

### 33. Extracción y ensayo de actividades glicosidasas de girasol. Efecto de la concentración de enzima y sustrato, del pH y de la temperatura sobre la actividad enzimática

Nieves Abril Díaz, José A. Bárcena Ruíz y Jesús V. Jorrín Novo

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales,  
Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba*

#### RESUMEN

Las enzimas son proteínas (con la excepción de los RNA catalíticos) producidos por los seres vivos que catalizan con gran eficacia las reacciones biológicas, actuando de forma específica y regulada. Las anteriores propiedades hacen que los enzimas se puedan aplicar, de forma muy eficaz, a procesos industriales tales como la obtención de fármacos, procesado de alimentos y en analítica. La cinética enzimática es la parte de la enzimología que estudia la velocidad de las reacciones catalizadas enzimáticamente y el efecto que diferentes factores físico-químicos sobre dicha velocidad. En esta práctica calcularemos los parámetros cinéticos que caracterizan a la enzima  $\alpha$ -manosidasa de plántulas de girasol y veremos cómo la velocidad de la reacción que cataliza se ve afectada por diversos factores como pH, temperatura y concentración de enzima y de sustrato.

*Palabras clave:* catalizador,  $k$  catalítica,

*Abreviaturas empleadas:* E: enzima; PNP: *p*-nitrofenol; S: sustrato

#### 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

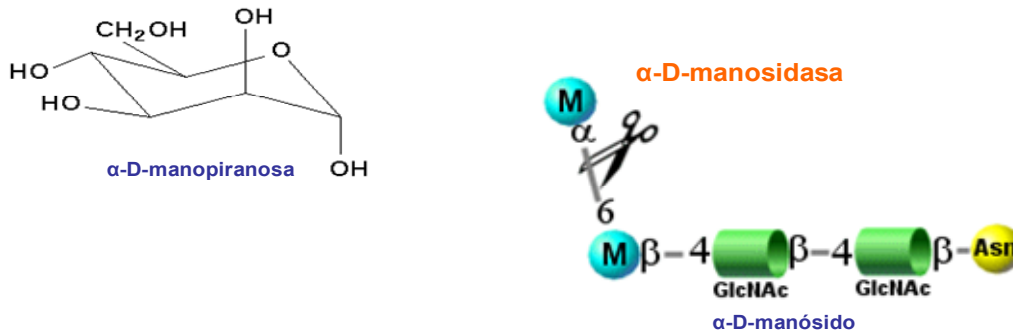
##### 1.1. Determinación de actividades enzimáticas.

Para el ensayo de actividades enzimáticas se preparan las denominadas *mezclas de ensayo*. En el caso más simple, éstas contienen un **tampón** (que determina el pH y la fuerza iónica a la que se lleva a cabo la reacción), el **sustrato** y la **enzima**. La mezcla de ensayo se incuba durante un determinado periodo de tiempo y a una cierta temperatura. Transcurrido ese tiempo, y en el caso más general, se analiza la cantidad de producto formado, siguiendo diferentes técnicas analíticas (colorimétricas o espectrofotométricas en la mayoría de los casos, aunque también se pueden utilizar, dependiendo del producto, técnicas fluorimétricas, radioisotópicas, etc). Para cada ensayo se ha de preparar un **blanco**, que nos va a permitir determinar la cantidad de producto que aparece en la mezcla de ensayo que no se ha originado por la acción del enzima y que es debido a transformaciones químicas o a su

presencia en la mezcla (esto se da cuando no utilizamos el enzima puro). Hay diferentes formas de preparar un blanco, siendo las más habituales aquellas en las que en la mezcla de ensayo no se añade sustrato (blanco de sustrato) o enzima (blanco de enzima).

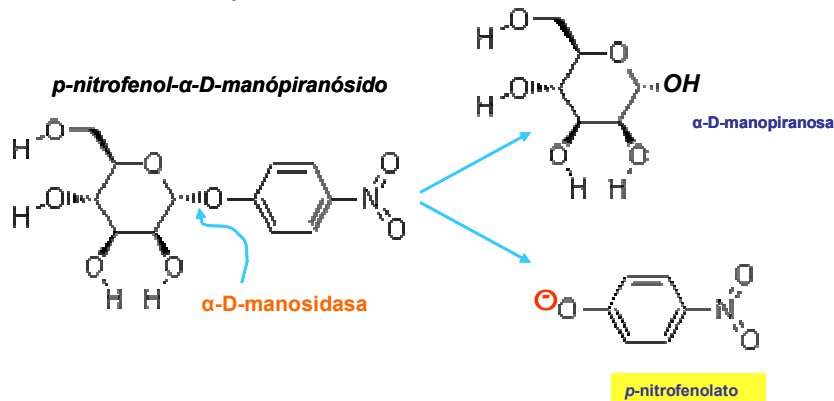
### 1.3. Actividad $\alpha$ -manosidasa.

La  $\alpha$ -manosidasa ( $\alpha$ -D-manósido hidrolasa, E.C. 3.2.24) cataliza la hidrólisis del extremo terminal no reductor de  $\alpha$ -D-manosa en manósidos (**Fig.1**). Como fuente de la actividad enzimática vamos a utilizar plántulas de girasol.



**Fig. 1.** La enzima  $\alpha$ -manosidasa reconoce unidades de  $\alpha$ -manosa en los manósidos y corta el enlace  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6).

Para el ensayo de la actividad manosidasa se utiliza un sustrato artificial, **p-nitrofenol- $\alpha$ -D-manópironósido**, que por acción de la manosidasa se escinde en  $\alpha$ -D-manópironosa y p-nitrofenol, quien presenta, a pH básico una coloración amarilla (máximo de absorción a 405 nm) (Fig. 2). La actividad enzimática se determina midiendo la cantidad de producto (p-nitrofenol, PNP) formado por unidad de tiempo.



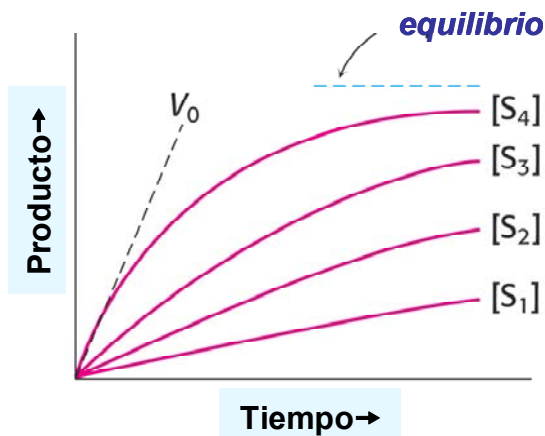
**Fig. 2.** La enzima  $\alpha$ -manosidasa reconoce la unidad de  $\alpha$ -manosa en el sustrato artificial p-nitrofenol  $\alpha$ -D-manopiranososa y corta el enlace glicosídico, liberando p-nitrofenol, el cual presenta color amarillo en una solución básica, que se puede medir espectrofotométricamente. A partir de los valores de absorbancia, se pueden calcular los valores de concentración de producto en la mezcla de ensayo. Y a partir de los valores de concentración de PNP y teniendo en cuenta el volumen de la mezcla de ensayo y el tiempo de incubación, se calculan los valores de actividad enzimática (kat o U.I.).

En la presente práctica se va a llevar a cabo la extracción, ensayo de la actividad  $\alpha$ -manosidasa de plántulas de girasol y la determinación de sus

parámetros cinéticos. Es conveniente que el alumno acuda a sus notas de clase o a un libro de texto de bioquímica general y repase los conceptos básicos sobre enzimología para un mejor entendimiento y aprovechamiento de la práctica y para presentar y discutir los resultados obtenidos en el cuaderno de prácticas.

#### 1.4 Determinación de velocidades iniciales

La actividad catalítica de una enzima se determina midiendo velocidades iniciales de reacción, que es la pendiente de la curva **[Producto]/tiempo** en el tiempo cero (**Fig. 3**). De forma general, y a tiempos largos, la velocidad de reacción decae, lo que puede ser debido, entre otros factores, a una disminución en la concentración de sustrato y aumento de la de producto, cambios de pH, inactivación del enzima, etc.



**Fig. 3. Determinación de la  $v_0$**  : La velocidad inicial de una reacción enzimática para una determinada cantidad de enzima, depende de la concentración inicial de sustrato y se calcula como la pendiente de la parte lineal de la curva **[Producto]/tiempo** (en el tiempo cero).

Para que la determinación de la actividad del enzima sea fiable, los ensayos de actividad deben de realizarse a tiempos en los que la reacción progresa linealmente con el tiempo.

A partir de la curva velocidad/tiempo se puede calcular la constante cinética de desaparición de sustrato o aparición de producto (velocidad inicial e unidireccional), que es la tangente de la curva en el tiempo cero.

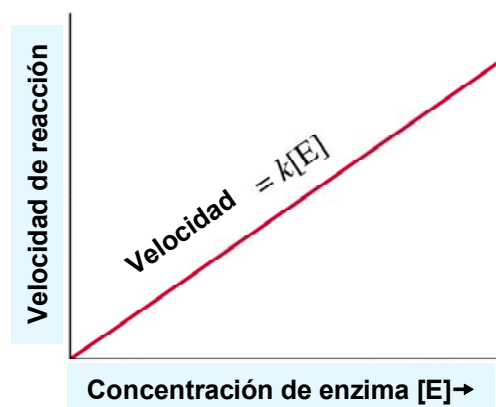
$$v = -d[S]/dt = d[p]/dt = k[S]; k = v_0 ; \text{ para } [S] \ll K_m$$

#### 1.5 Efecto de la concentración de enzima sobre la actividad enzimática

De forma general, la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente es proporcional a la cantidad de enzima en la mezcla de ensayo (**Fig.4**), según:

$$v = k_{cat} [E_0]$$

Con algunos sistemas enzimáticos, en especial cuando se trabaja con



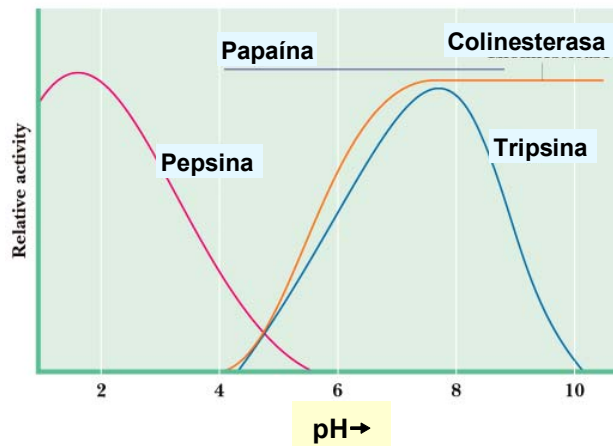
**Fig. 4.** La velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente es generalmente proporcional a la cantidad de enzima en la mezcla de ensayo.

extractos enzimáticos no purificados se observan desviaciones respecto al patrón indicado, debido, entre otros factores a la presencia de activadores e inhibidores, a enzimas oligoméricos disociables, etc.

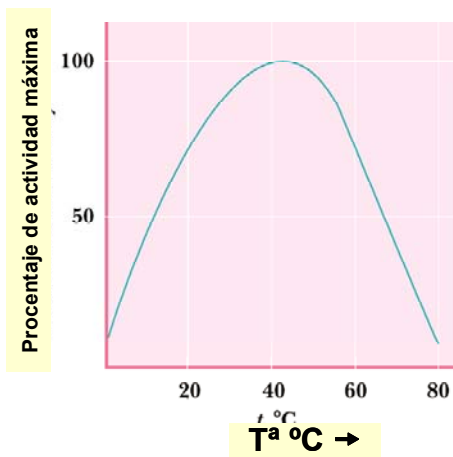
### 1.6. Efecto del pH sobre la actividad enzimática

La actividad de un enzima se ve afectada por el pH al cual se lleva a cabo la reacción. La curva actividad-pH puede ser diferente para cada tipo de enzima (**Fig. 5**).

En el caso más general la curva tiene forma de campana. El valor de pH al cual la actividad es máxima se denomina pH óptimo; dicho pH no tiene por que coincidir con el pH intracelular. La relación entre el pH y la actividad va a depender del comportamiento ácido-base de la enzima y el sustrato. El sustrato y la enzima (centro activo) contienen grupos funcionales ácidos y básicos, siendo su grado de disociación dependiente del pH, lo que determinará, entre otros aspectos, la conformación de la proteína, la capacidad de unión del sustrato al centro activo de la enzima ( $K_m$ ) y la capacidad de transformación del sustrato ( $k_{cat}$ ). Los estudios cinéticos a diferentes valores de pH nos proporciona información sobre el mecanismo catalítico de la enzima y la naturaleza de los aminoácidos más directamente implicados en el proceso catalítico.



**Fig. 5.** La velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente se ve afectada por el pH.



**Fig. 6.** La velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente se ve afectada por la  $T^{\circ}$

### 1.7. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

La velocidad de una reacción catalizada por una enzima se incrementa al aumentar la temperatura a la cual se lleva a cabo la reacción. La temperatura ejerce un doble

efecto, sobre la conformación de la enzima y sobre la propia reacción. En la **Fig.6** se representa la típica curva actividad-temperatura.

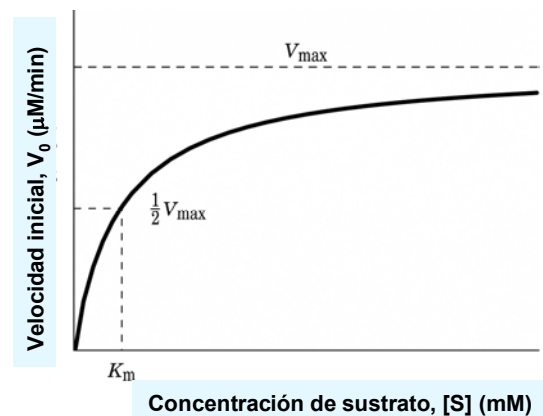
La velocidad de la reacción se incrementa al aumentar la temperatura dentro de un determinado rango, alcanzando un valor máximo a la denominada temperatura óptima. A valores superiores la actividad disminuye debido a que el enzima, como cualquier otra proteína, sufre procesos de desnaturalización y, por lo tanto, de inactivación. La relación entre la actividad y temperatura viene determinada por la ecuación de Arrhenius:

$$v = k e^{-Ea/RT},$$

donde **Ea** es la energía de activación, **R** la constante de los gases ( $2 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) y **T** la temperatura absoluta (K).

### 1.8. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática

En la **Fig.7** se representa el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente. Aunque no con todos las enzimas se observa dicho comportamiento (sería el caso de enzimas alostéricas), es el caso más habitual y sencillo; las enzimas que se ajustan a dicho modelo se conocen con el nombre de enzimas michaelianas.



**Fig. 7.**-Efecto de la [S] sobre la velocidad.

El anterior modelo cinético se ajusta a la ecuación:

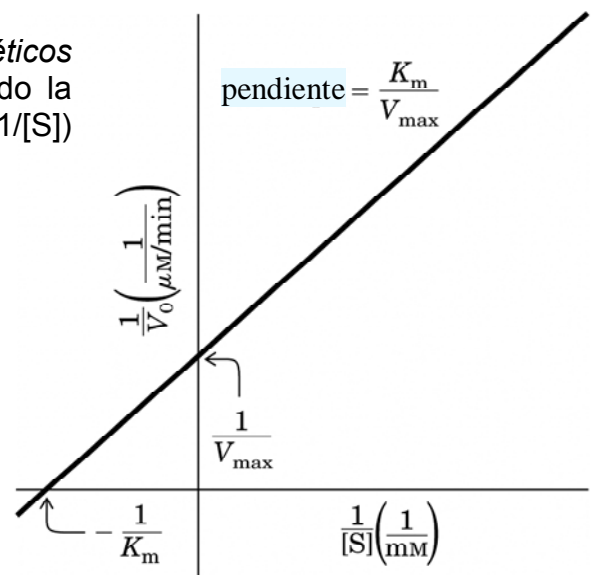
$$v = V_{\max} [S] / K_m + [S]$$

donde  $K_m$  es la *constante de michaelis* e indica la afinidad del enzima por su sustrato, y  $V_{\max}$  es la velocidad máxima e indica la capacidad catalítica.

La determinación de los *parámetros cinéticos*  $K_m$  y  $V_{\max}$  se puede llevar a cabo utilizando la representación de Lineweaver-Burk ( $1/v : 1/[S]$ ) (**Fig.8**).

La correspondiente ecuación sería:

$$1/v = 1/V_{\max} + K_m/V_{\max} \cdot 1/[S]$$



Los **OBJETIVOS** de la presente práctica son:

- a) Preparación de un extracto de plantas de girasol. El extracto se utilizará como fuente de actividad  $\alpha$ -manosidasa.
- b) Determinación de los niveles de actividad  $\alpha$ -manosidasa en extractos de girasol. Para ello se prepararán las mezclas de ensayo correspondiente.
- c) Determinación de velocidades iniciales.
- d) Estudiar el efecto de la concentración de enzima sobre la actividad enzimática.
- e) Estudiar el efecto del pH sobre la actividad  $\alpha$ -manosidasa.
- f) Estudiar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.
- g) Estudiar el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática. Determinación de parámetros cinéticos.

## **2. MATERIAL Y REACTIVOS**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Material vegetal**

Plántulas de girasol de 10 días de edad. Para su germinación las semillas se esterilizaron por inmersión durante 5 minutos en una solución de hipoclorito sódico al 0.5% (p/v), lavándose posteriormente de forma abundante con agua corriente. Las semillas se germinaron en placas de Petri sobre perlita humedecida, cubriéndose con papel de filtro húmedo. Las placas de Petri cerradas se incubaron en una estufa a 25 °C durante 48 h. Las semillas germinadas se sembraron en macetas (10 cm de diámetro, 15 semillas por maceta) sobre perlita. Las macetas se llenaron de perlita hasta 2/3 de su contenido y se humedecieron con 100 ml de agua, removiéndose posteriormente la perlita. Una vez sembradas las semillas, se cubrieron con perlita. Las plántulas se crecieron en una cámara de crecimiento de plantas con un fotoperiodo de 14 h luz (300  $\mu$ E de intensidad), a una temperatura de 24 °C día/18 °C noche y una humedad relativa del 80%. Las plántulas se regaron cada dos días con 50 ml de solución nutritiva.

#### **2.1.2 Material para cada grupo**

- gradillas con tubos de ensayo;
- juego de pipetas (20, 200 Y 1000  $\mu$ l);
- probetas (100 y 250 ml);
- vasos de precipitado (100 y 500 ml);
- frasco lavador con agua destilada;
- recipientes de plástico de 50 ml;

- baño de hielo
- papel de filtro;
- papel de parafina;
- rotulador para vidrio;
- bote con acetona;
- pipetas Pasteur de plástico;
- guantes de latex.
- morteros y majas.
- cubetas de plástico para medir en el espectrofotómetro (10).

### 2.1.3 Material de uso general

Centrifuga y tubos de centrifuga, espectrofotómetro; baño de agua termostático; agitador de tubos de ensayo; balanza; pHmetro; tijeras.

### 2.3 Reactivos

- Polivinilpolipirrolidona
- Tampón de extracción (**TE Buffer**. 10 mM Tris-Cl, pH 7.0 + 1 mM EDTA).
- Tampones McIlvaine (citrato-fosfato) 0.1 M, ajustados a pH: 2- 3- 4.5- 7 y 8.
- *p*-nitrofenol- $\alpha$ -D-manopiranosido 5mM en los tampones McIlvaine (citrato-fosfato) 0.1 M, ajustados a pH: 2, 3, 4.5, 7 y 8.
- Extracto enzimático a las siguientes diluciones: 1, 1:5, 1:10 y 1:50.
- Soluciones de *p*-nitrofenol- $\alpha$ -D-manopiranosido en tampón McIlvaine (citrato-fosfato) 0.1 M, pH 4.5, a las siguientes concentraciones 1 mM, 0.5 mM, 0.1 mM, 0.05 mM, 0.01 mM.
- Solución de NaOH 0.5N.

## 3. PROCEDIMIENTO

### 3.1 Extracción de la actividad $\alpha$ -manosidasa

Las operaciones de extracción debe de llevarse a cabo en frío (trabajar sobre un baño de hielo). Sacar las plántulas de las macetas y lavarlas para eliminar restos de perlita. Secar las plántulas con papel y trocearla en pequeños fragmentos. Pesar el tejido y echarlo en un mortero previamente enfriado; añadir polivinilpolipirrolidona (0.1 g /g de tejido fresco) y macerar el tejido con la maja. Añadir tampón de extracción (previamente enfriado a 4 °C), y seguir macerando. Añadir más tampón de extracción hasta un volumen de 4 veces el peso del tejido (4 ml por cada gramo). Centrifugar a 12 000 rpm durante 15 min. Filtrar el sobrenadante y anotar el volumen obtenido.

### 3.2 Ensayo de la actividad $\alpha$ -manosidasa

Para la determinación de actividades enzimáticas se prepararán las siguientes mezclas de ensayo:

TUBO	Tampón McIlvaine 0.1 M, pH 4,5 (ml)	PNP- $\alpha$ -D-manopiranosido en tampón McIlvaine 0.1 M, pH 4,5 (ml)	Volumen de extracto (ml)
<b>B</b>	0'75	0'00	0'25
<b>C</b>	0'25	0'75	0'00
<b>P-1</b>	0'00	0'75	0'25
<b>P-2</b>	0'00	0'75	0'25

Incubar las mezclas de ensayo a 40 °C durante 30 min. Posteriormente se añadirán a cada tubo 2 ml de NaOH 0.5 N. Determinar la absorbancia a 405 nm de las mezclas control (**C**) y problema (**P-1** y **P-2**) frente a la mezcla blanco (**B**).

### 3.3 Determinación de velocidades iniciales

1. Preparar 5 series de 3 tubos de ensayo (cada serie formado por un blanco, un control y dos problemas).
2. Preparar mezclas de ensayo según se indica en la tabla del apartado 3.2.
3. Cada serie se incubará a 40 °C durante:

SERIE	TIEMPO DE INCUBACIÓN (minutos)
<b>1</b>	5
<b>2</b>	10
<b>3</b>	15
<b>4</b>	30
<b>5</b>	60

4. Transcurrido el tiempo de incubación se añadirá a cada tubo 2 ml de NaOH 0.5 N.
5. Determinar la absorbancia a 405 nm de las mezclas control y problema frente a la mezcla blanco.

### 3.4 Efecto de la concentración de enzima sobre la actividad enzimática

1. Preparar 5 series de 3 tubos de ensayo (cada serie formado por un blanco, un control y dos problemas).
2. Preparar mezclas de ensayo tal y como se indica en la tabla del apartado 3.2.
3. Añadir a cada serie:



4. Incubar las mezclas de ensayo a 40 °C durante 30 minutos.
5. Transcurrido el tiempo de incubación se añadirá a cada tubo 2 ml de NaOH 0.5 N.
6. Determinar la absorbancia a 405 nm de la mezclas control y problema frente a la mezcla blanco.

### 3.5 Efecto del actividad

SERIE	Dilución del extracto enzimático
1	sin diluir
2	1/2
3	1/4
4	1/8
5	1/16

pH sobre la enzimática

1. Preparar de 3 ensayo

5 series tubos de (cada

- serie formado por un blanco, un control y dos problemas).
2. Preparar mezclas de ensayo tal y como se indica en la tabla del apartado 3.2.
3. Añadir a cada serie:

4. Incubar las mezclas de ensayo a 40 °C durante 30 minutos.
5. Transcurrido el tiempo de incubación se añadirá a cada tubo 2 ml de NaOH 0.5 N.

SERIE	pH del tampón McIlvaine en que se ha disuelto el sustrato
1	2,0
2	3,0
3	4,5
4	7,0
5	8,0

6. Determinar la absorbancia a 405 nm de la mezclas control y problema frente a la mezcla blanco.

### 3.6 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

1. Preparar 5 series de 3 tubos de ensayo (cada serie formado por un blanco, un control y dos problemas).
2. Preparar mezclas de ensayo según se indica en la tabla del apartado 3.2.
3. Cada serie se incubará durante 30 min a las siguientes temperaturas:

SERIE	TEMPERATURA DE INCUBACIÓN (° C)
1	T <sup>a</sup> ambiente
2	20
3	30
4	40
5	80

4. Transcurrido el tiempo de incubación se añadirá a cada tubo 2 ml de NaOH 0.5 N.
5. Determinar la absorbancia a 405 nm de las mezclas control y problema frente a la mezcla blanco.

### 3.7 Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática

1. Preparar 5 series de 3 tubos de ensayo (cada serie formado por un blanco, un control y dos problemas).
2. Preparar mezclas de ensayo tal y como se indica en la tabla del apartado 3.2.
3. Añadir a cada serie:

SERIE	CONCENTRACIÓN DEL SUSTRATO ( en tampón McIlvaine pH 4,5) (mM)
1	1,00
2	0,50
3	0,10
4	0,05
5	0,01

4. Incubar las mezclas de ensayo a 40 °C durante 30 minutos.
5. Transcurrido el tiempo de incubación se añadirá a cada tubo 2 ml de NaOH 0.5 N.
6. Determinar la absorbancia a 405 nm de las mezclas control y problema frente a la mezcla blanco.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. Determinación de la actividad enzimática.

En cada ensayo ha de determinarse la cantidad de producto (p-nitrofenol) formado. Para ello se utilizará el **coeficiente de extinción molar** ( $\epsilon M$ ) del PNP. A partir de dicho  $\epsilon M$ , el volumen total de la mezcla de ensayo y el tiempo de incubación se obtendrán los valores de actividad enzimática (en kat o U.I. o divisores) por cantidad de tejido (peso fresco en gramos).

### 4.2. Cálculo de velocidades iniciales.

- Representar la cantidad de producto formado a los distintos tiempos de incubación.
- A partir de la gráfica obtener el valor de velocidad inicial (kat o U.I.) y la ecuación de velocidad :

$$v = -d[S]/dt = d[p]/dt = k [S]; k = v_0.$$

### 4.3. Efecto de la cantidad de enzima sobre la velocidad de reacción.

- Representar los valores de actividad (kat o U.I.) frente a la cantidad de extracto enzimático añadido (ml).
- A partir de la representación, calcular el valor de kcat (kat ml<sup>-1</sup> de extracto) y la ecuación de velocidad

$$v = kcat [E].$$

### 4.4. Efecto del pH sobre la actividad enzimática.

- Representar los valores de actividad (kat o U.I.) frente al pH.
- Indicar en qué rango de pH el enzima es activo y el valor del pH óptimo.

### 4.5. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.

- Representar los valores de actividad (kat o U.I.) frente a la temperatura de ensayo. Indicar el valor de temperatura óptima.
- A partir de los valores de actividad y temperatura absoluta (grados kelvin) representar la ecuación de Arrhenius ( $\log v = \log k - E_a/RT$ ) y calcular el valor de la energía de activación ( $E_a$ ).

### 4.6. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción enzimática.

- Representar los valores de actividad (kat o U.I.) frente a concentración de sustrato.
- Indicar el modelo cinético que sigue la enzima.
- A partir de los valores de velocidad y de concentración de sustrato representar gráficamente la ecuación  $1/v = 1/V_{max} + K_m/V_{max} \cdot 1/[S]$  (representación de Lineweaver-Burk).
- A partir de la representación anterior, calcular el valor de los parámetros cinéticos,  $K_m$  y  $V_{max}$ , expresados en las unidades correctas.

**En todos los casos estudiados, dar una respuesta razonada al por qué de las variaciones de la velocidad de la reacción (actividad enzimática) observadas cuando cambiamos el tiempo de incubación, cantidad de extracto añadido, pH, temperatura y concentración de sustrato.**