



## **Trabajo Práctico : ENZIMAS**

### **Identificación**

#### **OBJETIVO**

- Identificar las enzimas mediante su actividad, frente a sustratos específicos.

#### **INTRODUCCIÓN TEÓRICA**

Las funciones vitales de una célula, ya sea esta de origen animal, vegetal o bacteriano, implican la existencia de una verdadera maraña de procesos o vías metabólicas, consistentes en una secuencia de reacciones químicas que se llevan a cabo con la ayuda de una serie de catalizadores orgánicos llamados enzimas.

Si estas reacciones tuvieran que realizarse en ausencia de tales catalizadores, lo harían con velocidades que en la mayor parte de los casos serían tan extremadamente lentas que las harían incapaces de satisfacer las necesidades fisiológicas de la célula.

No se puede considerar a todas las enzimas como proteínas, al descubrirse las ribozimas (enzimas formadas químicamente por RNA), pero al ser éstas escasas y poco conocidas, al estudiar enzimas consideramos únicamente las de estructura proteica.

Como todos los catalizadores, las enzimas aceleran notablemente la velocidad de la reacción catalizada y cumplen con las siguientes condiciones:

- Son eficaces en cantidades pequeñas.
- Pueden sufrir durante el ciclo catalítico alguna transformación química o física transitoria y reversible, aunque deben quedar, al final de la reacción, química y físicamente inalteradas.

Además de cumplir estas condiciones propias de todos los catalizadores, las enzimas presentan una serie de características, derivada de su naturaleza proteica, que las diferencian netamente de los catalizadores inorgánicos:

- Son termolábiles.
- Presentan una mayor eficiencia, entendiendo como tal el número de moles de sustrato transformado por mol de catalizador en la unidad de tiempo.
- Poseen una alta especificidad en relación con la naturaleza de la reacción que catalizan y sustrato que emplean.
- Están sujetos a una gran variedad de controles celulares, genéticos y alostéricos.



### **Clasificación**

**1-Oxidoreductasas:** catalizan reacciones de óxido-reducción.

1.1 Actúan sobre  $\text{>CH-OH}$

1.2 Actúan sobre  $\text{>C=O}$

1.4 Actúan sobre  $\text{>CH-NH}_2$

1.6 Actúan sobre  $\text{NADH; NADPH}$

**2-Transferasas:** transferencia de grupos funcionales de una molécula a otra.

2.1. Transfieren grupos de un átomo de carbono.

2.2. Transfieren grupos aldehído o cetónicos.

2.7. Transfieren grupos fosfatos.

**3-Hidrolasas:** tipo especial de transferasas que transfieren un grupo  $\text{-OH}$  desde el agua a otro sustrato de manera irreversible.

3.1. ésteres.

3.2. Enlaces glucosídicos.

3.3. Enlaces peptídicos.

**4-Liasas (Sintasas):** adición a los dobles enlaces.

**5-Isomerasas:** reacciones de isomerización. Suponen un movimiento de un grupo o un doble enlace dentro de la molécula, por lo que se obtiene un nuevo isómero.

**6-Ligasas:** formación de enlaces con escisión de ATP.

6.1. C-O

6.2. C-S

6.3. C-N

6.4. C-C

Tabla 8-1. Clasificación de las enzimas según la reacción catalizada	
Clase	subclase
1. Oxidorreductasas	Deshidrogenasas, oxidasas, reductasas, peroxidasas, catalasa, oxigenasas, hidroxilasas
2. Transferasas	Transaldolasas y transcetolasas, fosforiltransferasas, quinasas, fosfomutasas
3. Hidrolasas	Esterasas, glucosidasas, peptidasas, fosfatasas, tiolasas, fosfolipasas, amidasas, desaminasas, ribonucleasas
4. Liasas	Descarboxilasas, aldolasas, hidratasas, deshidratasas, sintasas, liasas
5. Isomerasas	Racemasas, epimerasas, isomerasas, mutasas
6. Ligasas	Sintetasas, carboxilasas



Existe una manera tradicional de nombrarlas que se obtiene al añadir el sufijo “asa” al nombre del sustrato o al tipo de reacción que catalizan.

La forma sistemática de nombrarlas indica más detalles sobre la reacción. Cada enzima se designa con las letras E.C. con un subíndice de cuatro números que indican los siguientes aspectos:

- Primer dígito: nombre de la clase de enzimas (1 a 6 siguiendo la clasificación general).
- Segundo dígito: subclase (tipo de sustrato, donador de electrones o el enlace afectado).
- Tercer dígito: aspectos específicos de la reacción (sustrato, grupo funcional que participa en la reacción, etc.).
- Cuarto dígito: señala el número concreto que ocupa la enzima dentro de la subclase.

Ejemplo: Enzima creatin-quinasa cataliza la reacción:



Nombre recomendado: creatin-quinasa.

Nombre sistemático: ATP: creatin-fosfotransferasa.

Número de clasificación: EC 2.7.3.2., donde EC significa comisión de enzimas y los números:

2 = clase: transferasas.

7 = subclase: fosfotransferasas.

3 = sub-subclase: fosfotransferasas con un grupo N como aceptor.

2 = designa a la creatin-quinasa.

## PARTE EXPERIMENTAL: IDENTIFICACIÓN DE ENZIMAS POR SU ACTIVIDAD

1 - Lipasa:

La lipasa es una enzima encargada de hidrolizar los triglicéridos a ácidos grasos de cadena larga presentes en estado de emulsión en la luz intestinal.

Tomar 0,5 gr de pancreatina (preparado de páncreas) y suspenderlo en 10 ml de agua destilada.

Preparar tres tubos de ensayo:

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
Leche	10 ml	10 ml	10 ml
Pancreatina	1 ml	1 ml (hervida)	10 ml
Rojo fenol	10 gotas	10 gotas	10 gotas
Incubación	Si	Si	no

Dejar los tubos en baño a 37°C de temperatura y observar si vira el indicador de rojo a amarillo, por disminución de pH al formarse los ácidos grasos.



## 2 - Sacarasa:

En el metabolismo de las levaduras la sacarosa se convierte en glucosa y fructosa. Esta transformación ocurre por medio de la enzima sacarasa o invertasa.

Como la sacarosa no es un azúcar reductor, podemos detectar la actividad de la sacarasa por su transformación en azúcares reductores.

Pesar 1 g de levadura, triturar en mortero y suspender en 20 ml de acetona fría. La misma destruye las células sin atacar la enzima. Dejar reposar la suspensión 20 minutos.

Decantar la acetona y extenderla para secar la preparación en un papel de filtro de tal manera de obtener un polvo blanco que contendrá la enzima.

Suspender el polvo en 3 ml de solución buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 4,5.

Agitar 5 minutos y centrifugar 5 minutos a 3000 rpm, recuperando el sobrenadante.

Preparar tres tubos:

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
Agua destilada	1 ml	1 ml	---
Solución enzima	1 ml	---	1 ml
Sacarosa 1%	---	1 ml	1 ml
Incubación	30 min	30 min	30 min

A cada tubo realizar una reacción de Fehling para detectar la presencia de azúcares reductores.

## 3- Amilasa salival:

Es una enzima que hidroliza el almidón dando glucosa. Podemos detectar su acción por la presencia de azúcares reductores o por la negatividad de la reacción de lugol.

Enjuagar la boca con agua y recoger saliva en un vaso.

Preparar cuatro tubos de ensayo:

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
Saliva 1:9	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml



Almidón 1 %	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
T° incubación	0 °C	37 °C	0 °C	37 °C
Tiempo	10 min	10 min	10 min	10 min
	Lugol	Lugol	Fehling	Fehling

Retirar los tubos del baño e investigar la presencia de azúcares reductores con la reacción de Fehling y la ausencia de almidón con Lugol. En caso de ser necesario se incubarán los tubos 10 minutos más.

### 3- Amilasa pancreática:

Tomar 0,2 g de pancreatina y suspender en 10 ml de agua destilada.

Pesar 0,1 g de almidón y suspender en 10 ml de agua destilada.

Preparar cuatro tubos de ensayo:

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
Pancreatina 2%	1,5 ml	---	1,5 ml	---
Almidón 1 %	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
T° incubación	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Tiempo	10 min	10 min	10 min	10 min
	Lugol	Lugol	Fehling	Fehling

Retirar los tubos del baño e investigar la presencia de azúcares reductores con la reacción de Fehling y la ausencia de almidón con Lugol. En caso de ser necesario se incubarán los tubos 10 minutos más

### 4 - Catalasa:

El peróxido de hidrógeno se descompone en agua y oxígeno por acción de la enzima catalasa. Esta reacción puede demostrarse mediante la producción de burbujas.

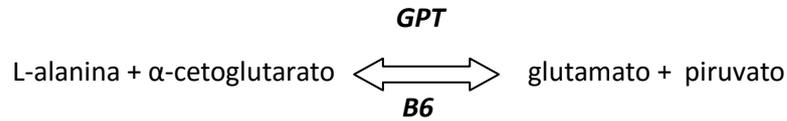


5- Transferasas: Las aminotransferasas catalizan la transferencia del grupo amino de un aminoácido dador a un aceptor adecuado, necesitando fosfato de piridoxal como coenzima.

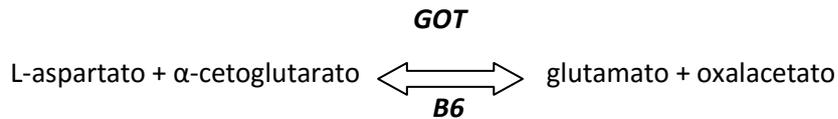


Se estudiarán las siguientes reacciones de transaminación:

**GPT:** glutámico pirúvico transaminasa, alanin amino transferasa o ALAT cataliza la reacción:



**GOT:** glutámico oxalacético transaminasa, aspartato amino transferasa o ASAT cataliza la reacción:



La presencia de las enzimas se demuestra por identificación de la formación de piruvato. El piruvato formado (el oxalacetato es inestable y se transforma en piruvato), reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidracina produciéndose, en medio alcalino, un compuesto de color pardo que se mide a 505 nm.

#### PARTE EXPERIMENTAL

Las enzimas se obtienen de hígado fresco, homogeneizándose en baño de hielo 1gr del mismo con 10 ml de buffer fosfato de potasio 0,05 M, pH 7,4.

Centrifugar 5 minutos a 3.000 rpm. Separar el sobrenadante que contiene la enzima. Hervir 3 minutos una parte y dejar sin hervir otra parte.

	GOT	GOT	GPT	GPT
Sustrato ( ml)	0,5	0,5	0,5	0,5
Homogenato hervido	--	0,5	--	0,5
Homogenato s/ hervir	0,5	--	0,5	--
Incubar 30 min a 37°	si	si	si	si
2,4 DNFH (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5
Incubar 10 min a 37°	si	si	si	si



NaOH 0,4 M (ml)	5	5	5	5
-----------------	---	---	---	---

Mezclar por inversión y comparar para cada enzima, el color desarrollado en cada tubo, teniendo en cuenta que los tubos en donde se encuentra la enzima desnaturalizada por el calor, actúan de blanco de reactivos.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Rivera J. M., Pertierra A. Fundamentos de Bioquímica estructural. Alfaomega S. A. México. 2005. Pág.: 193-198.
- Baynes J., Dominiczak . Bioquímica Médica. 4° Ed. Elseiver España. 2015 . Pág.: 54-57.