



Los enzimas. Introducción a la enzimología.

Apellidos, nombre	Cardona Serrate, Fernando (fcardona@tal.upv.es)
Departamento	Departamento de Tecnología de Alimentos
Centro	E.T.S. de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural Universitat Politècnica de València



1 Resumen de las ideas clave

En este artículo docente se abordarán los conceptos básicos de enzimología, para después ampliar en lo relativo al mecanismo de la catálisis y la regulación de la actividad enzimática. Por último, se abordan los conceptos básicos de cinética enzimática, incluyendo el tratamiento teórico y experimental de los datos para calcular las constantes cinéticas de interés.

2 Objetivos

Tras leer este documento con detenimiento el alumno será capaz de:

- Describir adecuadamente los conceptos básicos de enzimología
- Explicar el mecanismo de catálisis enzimática y su regulación.
- Utilizar los conocimientos adquiridos para el tratamiento teórico y experimental de las constantes de interés en cinética enzimática.

3 Introducción

Los enzimas son moléculas orgánicas que actúan como catalizadores de reacciones químicas, es decir, aceleran la velocidad de reacción. Comúnmente son de naturaleza proteica, pero también existe de ácido ribonucleico (ARN, ribozimas). Las enzimas modifican la **velocidad de reacción**, en reacciones energéticamente favorables. Los enzimas actúan sobre los **sustratos** de reacción, facilitando su conversión en productos. Los sustratos se unen al **centro activo** del enzima, que es la parte del enzima donde tiene lugar la catálisis, formada por un **sitio de unión** del sustrato y un **sitio catalítico**. Tras la unión del sustrato al centro activo se forman los **productos** de la reacción. Casi todos los procesos en las células necesitan enzimas para que ocurran a tasas significativas. A las reacciones mediadas por enzimas se las denomina **reacciones enzimáticas**. Debido a que los enzimas son extremadamente selectivos con sus sustratos y reacciones, el conjunto de enzimas de una célula, que viene determinado por los genes que expresa, determina el tipo de metabolismo que tiene la célula. Como todos los catalizadores, los enzimas actúan **disminuyendo la energía de activación** (ΔG), acelerando la tasa de reacción. Los enzimas no alteran el balance energético, ni modifican el equilibrio de la reacción. Una reacción catalizada por un enzima alcanza el **mismo equilibrio**, pero **mucho más rápido**, que la misma reacción no catalizada.

La actividad de los enzimas puede ser afectada por otras moléculas. Los **inhibidores** enzimáticos son moléculas que disminuyen o impiden la actividad de las enzimas, mientras que los **activadores** son moléculas que incrementan su actividad. Muchos fármacos son moléculas inhibitoras, activadoras o antagonistas de enzimas. Muchos enzimas requieren **cofactores** para su actividad catalítica. Su actividad se ve afectada por la temperatura, el pH, la concentración de enzima y del sustrato, además de otros factores físico-químicos.

Al igual que otros catalizadores, los enzimas **no se consumen** en las reacciones que catalizan. Aunque existen distintos grados de especificidad, los enzimas son muy específicos, y en general más que otros catalizadores, dado que debe existir **gran diversidad** de enzimas para catalizar alrededor de 4000 reacciones bioquímicas. También existen enzimas



diseñados y **producidos artificialmente**, que al igual que los naturales tienen usos industriales y comerciales importantes. Por ejemplo, en la síntesis de antibióticos, de productos de limpieza, la fabricación de alimentos, la industria textil o la producción de biocombustibles.

Dado que son proteínas, los enzimas presenta una estructura tridimensional de la que depende su actividad biológica (**estructura nativa**), y esa actividad se verá afectada por cambios conformacionales. La pérdida de la estructura nativa (**desnaturalización**) conlleva la pérdida de la **actividad catalítica**, y puede ser reversible o irreversible, dependiendo del grado en que se produzca. Son agentes desnaturalizantes el calor, la presión, los valores de pH extremos, altas concentraciones de sales, detergentes y agentes caotrópicos. Sin embargo, también se producen pequeños cambios conformacionales durante la catálisis, sin llegar a perder la estructura nativa ni la actividad. Por ejemplo, el acoplamiento enzima-sustrato y la catálisis puede implicar cambios conformacionales encaminados a que se produzca la reacción.

4 Desarrollo

En este apartado se desarrollarán los conceptos de mecanismo de acción enzimática y su regulación, así como los conceptos y cálculos básicos en el estudio de la cinética enzimática.

4.1 Mecanismo de acción enzimática

En las reacciones espontáneas se libera energía de Gibbs ($\Delta G < 0$), es decir, su valor en los productos finales es menor que en los reactivos. Sin embargo, la reacción requiere un aporte inicial de energía, que debe ser igual o mayor a lo que se denomina **energía de activación** (EA) (Figura 1), de forma que cuanto menor es la EA más fácil es que ocurra la reacción. Los catalizadores actúan **disminuyendo la EA**. Los enzimas son catalizadores biológicos, más eficaces que los catalizadores inorgánicos, pudiendo disminuir la EA hasta 15 veces más.

Para que una reacción química tenga lugar, las moléculas de los sustratos deben chocar con una **energía y una orientación adecuadas**. Al unirse al centro activo del enzima, los sustratos adquieren la orientación óptima para la reacción y se modifican sus propiedades químicas, debilitando los enlaces y facilitando la formación de otros nuevos. Estos dos eventos son el mecanismo por el cual el enzima disminuye de la EA.

Existen dos modelos para explicar cómo el sustrato se une al centro activo del enzima: el modelo llave-cerradura y el modelo del ajuste inducido.

El **modelo de llave-cerradura** supone que la estructura del sustrato (llave) y la del centro activo del enzima (cerradura) son complementarias. Este modelo explica el mecanismo en algunos casos, pero no es siempre correcto. En algunos casos, el centro activo adopta la conformación catalítica sólo cuando se une el sustrato (**modelo del ajuste inducido**). Según este modelo la unión del sustrato al centro activo provoca el cambio conformacional que da lugar a la formación del producto.

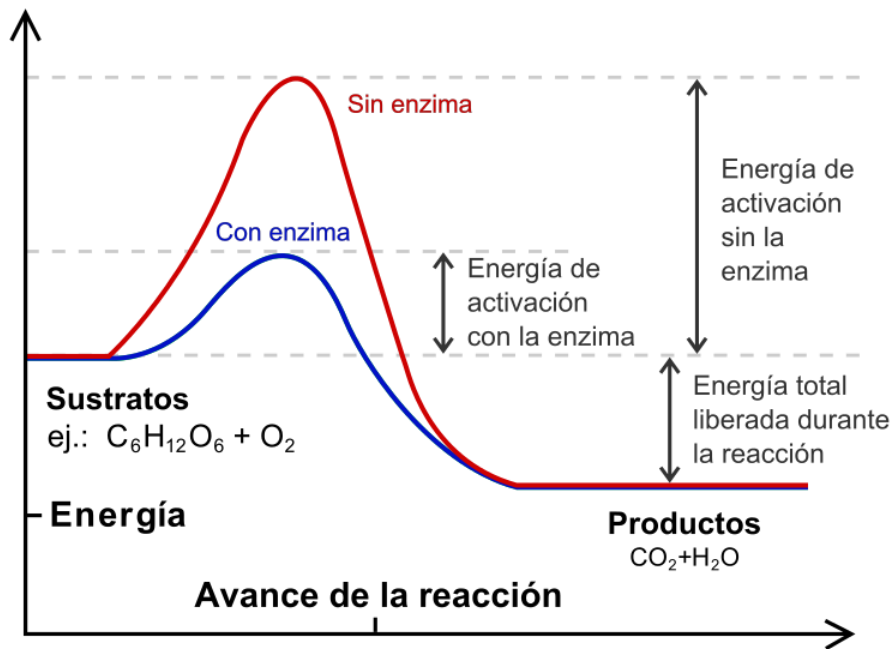


Figura 1. Reacción enzimática y energía de activación. Fuente: Wikimedia commons.

4.2 Regulación de la actividad enzimática

Los **factores** que más influyen en la **actividad catalítica** del enzima son el **pH** y la **temperatura** a la que ocurre la reacción, así como la presencia de **cofactores** enzimáticos.

4.2.1 Efecto del pH sobre la actividad enzimática

Los enzimas son generalmente proteínas globulares que pueden presentar tamaños muy variables. Como proteínas que son, poseen grupos ionizables en las cadenas laterales de los aminoácidos que los forman. El estado de ionización (carga positiva, negativa o neutra) de estos grupos funcionales, y por lo tanto la conformación estructural del enzima, va a depender del pH del medio. Por este motivo, la conformación será más adecuada para la catálisis, y por lo tanto la actividad será óptima a un pH determinado, denominado **pH óptimo**. La mayoría de enzimas son muy sensibles a los cambios de pH, y pequeñas variaciones pueden provocar su desnaturalización, por lo que en los sistemas biológicos existen los llamados **amortiguadores de pH** o tampones.

4.2.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

El aumento de temperatura en general aumenta la velocidad de las reacciones químicas. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta norma, pero a partir de cierta temperatura se desnaturaliza el enzima. La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama **temperatura óptima**. Por encima de esa temperatura la actividad enzimática disminuye con el aumento de temperatura hasta desaparecer.

4.2.3 Efecto de los cofactores sobre la actividad enzimática

Casi la tercera parte de los enzimas requieren la presencia de sustancias no proteicas que participan en la acción catalítica, los **cofactores**. Muchos son cationes inorgánicos como el Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} o Cu^{2+} . Si el cofactor es una molécula orgánica se denomina



coenzima. Cuando los cofactores y las coenzimas se encuentran unidos covalentemente al enzima se llaman **grupos prostéticos**. La forma catalíticamente activa del enzima, es decir, el enzima unido a su grupo prostético, se llama **holoenzima**. La parte proteica de un holoenzima se llama **apoenzima** (apoenzima + grupo prostético= holoenzima). Muchos coenzimas son o se sintetizan a partir de vitaminas. Por ejemplo, la Vitamina B1 o tiamina, cuyo derivado, el pirofosfato de tiamina, es esencial para el metabolismo energético de los glúcidos.

4.2.4 Efecto de las concentraciones de sustratos, productos e inhibidores sobre la actividad enzimática

Dado que la reacción enzimática es una reacción de **equilibrio reversible**, la velocidad de una reacción enzimática depende de la **concentración de sustrato**, y la presencia de los **productos finales** puede hacer que la reacción sea más lenta, o incluso invertir su sentido, según la reacción:



Ecuación 1. Equilibrio en la reacción enzimática.

dónde E es el enzima, S el sustrato, ES el complejo enzima-sustrato, ES* el complejo activado, y P el producto de la reacción

Por otro lado, ciertas moléculas pueden inhibir la acción de un enzima, Los **inhibidores enzimáticos**, actúan ocupando temporalmente el centro activo por semejanza estructural con el sustrato (**inhibidor competitivo**) o alterando la conformación espacial del enzima, de forma que no pueda unirse al sustrato (**inhibidor no competitivo**).

4.2.5 Modulación alostérica de la actividad enzimática

Hay enzimas que pueden adoptar dos conformaciones llamadas R (relajada) y T (tensa) en equilibrio, siendo R la forma más activa, de mayor afinidad por el sustrato. Existen moléculas que estabilizan la forma R, los llamados **moduladores positivos**. El propio sustrato es a menudo un modulador positivo. Cuando estas moléculas actúan sobre un sitio de unión distinto al del centro activo se denominan **activadores alostéricos**. Por otro lado, las moléculas que favorecen la forma T, y por lo tanto disminuyen la actividad enzimática se denominan **moduladores negativos**, y si actúan en sitios distintos al centro activo del se denominan **inhibidores alostéricos**.

4.2.6 Otras modificaciones de la actividad enzimática

Algunos enzimas pasan a una forma más o menos activa al **unirse covalentemente** a un grupo químico de pequeño tamaño, como por ejemplo el fosfato inorgánico.

Otros enzimas no se sintetizan como tales, sino como precursores inactivos. Se denominan **proenzimas o zimógenos**. Para activarse, los zimógenos sufren una **hidrólisis parcial** de uno o varios péptidos, adoptando el resto de la proteína la conformación y las propiedades del enzima activo.

Además, algunos enzimas con una actividad similar tienen distinta estructura. Se denominan **isoenzimas**. Las actividades de los isoenzimas presentan pequeñas diferencias,



adaptada a la funció que debe realitzar, específica del tip de **tejidó, compartimentó celular** o el **momentó del desarrolló** en que se exprese.

4.3 Cinética enzimática

La unidad de **actividad enzimática** (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato en un minuto. La **actividad específica** es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína (**U/mg**) o por mililitro de disolución (**U/ml**). Sin embargo, el Sistema Internacional de unidades (SI) definió la unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que transforma 1 mol de sustrato por segundo. Esta unidad se llama **katal (kat)**. Dado son 10^6 μmoles en 60 segundos, 1 katal equivale a 60×10^6 U. Debido a que es una unidad muy grande, se utilizan frecuentemente sus submúltiplos, el microkatal (μkat , 10^{-6} kat) o el nanokatal (nkat, 10^{-9} kat).

Cuando se conoce el peso molecular y el número de centros activos del enzima, se puede calcular el **número de recambio** del enzima, que es el número de reacciones por cada centro activo y por unidad de tiempo.

La cinética enzimática estudia la **velocidad de las reacciones** catalizadas por enzimas, proporcionando información del mecanismo de reacción y la especificidad del enzima. En condiciones óptimas de pH, temperatura, presencia de cofactores, etc, utilizando concentraciones saturantes de sustrato, la velocidad de reacción observada es la **velocidad máxima (Vmax)**.

Al representar la velocidad de aparición de producto (o de desaparición del sustrato) en función del tiempo se obtiene la llamada **curva de avance**, o cinética de la reacción. A medida que la reacción transcurre, la velocidad de acumulación del producto va disminuyendo porque se va consumiendo el sustrato de la reacción (Figura 2). La **velocidad inicial** de la reacción (V_0) es la pendiente de la curva de avance a tiempo cero. La medida de V_0 se realiza antes de que se consuma el 10% del total del sustrato, de forma que pueda considerarse la concentración de sustrato como constante, y no es necesario considerar la reacción inversa, ya que la cantidad de producto formada es muy pequeña.

La cinética permite estudiar el efecto de la **concentración inicial de sustrato** (S_0) sobre la **velocidad inicial de la reacción** (V_0), manteniendo la concentración de enzima constante. Si representamos V_0 frente a S_0 obtenemos la gráfica de la Figura 2. Cuando S_0 es pequeña, la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de sustrato, y por tanto, la cinética es de primer orden. Cuando S_0 es alta, el enzima se satura de sustrato, y la velocidad ya no depende de S_0 , pasando a cinética de orden cero y siendo la velocidad igual a la V_{max} .

Modelo cinético de Michaelis-Menten

El modelo cinético de Michaelis-Menten describe la velocidad de reacción de muchas reacciones enzimáticas, aunque sólo es válido cuando la **concentración del sustrato es mayor que la concentración de la enzima**, y para condiciones de estado estacionario, es decir, cuando la **concentración del complejo enzima-sustrato es constante**. Para determinar la velocidad máxima de una reacción enzimática (Figura 2), la concentración de sustrato se

aumenta hasta alcanzar una velocidad constante de formación de producto. Esa es la **velocidad máxima (V_{max})** de la enzima, que aparece cuando los sitios activos de la enzima están saturados con sustrato.

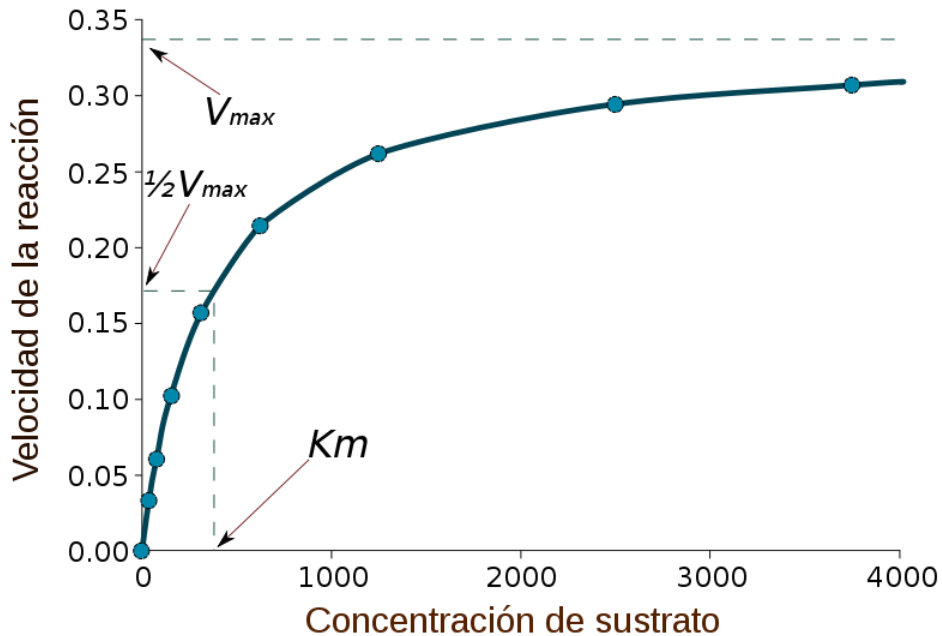
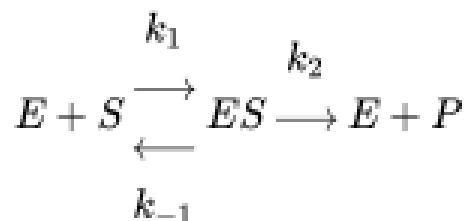


Figura 2. Cinética enzimática. La velocidad de la reacción indica el número de moléculas del sustrato que se convierten en producto por segundo. Fuente: Wikimedia commons.

Con concentraciones crecientes de sustrato, la enzima va acercándose asintóticamente a su **velocidad máxima V_{max}**, sin llegar a alcanzarla, por lo que no existe un valor de concentración de sustrato real para la V_{max}. Puede definirse un parámetro característico de la enzima con la concentración de sustrato a la que se alcanza la mitad de la velocidad máxima (**V_{max}/2**). Esta **concentración de sustrato** se conoce como **constante de Michaelis-Menten (K_m)**. Esta constante representa la **constante de disociación del complejo enzima-sustrato (ES)** (inversa a la de afinidad entre enzima y sustrato). Valores bajos indican que el complejo ES está unido muy fuertemente y raramente se disocia sin que el sustrato reaccione para dar producto.

La derivación de Michaelis y Menten, suponiendo que la reacción enzimática es irreversible, y que el producto no se une al enzima de nuevo después de la reacción, se explica utilizando la ecuación 2.



Ecuación 2. Constantes de la reacción enzimática. Fuente: Wikimedia Commons.

Siguiendo la aproximación del estado estacionario, que señala que la concentración del complejo enzima-sustrato es pequeña y se mantiene casi constante a lo largo de la reacción enzimática, y definiendo K_m como $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$, sustituyendo y reordenando, llegamos a la ecuación 3.

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2 [E_0] \frac{[S]}{K_m + [S]} = V_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Ecuación 3. Variación de la concentración de producto con el tiempo en función de V_{max} , K_m y la concentración de sustrato. Fuente: Wikimedia Commons.

donde $[S]$ es la concentración de sustrato, $[P]$ la concentración de producto, E_0 es el total de enzima, $d[P]/dt$ o V_0 es la velocidad de formación del producto, $k_2[E_0]$ o V_{max} es la velocidad máxima. k_2 se denomina con frecuencia k_{cat} .

Cabe observar que $[S]$ es grande comparada con K_m , $[S]/(K_m + [S])$ tiende a 1. La velocidad de formación de producto es igual a $k_2[E_0]$ en ese caso. Cuando $[S]$ es igual a K_m , $[S]/(K_m + [S])$ vale 0.5. (Figura 2) En ese caso, la velocidad de formación de producto es la mitad de la máxima ($1/2 V_{max}$). Representando gráficamente V_0 frente a $[S]$ se puede determinar V_{max} y K_m . Esto requiere una serie de **experimentos a E_0 constante y diferentes concentraciones de sustrato**.

Para determinar gráficamente los valores de K_m y V_{max} es más sencillo utilizar la **representación doble recíproca** ($1/V_0$ frente a $1/[S]_0$), ya que es una línea recta. Esta representación doble recíproca recibe el nombre de **representación de Lineweaver-Burk** (Figura 3), que es una recta en la cual la pendiente es K_m/V_{max} , a abscisa en el origen ($1/V_0 = 0$) es $-1/K_m$, la ordenada en el origen ($1/[S]_0 = 0$) es $1/V_{max}$

Con esta gráfica, a partir de datos experimentales se puede **calcular gráficamente**, los valores de **K_m y V_{max}** de un enzima para diversos sustratos.

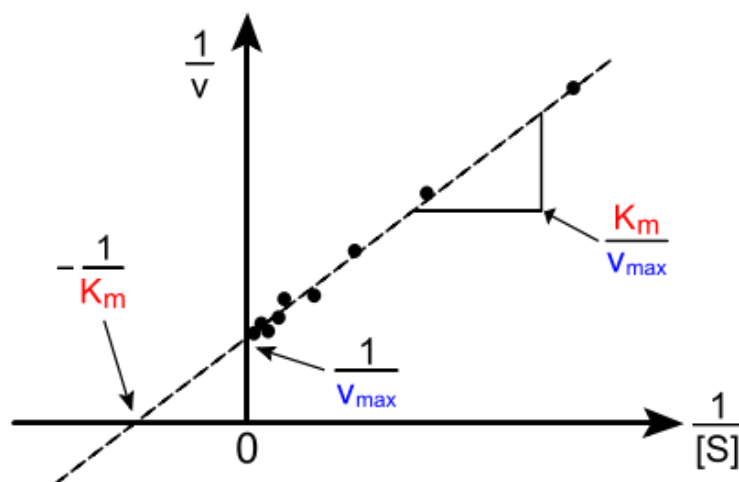


Figura 3. Representación de Lineweaver-Burk (Figura 3). Fuente: Wikimedia Commons.



5 Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos introducido los conceptos básicos de enzimología, para después ampliar en lo relativo al mecanismo de la catálisis y la regulación de la actividad enzimática. Por último, se han abordado los conceptos básicos de cinética enzimática, incluyendo el tratamiento teórico y experimental de los datos para calcular las constantes cinéticas de interés.

6 Bibliografía

Referencias de fuentes electrónicas:

-Wikipedia. <https://es.wikipedia.org/wiki/Enzima>

-Wikimedia commons. <https://commons.wikimedia.org/wiki>

- BioROM. T11. Enzimas.

https://www.sebbm.es/BioROM/contenido/UPV_EHU/enzimas/tema11.htm