las enzimas un doble efecto. 1) Intervienen en el estado iónico de los grupos amino (-NH₂) y carboxilo (-COOH) de los aminoácidos del centro activo, importantes en la catálisis y en la unión del sustrato. 2) modifican la estabilidad y estructura terciaria de las enzimas lo cual afecta la unión al sustrato y si se alcanzan valores extremos, la enzima se desnaturaliza (Stryer et al. 2009).

3.3 Concentración de sustrato

En una etapa inicial un incremento de la concentración de sustrato produce un aumento rápido de la velocidad de reacción, sin embargo a altas concentraciones de sustrato la velocidad de reacción no cambia, debido a que los centros activos de la enzima se encuentran saturados (Stryer et al. 2009).

3.4 Concentración de la enzima

Una reacción enzimática depende de la concentración de enzima presente. La cantidad de una enzima en una célula puede incrementarse por un aumento en la velocidad de síntesis de esta, una disminución en la velocidad de su degradación

o por ambas. Esto quiere decir que existe una relación lineal entre la velocidad de la reacción y la concentración de la enzima (Muller-Sterl 2009).

3.5 Productos finales

Los productos finales de la reacción tienen una influencia decisiva sobre el grado de actividad de la enzima. Si se permite que aumente su concentración sin eliminarlos del medio de reacción, producen un decaimiento de la misma. Algunos productos finales, cuando son de naturaleza ácida o alcalina pueden afectar el pH del medio y por lo tanto la velocidad de la reacción (Routh et al. 1990).

4. INHIBIDORES

La actividad enzimática se puede reducir o detener en presencia de ciertas sustancias denominadas inhibidores. Éstos desempeñan una función principal en la regulación de los procesos metabólicos. Los inhibidores enzimáticos pueden dividirse en dos tipos: reversibles e irreversibles. A su vez los inhibidores reversibles pueden considerarse competitivos o no competitivos.

Los inhibidores reversibles son tan parecidos a un sustrato que pueden acoplarse débilmente al sitio activo de la enzima, por lo que son fáciles de desplazar, pero no pueden catalizar la reacción; si evitan que el sustrato interactúe con la enzima al ocupar el espacio que este debía ocupar en el centro activo se denominan competitivos. Cuando los inhibidores no compiten con el sustrato, debido a que se unen a otro sitio de la enzima y llevan a que se produzca un cambio conformacional del centro activo, se denominan no competitivos, aunque en este caso si puede unión al sustrato pero la rapidez de la reacción se reduce.

Los inhibidores irreversibles se unen por medio de enlaces covalentes a la enzima con alguno de sus residuos de aminoácidos, inactivándola y evitando la interacción con el sustrato (Muller-Sterl 2009) (**Figura 2**).



Figura 2. Distinción entre un inhibidor competitivo y no competitivo: (izquierda) complejo enzima-sustrato; (centro) un inhibidor competitivo impide la unión al sustrato; (derecha) un inhibidor no competitivo no impide la unión al sustrato. (Stryer et al. 2009).

5. ACTIVIDAD OXIDATIVA DE LA ENZIMA POLIFENOL OXIDASA

La polifenol oxidasa (PFO) es un metaloenzima que se encuentra ampliamente distribuida en plantas y hongos. La PFO contiene dos átomos de cobre en el centro activo que catalizan dos tipos de reacciones usando O_2 como agente oxidante: (a) la o-hidroxilación de monofenoles para producir o-difenoles (actividad monofenol monooxigenasa; y (b) la posterior oxidación de o-difenoles a o-quinonas.

La reacción general sugiere que el enzima cataliza la formación de quinonas altamente reactivas que reaccionan con grupos amino o sulfhidrilo de proteínas. Estas reacciones generan cambios en las características físicas, químicas y nutricionales del alimento. Las quinonas también pueden conducir a la polimerización y a reacciones de condensación entre proteínas y polifenoles, produciendo como consecuencia pigmentos de color rojizo, proceso conocido como “pardeamiento enzimático” que va en detrimento del perfil nutricional del alimento (Muñoz et al. 2007).

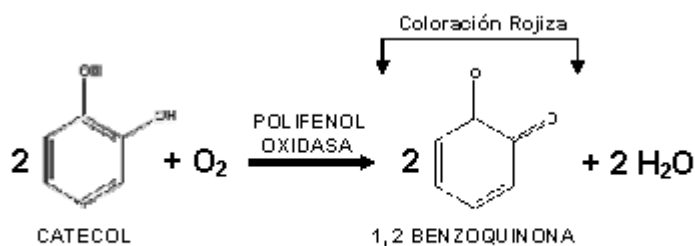


Figura 3. Oxidación de o-difenoles (Catecol) a o-quinonas (1,2 Benzoquinona) mediada por la enzima PFO (Garcia-Vallvé, 2010)

6. ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE LA ENZIMA α -AMILASA

El almidón es la reserva alimenticia de las plantas, pero las células para la obtención de su energía no pueden metabolizar el almidón como tal, sino que es necesario que lo degraden por hidrólisis en componentes más sencillos como monosacáridos o glucosa, para que estas puedan metabolizarse en los caminos energéticos (Quesada, 2007).

La digestión del almidón comienza en la boca, donde los alimentos se mezclan con la Amilasa salival (ptialina), enzima extracelular que pertenece al grupo de las hidrolasas y tienen como función hidrolizar enlaces alfa-1,4 glucosídicos del almidón, transformándolo en maltosa, pero pasando por unos estados intermedios

llamados dextrinas. Como toda enzima, la acción que ejerce sobre su sustrato (almidón) depende de una serie de parámetros: pH, temperatura, concentración del sustrato y de la enzima (Stryer et al. 2009).

El curso de la hidrólisis se pueden seguir de dos maneras: por la desaparición de la reacción con el yodo (Lugol) a medida que avanza la hidrólisis, o por la formación de azúcares reductores (reactivo Benedict). Mientras más hidrolizado este el almidón, más azúcares reductores habrá, y menor será la reacción con el yodo hasta hacerse totalmente negativa (Quesada2007).

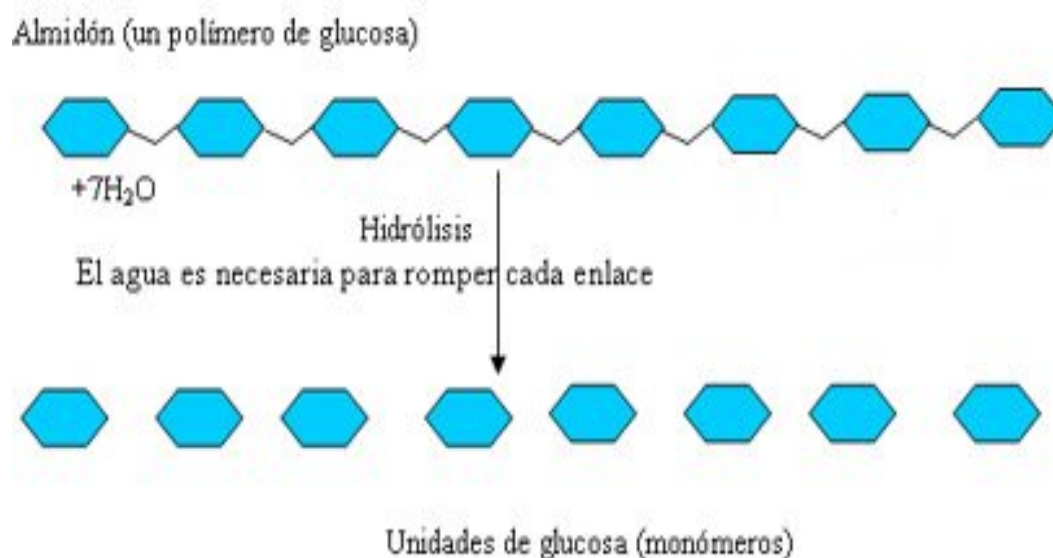


Figura 4. Degradación hidrolítica del almidón (Ghalayini, 2005)

Observaciones:

Tenga en cuenta que tanto la solución de papa como la de saliva no pueden considerarse muestras puras de las enzimas a estudiar. Como sucede en el caso del extracto de papa esta contiene la enzima PFO así como un numeroso grupo de enzimas y sustancias que no estamos midiendo. Además hay un poco de catecol en la papa que sirve como sustrato para que se lleve a cabo una reacción natural.

COMPUESTOS TÓXICOS

PRECAUSIONES: En este laboratorio se usarán algunos compuestos considerados tóxicos. Es importante conocer los riesgos que implican el manejo de estos compuestos, para lo cual se recomienda leer cuidadosamente la siguiente tabla:

COMPUESTO	RIESGOS/PELIGRO	PRECAUCIONES	DESECHO DEL COMPUESTO
Catecol	Provoca quemaduras graves Altamente irritante Muy peligroso si se ingiere o se inhala	Guantes Gafas de seguridad	Todos los residuos que contengan Catecol, Fenol o Hidroquinona SOLO deben ser descartados en el contenedor plástico que le indique el profesor.
Fenol:	Altamente inflamable Irritante	Muy buena ventilación Guantes Gafas de seguridad	
Hidroquinona:	Fácilmente inflamable Provoca quemaduras graves Altamente irritante Muy peligroso si se ingiere o se inhala	Guantes Muy buena ventilación	

MATERIALES PARA LA PRÁCTICA		
INSTRUMENTAL BÁSICO	SOLUCIONES	MATERIAL BIOLÓGICO
<ul style="list-style-type: none"> • Tubos de ensayo • Goteros o pipetas 2 y 5 ml • Nevera • Incubadora • Mechero • Baño María 	<ul style="list-style-type: none"> • Catecol 0.1% • Fenol 0.1% • Hidroquinona 0.1% • Buffers pH 5, 7 y 9 • Suero fisiológico 0.9% • Almidón 4% 	<ul style="list-style-type: none"> • Papa en trozos 1 (sabanera o pastusa) • Extracto de papa 1 • Saliva

PROCEDIMIENTO

1. PREPARACIÓN DE LAS ENZIMAS

1.1. Preparación de la Enzima Polifenol Oxidasa a partir de Extracto de Papa (Figura 5)

- Lave, pele y corte en trozos dos o tres papas medianas (no olvide dejar unos trozos para realizar la sección 2.2).
- Coloque los trozos de papa en la licuadora con 1000 ml de agua destilada y homogenice por dos minutos.
- Filtre la solución con una gasa y recoja la porción líquida, la cual contiene la enzima polifenol-oxidasa (PFO). Como no usará toda la solución de inmediato, manténgala en un baño de hielo durante la práctica y al momento de usarse no olvide homogenizar la solución para evitar que la enzima se precipite.



Figura 5. Preparación de la muestra con la enzima Polifenol-oxidasa a partir de extracto de papa

1.2. Preparación de la Enzima α -Amilasa a partir de Saliva (Figura 6)

- En cada grupo, uno de sus integrantes aportará la saliva con la que van a trabajar. Esta persona debe tener su boca limpia por lo que se recomienda que se enjuague con agua antes de empezar.
- Deposite saliva en un beaker hasta recoger 4 ml (tenga en cuenta que pensar en sustancias ácidas como el limón aumentan la salivación por lo que le ayudará en la recolección de la muestra).
- Mezcle los 4 ml de saliva con 16 ml de suero fisiológico y agite.

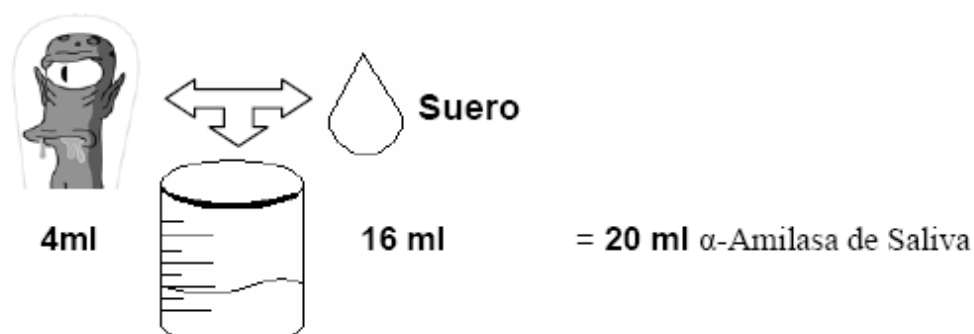


Figura 6. Preparación de la muestra con la enzima α -Amilasa de saliva

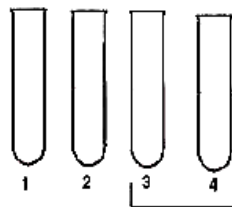
2. DETECCIÓN Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

2.1 Determinación de la actividad hidrolítica de la enzima α -Amilasa:

- En 4 tubos de ensayo adicione las soluciones de la siguiente tabla (Figura 7):

Solución Tubo	Solución de Almidón 4% (ml)	Solución Enzima α-Amilasa (ml)	INCUBAR	PRUEBA
1	1.5	-	37°C, 15 minutos	Azúcares Reductores
2	1.5	-	37°C, 15 minutos	Identificación Almidones
3	1.5	1.5	37°C, 15 minutos	Azúcares Reductores
4	1.5	1.5	37°C, 15 minutos	Identificación Almidones

Muestra de almidón en los 4 tubos



Añadir saliva a los tubos 3 y 4

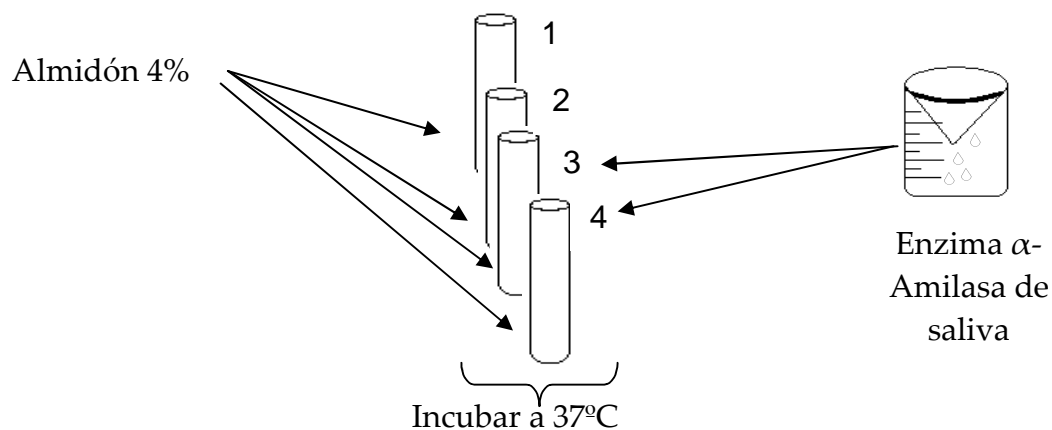


Figura 7. Preparación del ensayo para determinar la actividad hidrolítica de la enzima α -Amilasa

- Una vez realice las pruebas correspondientes, observe y registre la coloración de cada tubo e interprete los resultados

2.2 Determinación de la actividad oxidativa de la enzima polifenol-oxidasas (Figura 8)

- Coloque un trozo pequeño de papa sin cáscara en un tubo de ensayo.
- Adicione 10 gotas de catecol.
- Deje pasar unos minutos y observe la coloración que presenta la reacción. Este ensayo úselo como control positivo en las siguientes reacciones que involucren esta enzima.
- Además en un tubo de ensayo adicione 2 ml de agua y 10 gotas de catecol observe la reacción y use este ensayo como control negativo para comparar las siguientes reacciones.

Tubo	Muestra	Catecol	Control
1	Trozo de papa	10 gotas	Positivo
2	Agua (2ml)	10 gotas	Negativo

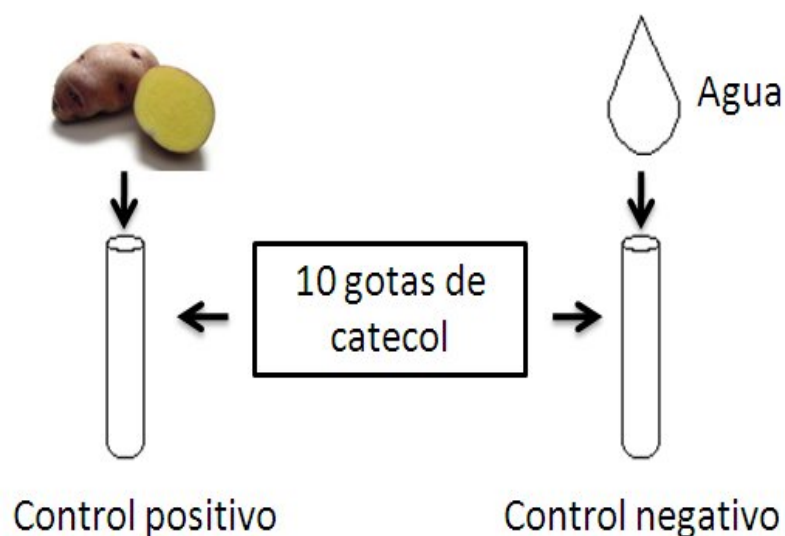


Figura 8. Controles actividad polifenol-oxidasa.

3. FACTORES QUE MODIFICAN LA VELOCIDAD DE REACCIÓN ENZIMÁTICA

3.1. Efecto de la Temperatura

En 4 tubos de ensayo adicione las soluciones de la siguiente tabla (Figura 9):

Tubo	Solución	Solución Enzima PFO (ml)	Temperatura	Tiempo	Después del tiempo respectivo agregar:	Catecol (ml)
1		1	Congelador (0°C)	10 minutos	➔	1
2		1	Ambiente (25°C)	10 minutos		1
3		1	Incubadora (37°C)	10 minutos		1
4		1	Hervir (100°)	30 segundos		1

ATENCIÓN:

Sólo cuando hayan pasado 10 minutos en la respectiva temperatura adicione a cada tubo el CATECOL y tome este momento como el tiempo cero en que inicia la reacción. Nunca saque los tubos de su respectiva temperatura a excepción del tubo 4 que sólo necesita 30 segundos expuesto a la llama del mechero, pasado este tiempo saque este tubo de los 100°C y tome las anotaciones manteniéndolo a temperatura ambiente.

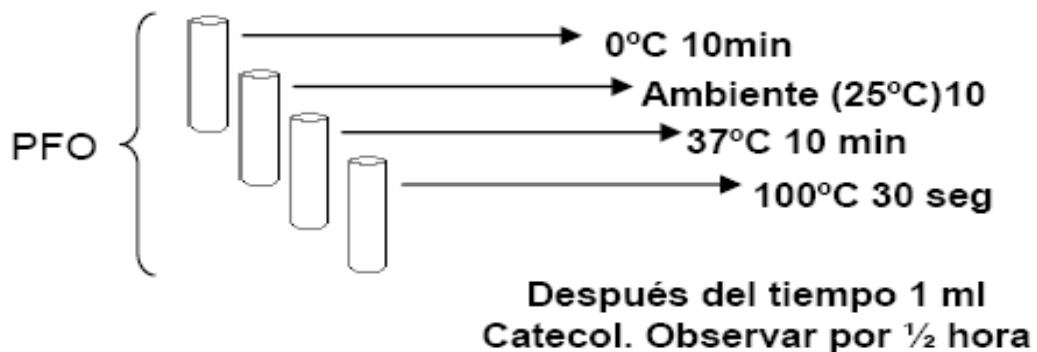


Figura 9. Preparación del ensayo para determinar el efecto de la temperatura como factor que modifica la velocidad de reacción enzimática

- Agite, observe y registre la coloración comparando los 4 tubos cada 10 minutos durante media hora. Interprete los resultados.
- Mantener los tubos a la misma temperatura durante todo el experimento

3.2. Efecto del pH

En 3 tubos de ensayo adicione las soluciones de la siguiente tabla (Figura 10):

Tubo	Solución			Buffer pH (ml)	Solución de Almidón al 4% (ml)	Lugol (gotas)	Después de que tenga preparados los tres tubos	Solución Enzima α -Amilasa (ml)
	5	7	9					
1	2	-	-	4	2			4
2	-	2	-	4	2			4
3	-	-	2	4	2			4

ATENCIÓN:

Asegúrese de no poner la solución de la ENZIMA hasta no tener todos los tres tubos preparados, el momento en que se adicione la enzima comienza la reacción por ende este corresponderá al tiempo cero desde el cual se empieza a contabilizar.

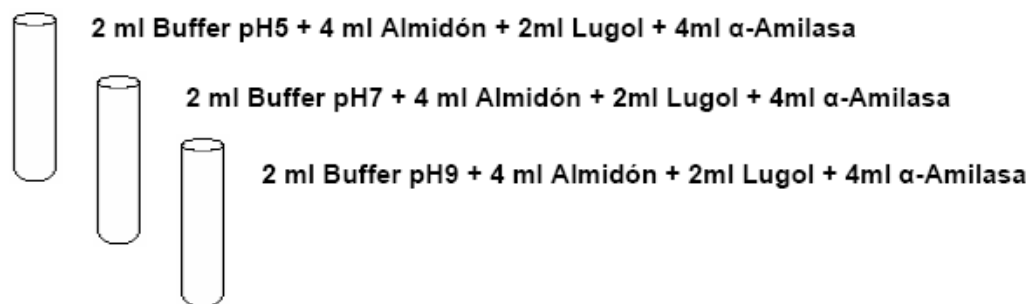


Figura 10. Preparación del ensayo para determinar el efecto del pH como factor que modifica la velocidad de reacción enzimática

- Coloque todos los tubos en la incubadora a 37°C.
- Observe y registre en la gráfica de resultados la coloración de cada tubo cada 5 minutos durante 30 minutos. Interprete los resultados. (No olvide

que los diferentes buffer tienen una coloración determinada, por lo que no esperen los tubos transparentes).

3.3. Efecto de la Concentración del Sustrato

- En 4 tubos de ensayo adicione las soluciones de la siguiente tabla (Figura 11):

Tubo	Solución Agua (ml)	Solución Enzima PFO (ml)	Después de que tenga preparados los cuatro tubos	Catecol (ml)
1	4.5	1	➔	-
2	4	1		0.5
3	2	1		2.5
4	-	1		4.5

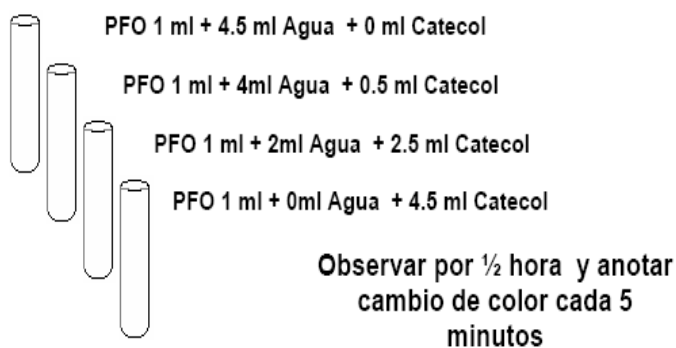


Figura 11. Preparación del ensayo para determinar el efecto de la concentración del sustrato como factor que modifica la velocidad de reacción enzimática.

ATENCIÓN:

Asegúrese de no poner el CATECOL hasta no tener TODOS los cuatro tubos preparados, el momento en que se adicione este comienza la reacción, por ende este corresponderá al tiempo cero desde el cual se empieza a contabilizar.

- Observar y anotar la intensidad del color cada 5 minutos por media hora o hasta que se estabilice la coloración de los 4 tubos e intérprete los resultados.

4. ESPECIFICIDAD DE LA ENZIMA

- En 4 tubos de ensayo adicione las soluciones de la siguiente tabla (Figura 12):

Solución Tubo	Agua (ml)	Catecol (ml)	Fenol (ml)	Hidroquinona (ml)	Solución Enzima PFO (ml)
1	1.5	-	-	-	1.5
2	-	1.5	-	-	1.5
3	-	-	1.5	-	1.5
4	-	-	-	1.5	1.5



Figura 12. Preparación del ensayo para determinar la especificidad de la enzima

- Observe y registre la coloración en cada tubo, compárelas con los controles e interprete los resultados de los 4 tubos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B, Bray D, Hopkin K and Johnson A. (2009).Energy, catalysis and biosynthesis, Editorial Taylor & Francis. Essential Cell Biology. (pp. 83-118)
- Garcia-Vallvé, S. (2010). The Industrial Enzymologist. Recuperado el 26 de septiembre de 2010, del sitio web:
http://theindustrialezymologist.blogspot.com/2008_12_01_archive.html

- Ghalayini, R (2005). Biología. Recuperado el 26 de septiembre de 2010, del sitio web: <http://www.biology-books.com/biologia/index.html>
- Lehninger A. (2007). Enzimas. Editorial Omega, Lehninger: Principios de Bioquímica. Quinta Edición (pp.1296). España
- Muller-Sterl W. (2009).Regulación de la actividad enzimática. Editorial Reverté. Bioquímica: Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida. (pp. 172-186). Barcelona
- Muñoz K, Durango, K., Bravo Muñoz E., & Londoño J. (2007). Caracterización Preliminar del enzima Polifenol Oxidasa en Frutas Tropicales: Implicaciones en su Proceso de Industrialización. Scientia et Technica Vol: XIII N°. 33. www.utp.edu.co/php/revistas/.../docsFTP/155648161-164.pdf
- Quesada-Mora S. (2007). Digestión. Editorial Universidad Estatal a Distancia. Manual de Experimentos de laboratorio para Bioquímica. (pp. 102). San José de Costa Rica.
- Stryer L, Berg J.M, Tymoczko J.L.(2009). Enzimas: conceptos básicos. Editorial Reverté, Bioquímica sexta edición (pp. 205-240).España.

➔ **BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA PARA ESTA PRÁCTICA:**

La bibliografía que encontrará a continuación puede hallarla en la biblioteca. Recuerde que los libros que se sugieren no son los únicos que puede llevar a clase, usted es libre de llevar otros textos que le permitan responder las preguntas del informe. No olvide que es OBLIGATORIO llevar libros de consulta al laboratorio.

- Carrillo, L. 2005. Microbiología Agrícola. Capítulo 3. 2 ed. SS Jujuy: EDIUNJU, v.1. p.180.
- CARRERA, Jorge. 2002. Biotecnología de las enzimas. Módulos de laboratorio. Universidad del Cauca. Facultad de ciencias agropecuarias. Popayán. p 132 - 145.

- Cornish-Bowden, Athel. 2004. Fundamentals of enzyme kinetics. London: Portland Press. xvi, 422 p. 1855781581
- Fernández, A. 2003. Actividad peroxidasa, polifenol-oxidasa, fenilalanina amonioliase y glucanasa en somaclones y mutantes de arroz. Revista de Protección Vegetal. Volumen 18. Nº 3 : 183-188
- Hoyos, J., Carrera, J. 2004. Desarrollo de un complejo enzimático por fermentación de sustrato sólido con *Rhizopus niveus*, para la optimización de la producción de alcohol etílico a partir de maleza. Facultad de ciencias Agropecuarias. Vol 2, Nº 1. 33-42.
- Machat, S. 2007. Perdeamiento enzimático del fruto del níspero (*Eriobotrya japonica* cv algerie): enzimología y fisiología de las polifenol-oxidasa. Universidad de alicante. Tesis doctorales. www.eltallerdigital.com.
- Murray, Robert K. Robert K. Murray, Daryl K. Granner, Peter A. Mayes, Víctor W. Rodwell. 1997. Bioquímica de Harper. México : El Manual Moderno. ISBN 968-426-756-8.
- Nielsen, J., Borchert, T. & Vriend, G. (2001). The Determinants of α -Amilasa pH-activities profile (Version Electrónica). In Protein Engineering. Vol. 14, Nº 7, 505 – 512.
- Sadava, D., Heller, H., Orians, G., Purves, W., Hillis, D. 2008. Life The Science of Biology. Eight Edition. Cap. 6. ISBN 978-0-7167-7674. The Courier Companies
- Thygesen, P., Dry, I. & Robinson, S. (1995). Polyphenol Oxidase in Potato. A Multigene Family That Exhibits Differential Expression Patterns. (Versión Electrónica). In Plant Physiology. Vol 109, 525-531