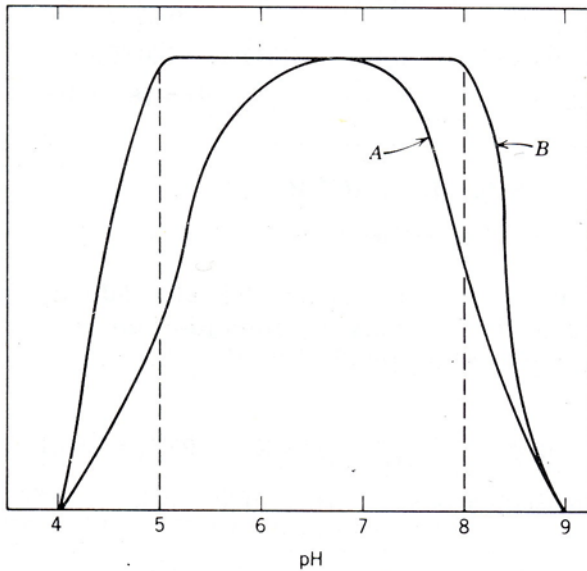
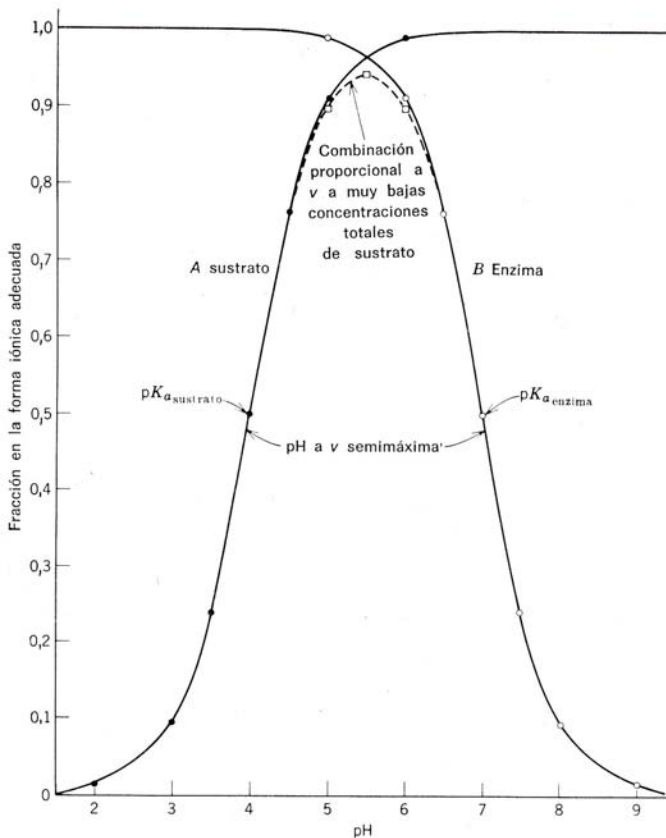


## Efecto del pH sobre la estabilidad y actividad de los enzimas

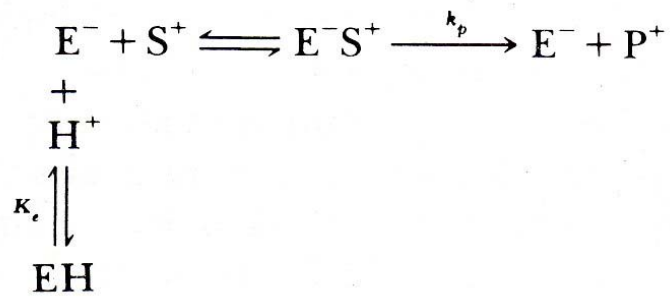


Efecto del pH sobre la actividad y la estabilidad de un enzima. Curva A: representación de  $v$  frente a pH. Curva B:  $v$  a pH = 6.8, después de preincubar el enzima a los valores indicados de pH. La disminución en la actividad entre pH = 6.8 y 5 y entre 6.8 y 8, puede atribuirse al efecto del pH sobre los grupos ionizables del sitio activo o del sustrato. La disminución en la actividad por encima de pH = 8 y por debajo de pH = 5 puede atribuirse a la desnaturalización irreversible del enzima.

### $v$ frente al pH



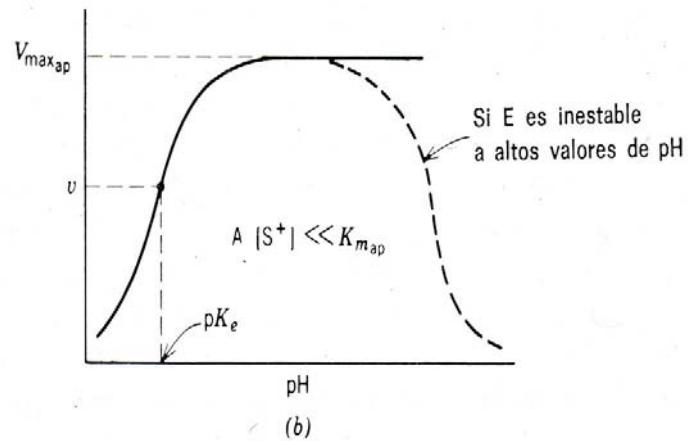
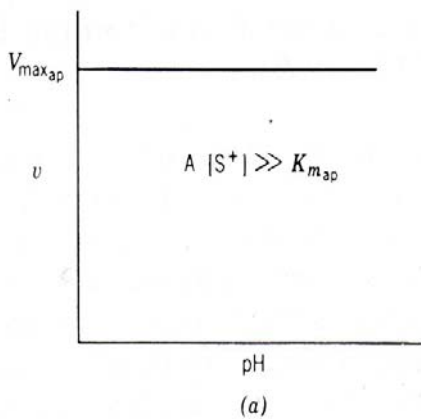
Curva A: Fracción del sustrato total que está en la forma iónica adecuada ( $A^-$ ) en función del pH. Curva B. fracción del enzima total que está en la forma iónica adecuada ( $EH^+$ ) en función del pH.  $pK_a$  del sustrato = 4  $pK_a$  del enzima = 7. La línea de puntos representa el producto de las dos fracciones que es proporcional a  $v$  a una concentración de  $[A^-] \ll K_{map}$ . Debido a que los dos valores de  $pK_a$  están separados (por tres unidades de pH), el pH a  $v$  semimáxima será muy próximo a los valores de  $pK_a$



$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[\text{S}^+]}{K_m \left( 1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_e} \right) + [\text{S}^+]}$$

y

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_e} \right) \frac{1}{[\text{S}]} + \frac{1}{V_{\max}}$$



(a) Representación de  $v$  frente al pH a  $[\text{S}^+] \gg K_{m,ap}$ . (b) Representación de  $v$  frente al pH a una  $[\text{S}^+] \ll K_{m,ap}$

## Mecanismos catalíticos

Para catalizar reacciones específicas, los enzimas normalmente emplean una o más de las estrategias siguientes:

**1) Catálisis general ácido base.** En general en la catálisis ácido-base, una molécula diferente del agua desempeña el papel de donador o aceptor de un protón.

**2) Catálisis covalente.** En la catálisis covalente, el centro activo contiene un grupo reactivo, habitualmente un nucleófilo potente, que en el transcurso de la catálisis llega a ser modificado covalentemente de forma temporal.

**3) Catálisis por ión metálico.** Los iones metálicos pueden funcionar catalíticamente de varias maneras.

a) Un ión metálico puede actuar como un catalizador electrofílico mediante la estabilización de una carga negativa sobre un intermediario de la reacción.

b) También puede generar un nucleófilo cuando aumenta la acidez de una molécula cercana como el agua.

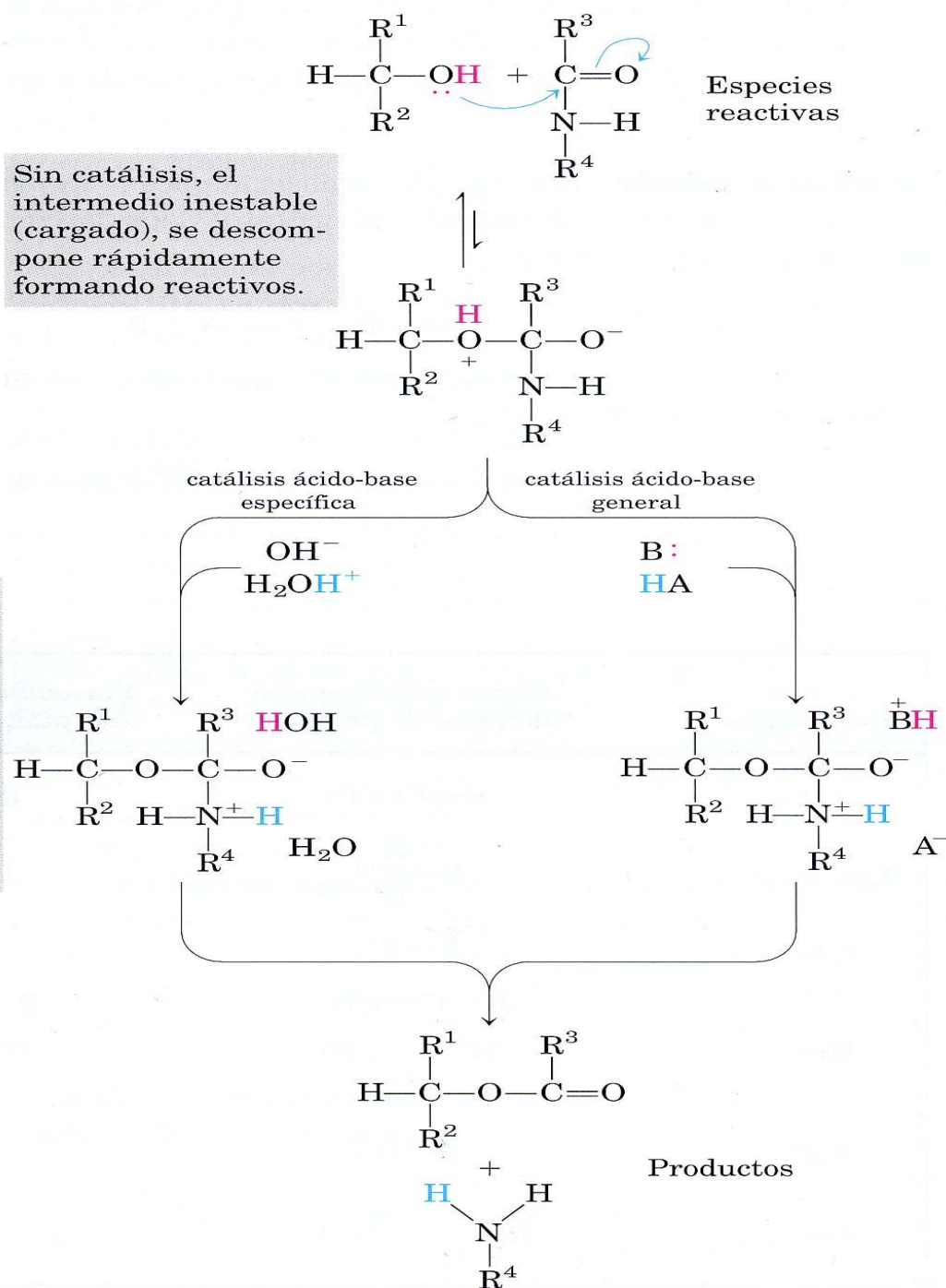
c) Alternativamente pueden unirse al sustrato, aumentando el número de interacciones con el enzima y así, la energía de fijación.

**4) Catálisis por aproximación.** Muchas reacciones incluyen dos sustratos diferentes. En estos casos, la velocidad de la reacción puede aumentarse considerablemente si se atraen a los dos sustratos juntos sobre una misma superficie de unión del enzima.

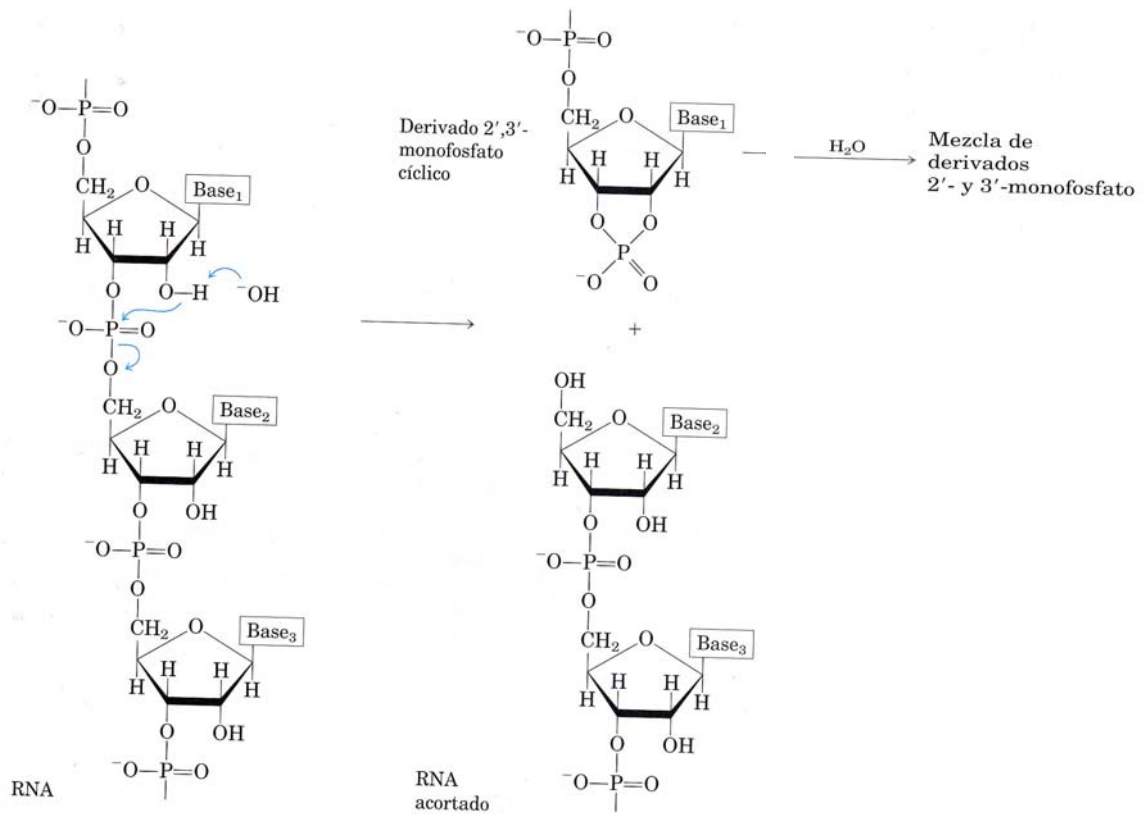
Residuos aminoácidos	Forma ácida general (donador de protones)	Forma básica general (aceptor de protones)	pK <sub>R</sub> (grupo R)
<b>Glu, Asp</b>	$\text{R}-\text{COOH}$	$\text{R}-\text{COO}^-$	4.25 y 3.65
<b>Lys, Arg</b>	$\text{R}-\overset{\text{H}}{\overset{+}{\text{N}}}\text{H}$	$\text{R}-\ddot{\text{N}}\text{H}_2$	10.53 y 12.48
<b>Cys</b>	$\text{R}-\text{SH}$	$\text{R}-\text{S}^-$	8.18
<b>His</b>			6.00
<b>Ser</b>	$\text{R}-\text{OH}$	$\text{R}-\text{O}^-$	
<b>Tyr</b>			10.07

### Catálisis ácido - base

Sin catálisis, el intermedio inestable (cargado), se descompone rápidamente formando reactivos.

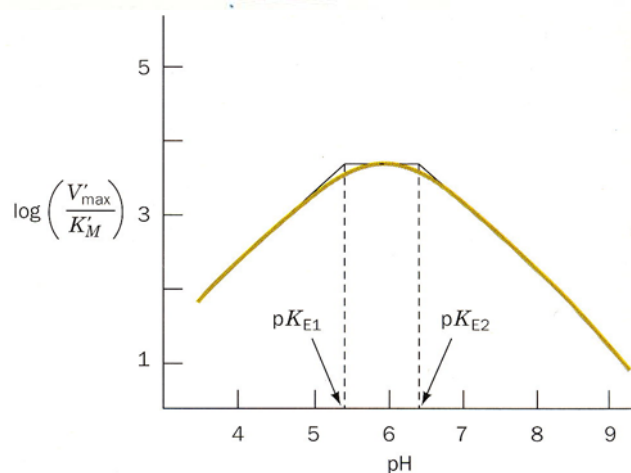
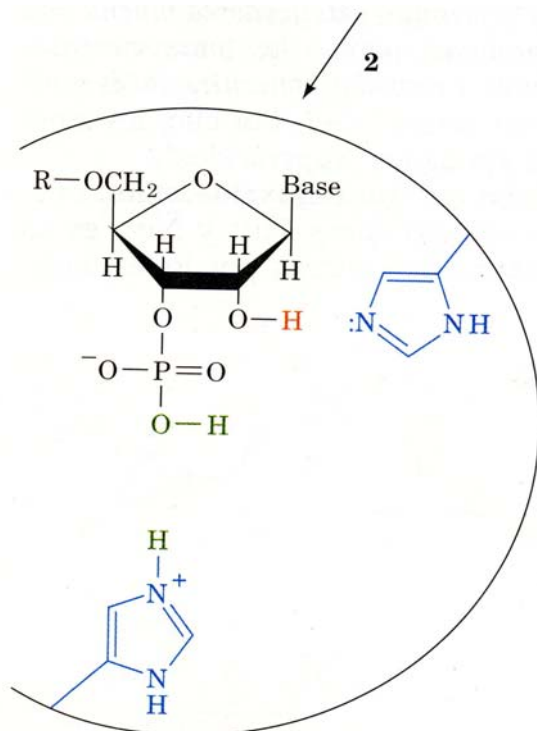
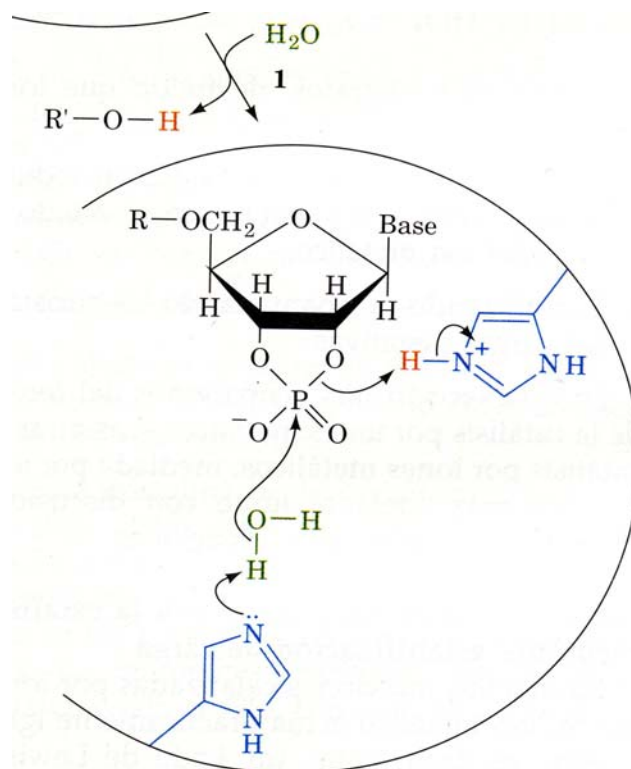
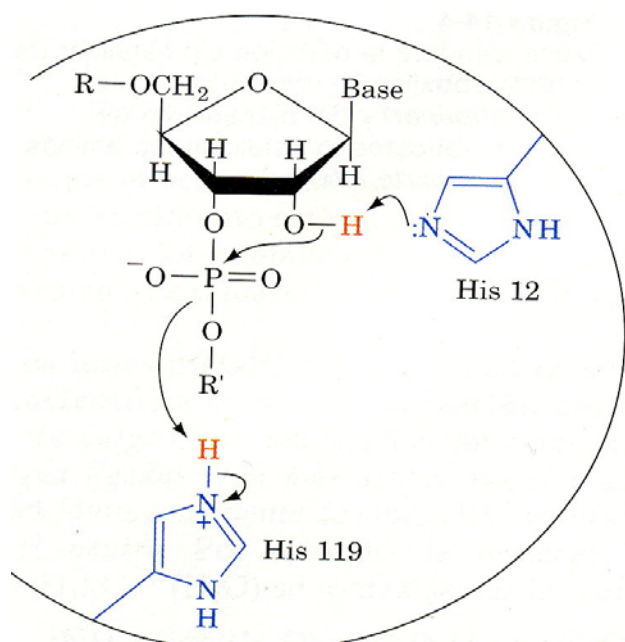


Formación desfavorable de carga durante la rotura de una amida y manera de evitarla mediante catálisis. Se muestra la hidrólisis de un enlace amida, la misma reacción que catalizan la quimotripsina y otras proteasas. Se puede evitar la formación de carga desfavorable por donación de un protón por el  $\text{H}_3\text{O}^+$  (catálisis ácida específica) o por HA (catálisis ácida general). De modo parecido se puede neutralizar la carga por captación del protón por  $\text{OH}^-$  (catálisis básica específica) o B: (catálisis básica general), en donde B: representa cualquier base.



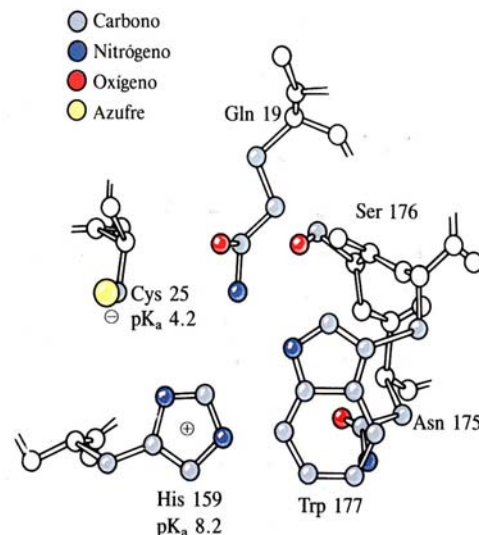
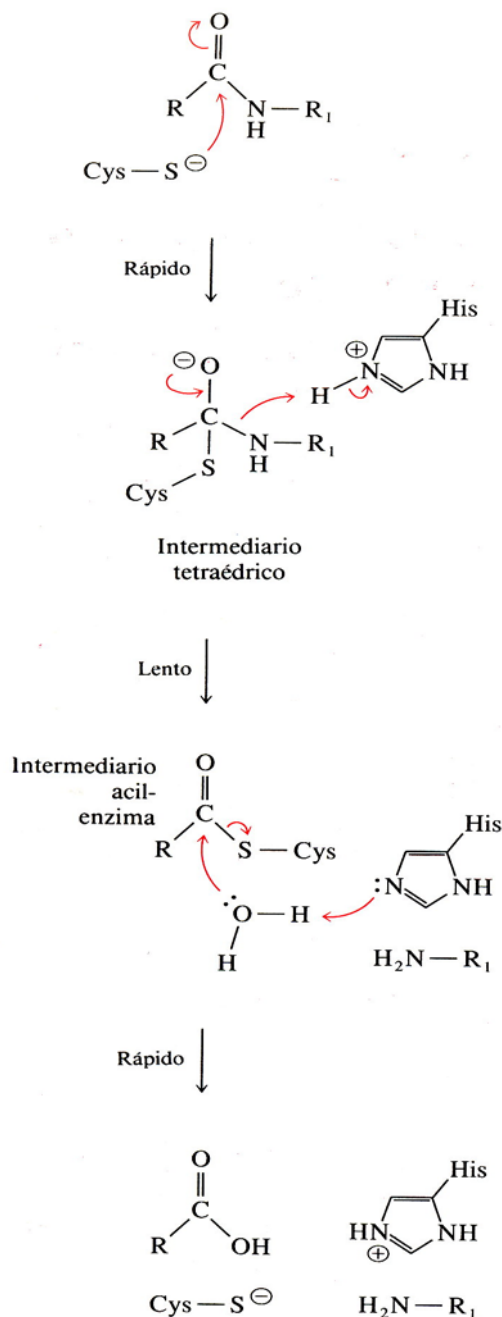
Hidrólisis del RNA en condiciones alcalinas. El grupo hidroxilo en 2' actúa como un nucleófilo en una reacción de desplazamiento intramolecular. El derivado 2'-3' monofosfato cíclico se hidroliza a su vez, dando lugar a una mezcla de derivados 2' y 3' monofosfato. El DNA que carece de grupo hidroxilo en 2', es estable en condiciones similares.

La hidrólisis del RNA catalizada por la RNasa A pancreática bovina es un proceso en dos etapas, con la formación intermedia de un nucleótido 2'-3'-cíclico

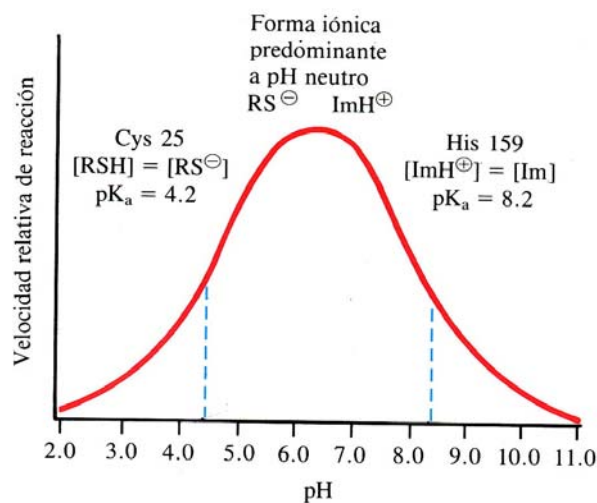


Dependencia de  $V'_{\max} / K'_M$  respecto del pH en la hidrólisis de la histidina 2'-3'-fosfato cíclico, catalizado por la RNasa A, donde  $V'_{\max} / K'_M$  se da en unidades de  $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ . El análisis de esta curva sugiere la participación catalítica de grupos con  $\text{p}K_{\text{a}}$  de 5.4 a 6.4.

## Catálisis covalente. Ejemplos: Papaina y quimotripsina



Centro activo de la papaina. En la reacción catalítica participan directamente varios residuos de aminoácidos. El ión imidazolio de la histidina 159 está estabilizado por los electrones  $\pi$  del anillo aromático de la cadena lateral del residuo de triptófano 177. El ión imidazolio, a su vez, estabiliza el ión tiolato de la cisteína 25, que es consecuentemente un reactivo nucleófilo poco frecuente. Las cadenas laterales están destacadas en color.

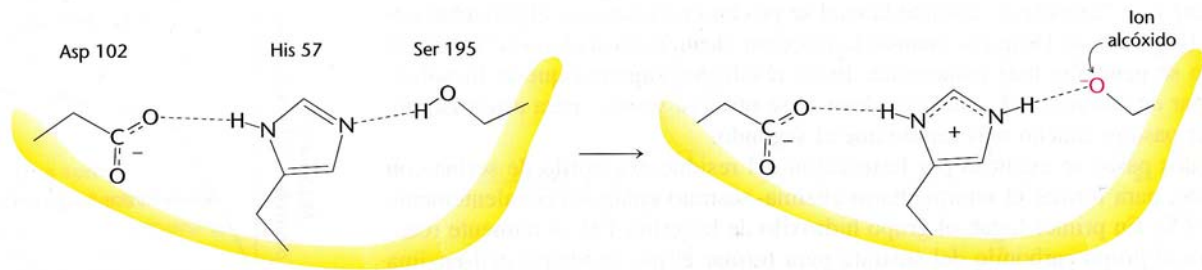


Mecanismo catalítico de la papaina. El anión tiolato de la cisteína 25 ataca al carbono carbonílico del sustrato y se forma un intermediario tetraédrico. Este intermediario se rompe, etapa lenta de la reacción, por la cesión de un protón del ión imidazolio de la histidina 159 al grupo saliente. El intermediario acil-enzima formado se hidroliza rápidamente gracias a la catálisis básica general del anillo imidazol de la histidina 159. Esta etapa final regenera la forma catalíticamente activa del enzima.

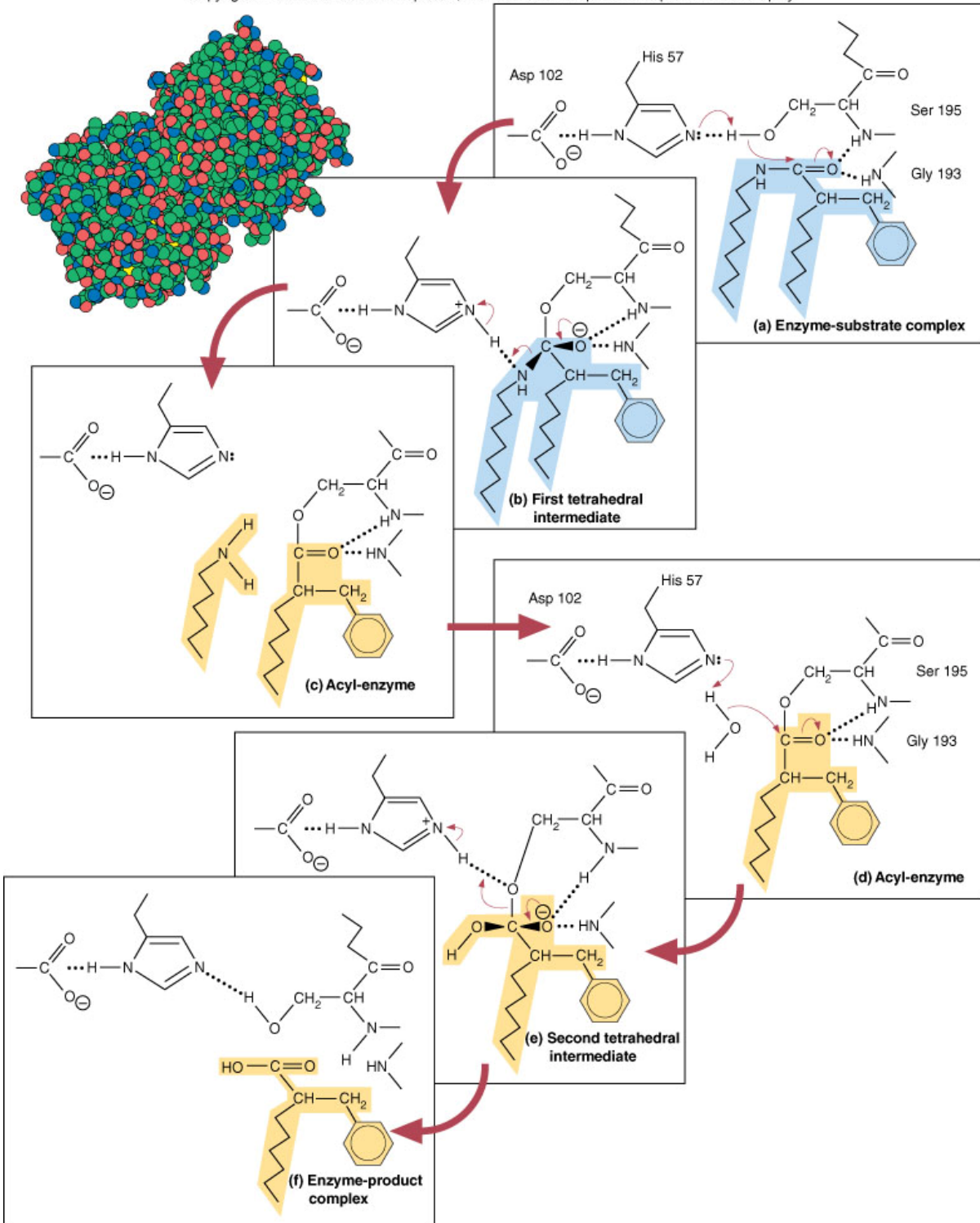
Perfil de velocidad frente a pH de la papaina. La curva tiene forma de campana. Las ramas derecha e izquierda corresponden a las curvas de titulación de dos residuos del centro activo. El punto de inflexión a 4.2 corresponde al  $\text{pK}_a$  de la cadena lateral del residuo de cisteína 25, mientras que el punto de inflexión a pH 8.2 corresponde al  $\text{pK}_a$  de la cadena lateral del residuo de histidina 159. La actividad enzimática es máxima cuando la cadena lateral del residuo de cisteína del centro activo se encuentra como anión tiolato ( $\text{RS}^-$ ) y la del residuo de histidina como catión imidazolio ( $\text{ImH}^+$ ).



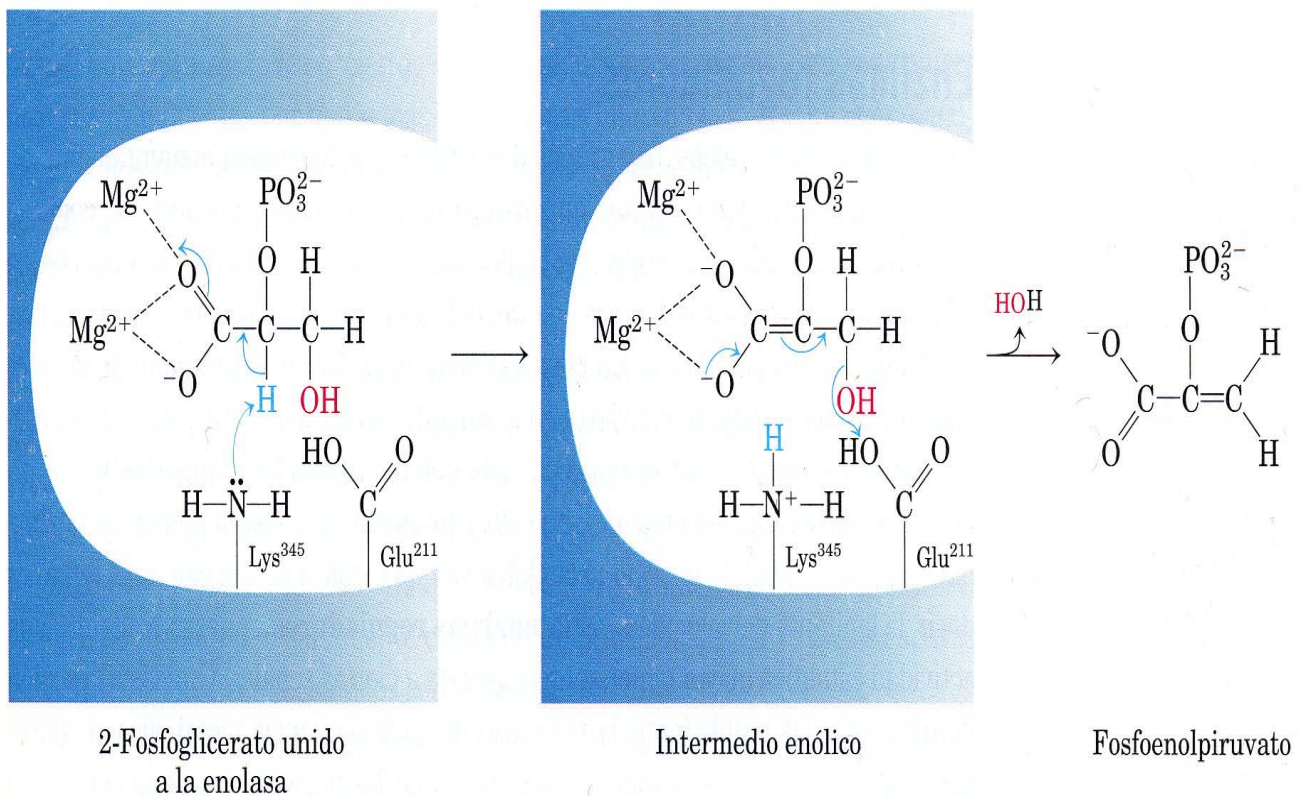
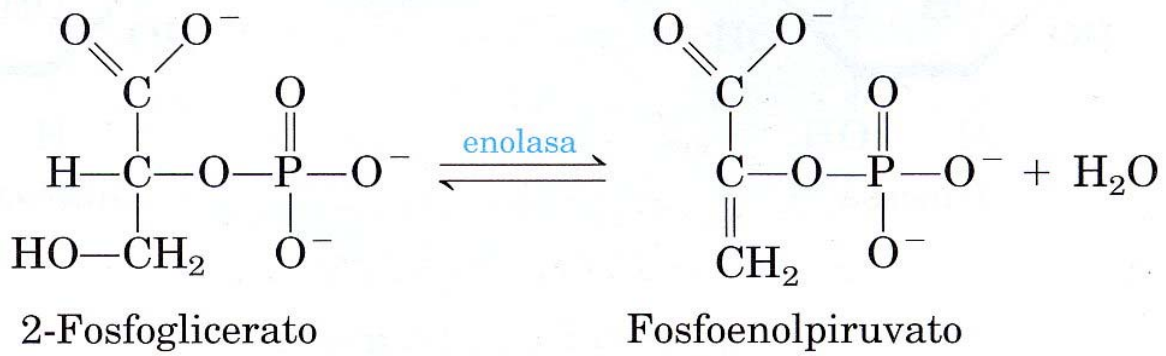
# Quimotripsina



Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

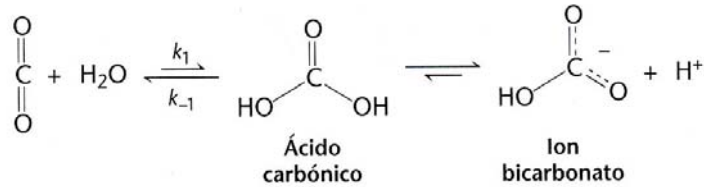






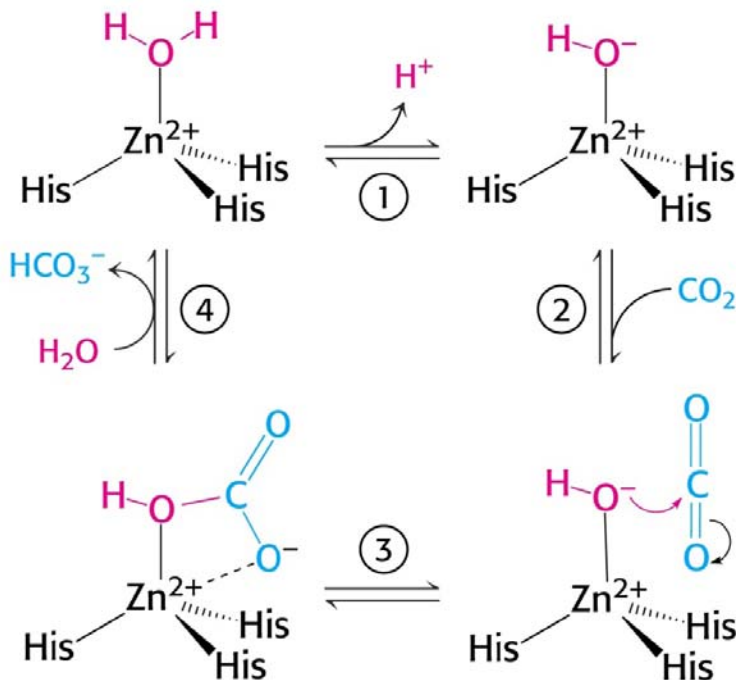
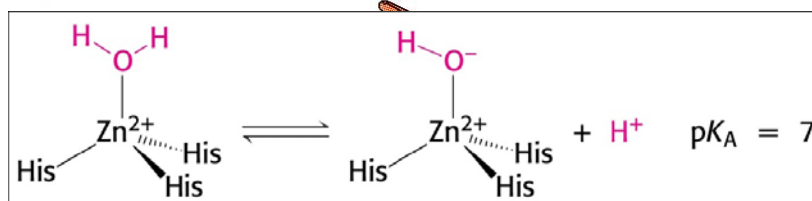
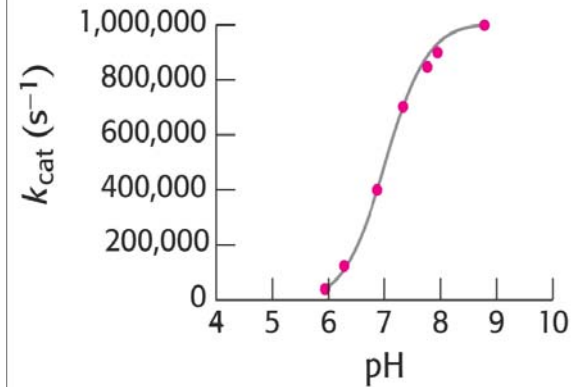
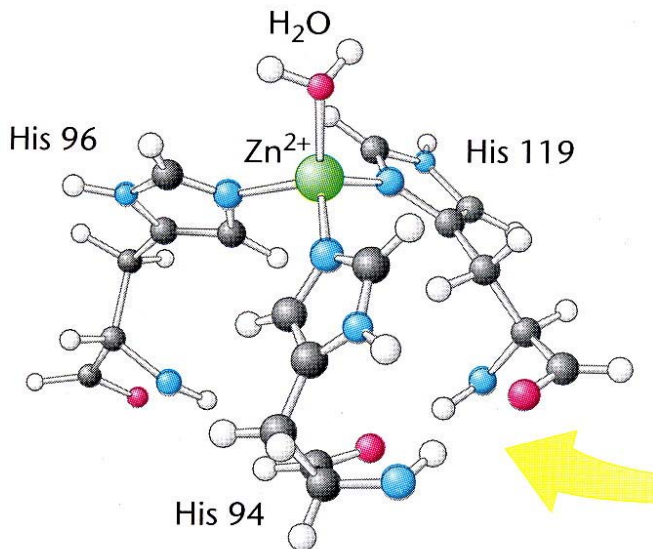
Reacción en dos pasos catalizada por la enolasa. Mecanismo mediante el que se convierte el 2-fosfoglicerato en fosfoenolpiruvato por la enolasa. El grupo carboxilo del 2-fosfoglicerato (2-PGA) está coordinado por dos iones magnesio al centro activo. Se abstrae un protón mediante catálisis básica general ( $\text{Lys}^{345}$ ). El el intermedio enólico resultante se estabiliza gracias a los dos iones  $\text{Mg}^{2+}$ . La eliminación posterior del OH viene favorecida por la catálisis ácida general ( $\text{Glu}^{211}$ ).

## Anhidrasa Carbónica



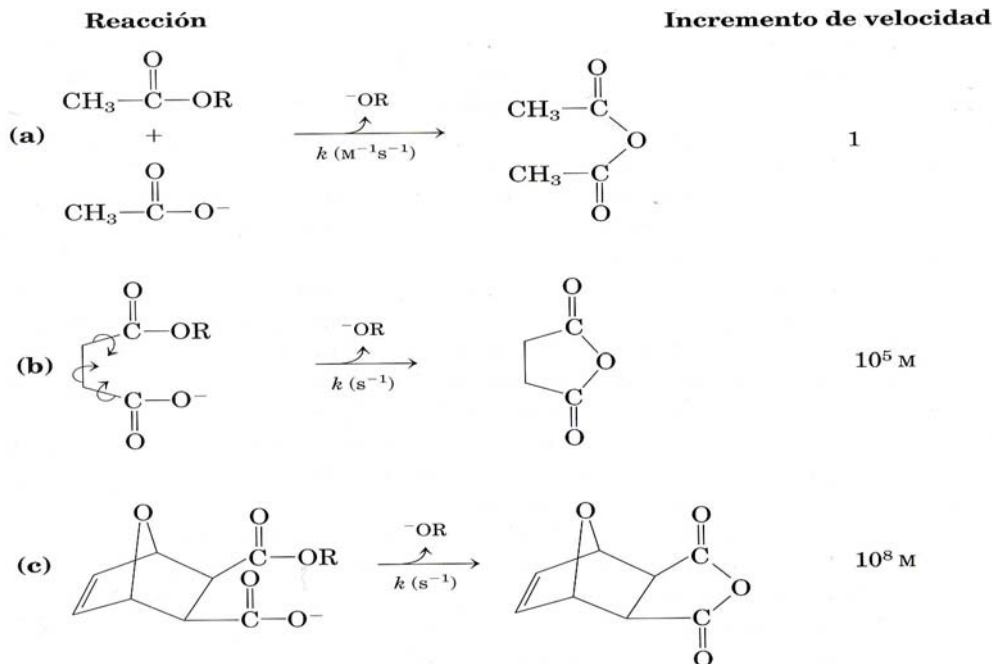
Centro de unión al zinc. El zinc se une a los anillos de imidazol de tres residuos de histidina y además a una molécula de agua

Efecto del pH sobre la actividad de la anhidrasa carbónica. Los cambios en el pH modifican la velocidad de hidratación del dióxido de carbono. El enzima tiene la máxima actividad a pH alto

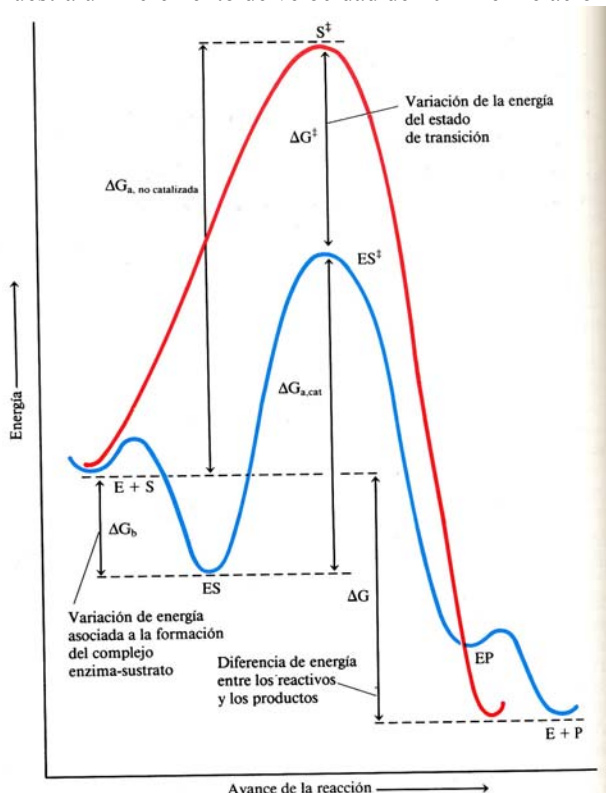


### Mecanismo de la anhidrasa carbónica

- 1) El zinc facilita la liberación de un protón de una molécula de agua, lo que genera el ión hidróxido.
- 2) El sustrato dióxido de carbono se une al centro activo del enzima y se posiciona para reaccionar con el ión hidróxido.
- 3) El ión hidróxido ataca al dióxido de carbono convirtiéndolo en ión bicarbonato.
- 4) El centro catalítico se regenera con la liberación del ión bicarbonato y la unión de otra molécula de agua.



Aumento de la velocidad de reacción por aproximación y rigidez de los reactivos. Se muestran las reacciones de un éster con un grupo carboxilato para formar un anhídrido. El grupo R es el mismo en todos los casos (a) Para esta reacción bimolecular la constante de reacción K es de segundo orden y tiene como unidades  $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ . (b) Cuando los dos grupos reaccionantes forman parte de la misma molécula, la reacción es mucho más rápida. Para esta reacción unimolecular K tiene como unidades  $\text{s}^{-1}$ . Dividiendo la constante de velocidad de (b) por la constante de velocidad de (a) se obtiene un incremento de velocidad de aproximadamente  $10^5 \text{ M}$ . (El incremento tiene unidades de molaridad debido a que estamos comparando una reacción unimolecular con una bimolecular) En otras palabras, si el reactivo en (b) estuviera presente a una concentración 1 M, los grupos reactivos se comportarían como si estuvieran presentes a una concentración  $10^5 \text{ M}$ . Obsérvese que el reactivo en (b) tiene libertad de rotación alrededor de tres enlaces, (mostrados con flechas curvadas) pero todavía representa una reducción sustancial de la entropía en relación a (a). Si los enlaces que rotan en (b) están restringidos como en (c), la entropía disminuye todavía más y la reacción muestra un incremento de velocidad de  $10^8 \text{ M}$  en relación a (a).



$$-d[\text{X}] / dt = (KT / h) e^{(-\Delta G^\ddagger / RT)} [\text{X}];$$

$$K = (KT / h) e^{(-\Delta G^\ddagger / RT)} \quad \text{Ecuación de Arrhenius}$$

La energía libre de activación  $\Delta G^\ddagger$  puede separarse en términos entálpicos y entrópicos, utilizando otra relación de la termodinámica de equilibrio.

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$$

(en donde  $\Delta H^\ddagger$  es la entalpía y  $\Delta S^\ddagger$  la entropía de activación)

$$K = (KT / h) e^{-(\Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger) / RT}$$

$$K = (KT / h) e^{-\Delta H^\ddagger / RT} e^{\Delta S^\ddagger / R}$$

$$\ln K = \frac{-\Delta H}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \frac{KT}{h}$$