



## BLOQUE I: ¿CUÁL ES LA COMPOSICIÓN DE LOS SERES VIVOS?

### TEMA 6. LAS ENZIMAS

1.6.1. Concepto y estructura.

1.6.2. Mecanismos de acción y cinética enzimática (actividad enzimática).

1.6.3. Regulación de la actividad enzimática: temperatura, pH, inhibidores.

#### 6.1. CONCEPTO Y ESTRUCTURA.

Las enzimas comenzaron a estudiarse a finales del siglo XIX. Concretamente fueron las enzimas digestivas, denominadas en aquellos tiempos **fermentos digestivos** y ya entonces se intuyó su función. [Curiosidad: ningún fabricante de yogures se atreve a poner en el apartado de ingredientes “contiene millones de bacterias vivas”. Queda sustituido por “fermentos lácticos”, que obviamente son las enzimas que poseen estos organismos. (Ni aun cuando dicen “L. casei inmunitans” o “Bífidos activos” nombran a las verdaderas fabricantes del yogur)].

El conjunto de las reacciones químicas que tienen lugar en un organismo se denomina **metabolismo**. Estas reacciones pueden consistir en la creación de biomoléculas más o menos complejas, en la descomposición de otras o, de modo general, en la transformación de unas moléculas en otras distintas. En todo ser vivo se están dando continuamente miles de reacciones químicas diferentes.

Muchas reacciones requieren energía para poder ser llevadas a cabo (reacciones endergónicas), pero incluso las que desprenden energía (exergónicas) precisan de un aporte inicial ya que si no la velocidad de reacción resulta extremadamente baja (en muchos casos inapreciable).

Hay dos formas de acelerar la velocidad de una reacción en laboratorio: **calentando** los sustratos o sustancias reaccionantes o empleando un **catalizador**. En los seres vivos se emplean ambos métodos, es decir, se suele aportar una cierta cantidad de calor (los animales homeotermos mantienen una alta temperatura corporal para conseguir una buena facilidad de reacción; los poiquilotermos, en muchos casos, se exponen al Sol y en invierno, sencillamente se aletargan); además del calor, todos los seres vivos emplean catalizadores biológicos o biocatalizadores.

En la industria, el uso de catalizadores es de tal importancia que se sigue investigando para obtener nuevas moléculas que faciliten las reacciones químicas evitando tener que calentar demasiado los reactivos (el uso de la energía encarece enormemente los procesos). El premio Nobel de Química del año 2.005 fue para los diseñadores de los catalizadores empleados en las industrias que trabajan con moléculas orgánicas (plásticos, fibras textiles, etc.).

Las **enzimas** son los catalizadores empleados por los seres vivos, por eso también se les denomina **biocatalizadores**.

Las (o los) enzimas, como catalizadores que son, cumplen las siguientes premisas:

1. Durante la reacción no se alteran.
2. No se consumen.
3. No desplazan la constante de equilibrio de la reacción en la que intervienen. Sólo aumentan la velocidad de reacción en ambas direcciones.

Pero, a diferencia de los catalizadores no biológicos, las enzimas:

1. Presentan una alta **especificidad**.
2. Siempre son proteínas, bien independientes o bien conjugadas con moléculas no proteicas. (La única excepción es un tipo de ARN llamado ribozima).

- Las enzimas, trabajan a temperaturas próximas a la del ambiente (15°C a 40°C no son temperaturas extremas) [como de costumbre, tenemos excepciones: bacterias que viven en aguas termales y bacterias fotosintéticas de los hielos de la Antártida].

### Estructura de las enzimas

Según la composición y a la vez la estructura, distinguimos dos tipos de enzimas:

- Enzimas formadas sólo por proteínas.
- HOLOENZIMAS** que son enzimas que presentan una parte proteica o **apoenzima** y otra no proteica o **cofactor**. A su vez, el cofactor puede ser inorgánico, tratándose generalmente de un ión metálico (Zn, Mg, K,...) o puede ser una molécula orgánica compleja que recibe el nombre de **coenzima**.

Los coenzimas pueden ser de muchos tipos, destacando entre ellos algunos **nucleótidos** (FAD, NAD,...) y las **vitaminas**.

En la proteína enzimática se pueden distinguir tres tipos de aminoácidos según la función que realicen:

- A.a. estructurales** son los que forman parte de la molécula pero no intervienen en la catalización.
- A.a. de fijación** son los que establecen enlaces débiles con el sustrato. Constituyen el **centro de fijación**.
- A.a. catalizadores** que son los que se unen al sustrato provisionalmente pero mediante enlaces covalentes fuertes, de modo que se debilita la estructura del sustrato. Forman el **centro catalítico** de la enzima.

El centro catalítico y el de fijación suelen hallarse próximos y forman el denominado **centro activo**.

### Las coenzimas:

Las coenzimas pueden actuar de diferentes modos. Algunas no llegan a unirse a la proteína, pero colaboran en la transformación del sustrato. Otras se unen a la proteína y forman parte del centro activo. Las coenzimas, a diferencia de las apoenzimas (fracción proteica), sí suelen alterarse durante la reacción química pero una vez acabada ésta, se regeneran rápidamente y vuelven a ser funcionales.

Las coenzimas casi nunca son exclusivas de un solo tipo de apoenzima; en muchos casos una misma coenzima puede formar parte de enzimas con funciones muy diferentes (catalizadoras de reacciones de tipos diversos).

Las coenzimas mejor estudiadas son el NAD, NADP, FMN, FAD, que son nucleótidos (Se comentarán en el tema dedicado a ácidos nucleicos). Todas ellas intervienen en reacciones de deshidrogenación (enzimas deshidrogenasas). Las vitaminas también son coenzimas de muchas enzimas.

## 6.2. MECANISMOS DE ACCIÓN Y CINÉTICA ENZIMÁTICA (ACTIVIDAD ENZIMÁTICA).

En toda reacción química se parte de unas sustancias reaccionantes llamadas **reactivos** o **sustratos** (S) y se llega a unas sustancias finales o **productos** (P).

La transformación no se lleva a cabo directamente, sino que es necesario un paso intermedio en el cual el sustrato se **active**, de forma que sus enlaces se debiliten y estén en disposición de unirse a nuevos átomos. Esa situación intermedia y transitoria se conoce como **complejo activado** y requiere un aporte de energía (generalmente calor) para llegar a él. Se la denomina **energía de activación**. (Ver esquema)



Las enzimas consiguen rebajar la energía de activación y por ello permiten a las moléculas reaccionantes lograr el estado de transición o situación de complejo activado. Pueden hacerlo de dos formas distintas:

1. Debilitando enlaces de modo que no haga falta tanta energía de activación.
2. Acercando (físicamente) las sustancias reaccionantes y disponiéndolas de modo que puedan más fácilmente entrar en contacto y reaccionar.

Las enzimas, una vez realizada la reacción se liberan de los productos de reacción, quedando en disposición de unirse a nuevas moléculas de sustrato. El aumento de velocidad para la mayoría de las enzimas está entre un millón y un trillón de veces.

Las enzimas suelen formar **complejos multienzimáticos**, de modo que el producto de una reacción (obtenido gracias a una enzima) constituye el sustrato de otra reacción y así, sucesivamente, podemos encontrarnos con una serie de 5, 6, 10 ó muchas más reacciones. Se habla también de *reacciones en cadena*, de modo que si falla una de ellas, se paraliza el proceso y no se alcanza el producto final.

[La importancia de las enzimas y el hecho de las reacciones en cadena quedó demostrado al estudiar ciertas enfermedades llamadas metabólicas en las que los pacientes sufren trastornos ante la falta de una enzima: no se obtiene un producto final necesario para el organismo y en cambio aparecen sustancias en sangre y en orina que no deberían estar. Son los sustratos que no han podido seguir la cadena de reacciones. Por ejemplo la fenilcetonuria es una de esas enfermedades].

Esta disposición en cadena –ordenada- de las enzimas **permite que las reacciones químicas tengan lugar en una sola dirección**, ya que como se ha comentado anteriormente, las enzimas **no** modifican el equilibrio de la reacción y sólo aumentan la velocidad de la misma. Ahora bien, si una enzima aprovecha el producto de otra enzima como sustrato, sí se está modificando el equilibrio de la primera reacción, que se desplazará hacia la derecha:

$A+B \leftrightarrow C \leftrightarrow D+E$  La primera reacción es regulada por una enzima. El producto C sirve de sustrato a una segunda reacción, regulada por otra enzima. El hecho de que C sea consumido para ser transformado en D+E, desplaza el equilibrio de la primera reacción hacia la derecha, de modo que tiende a producirse más C y no se descompone éste en A+B.

[Al estudiar la fotosíntesis, veremos que el rendimiento global de la misma es bajo debido al fenómeno de la fotorrespiración; consiste básicamente en que una parte importante de la materia orgánica recién sintetizada (carbono reducido) es oxidada por el oxígeno. La razón es que la enzima encargada del primer proceso es la que hace el segundo, ya que reducción y oxidación del carbono son los resultados de la misma reacción pero en dirección contraria. En este caso, un exceso de oxígeno en el medio desplaza el equilibrio de la reacción].

Algunas enzimas no son activas hasta que actúan sobre ellas otras enzimas o iones (por ejemplo  $H^+$  o medio ácido). Se denominan **zimógenos o proenzimas**. Por ejemplo, el pepsinógeno vertido al estómago es el zimógeno de la pepsina, activándose en presencia de ácido clorhídrico. También hay zimógenos formando parte del sistema de coagulación de la sangre. (Es un mecanismo de control para las propias enzimas: aunque ya estén fabricadas no comenzarán a actuar hasta que se den unas condiciones determinadas).

Continuando con la estructura de las enzimas, debe resaltarse el hecho de que la actividad catalítica está relacionada con la configuración tridimensional de la proteína. Este hecho se comprueba fácilmente, ya que si desnaturalizamos la proteína enzimática, cesa su actividad catalítica.

El sustrato (o sustratos) debe poseer algún grupo funcional que le permita unirse a la enzima de modo que la molécula quede situada de forma precisa en el lugar adecuado. Una vez colocado en su posición correcta, el sustrato debe poseer un enlace químico específico que será “debilitado” por la enzima.

Algunas enzimas poseen una especificidad casi absoluta con un determinado sustrato, mientras que otras pueden actuar sobre varios diferentes que, eso sí, comparten algún rasgo estructural. Una primera aproximación a la interacción enzima-sustrato es el llamado modelo de **llave-cerradura** (Fischer año 1.894) en la que se propone que la especificidad entre enzima y sustrato es la que existe entre una llave y su cerradura. Pero, las pruebas indican que no existe tanta rigidez y que los a.a. de las proteínas tienen una cierta movilidad. Así, tiempo después se propuso el modelo de **ajuste inducido** o de **la mano y el guante** (Koshland). Según este modelo, el sustrato no tiene por qué encajar perfectamente en un hueco hecho a su medida en el enzima sino que al aproximarse a ésta, la proteína modifica su configuración, adaptándose a la forma de la molécula de sustrato (un guante no es rígido como una cerradura sino que se adapta a la forma de la mano cuando esta penetra en él). (La ligera modificación en la estructura tridimensional de la proteína no puede compararse a la alteración que puede llegar a sufrir la coenzima y en ambos casos es transitoria).

### 6.3. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA: TEMPERATURA, PH, INHIBIDORES.

En la actividad de una enzima influye una serie de factores entre los que destacan los siguientes:

#### 1- Temperatura.

La elevación de la temperatura provoca un aumento de la energía inicial de las moléculas (mayor agitación térmica) que las acerca al estado de transición (complejo activado), que de por sí ya es rebajado por acción de la enzima. De aquí que un incremento de la temperatura aumente la velocidad de reacción. Pero a partir de un cierto límite la excesiva agitación de las partículas en vez de favorecer las reacciones químicas las dificulta y, por otra parte, hay un momento en que las proteínas se desnaturalizan y dejan de actuar. Existe una temperatura óptima para la cual la actividad de cada enzima es máxima. En general, las enzimas están “adaptadas” a la temperatura a la que habitualmente se encuentran las células del ser vivo: en los mamíferos la  $T^a$  óptima se halla a  $37^{\circ}\text{C}$ ; en las aves a  $42^{\circ}\text{C}$  y es de suponer que los vegetales pueden tener un metabolismo óptimo por debajo de esas temperaturas.

[Las enzimas se desnaturalizan por encima de los  $50^{\circ}\text{C}$  aproximadamente, pero hay una excepción muy llamativa: son las enzimas, y en realidad todas las proteínas, de las bacterias extremófilas: son organismos que viven en aguas termales a temperaturas que rondan los  $90^{\circ}\text{C}$ . Esta cualidad se emplea actualmente en las técnicas de replicación artificial de ADN, concretamente en la **PCR** o reacción en cadena de la polimerasa. En pocas palabras, consiste en separar las dos cadenas de la molécula de ADN que se quiere duplicar empleando una alta temperatura en presencia de nucleótidos y utilizando una ADN-polimerasa, la **TAC** extraída de la bacteria *Thermus aquaticus*. La enzima ADNpol coloca nucleótidos complementarios a los que aparecen en una cadena sencilla de ADN]. Por otra parte, es de suponer que las enzimas de las cianobacterias de los hielos antárticos tienen su temperatura óptima muy cerca de los  $0^{\circ}\text{C}$ , y por lo tanto esta baja temperatura no desnaturaliza sus proteínas y además les permite trabajar correctamente].

#### 2- pH.

Por encima y por debajo de un cierto pH la mayor parte de las enzimas deja de cumplir con su misión. Entre ambos extremos encontramos un pH óptimo en el cual la actividad enzimática es máxima.

El pH óptimo varía en función del tipo de enzima y de sustrato. Es lógica la adaptación de la enzima al pH reinante en el medio en el que se realiza la catálisis (por ejemplo, la pepsina alcanza su velocidad máxima a  $\text{pH} = 2$ , que es el que hay en el estómago).

Un pH muy alejado del óptimo puede también suponer la desnaturalización de la enzima con la consiguiente pérdida de actividad.

Existen algunas enzimas, como la papaína, cuya actividad no se ve afectada por cambios en el pH del medio en el que se encuentren.



### 3- Activadores.

Son ciertas sustancias, concretamente algunos iones, que favorecen la unión enzima sustrato. Por ejemplo, el Mg favorece la reacción por la cual el ADP es transformado en ATP por reacción del primer compuesto con ácido fosfórico. (En ningún caso el metal actúa como cofactor de la enzima). [Se hablará del ADP y del ATP en el próximo tema].

### 4- Inhibidores.

Son sustancias que disminuyen la actividad de la enzima e incluso la impiden por completo. Según el modo de acción del inhibidor, la inhibición puede ser de varios tipos:

- **Inhibición irreversible o envenenamiento de la enzima.** El inhibidor se fija permanentemente al centro activo de la enzima por lo que no hay posibilidad de que actúe sobre el sustrato. Por ejemplo, el *cianuro potásico* actúa de este modo sobre una enzima mitocondrial –un citocromo– impidiendo que se produzca una reacción de oxidación (respiración celular). Se habla de envenenamiento de la enzima. [Saliendo del tema de enzimas y yendo al de los catalizadores industriales, podríamos decir que a la gasolina antigua se le eliminó el plomo que tenía por dos motivos: uno era para evitar la contaminación del aire y la otra, que este metal envenena el catalizador del tubo de escape y lo inutiliza].
- **Inhibición reversible.** El inhibidor se fija temporalmente a la enzima, pudiendo actuar de varios modos.

**Inhibición reversible competitiva.** En este caso el inhibidor se parece estructuralmente al sustrato y compite con él por ocupar el centro activo. El inhibidor se une y se desprende sin ser modificado.

**Inhibición reversible no competitiva.** El inhibidor puede actuar de dos maneras, o bien se une al complejo enzima-sustrato impidiendo que se produzca la reacción o que se desprenda el producto; o bien se une a la enzima impidiendo el acceso del sustrato al centro activo. (fot. 3, fig. 5)

### 5- Concentración de sustrato y AFINIDAD de la enzima por el sustrato.

Para una concentración constante de enzima ([E]= cte.) se observa que hay un aumento en la velocidad de reacción que es directamente proporcional a la concentración de sustrato. Este proceso se mantiene hasta un cierto punto, a partir del cual un aumento en la concentración no supone un aumento de la velocidad. Decimos que se ha alcanzado la **velocidad máxima** ( $V_{max}$ ) y esto sucede porque en estas condiciones todas las moléculas de enzima están **saturadas**, lo cual significa que todas ellas están en la forma de complejo ES, por lo que el exceso de sustrato no puede reaccionar por falta de enzima libre.

La velocidad de reacción viene dada por la ecuación de Michaelis-Menten, según la cual:

$$V = V_{max} \cdot [S] / [S] + K_M$$

Donde **V** es la velocidad de la reacción;  $V_{max}$  es la velocidad máxima de reacción para una **[E]** dada; **[S]** es la concentración de sustrato de partida y  $K_M$  es la constante de Michaelis-Menten, que representa la **[S]** a la que una enzima alcanza  $\frac{1}{2}$  de  $V_{max}$  (entender la gráfica).

$K_M$  nos da una idea de la **afinidad** (o “apetencia”) de la enzima por el sustrato, esto es, la facilidad con la que enzima y sustrato forman el complejo enzima-sustrato [ES]. Cuanto menor es el valor de  $K_M$ , mayor es la afinidad de la enzima por el sustrato y significará que con cantidades muy pequeñas de sustrato en el medio se alcanzan velocidades cercanas a la máxima. Por el contrario una constante alta indicará que la afinidad es pequeña y por ello se requerirá una

cantidad relativamente elevada para que la velocidad de la reacción se acerque a la velocidad máxima. (Ver gráficas). En ambos casos la velocidad máxima de reacción puede ser la misma, pero una mayor afinidad nos asegurará que incluso con muy poco sustrato en el medio la reacción va a tener lugar de forma rápida. Pensemos que la cantidad de sustrato es en general limitada, por lo que no siempre se alcanza la máxima velocidad posible.

Existen enzimas que catalizan la misma reacción pero que poseen  $K_M$  y  $V_{max}$  diferentes. Se denominan **isozimas** y son muy importantes para ciertas reacciones en lugares diferentes de la célula o en distintas células del mismo organismo. La diferente afinidad y en consecuencia la diferente velocidad resulta ser una manera de regular procesos metabólicos.

## MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Ya hemos visto que las enzimas son las responsables de la realización de las reacciones químicas de los seres vivos, también que ciertos factores pueden influir sobre ellas y cómo además pueden presentar diferente afinidad catalizando una misma reacción. Pues bien, puede darse un grado más de control del metabolismo celular. Existen unas enzimas denominadas **enzimas alostéricas** que presentan unas características y unos comportamientos especiales. Sus curvas de velocidad de reacción / concentración de sustratos son típicamente sigmoideas (forma de S).

Las enzimas alostéricas contienen un **centro regulador** además del centro activo. Muchas de estas enzimas suelen estar formadas por varias subunidades y cada una de ellas también posee su centro regulador. Cuando el centro regulador o alostérico está vacío, la enzima actúa a "velocidad normal", pero cuando el centro regulador es ocupado por una molécula a la que llamamos **modulador o regulador**, la enzima sufre un cambio en su configuración que la hará más activa o menos activa que antes en función de que el elemento regulador sea activador o inhibidor respectivamente. Aquellas sustancias que favorecen el paso a la forma activa se denominan **moduladores positivos o activadores**. El propio sustrato de la reacción puede ser el activador (o bien otras moléculas). Las que hacen pasar la enzima al estado inhibido (con muy poca afinidad por el sustrato) se llaman **reguladores negativos o inhibidores alostéricos**.

Una misma enzima alostérica puede tener moduladores positivos y también inhibidores, incluso más de uno en ambos casos, que encajarán en centros reguladores específicos.

Si la enzima alostérica está formada por varias subunidades, un activador que se sitúe en el centro regulador de una de ellas hará entrar al resto de las subunidades en el mismo estado de actividad de la primera (activación o inhibición). A este efecto se denomina **transmisión alostérica o cooperatividad**.

Algunas enzimas alostéricas requieren un activador para pasar a la forma activa (y sin él no actúan). Este activador suele ser el mismo sustrato. Otras enzimas alostéricas, por el contrario, sin activador ya tienen actividad catalítica y cuando se les une un regulador (inhibidor) se inactivan.

Las enzimas alostéricas suelen encontrarse en los **sistemas multienzimáticos** constituyendo la primera de las enzimas de la cadena de reacciones y el inhibidor no es otro que el producto final de la reacción. De esta manera estas enzimas actúan como reguladoras de todo el sistema de reacciones. A este tipo de control se denomina **retroalimentación negativa o feedback**: cuando la cantidad de producto final aumenta por encima de un cierto límite, produce en la enzima alostérica una inhibición que hace detenerse a todo el proceso. Cuando la concentración del producto final disminuye (por ejemplo porque ha sido utilizado), la enzima vuelve a estar activa y comienzan nuevamente las reacciones en cadena.



## Nomenclatura y clasificación de enzimas.

Se establecen 6 grandes grupos de enzimas según el tipo de reacción que catalicen:

1. **OXIDORREDUCTASAS.** Intervienen en reacciones de óxido-reducción. Entre todas ellas destacan las **hidrogenasas** que transportan hidrógenos ( $H^+$ ) y las **oxidasas** que captan electrones y los transfieren al oxígeno. Son enzimas propias de la cadena respiratoria.
2. **TRANSFERASAS.** Se encargan de transferir grupos de un sustrato a otro.
3. **HIDROLASAS.** Catalizan reacciones de hidrólisis que consisten en la rotura de enlaces entre los monómeros de macromoléculas introduciendo moléculas de agua. Hay subclases como las peptidasas, lipasas, amilasas, etc.
4. **LIASAS.** En general producen dobles enlaces ( $C=C$ ,  $C=N$ ,  $C=O$ ) mediante la eliminación de ciertos grupos químicos presentes en la cadena carbonada del sustrato.
5. **ISOMERASAS.** Transforman unas moléculas en otras isómeras de las anteriores (fructosa en glucosa por ejemplo).
6. **LIGASAS O SINTETASAS.** Unen moléculas o grupos funcionales a otras moléculas empleando la energía aportada por el ATP.

**Nomenclatura:** las enzimas pueden tener varios nombres tal y como sucede con los compuestos químicos.

- **Nombre recomendado** (nombre “vulgar”). Es un nombre que viene de antiguo y que se usa de modo generalizado. Por ejemplo la pepsina.
- **Nombre sistemático.** Este nombre hace referencia a los sustratos y a la función que realiza la enzima, terminado en **asa**. Ejemplo: succinato deshidrogenasa.
- **Número de clasificación.** Actualmente y para evitar ambigüedades, dado el alto número de enzimas conocidas, al nombre sistemático se le añaden 4 números que definen los siguientes aspectos:
  - ◆ El primer número define la **clase** (del uno al seis, puesto que hay seis clases).
  - ◆ El segundo número se refiere a la **subclase**.
  - ◆ El tercer número hace referencia a la **subsubclase**.
  - ◆ El cuarto número es arbitrario dentro del grupo anterior.

Un ejemplo de todo lo anterior: La enzima de nombre recomendado **Carboxipeptidasa A**, tiene como nombre sistemático **peptidil-l-aminoácido hidrolasa**. Su número de clasificación es **EC 3.4.17.1** (EC= comisión de enzimas; 3= clase hidrolasas; 4= subclase enlace peptídico; 17= metalocarboxipeptidasas (posee un ion  $Zn^{++}$ ); 1= dentro de la subsubclase es la que lleva ese número).