

Universidad de Puerto Rico en Ponce
Departamento de Biología

Ejercicio 6
PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS

Preparado por Heidi I. Reyes

Introducción

Las reacciones químicas que ocurren en una célula no son eventos al azar sino que están controladas por catalizadores biológicos llamados **enzimas**. Las enzimas reducen la **energía de activación** de una reacción (cantidad de energía necesaria para que una reacción comience).

La mayoría de las enzimas son proteínas con formas individuales debido a su secuencia de aminoácidos. Esas secuencias están determinadas por genes específicos, por ende las actividades de la célula están bajo el control genético. La forma de una enzima, especialmente en su sitio activo, determina sus efectos catalíticos. El sustrato de la enzima se acoplará en el sitio activo principal. Las enzimas son sustrato-específicas, por ejemplo algunas enzimas se unen a la glucosa pero no a la ribosa ya que la primera es un azúcar de 6 carbonos y la última tiene 5 carbonos.

Una molécula que se une a la enzima y que es modificada químicamente es el **sustrato** de esa enzima. A menudo iones metálicos como Fe^{++} , Mg^{++} , Ca^{++} o Mn^{++} , así como las vitaminas, ayudan en el proceso de unión, todos los anteriores se conocen como **cofactores**.

La unión entre la enzima y el sustrato consiste de enlaces químicos débiles que forman un **complejo enzima-sustrato** que dura por milisegundos. Durante ese instante los enlaces covalentes del sustrato se orientan de tal forma que pueden ser atacados por otras moléculas, por ejemplo por agua en una reacción de hidrólisis. El resultado es un cambio químico en el sustrato que lo convierte en un nuevo tipo de molécula llamada **producto** de la reacción. El producto abandona el sitio activo y es usado por la célula. Durante la reacción la enzima no sufre ningún cambio permanente, por lo tanto puede entrar a otro ciclo catalítico cuando otras moléculas de sustrato estén disponibles.

Moléculas individuales de enzimas pueden entrar al ciclo catalítico varias miles de veces por segundo; así que una pequeña cantidad de enzima puede convertir grandes cantidades de sustrato en producto. Eventualmente las enzimas se desgastan, se rompen y pierden su capacidad catalítica. Proteinasas celulares degradan enzimas inactivas a aminoácidos, los cuales son reciclados por la célula para sintetizar otras enzimas.

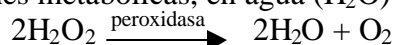
El pH o la concentración de sales de una solución afecta la forma de las enzimas y la eficiencia con la que el sustrato se pega a éstas. La temperatura afecta la frecuencia con la que la enzima y el sustrato chocan y debido a esto la unión de ambos se afecta. La presencia y concentración de los cofactores, del sustrato y de la enzima, al igual que el

pH y la temperatura, son factores que afectan la razón de la reacción catalizada por ésta. Algunos de esos factores serán investigados en este laboratorio.

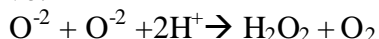
Peroxidasa

Durante este laboratorio se estudiará la enzima llamada peroxidasa. Esta es una proteína grande que consiste de cientos de aminoácidos y que tiene un ión de hierro localizado en su sitio activo. La papa y las raíces del rábano contienen una gran cantidad de esta enzima.

La función normal de la peroxidasa es convertir el peróxido de hidrógeno (HOOH), producido en ciertas reacciones metabólicas, en agua (H₂O) y oxígeno (O₂).

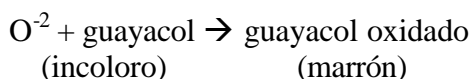
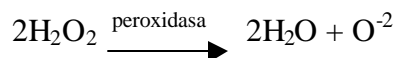


La acción de la peroxidasa se puede medir por la formación del oxígeno. La cantidad de oxígeno presente después de la reacción puede ser medida en dos formas: mediante la acumulación de gas en un sistema cerrado conectado a un manómetro o por la aparición de oxígeno químicamente activo.



Algunos tintes reaccionan con el oxígeno reactivo (O⁻²), cambiando de un estado incoloro a uno con color. La reacción catalizada por la enzima forma un producto que entra en una reacción secundaria con el tinte. La enzima no se une o afecta al tinte.

Usted usará el tinte guayacol, que se torna marrón cuando se oxida. La reacción de peroxidasa, incluyendo la medición del oxígeno activo a través del guayacol, es como sigue:



Para medir cuantitativamente la cantidad de color marrón en el producto final, tanto la enzima, como el sustrato y el tinte deben mezclarse en un tubo y colocarse en el espectrofotómetro. Según el color se acumule la absorbancia a 500 nm aumentará.

Objetivos

Al finalizar el laboratorio los estudiantes serán capaces de:

1. hacer una prueba cuantitativa de la actividad de la enzima presente en un extracto de un tejido.
2. determinar la temperatura y el pH óptimos para una reacción catalizada por enzimas.
3. ilustrar como la desnaturalización y los inhibidores alteran la actividad enzimática.

Materiales

baño de agua
 espectrofotómetro y cubetas
 papel para secar las cubetas
 pipetas de 10 mL
 vasos de precipitado de 250 mL
 tubos de ensayo y gradillas
 cinta adhesiva
 extracto de papa

hornillas
 termómetros
 guayacol 25 mM
 hidroxilamina 1%
 “buffers” pH 3, 5, 7 y 9
 hielo
 H₂O₂ 10 mM

Métodos

Procedimiento 1. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática

Haga el experimento siguiente para determinar la temperatura óptima de la actividad de peroxidasa.

- Prepare 4 baños de agua:
 - en el refrigerador aproximadamente a 4 °C (en agua con hielo)
 - a temperatura ambiente (aproximadamente a 23 °C)
 - a 32 °C
 - a 48 °C
- Numere 9 tubos de ensayo, del 1 al 9. Refiérase a la Tabla 1 para los volúmenes de los reactivos a ser añadidos a cada tubo.

Tabla 1. Tabla de mezclas para el experimento de temperatura

Temperatura	Tubo	“Buffer” (pH 5)	H ₂ O ₂	Extracto	Guayacol
	1 control	5 mL	0 mL	2 mL	1 mL
4 °C	2	0 mL	2 mL	0 mL	1 mL
4 °C	3	3 mL	0 mL	2 mL	0 mL
23 °C	4	0 mL	2 mL	0 mL	1 mL
23 °C	5	3 mL	0 mL	2 mL	0 mL
32 °C	6	0 mL	2 mL	0 mL	1 mL
32 °C	7	3 mL	0 mL	2 mL	0 mL
48 °C	8	0 mL	2 mL	0 mL	1 mL
48 °C	9	3 mL	0 mL	2 mL	0 mL

- Preincube todas las soluciones en las temperaturas indicadas durante 15 minutos antes de mezclarlas. Mantenga los tubos 2 y 3 en un envase con hielo y los tubos 8 y 9 en baño de María a 48 °C.
- Después de haber calibrado el espectrofotómetro usando el tubo de ensayo 1, mezcle los tubos (2 y 3, 4 y 5, 6 y 7, 8 y 9) un par a la vez. Transfiera las soluciones a las cubetas, séquelas bien y mida los cambios en absorbancia durante 2 minutos (a intervalos de 20 segundos) para cada tratamiento de temperatura. Anote los resultados en la Tabla 2.

Tabla 2. Efectos de las temperaturas en la actividad de la peroxidasa (medidas de absorbancia a 500 nm)

Tiempo (seg)	Tubos 2 y 3 4 C	Tubos 4 y 5 23 C	Tubos 6 y 7 32 C	Tubos 8 y 9 48 C
20				
40				
60				
80				
100				
120				

Conteste las preguntas a continuación:

1. ¿La actividad enzimática varía con la temperatura?

2. ¿Cuál es la temperatura óptima?

Procedimiento 2. Efecto del pH en la actividad enzimática

Efectúe el experimento a continuación para determinar el pH óptimo de la peroxidasa.

1. Numere 9 tubos de ensayo, rotúelos del 1 al 9. Refiérase a la Tabla 3 para determinar las cantidades de los reactivos a ser mezclados.

Tabla 3. Tabla de mezclas para el experimento de pH

pH	Tubo	“Buffer”	H ₂ O ₂	Extracto	Guayacol
5	1 control	5 mL	0 mL	2 mL	1 mL
3	2	0 mL	2 mL	0 mL	1 mL
3	3	3 mL	0 mL	2 mL	0 mL
5	4	0 mL	2 mL	0 mL	1 mL
5	5	3 mL	0 mL	2 mL	0 mL
7	6	0 mL	2 mL	0 mL	1 mL
7	7	3 mL	0 mL	2 mL	0 mL
9	8	0 mL	2 mL	0 mL	1 mL
9	9	3 mL	0 mL	2 mL	0 mL

2. Después de calibrar el espectrofotómetro usando el tubo 1, mezcle los tubos (2 y 3, 4 y 5, 6 y 7, 8 y 9). Seque con papel de lentes el exterior de la cubeta antes de colocarla en el espectrofotómetro. Mida la absorbancia durante 2 minutos (a intervalos de 20 segundos) para cada par mezclado. Anote los resultados en la Tabla 4.

Tabla 4. Efectos del pH en la actividad de la peroxidasa (medidas de absorbancia a 500 nm)

Tiempo (seg)	Tubos 2 y 3 pH 3	Tubos 4 y 5 pH 5	Tubos 6 y 7 pH 7	Tubos 8 y 9 pH 9
20				
40				
60				
80				
100				
120				

Conteste las preguntas a continuación:

1. ¿La actividad enzimática varía con el pH?

2. ¿Cuál es el pH óptimo?

Procedimiento 3. Efecto de hervir el extracto de peroxidasa en la actividad de esta enzima

La mayoría de las proteínas se desnaturalizan cuando se calientan a más de 70 °C. La desnaturalización es un cambio en la estructura tridimensional de la proteína. Si la forma de la enzima es alterada significativamente, ¿qué usted cree que sucederá con la actividad enzimática?

- Para demostrar que los cambios que usted observó en los otros experimentos se deben a la enzima, añada 5 mL del extracto de papa a un tubo de ensayo y colóquelo en agua hirviendo por 5 minutos. Después de transcurrido el tiempo, remueva el tubo y permita que enfríe a temperatura ambiente.
- Numere 3 tubos de ensayo y añada los reactivos correspondientes según la Tabla 5.

Tabla 5. Tabla de mezclas para el extracto hervido

Tubo	“Buffer” (pH 5)	H ₂ O ₂	Extracto hervido	Guayacol
1 control	5 mL	0 mL	2 mL	1 mL
2	0 mL	2 mL	0 mL	1 mL
3	3 mL	0 mL	2 mL	0 mL

- Use el contenido del tubo 1 para calibrar el espectrofotómetro. Mezcle los contenidos de los tubos 2 y 3, transfíeralos a una cubeta, séquela y mida la absorbancia durante 2 minutos (a intervalos de 20 segundos). Anote los resultados en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados al usar el extracto hervido (medidas de absorbancia a 500 nm)

Tiempo (seg)	Tubos 2 y 3 extracto hervido
20	
40	
60	
80	
100	
120	

Compare la actividad de la peroxidasa hervida con la de la peroxidasa a temperatura ambiente y pH 5 (vea las Tablas 2 y 4).

Conteste la pregunta a continuación:

¿Cómo se afectó la actividad al hervir la peroxidasa?

Procedimiento 4. Efecto de un inhibidor competitivo

Hidroxilamina (HONH_2) tiene una estructura similar al peróxido de hidrógeno (HOOH). Esta molécula se une al átomo de hierro en el sitio activo de la peroxidasa lo que previene la unión del peróxido de hidrógeno al sitio activo. ¿Cuál será el efecto en la actividad enzimática?

1. Para probar esta hipótesis, mezcle 5 gotas de hidroxilamina 1% y 2 mL del extracto. Deje que la mezcla repose durante 5 minutos.
2. Numere 5 tubos de ensayo, vea la Tabla 7 para determinar las cantidades de los reactivos para cada tubo.

Tabla 7. Tabla de mezclas para el experimento de inhibición

Tubo	“Buffer” (pH 5)	H_2O_2	Extracto	Guayacol	Extracto con hidroxilamina
1 control	5 mL	0 mL	2 mL	1 mL	0 mL
2	0 mL	2 mL	0 mL	1 mL	0 mL
3	3 mL	0 mL	2 mL	0 mL	0 mL
4	0 mL	2 mL	0 mL	1 mL	0 mL
5	3 mL	0 mL	0 mL	0 mL	2 mL

3. Después de calibrar el espectrofotómetro con el tubo 1, mezcle los tubos (2 y 3, 4 y 5).
4. Mida la absorbancia durante 2 minutos (a intervalos de 20 segundos). Anote los resultados en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados de la inhibición enzimática (medidas de absorbancia a 500 nm)

Tiempo (seg)	Tubos 2 y 3 extracto normal	Tubos 4 y 5 extracto con hidroxilamina
20		
40		
60		
80		
100		
120		

Conteste la pregunta a continuación:

¿Cuál ha sido el efecto de la hidroxilamina?

Preguntas de pensamiento crítico

1. Cuando usted corta una manzana o un guineo la enzima fenil oxidasa comienza una “reacción” en el área afectada. Esto provoca que el área se torne color marrón. Los buenos cocineros rocían jugo de limón para evitar esta decoloración. ¿Por qué esto funciona?

2. Usted vive en Estados Unidos y por vagancia, durante el invierno, deja la caja de desperdicios del gato afuera por un tiempo. ¿Cómo se afectará la razón de hidrólisis de la urea por la enzima ureasa? ¿Por qué?

Referencias en Internet

All about ENZIMES.

J.R. Wanamaker

Animaciones de reacciones enzimáticas y denaturalización.

<http://www.lewport.wnyric.org/jwanamaker/animations/Enzyme%20activity.html>

Factors Affecting Enzymes

Natural Toxins Research Center at Texas A&M University – Kingsville

<http://ntri.tamuk.edu/cell/enzyme2.html>