

Laborator 7 Medicina

Enzime I. Efectul catalitic al enzimelor. Specificitatea enzimelor. Factorii care influențează viteza reacțiilor enzimatice

Obiective:

1. Cunoașterea definiției enzimelor și a componentelor structurale ale acestora.
2. Cunoașterea tipurilor de specificități și exemple din fiecare categorie.
3. Deprinderea abilității de a demonstra influența specificității de substrat.
4. Însușirea noțiunii de activitate enzimatică și a modalităților de exprimare a acesteia.
5. Cunoașterea factorilor care influențează activitatea enzimatică cu precizarea modului în care se realizează această influență.
6. Însușirea clasificării enzimelor după localizarea celulară și a cauzelor prezenței în ser a acestora.

Enzimele sunt biocatalizatori care măresc viteza reacțiilor chimice pe care le catalizează, permițând ca acestea să aibă loc în condiții compatibile cu viața. Enzimele catalizează numai reacții care termodinamic sunt posibile, ele nu deplasează echilibrul unei reacții, ci fac ca acesta să fie mai repede atins.

Substanțele asupra cărora acționează enzima poartă numele de *substrat*, iar compusul sau compușii care rezultă în urma acțiunii enzimei poartă numele de *produs de reacție*.

Enzimele sunt compuși cu structură complexă. Unele sunt proteine formate numai din resturi de aminoacizi, altele sunt constituite dintr-o componentă proteică (*apoenzima*) și una neproteică care, dacă este puternic legată în structura enzimei este denumită *grupare prostetică*, iar dacă este ușor dissociabilă poartă numele de *coenzimă*. Enzimele au toate caracteristicile catalizatorilor, dar eficiența lor catalitică este superioară celei înregistrate în cazul catalizatorilor chimici.

Cea mai importantă deosebire între activitatea catalitică a enzimelor și cea a catalizatorilor chimici constă în înalta specificitate de acțiune a enzimelor.

Specificitatea enzimelor

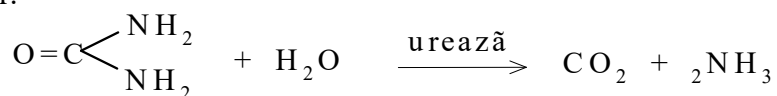
Apoenzima determină *specificitatea de substrat*. Coenzimele (în general, derivați ai vitaminelor hidrosolubile și ioni metalici) sunt cele care determină *specificitatea de reacție*. În funcție de modul în care apoenzima leagă substratul se pot deosebi mai multe tipuri de *specificitate de substrat*:

- specificitate absolută de substrat;
- specificitate relativă de substrat;
- stereospecificitate de substrat.

Specificitatea absolută

Principiu: Enzimele care acționează asupra unui singur substrat sunt considerate că au *specificitate absolută*. Astfel, ureaza catalizează numai reacția de hidroliză a ureei, dar nu și a compușilor cu structură asemănătoare, ca tiouree sau acetamidă.

Prin hidroliza ureei rezultă CO₂ și NH₃, ultimul putând fi identificat prin reacția cu reactivul Nessler.



Reactivi:

1. Uree 2%;
2. Tiouree 2%;

3. Acetamidă 2%;
4. Urează 1%;
5. Reactiv Nessler.

Mod de lucru:

În trei eprubete se introduc următorii reactivi:

Reactivi	1	2	3
Uree 2%	3	-	-
Tiouree 2%	-	3	-
Acetamidă 2%	-	-	3
Urează 1%	1	1	1
15 min la 37 ⁰ C			
Reactiv Nessler	0,5	0,5	0,5

Numai în eprubeta 1 se va obține cu reactivul Nessler o colorație portocalie, care arată prezența amoniacului deci, sub influența ureazei, s-a produs numai reacția de hidroliză a ureei. Celelalte substanțe, deși prezintă structuri asemănătoare cu ureea, nu au fost hidrolizate în aceleași condiții de reacție, ceea ce demonstrează că ureaza acționează selectiv asupra ureei.

Specificitatea relativă

Principiu: O enzimă care acționează asupra unui grup de substanțe care au structură apropiată prezintă *specificitate relativă de substrat*.

Astfel, tirozinaza din cartof catalizează oxidarea fenolilor (tirozină, adrenalină, fenol, crezol) la compuși chinonici de culoare brună.

Reactivi:

1. Extract de cartof crud. Se curăță cartoful de coajă și apoi se taie felii subțiri, care se mărunțesc în mojar cu 10 ml apă distilată. Extractul se filtrează și conține tirozinază;
2. Tirozină 0,5 % în hidroxid de sodiu 0,01 N;
3. Fenol 1%;
4. Rezorcină 1%.

Mod de lucru:

În trei eprubete se măsoară 2 ml soluție tirozină, 2 ml soluție de fenol în cea de-a doua și 2 ml soluție rezorcină în a treia eprubetă. Se adaugă în eprubete 1 ml extract de cartof și se menține o oră la 37 °C, pe baie de apă sau la termostat. Se agită din timp în timp pentru a mări contactul cu oxigenul atmosferic. Conținutul eprubetelor se colorează în roșu-brun, iar după 1 h se colorează în brun-negru.

Factorii care influențează activitatea enzimelor

Cantitatea de enzimă care se găsește într-o probă și acționează în condiții optime asupra substratului adecvat este exprimată prin activitatea enzimatică. Activitatea enzimatică este influențată de o serie de factori fizici sau chimici: temperatura, pH-ul, concentrația enzimei, efectori enzimatici: activatori sau inhibitori.

Influența temperaturii asupra activității amilazei salivare

Influența temperaturii asupra reacțiilor enzimatice se manifestă prin:

- modificarea vitezei reacției enzimatice;
- denaturarea părții proteice a enzimei.

Temperatura optimă este cuprinsă într-un interval larg, pentru majoritatea enzimelor variind între 30-50°C. Se preferă ca temperatura de lucru să fie 37⁰C, deoarece distrugerea enzimei este practic nulă, iar viteza reacției este suficient de mare.

Principiu: Amilaza salivară este activă la 37⁰C, dar prin fierbere se inactivează și nu mai are acțiune hidrolitică asupra amidonului.

Reactivi:

1. Salivă diluată;
2. Amidon 1 % în clorură de sodiu 0,3 %;
3. Reactiv Fehling.

Mod de lucru:

În două eprubete se măsoară câte 4 ml soluție amidon. Într-una din eprubete se adaugă 1 ml salivă proaspătă nefiartă, iar în cealaltă 1 ml salivă fiartă. Se agită și se introduc în termostat la 37°C, timp de 15 minute. Se adaugă în fiecare eprubetă câte 1 ml reactiv Fehling și se fierb pe baie de apă 5 minute. Se analizează prezența oxidului cupros roșu-cărămiziu în cele două eprubete.

Influența pH-ului asupra activității amilazei salivare

Enzimele, în calitate de proteine, conțin un număr mare de grupări amino, carboxil și alte grupări disociabile, comportându-se ca amfioni. Din această cauză variațiile de pH produc modificări în încărcătura ionică a enzimei, cu repercursiuni asupra conformației, ceea ce afectează și centrul catalitic. Influențele survenite se reflectă în activitatea catalitică, respectiv în viteza de reacție, a cărei reprezentare grafică corespunde unei curbe sub formă de clopot. pH-ul corespunzător maximului curbei se consideră pH-ul optim de acțiune a enzimei.

Viteza unei reacții enzimatice este maximă la un pH optim specific fiecărei enzime. De exemplu, pepsina din suc gastric acționează la pH = 2, tripsina din suc pancreatic la pH de aproximativ 7,8-8, fosfatazele alcaline la pH între 8,5-10 etc.

Reactivi:

1. Clorură de sodiu 0,3 %;
2. Amidon 1 % în clorură de sodiu 0,3 %;
3. Acid clorhidric 0,2 %;
4. Hidroxid de sodiu 1 %;
5. Soluție I₂/KI;
6. α-amilază -1 mg/ml.

Mod de lucru:

În două seturi a câte 8 eprubete se pipetează câte 1 ml apă distilată. În prima eprubetă a primului set se introduce 1 ml soluție HCl 0,2 %. Se omogenizează prin agitare. Se recoltează 1 ml soluție și se introduce în a doua eprubetă, agitând pentru omogenizare. Operația se continuă până la ultima eprubetă, din care se înlătură 1 ml soluție.

Se procedează asemănător și cu al doilea set de eprubete, numai că, în locul HCl, se folosește soluție NaOH 1 %. Se măsoară pH-ul soluțiilor. Se adaugă în fiecare eprubetă câte 2 ml amidon 1 % și 1 ml α-amilază. Se omogenizează și se incubează 15 minute la 37°C. Răcire.

Acid sau bază,mg	1	2	3	4	5	6	7	8
HCl	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,0312	0,0156	0,0078
pH								
NaOH	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,038
pH								

În fiecare probă se adaugă câte 2 picături reactiv I₂/KI. După agitare se notează prima probă în care nu se mai observă o colorație roșie-brună, indiciu pentru hidroliza completă a amidonului. Cu ajutorul datelor din tabel se găsește pH-ul optim de acțiune a enzimei.

Influența efectorilor

Efectorii care stimulează activitatea enzimelor se numesc *activatori*, iar cei care o încetinesc sau o inhibă se numesc *inhibitori*.

Exemple: ionii de clor activează amilaza, ionii de mangan activează arginaza, ionii de magneziu activează fosfatazele.

Inhibitorii pot să acționeze fie asupra enzimei, fie asupra complexului enzimă-substrat. Inhibiția poate fi: competitivă, necompetitivă, incompetitivă, allosterică.

Influența efectorilor asupra α -amilazei

Principiu: Se experimentează acțiunea α -amilazei asupra soluției de amidon, în prezența unui activator (NaCl), a unui inhibitor ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) și în absența acestora. Prin reacția cu iodul a probelor colectate la mai multe intervale de timp se determină timpul în care se produce hidroliza integrală a amidonului.

Reactivi:

1. Amidon 1%;
2. Amilază;
3. Soluție tampon fosfat 0,066 M, pH 6,8: se prepară din soluție de fosfat monopotasie 0,066 m și soluție fosfat disodic 0,066 M;
4. Clorură de sodiu 1 %;
5. Azotat de plumb 0,001 M;
6. Soluție I_2/KI 1%.

Mod de lucru:

Reactivi	Martor	1	2
Amidon 1 %	5	5	5
Tampon fosfat	2	2	2
NaCl 1%	-	2	-
Azotat de plumb 0,001 M	-	-	2
Apă distilată	2	-	-
Se termostatează la 37°C			
Amilază	0,5	0,5	0,5

Se recoltează la intervale de 4 minute eșantioane de câte 1 ml pe care se încearcă reacția cu iodul prin tratare cu 2 picături soluție iod-iodură. Se notează pentru fiecare probă intervalul de timp la sfârșitul căruia reacția cu iodul nu mai este pozitivă.

Inhibiția ureazei de către ionii de Cu^{2+}

Principiu: Ionii de cupru inhibă activitatea ureazei, enzimă care hidrolizează ureea cu formare de amoniac și dioxid de carbon.

Reactivi:

1. Urează 2 %;
2. Uree 0,5 %;
3. Sulfat de cupru 2 %;
4. Reactiv Nessler.

Mod de lucru:

În două eprubete se măsoară câte 1 ml soluție de urează 2 %. Într-una din eprubete se adaugă 0,3-0,4 ml soluție sulfat de cupru 2 %. În ambele eprubete se adaugă 0,5 ml soluție de uree 0,5 % și se mențin într-un termostat la 37°C, timp de 30 minute. După răcire se adaugă în fiecare eprubetă 3-4 picături reactiv Nessler. În eprubeta în care s-a adăugat soluția de sulfat de cupru reacția trebuie să fie negativă, iar în eprubeta fără sulfat de cupru trebuie să se formeze complexul cărămiziu rezultat în urma reacției dintre amoniac și reactivul Nessler.

Exprimarea activității enzimatice

Pentru exprimarea activității enzimatice se pot folosi **unități arbitrare**, dar acestea creează confuzii la interpretarea rezultatelor.

Exemple:

- cifra catalazică pentru catalază;

- unități Bodansky pentru fosfataze;
- ml NaOH pentru lipaze etc.

De aceea, Uniunea Internațională de Biochimie (IUB) a propus unitatea internațională (UI).

UI reprezintă cantitatea de enzimă care transformă un μmol substrat pe minut la 25°C , în condiții optime.

$1 \text{ UI} = 1 \mu\text{mol de substrat transformat} / \text{min} / 1 \text{ la } 25^{\circ}\text{C}$.

Activitatea enzimelor se poate exprima și în mU/ml (au concentrație mică în medii biologice).

Unitățile arbitrare se pot transforma în UI prin corecție cu anumiți factori de corecție.

Recent s-a introdus o nouă unitate denumită **katal** (1kat este cantitatea de enzimă ce catalizează transformarea a 1 mol de substrat pe secundă), echivalența acestuia cu unitatea internațională fiind $1 \text{ UI} = 16,67 \text{ nkat}$. Se folosește exprimarea în nkat pentru că activitățile enzimelor în lichidele biologice sunt mici.

Puritatea unei enzime dintr-un extract proteic se exprimă prin activitatea specifică care reprezintă numărul de unități (UI) pe mg proteină sau numărul de katali pe kg proteină.

Repartizarea intracelulară și tisulară a enzimelor

Enzimele sunt repartizate intracelular diferențiat existând o anumită specializare biochimică în raport cu fiecare compartiment subcelular.

Membrana celulară are numeroase enzime implicate în transportul substanțelor.

În mitocondrii sunt localizate enzimele care catalizează o serie de procese al căror efect energetic este foarte important. Astfel, în membrana mitocondrială se găsesc localizate enzimele lanțului respirator, ale decarboxilării oxidative a α -cetoacizilor, iar în matricea mitocondrială enzimele ciclului Krebs, ale oxidării acizilor grași, pentru unele etape din procese de sinteză din metabolismul proteic, al bazelor azotate etc.

În nucleu se găsesc numeroase enzime, caracteristice fiind cele implicate în metabolismul acizilor nucleici.

În ribozomi se găsesc enzimele ce intervin în biosinteza proteinelor.

În reticulul endoplasmatic neted sunt localizate enzime implicate în metabolismul colesterolului, procesele de detoxifiere, iar în citoplasmă se găsesc numeroase enzime care intervin în diferite procese metabolice esențiale pentru metabolismul intermediar (lactat dehidrogenaza, transaminaza GPT, hexokinaza, etc.).

În lizozomi se găsesc o serie de hidrolaze cu rol în degradarea hidrolitică a celor mai diverse substraturi.

Unele enzime au *localizare mixtă* prezentând forme ce se găsesc în mai multe compartimente subcelulare (transaminaza GOT, malatdehidrogenaza, etc.).

Cauzele prezenței în ser a enzimelor celulare

Prezența în plasmă a unor enzime mitocondriale sau din alte organite indică un grad de severitate mai mare pentru afecțiunea respectivă decât în cazul prezenței enzimelor citoplasmatic.

Clasificarea enzimelor plasmatice după localizare:

1. enzime plasmatice funcționale – enzime ce au substrat în plasmă:
 - pseudocolinesteraza;
 - lipoproteinlipaza;
 - ceruloplasmina;
 - factorii coagulării (trombina).
2. Enzime nespecifice plasmei:
 - a. enzime de secreție – secretate de diverse organe (amilaza, lipaza, tripsina, pepsina);

- b. enzime celulare – care acționează în condiții normale în celule, concentrația lor plasmatică fiind foarte mică.

Cauzele prezenței în ser a unor cantități mai mari de enzime sunt:

- modificarea permeabilității membranei;
- liza celulelor;
- necroza tisulară.