



Enzimas

Objetivos

Al finalizar este laboratorio el estudiante podrá:

1. Explicar qué es una enzima y cómo éstas actúan en reacciones intracelulares.
2. Identificar factores que afectan la actividad enzimática.
3. Distinguir entre inhibición competitiva e inhibición no-competitiva.

INTRODUCCIÓN

Las células llevan a cabo simultáneamente una gran cantidad de reacciones químicas necesarias para la vida. Muchos de los productos de esas reacciones se necesitan inmediatamente, y si no fuera por la participación de las enzimas, algunas reacciones no se producirían tan rápido. Las **enzimas**, en su mayoría proteínas o RNA (riboenzimas), son catalizadores químicos que agilizan una reacción que envuelve la formación o rompimiento de enlaces químicos.

Las enzimas no se consumen en las reacciones, ni tampoco se alteran, razón por lo cual no se necesitan en grandes cantidades. Las enzimas actúan sobre los sustratos formando un **complejo enzima-sustrato**; esto ocurre en un lugar en específico conocido como el **sitio activo** de la enzima. Las enzimas son muy selectivas porque pocas moléculas pueden interactuar bien con este sitio (Figura 5.1).

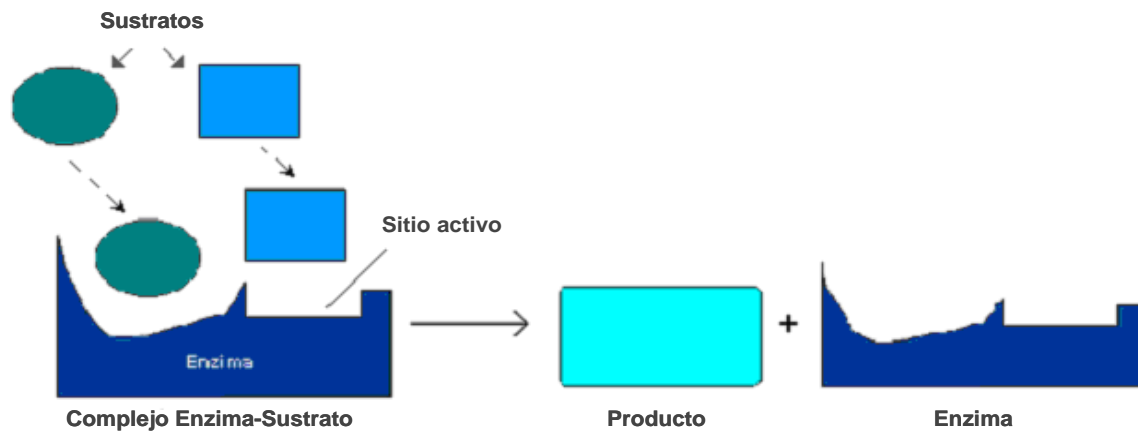


Figura 5.1

Reacción con participación de una enzima.

Las enzimas reducen la **energía de activación** necesaria para llevar a cabo una reacción; es decir, reducen la barrera de energía que hay que superar para que la reacción se lleve a cabo (Figura 5.2).

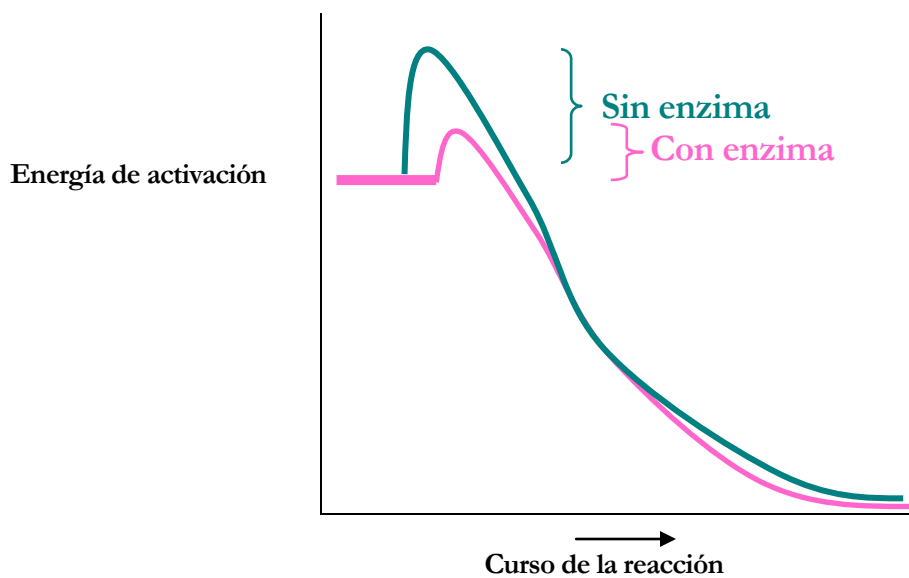


Figura 5.2

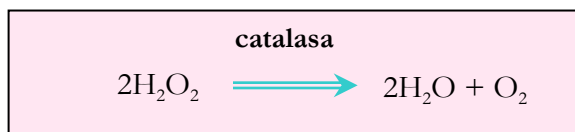
Energía de activación necesaria para iniciar la reacción.

Las enzimas trabajan óptimamente bajo condiciones específicas y ciertos cambios pueden alterar el funcionamiento de la enzima, desactivarla o hasta destruirla. Algunas enzimas necesitan *activadores* para cambiar su conformación de modo que pueda formarse el complejo enzima-sustrato. Estos activadores se conocen como **cofactores** y pueden ser tan simples como iones metálicos. Los cofactores orgánicos se conocen como **coenzimas**. Las enzimas pueden afectarse negativamente por *inhibidores* que impidan la actividad enzimática. Estos inhibidores pueden afectar el sitio activo de dos maneras: competitivamente, al bloquear el sitio activo, o no competitivamente, al pegarse en otro lugar de la enzima y alterar indirectamente la forma del sitio activo.

EJERCICIO 5.1
FUNCIONAMIENTO DE LA CATALASA EN VARIOS ORGANISMOS

A. Factores que afectan el funcionamiento de la catalasa

En los ejercicios siguientes se estudiará el cómo algunos factores pueden afectar funcionamiento de la **catalasa**. Esta enzima está presente en casi todas las células aeróbicas y actúa descomponiendo *peróxido de hidrógeno* (agua oxigenada) en agua y oxígeno, según la siguiente reacción:



A.1. Funcionamiento de la enzima catalasa en varios organismos

MATERIALES

Por laboratorio:

- Peróxido de hidrógeno
- Papa
- Hígado
- Setas
- Espinaca o cebolla
- Gasa (*cheesecloth*)
- Placas de porcelana
- Goteros o pipetas desechables
- Morteros o licuadora
- Embudo
- “Beakers” o vasos

PROCEDIMIENTO

En este ejercicio se preparará un **homogenado de hígado** para obtener partículas pequeñas y uniformes al mezclarlas con el agua.

1. Para preparar el homogenado, corte en pedazos por separado la muestra de hígado.
2. Usando una licuadora o mortero, muele el material con un poco de agua hasta diluir parte de la muestra; no muele excesivamente para que no queden pedazos muy pequeños del material.
3. De ser necesario, filtre el macerado con una gasa (*cheesecloth*).
4. Coloque el homogenado en un “beaker”.
5. Usando un gotero, coloque cinco cuatro gotas del homogenado de hígado en una de las fosas de la placa de porcelana y añada tres gotas de peróxido de hidrógeno.
6. En otra fosa coloque un pedazo pequeño de una seta. Rompa este pedazo con un bisturí en pedazos más pequeños. Añada tres gotas de peróxido de hidrógeno.
7. Haga el mismo procedimiento que en el #6, en otra fosa con un pedazo de espinaca o cebolla.
8. A una fosa añada cuatro gotas de agua y tres gotas de peróxido de hidrógeno.

9. Anote los resultados en la Tabla 5.1:

Tabla 5.1 Resultados homogenado con peróxido de hidrógeno	
Homogenado	Reacción al añadir gotas de peróxido
Agua	
Setas	
Hígado	
Espinaca	

10. ¿Qué ocurrió al añadir el peróxido?

11. ¿Ocurrió lo mismo en todas las muestras?

12. ¿Por qué se forman burbujas?

13. ¿Qué otros organismos podrían usarse para esta prueba?

14. ¿Por qué se preparó un homogenado o se picaron las muestras? ¿Por qué no se añadió el peróxido directamente a los tejidos sin macerarlos?

15. ¿Qué indican los resultados sobre la fisiología de estos organismos?

A.2. Efecto de la temperatura sobre el funcionamiento de las enzimas

MATERIALES

- Homogenado de hígado
- Baño de agua
- Tubos de ensayo grandes
- Gradilla de tubos de ensayo
- Termómetro
- Agarradera de tubo
- Hielo
- Congelador
- “Hot plate”

PROCEDIMIENTO

1. Rotule cinco tubos de ensayo del 1 al 5 y caliente un baño de agua hasta 37 °C y otro hasta 80°C.
2. Añada 5 mL de hígado homogenado a cada tubo.
3. Mantenga los tubos a las siguientes temperaturas:
 - Tubo 1 = 80 °C por 15 minutos
 - Tubo 2 = 37 °C por 15 minutos
 - Tubo 3 = Temperatura ambiental
 - Tubo 4 = Hielo por 30 minutos
 - Tubo 5 = Congelador a 4 °C por 30 minutos
4. Añada 2 mL de peróxido de hidrógeno al tubo 1.
5. Mida el tiempo transcurrido desde que se añadió el peróxido hasta que se comienzan a producir burbujas, y anótelos en la Tabla 5.3.
6. Repita con los demás tubos.
7. Compare sus resultados en término de tiempo de reacción vs. temperatura.

Tabla 5.3 Resultados del efecto de temperatura			
Tubo	Temperatura	Tiempo que tardó en comenzar reacción	Observaciones
1	80 °C		
2	37 °C		
3	Ambiente		
4	Hielo		
5	Congelador (4°C)		

8. ¿Cómo se relacionan la temperatura y la actividad enzimática?

9. ¿Qué le sucede a las enzimas cuando se exponen a temperaturas extremas (muy frías o muy calientes)?

A.3. El efecto del pH sobre el funcionamiento de las enzimas

MATERIALES

- Homogenado de hígado
- Tubos de ensayo grandes
- Gradilla de tubos de ensayo
- Agarradera de tubo
- Solución 3M de HCL
- Solución 3M de NaOH
- Probeta
- Pipetas desechables

PROCEDIMIENTO

1. Rotule tres tubos de ensayo A, B y C
2. Añada 3 mL de homogenado de hígado a cada tubo.
3. Añada soluciones 3M de HCl o 3M de NaOH a los tubos como se indica a continuación, y agite suavemente hasta mezclar:

Tubo A – 3 ml de 3M HCl

Tubo B – 3 ml de 3M NaOH

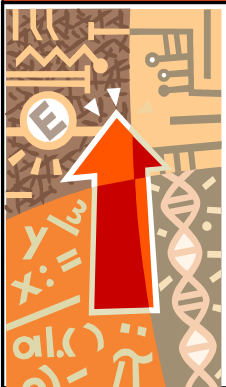
Tubo C – control (no ácido ni base)

4. Añada 3 mL de peróxido de hidrógeno a cada tubo.
5. Observe y anote las reacciones en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4 Resultados del efecto del pH sobre la actividad enzimática		
Tubo	Tiempo que toma la reacción en completarse	Descripción comparativa de las reacciones
A		
B		
C		

6. ¿Cómo afecta el pH la actividad enzimática?
7. Las enzimas del estómago funcionan óptimamente a un pH de 2. ¿Cómo se afectaría la digestión si el pH aumenta a 4?
8. ¿De qué otras maneras se podría explorar el funcionamiento de las enzimas estudiadas en el laboratorio?
9. ¿Puede mencionar otras enzimas que actúan en nuestro cuerpo?
10. ¿Qué efecto podría tener una fiebre alta prolongada sobre el funcionamiento de las enzimas?
11. Busque un ejemplo de una condición médica que se deba al mal funcionamiento de una enzima.

INFORMACIÓN ADICIONAL



- La catalasa: se encuentra en casi todas las células aeróbicas, donde acelera el rompimiento de peróxido de hidrógeno (producto tóxico de las células). A veces, la reducción de oxígeno al agua es incompleta y se produce “superóxido”, una sustancia sumamente tóxica. Una enzima rompe el “superóxido” y forma agua y peróxido de hidrógeno, que es menos tóxico. La catalasa entonces rompe el peróxido de hidrógeno para producir agua y oxígeno.

LABORATORIO 5: ENZIMAS

PLAN DE ENSEÑANZA PARA LOS INSTRUCTORES

Destrezas que el estudiante adquirirá a partir de este laboratorio:

1. Trabajo individual y grupal.
2. Se enfatiza la división óptima de tiempo para tareas en grupos.
3. Se aprenderán técnicas de laboratorio.
4. Se practicarán destrezas de comunicación escrita y se reforzarán los conceptos de investigación científica.

Manejo del laboratorio:

- El instructor debe introducir los términos generales brevemente, dejando para la discusión final los términos más específicos.
- Asegúrese de explicar bien el procedimiento a seguirse, recalcando el uso eficiente del tiempo.
- Debe discutirse qué se espera del informe escrito y debe repasarse el método científico.
- Vocabulario que los estudiantes deben conocer al finalizar el laboratorio:

Enzima, catalizador, sustrato, producto, sitio activo, complejo enzima-sustrato, activadores, cofactores, coenzimas, inhibidores competitivos, inhibidores no-competitivos y energía de activación

- Recordarles a los estudiantes que vengán preparados para el próximo laboratorio y anunciarles la prueba corta de la semana (si va a ofrecerse).

Manejo del tiempo:

1. Presentación de objetivos e introducción10 minutos
2. Visita al invernadero para tomar datos
(Laboratorio 2)10 minutos
3. Ejercicio 5.1
 - A.1: Enzima catalasa en varios organismos.....30 minutos
 - A.2: ¿Se comportan los organismos iguales?.....30 minutos
 - A.3: Efecto de la temperatura sobre las enzimas30 minutos
 - A.4: Efecto del pH sobre las enzimas30 minutos
4. Discusión y repaso de objetivos15 minutos
5. Prueba corta10 minutos
5. Discutir asignación de informe corto:
 - Preparar introducción10 minutos
6. Recoger el laboratorio5 minutos