

# BIOQUÍMICA DELS ENZIMS

pel doctor FERRAN CALVET

Cap del Departament de Bioquímica a la Facultat de Ciències  
de la Universitat de Barcelona

Aquestes paraules inicials que m'han encomanat d'adreçar-vos, volen ésser com una introducció al col·loqui que tinc l'honor i el plaer d'obrir, sense altra pretensió que la de recordar coses ben sabudes sobre els enzims, catalitzadors metabòlics presents en tots els citoplasmes cel·lulars dels organismes vivents. L'alteració dels enzims caracteritza moltes malalties, les quals seran discutides pels metges especialistes que seguiran la meua disertació. Crec que per a una millor comprensió d'aquestes malalties convé tenir ben presents les principals característiques d'aquests biocatalitzadors.

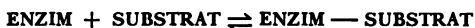
Els enzims són uns catalitzadors d'origen biològic que garanteixen que les reaccions bioquímiques tinguin lloc amb una gran eficàcia a les baixes temperatures corporals dels éssers vius (entre 0 i 45°C).

Químicament considerats, els enzims són proteïnes, és a dir, posseeixen macromolècules integrades per una concatenació d'aminoàcids —units mitjançant enllaços peptídics— d'acord amb una determinada seqüència, anomenada estructura primària de la proteïna. Moltes d'aquestes cadenes es mantenen orientades paral·lelament entre elles mitjançant enllaços transversals de cistina —ponts de sofre—, ponts d'hidrogen i forces de van der Waals, tot constituint així una fibra que sovint adopta una configuració helicoïdal, com la d'una escala de caragol. Aquesta és l'estructura secundària establerta gràcies a la interpretació dels diagrames de raigs X. Moltes d'aquestes fibres espirals es mantenen rígidament travades entre elles per forces electrostàtiques i de van der Waals, i formen una estructura filiforme (proteïnes filamentoses), a voltes entortolligada en forma de cabdell (proteïnes globulars). Aquesta estructura ternària es veu completada per l'anomenada quaternària, referent a l'associació de diferents d'aquestes estructures que ocupen situacions fixes en l'espai i constitueixen polímers de pes molecular elevat.

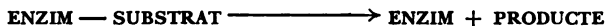
Tot això dóna idea de la complexitat de l'edifici molecular de les proteïnes, així com de llur labilitat o sensibilitat a les variacions de l'ambient físico-químic en què es troben disperses.

De la gran macromolècula proteica col·loïdal, la part més important per a l'acció catalitzadora és la zona, o zones específiques, de la seva superfície, «locus» d'activitat indispensable, que estigui lliure —no clos— perquè es pugui manifestar sense obstacle la cinètica de la reacció específica que catalitza.

L'actuació d'un enzim comença per la seva junció al substrat, formant un complex enzim-substrat, segons una reacció incompleta que respon a la llei de Guldberg i Waage de l'equilibri químic:



Després té lloc la bioreacció veritable.



L'enzim queda alliberat i en condicions de tornar-se a combinar amb una nova quantitat de substrat i de transformar-lo en el producte final del canvi bioquímic.

#### CARACTERÍSTIQUES D'ACTUACIÓ DELS ENZIMS

En primer lloc cal remarcar que els enzims són efectius en quantitats realment minúscules, i que actuen a dilucions tals que no permeten d'ésser reconeguts com a proteïnes, fins i tot utilitzant els reactius proteics més sensibles. L'activitat és prodigiosa, i l'enzim més potent, la catalasa, és capaç de transformar fins a tres milions de volums d'aigua oxigenada per minut i per mol d'enzim.

Els enzims no resulten transformats en la bioreacció que catalitzen, bé que amb el temps perden llur activitat perquè, com a proteïnes natives que són, es desnaturalitzen progressivament.

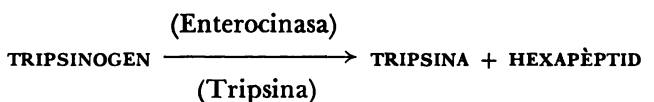
No afecten de cap manera l'equilibri final de la reacció, i solament en fan augmentar les velocitats.

En llur actuació, els enzims són específics en el sentit que cadascun actua solament sobre un cert substrat o un grup determinat de substrats afins; el clàssic símil d'Emil Fischer del pany i la clau és aplicable encara amb un sentit menys restringit, i amb certes generalitzacions.

La classificació tradicional dels enzims consistia a fer-ne dues grans agrupacions: les hidrolases (que amb les proteases, carbohidrases i esterases,

provoquen, per hidròlisi, el trencament d'enllaços C-O i C-N), i les desmolases (que per desmòlisi —òxido-reducció— catalitzen la ruptura de lligams C-C). La Comissió d'Enzims de la Unió Internacional de Bioquímica, l'any 1961, en publicà una classificació oficial en sis grups: 1. *Oxido-reduc-tases*. 2. *Transferases* (transaminases, transaldolases, etc.). 3. *Hidrolases*. 4. *Liases* (separen agrupacions atòmiques: carboxilasa, carbònic-anhídrasa, aspartasa, etc.). 5. *Isomerases* (epimerasa, fosfohexosa-isomerasa, etcètera). 6. *Ligases o sintetases* (acoblament de dues molècules amb degradació de l'ATP: glutatio-sintetasa, pantotènic-sintetasa, etc.).

Els enzims, sovint, es troben als citoplasmes en unes formes anomenades zimògens (inactives) que es transformen ràpidament en actives una vegada segregades, com a resultat de certes accions catalítiques:



A molts enzims, per a actuar, els cal la presència i la col·laboració de determinats cofactors anomenats *coenzims*, substàncies de baix pes molecular, dialitzables, cristallitzables, i d'estructura molecular perfectament coneguda, com són les codeshidrogenases I i II (NAD i NADP, nicotín-adenín-dinucleòtid i el seu fosfat). El FMN (flavín-mononucleòtid) i el FAD (flavín-adenín-dinucleòtid). Alguns coenzims tenen caràcter vitamínic, com la cocarboxilasa o vitamina B<sub>1</sub> (pirofosfat de tiamina). D'altres, són inespecífics, com els ions magnèsic, manganèsic i càlcic.

Hi ha moltes substàncies que retarden o impedeixen les accions enzimàtiques. Són els anomenats inhibidors, els quals constitueixen veritables tòxics de la vida cel·lular; en són exemples ben coneguts els ions mercúric, argèntic, àuric, cianur, fluorur, iodacetat, els oxidants com el permanganat i l'aigua oxigenada, l'arsènic, el formaldehid, els raigs X i el radi.

#### TEMPERATURA I PH ÒPTIMS

L'activitat d'un enzim augmenta amb la temperatura. Hom admet que les reaccions químiques dupliquen aproximadament la velocitat de reacció per cada augment de 10°C. En el cas dels enzims, això és així a temperatures no massa altes: més amunt de l'escala termomètrica la proteïna es desnatura i l'activitat enzimàtica minva fins a fer-se igual

a zero. Precisament un assaig senzill que permet d'esbrinar si una reacció és o no enzimàtica, consisteix a escalfar el sistema reaccionant a  $100^{\circ}\text{C}$  durant cinc minuts; si en refredar la barreja a la temperatura original la reacció continua, hom pot assegurar que no es tracta d'una acció catalitzada per enzims. Tots els enzims es desnaturalitzen totalment a temperatures pròximes als  $70^{\circ}\text{C}$ . La majoria treballen perfectament entre  $37$  i  $45^{\circ}\text{C}$ .

### EFFECTE DE LA TEMPERATURA

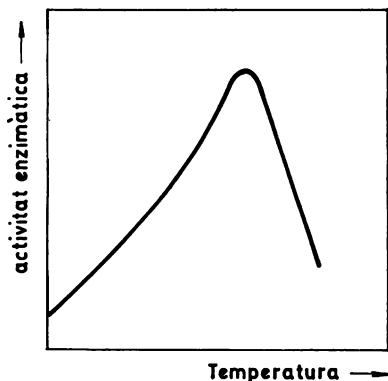


FIG. 1

Per a experimentar «in vitro» amb reaccions enzimàtiques, és imprescindible de disposar d'un bon termòstat. Únicament així, mantenint la temperatura fixada entre límits ben estrets, hom pot tenir mesures d'activitat comparables.

El concepte de temperatura òptima d'un enzim no és una bona constant del biocatalitzador. És el resultat de la combinació de dos efectes: l'augment d'activitat i la desnaturalització que en resulta en incrementar la temperatura.

Alguns enzims són més estables en presència dels seus substrats específics. Aquest fenomen segurament és degut al fet que els «loci» actius, que són les parts més sensibles de la macromolècula enzimàtica, es troben protegits per l'adherència del substrat.

## INFLUÈNCIA DEL pH

Les proteïnes enzimàtiques són electròlits amfòters perquè contenen, al mateix temps, grups  $-\text{COOH}$  i  $-\text{NH}_2$  lliures. Prosseeixen, per tant, un punt isoelectríc o pH de solubilitat mínima. Es comprèn que exhibeixen un pH òptim, o d'activitat màxima característic, en el qual es troben dissoltes a l'estat d'anió o de catió. L'activitat específica d'un enzim varia gra-

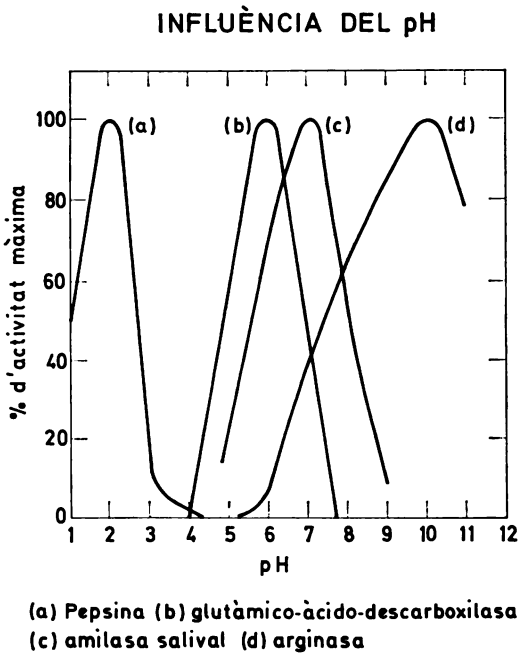


FIG. 2

dualment en funció del pH, passa per un punt màxim i constitueix una corba gràfica de forma de campana. En els casos de la tripsina i de la pepsina, per exemple, els pH òptims d'ambdós enzims coincideixen amb els pH fisiològics dels llocs del tractus gastrointestinal on precisament actuen normalment.

Aquest fenomen obliga els enzimòlegs a tenir cura d'operar sempre en medis curosament amortits quan experimenten amb sistemes enzimàtics, a fi d'assegurar la consecució de resultats comparables i reproductibles.

## EXTRACCIÓ, PURIFICACIÓ I VALORACIÓ DELS ENZIMS

L'aspiració del bioquímic enzimòleg consisteix a aïllar un enzim en la forma més concentrada i més purificada possible, a fi de poder estudiar perfectament les seves propietats i característiques d'actuació, i reconstruir «in vitro» el sistema enzimàtic que funciona naturalment en l'organisme dels éssers vius.

Els enzims es troben molt extensament distribuïts arreu dels diversos teixits integrants dels vegetals, dels animals i en els microorganismes. Per a beneficiar-los, s'extreuen generalment de certes glàndules, teixits o cultius, on hom ha establert prèviament que es troben en gran concentració. Així hom aconsegueix que l'extracció sigui més efectiva i que el líquid extret contingui el mínim de substàncies inertes acompanyants. En les plantes hom parteix de fulles, flors, brots, arrels, fruits o llavors. En els animals hom utilitza, com a matèries de partida, certes glàndules delimitades, com el fetge i pàncreas, cervell, os o múscul, etc. Amb els microorganismes hom tracta la totalitat del cultiu, sigui de llevats, fongs o bacteris. En tots els casos cal procedir primerament a esmicolar o trinxar el teixit o el cultiu, utilitzant diferents mitjans mecànics, a fi que el contacte amb el dissolvent d'extracció sigui com més íntim millor. Com a dissolvent hom pot utilitzar aigua, però és millor d'utilitzar dissolucions d'electròlits, com és ara sèrum fisiològic, àcids o bases diluïts. En alguns casos hom utilitza procediments diversos especials. Per purificar les dissolucions obtingudes, hom aprofita les propietats proteiques dels enzims: utilització del salat o de les precipitacions isoelectriques, les adsorcions selectives amb alumina, sílico-gel, caolí, septacell, hidrocèl·lulosa, DEAE-cellulosa, mitjançant columnes cromatogràfiques i elucions selectives. En alguns casos, hom aplica l'electroforesi preparativa de Tiselius.

Finalment, hom intenta la cristallització de l'enzim. Això no és sempre possible d'aconseguir; generalment és difícil, i requereix tota l'experiència i l'habilitat de l'enzimòleg. Actualment ha estat aconseguida amb bastants enzims (uns 90) i constitueix una garantia de la uniformitat del producte obtingut.

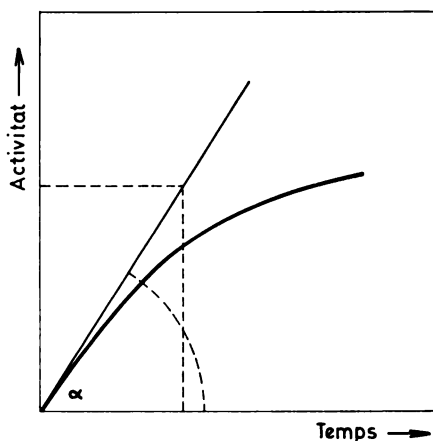
La cristallització d'un enzim, però, no sempre és un bon criteri de màxima puresa o concentració. Per hidròlisi de la pepsina cristallitzada hom ha obtingut una pepsina amorfa que posseeix una més gran activitat per mil·ligram de nitrogen proteic.

## CRITERI DE CONCENTRACIÓ I PURESA

En cada una d'aquestes fases d'extracció i purificació de l'enzim cal comprovar si realment augmenta la concentració enzimàtica del preparat; és l'única manera de saber si realment hom avança pel bon camí.

Per a mesurar l'activitat d'un preparat enzimàtic cal establir la velocitat inicial de la bioreacció específica que catalitza, en els primers moments de l'acció: hom treballa sempre amb un excés de substrat, per tal que el

## VELOCITAT DE REACCIÓ



$$\text{Pendent: } \operatorname{tg} \alpha = \frac{\sin \alpha}{\cos \alpha}$$

FIG. 3

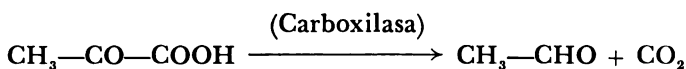
factor limitant sigui l'enzim. Aleshores s'admet proporcionalitat entre la velocitat de reacció ( $v$ ) i la concentració o activitat enzimàtica, tot operant a temperatura i pH constants, i tot tenint en compte la presència o absència d'inhibidors o activadors.

La velocitat és constant en els primers moments de la reacció, però més endavant minva —desnaturalització de l'enzim—. L'activitat de l'or-

denada és expressada per les quantitats de substrat consumides o reaccionades, o per l'augment de concentració dels productes de la reacció. La tangent en l'origen de la corba és la mesura de la velocitat.

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{\sin \alpha}{\cos \alpha}$$

Per exemple: en la reacció que catalitza la carboxilasa, hom pot determinar la quantitat d'àcid pirúvic que desapareix en temps coneguts, o bé les d'aldehid acètic o de gas carbònic produïts. Hom pot emprar tècniques químiques, colorimètriques, gasomètriques, etc.



La unitat internacional d'activitat enzimàtica d'un preparat és definida com el nombre de micromols de substrat transformat per minut i per gram de preparació de l'enzim catalitzador:

$$\text{U.I.} = \mu\text{M/g/minut}$$

Per a determinar les concentracions de substrat o dels metabòlits produïts segons els casos, són utilitzades tècniques físiques, químiques o físico-químiques, com polarimetria, refractometria, interferometria, espectrofotometria, colorimetria, viscosimetria, nefelometria, dilatometria, gasometria, etc.

#### IMPORTÀNCIA I APLICACIONS DELS ENZIMS

Bé que la importància creixent dels enzims és un concepte ben generalitzat avui dia, convé recordar algunes de les seves múltiples aplicacions. Les classificarem en tres grans subdivisions: aplicacions industrials o de fabricació de productes, aplicacions al diagnòstic clínic i aplicacions com a agents terapèutics.

Des de temps molt antic han estat utilitzades les accions enzimàtiques per a la fabricació de productes dietètics tan importants com el pa, el vi, el vinagre, la cervesa, el quefir, el iogurt i el formatge. Més modernament han estat emprades per a preparar àcid làctic i altres àcids orgànics, butanol-acetona, i en l'actualitat per a fabricar antibiòtics com penicil·lina, tetraciclina i cloramfenicol, vitamines B<sub>2</sub> i B<sub>12</sub>, i aminoàcids, entre altres.

Molt recentment s'han desenvolupat modernes tècniques de determina-



ció d'enzims a la clínica, les quals permeten el diagnòstic de diversos estats patològics: en constitueixen exemples il·lustratius la determinació de nivells de transaminases com la glutàmico-oxalacètic (GOT), la glutàmico-pirúvic (GPT) i la làctico-deshidrogenasa (LDH), en l'infart de miocardi, insuficiència coronària, hepatitis, etc.; l'aldolasa en les distròfies musculars, en la miastènia gravis i en les hepatitis, i en el càncer de pròstata, etc., la fosfatasa àcida.

Finalment, alguns enzims troben cada dia més aplicació en el tractament de diferents malalties. Avui són ben conegudes les propietats antiinflamatòries de la tripsina, la qual també hom emprà per al desbridament de ferides, úlceres i cremades; l'ús antiinflamatori de l' $\alpha$ -quimotripsina injectable (que no coagula la sang), i la seva aplicació en la periartritis i en l'anomenada zonulòlisi enzimàtica, la qual facilita la cirurgia de la cataracta; les propietats lisants de la desoxiribonucleasa i de la ribonucleasa; la interferència inhibidora de la catalasa en la biosíntesi del colesterol i de l'àcid úric; i la influència d'un coenzim, la cocarboxilasa (vitamina B<sub>1</sub>), en el metabolisme dels glúcids. És d'esperar que la terapèutica enzimàtica tindrà un esdevenidor insospitat pocs anys a venir.

Per a acabar, permeteu-me de recordar que la vida dels éssers és basada en les múltiples bioreaccions coordinades que s'esdevenen en la intimitat dels citoplasmes cel·lulars, les quals tenen lloc amb molta subtilitat i eficàcia. Tot aquest metabolisme funciona gràcies a les accions catalitzadores de nombrosos enzims, la majoria encara per descobrir. Quan aquesta coordinació d'accions enzimàtiques experimenta alguna alteració, es produeix un estat patològic. I quan els enzims es desborden i actuen caòticament, com quan sorgeix una anòxia —les catepsines que són poc actives en la seva forma oxidada passen a les formes reduïdes molt actives—, en resulta la mort de les cèl·lules (autòlisi) i de l'ésser a qui pertanyen.

Com a exemples de malalties ben conegudes que responen a disfuncions dels sistemes enzimàtics, tenim les anomenades malalties moleculars o enzimàtiques. Mencionarem solament l'alcaptonúria (defecte d'homogentísico-oxidasa), l'albinisme (defectuós funcionament de la tirosinasa), la cistinúria (reabsorció tubular dificultada), la pentosúria (inhibició del cicle de les pentoses), l'hematoporfíria congènita (aberració del metabolisme porfirínic), l'oligofrènia fenilpirúvica o fenilcetonúria (inhibició del pas de fenilalanina a tirosina), l'anèmia falciforme (biosíntesi d'una hemoglobina amb anormal seqüència d'aminoàcids) i la miastènia gravis (excés d'activitat colinesteràsica).

Si amb aquesta resumida i elemental exposició he aconseguit de fer-vos recordar alguns aspectes de l'enzimologia i dels enzims, em consideraré molt satisfet, perquè creuré haver-vos estat d'alguna utilitat envers la millor comprensió de les exposicions dels qui em segueixen.