

APLICACIONES ANALITICAS DE ENZIMAS

Parte I

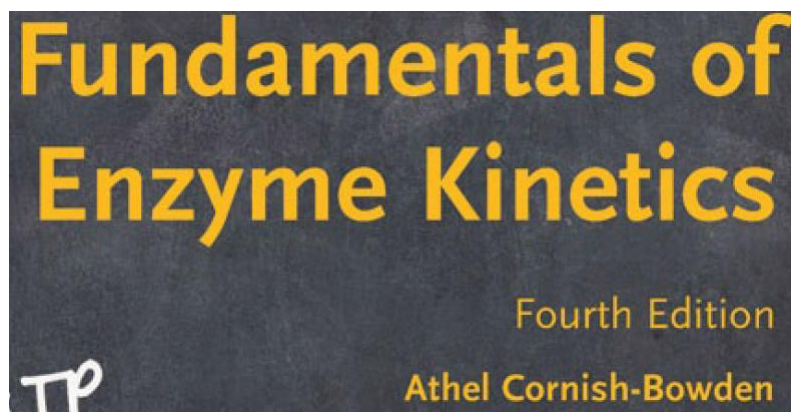
Determinación de moléculas de interés

Medida de la concentración de metabolitos o moléculas de interés en mezclas complejas

- Especificidad de las enzimas
- Aplicabilidad a sustancias que participan de una reacción catalizada por enzimas

BIBLIOGRAFIA.

https://openwetware.org/wiki/Lidstrom:Enzyme_Assay_Basics#How_high_should_my_5Benzyme.5D_be.3F



El análisis cualitativo y cuantitativo de los componentes de una muestra utilizando enzimas puede ser rápido, altamente sensible, selectivo y preciso.

-Por lo general, las etapas previas de purificación y separación no son necesarias en el análisis enzimático.

-En un ensayo enzimático, la determinación espectrofotométrica o electroquímica del reactivo o del producto es el enfoque preferido.

-Cuando esto no sea aplicable, la determinación se realiza mediante un ensayo enzimático acoplado. La reacción acoplada incluye una reacción auxiliar en la que el constituyente alimentario es el reactivo que se va a convertir en producto, y una reacción indicadora que implica una enzima indicadora y su reactivo o producto, cuya formación o descomposición puede seguirse analíticamente fácilmente.

-En la mayoría de los casos, la reacción del indicador sigue a la reacción auxiliar.

Constituent	Auxiliary reaction	Indicator reaction
Glucose	$\beta\text{-D-Glucose}^b + \text{O}_2 \xrightleftharpoons[\text{oxidase}]{\text{Glucose}} \beta\text{-D-Gluconolactone} + \text{H}_2\text{O}_2(a_1)$ $\text{Glucose} + \text{ATP} \xrightleftharpoons[\text{kinase}]{\text{Hexo-}} \text{Glucose-6P}(b_1)$	$\text{o-Dianisidine} + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightleftharpoons{\text{Peroxidase}} \text{Oxid. o-dianisidine}(a_1)$ $\text{Glucose-6P} + \text{NADP}^{\oplus} \xrightleftharpoons[\text{dehydrogenase}]{\text{Glucose-6P}} \text{Gluconate-6P} + \text{NADPH} + \text{H}^{\oplus}(b_2)$
Fructose	$\text{Fructose} + \text{ATP} \xrightleftharpoons[\text{kinase}]{\text{Hexo-}} \text{Fructose-6P}$ $\text{Fructose-6P} \xrightleftharpoons[\text{isomerase}]{\text{Glucosephosphate}} \text{Glucose-6P}$	As glucose-6P (b_2)
Sorbitol	$\text{D-Sorbitol} + \text{NAD} \xrightleftharpoons[\text{dehydrogenase}]{\text{Sorbitol dehy-}} \text{Fructose} + \text{NADH} + \text{H}^{\oplus}$	
Maltose	$\text{Maltose} + \text{H}_2\text{O} \xrightleftharpoons[\alpha\text{-Glucosidase}]{\alpha\text{-Glucosidase}} 2 \text{ Glucose}$	As glucose ($b_1 + b_2$)
Starch	$\text{Starch} + (n-1) \text{H}_2\text{O} \xrightleftharpoons[\text{glucosidase}]{\text{Amylo-}} n \text{ Glucose}$	As glucose ($b_1 + b_2$)
Galactose	$\beta\text{-D-Galactose} + \text{NAD}^{\oplus} \xrightleftharpoons[\text{dehydrogenase}]{\text{Galactose}} \text{D-Galactono-}\gamma\text{-lactone} + \text{NADH} + \text{H}^{\oplus}$	
Ethanol	$\text{Ethanol} + \text{NAD}^{\oplus} \xrightleftharpoons[\text{dehydrogenase}]{\text{Alcohol}} \text{Acetaldehyde} + \text{NADH} + \text{H}^{\oplus}$	
Glycerol	$\text{Glycerol} + \text{ATP} \xrightleftharpoons[\text{kinase}]{\text{Glycerol}} \text{sn-Glycerol-3P} + \text{ATP}$	$\text{ADP} + \text{Phosphoenolpyruvate} \xrightleftharpoons[\text{kinase}]{\text{Pyruvate}} \text{ATP} + \text{Pyruvate}(c)$ $\text{Pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^{\oplus} \xrightleftharpoons[\text{dehydrogenase}]{\text{Lactate}} \text{Lactate} + \text{NAD}^{\oplus}(d)$
Lactate	L-Lactate assay is achieved by a reversed reaction of d), and D-lactate assay with a dehydrogenase specific for D-enantiomer.	
Creatinine and Creatine	$\text{Creatinine} + \text{H}_2\text{O} \xrightleftharpoons{\text{Creatininase}} \text{Creatine}$ $\text{Creatine} + \text{ATP} \xrightleftharpoons[\text{kinase}]{\text{Creatine}} \text{Creatine-P} + \text{ADP}; \text{ADP is determined through c) and d)}$	
Individual amino acids	$\text{R-CH(NH}_2\text{)COOH} \xrightleftharpoons[\text{decarboxylase}^d]{\text{Amino acid}} \text{R-CH}_2\text{-NH}_2 + \text{CO}_2$	
L-Malate	$\text{L-Malate} + \text{NAD}^{\oplus} \xrightleftharpoons[\text{dehydrogenase}]{\text{Malate}} \text{Oxalacetate} + \text{NADH} + \text{H}^{\oplus}$	

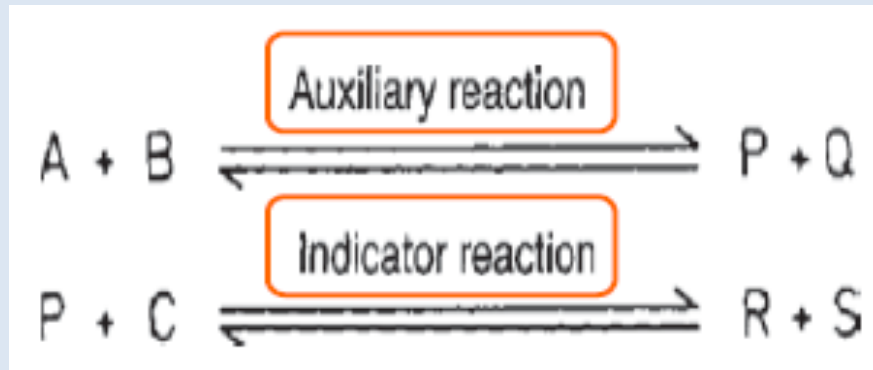
^a For saccharose and lactose see Fig. 2.42.

^b The content of α -anomeric form is accessible through mutarotation.

^c After hydrolysis this method is suitable for the assay of acylglycerols.

^d Specific decarboxylases are available as exemplified by those for L-tryptophan, L-lysine, L-glutamic acid, L-aspartic acid, or L-arginine.

-Reactante A es el constituyente que se está analizando.



-Se mide C o R o S.

-El estado de equilibrio de la reacción indicadora acoplada depende de la concentración.

-La reacción debe ajustarse de alguna manera para eliminar, por ejemplo, P de la reacción auxiliar antes de que se logre un equilibrio.

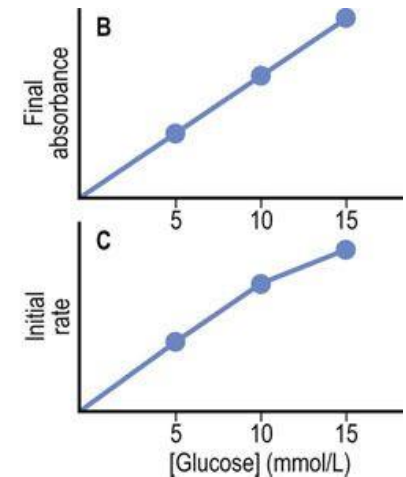
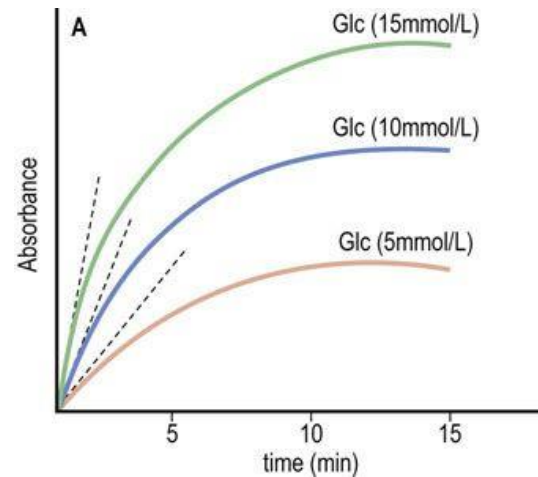
-Al usar varias reacciones auxiliares secuenciales con una reacción indicadora, es posible determinar varios constituyentes en un ensayo.

METODOS: CLASIFICACION

- Punto final { Reacciones Irreversibles
Reacciones en equilibrio

- Cinéticos { Orden cero
Orden uno

¿Que es lo que miramos en cada caso?



Kinetic vs End Point Reaction

More Information Online WWW.DIFFERENCEBETWEEN.COM

DEFINITION

Kinetic Reaction

An analysis method used in clinical chemistry to determine the difference in absorbance between two points of the progression of a reaction.

End Point Reaction

An analysis method used in clinical chemistry to determine the total amount of analytes consumed during the progression of a reaction.

TIME PERIOD

The time considered for a kinetic reaction is 20 seconds to 1 minute.

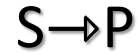
The time considered for an end point reaction is about 5 to 15 minutes.

WHAT IS MEASURED

We measure the difference in absorbance between two points during the progression of the reaction.

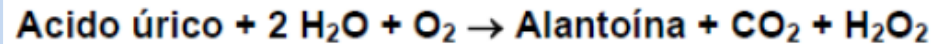
We measure the total amount of analytes that participate in the reaction.

METODOS DE PUNTO FINAL



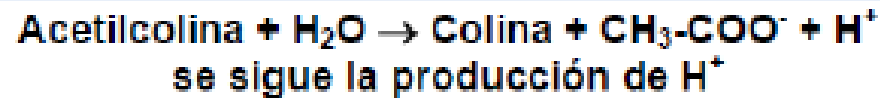
Contar con una propiedad física diferencial entre S y P
Ausencia de interferencia

∇ ACIDO URICO (uricasa, urato oxidase)

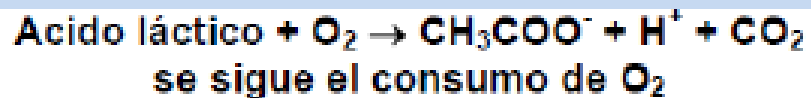


Úrico absorbe $\epsilon_{293 \text{ nm}} = 12600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

∇ ACETILCOLINA (acetilcolinesterasa)



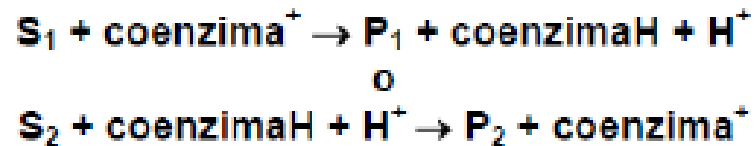
∇ ACIDO LACTICO (lactato oxidasa)



METODOS DE PUNTO FINAL

∇

Sustratos que participan en reacciones enzimáticas que requieren como coenzimas NAD/NADH y NADP/NADPH (deshidrogenasas)



EJEMPLOS

Etanol (alcohol deshidrogenasa)

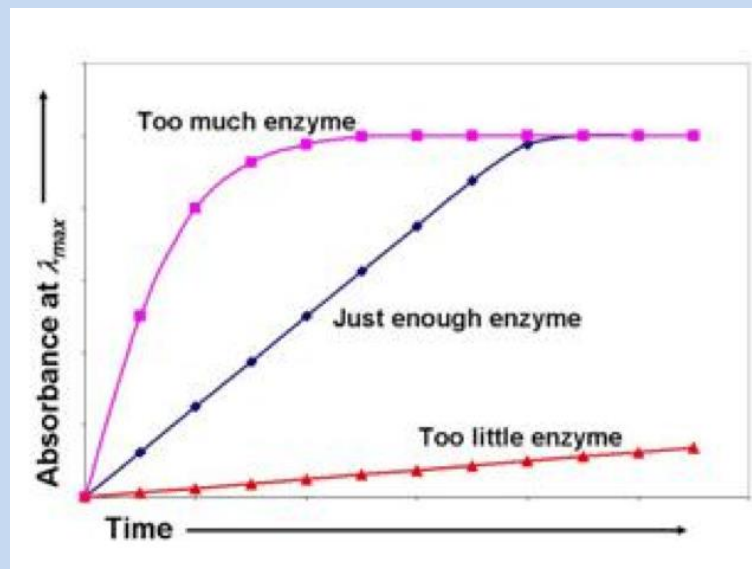


Piruvato (lactato deshidrogenasa)



CONSIDERACIONES GENERALES EN UN ENSAYO DE PUNTO FINAL

- ❖ Especificidad de la enzima
- ❖ Afinidad de la enzima por sustrato
- ❖ Actividad de la enzima
- ❖ Este procedimiento es confiable cuando la reacción avanza virtualmente hasta completarse. Conversión completa (99%) en un tiempo razonable. El tiempo de reacción se calcula cuando la velocidad de reacción sigue una cinética de primer orden para la mayor parte de la reacción enzimática.



Concentraciones de enzimas utilizadas en métodos de punto final en el análisis enzimático de alimentos

Substrate	Enzyme	K_m (mol/l)	Enzyme concentration (μ cat/l)
Glucose	Hexo-kinase	$1.0 \cdot 10^{-4}$ (30 °C)	1.67
Glycerol	Glycerol kinase	$5.0 \cdot 10^{-5}$ (25 °C)	0.83
Uric acid	Urate oxidase	$1.7 \cdot 10^{-5}$ (20 °C)	0.28
Fumaric acid	Fumarase	$1.7 \cdot 10^{-6}$ (21 °C)	0.03

- K_m se expresa en unidades de concentración, generalmente en unidades molares.

- K_m es la concentración de sustrato que conduce a la mitad de la velocidad máxima. $K_m = 1/2 V_{max}$

METODOS DE PUNTO FINAL

- ❖ Los ejemplos que se muestran en esta Tabla sugieren que las enzimas con valores de K_m bajos son deseables para el método de punto final con mayor flexibilidad.
- ❖ Se necesitan datos para K_m y V para calcular el tiempo de reacción requerido.
- ❖ Un requisito previo es una reacción en la que el estado de equilibrio se desplaza hacia la formación de un producto con una eficiencia de conversión del 99%.

METODO DE PUNTO FINAL EVALUACION DEL TIEMPO DE REACCION

Caso particular: $[S] \ll K_m$

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

$$k = \frac{V_{max}}{K_m}$$

$$S_t = S_0 e^{-k t}$$

$$2.3 \log \frac{S_0}{S_t} = k t$$

$$t = \frac{2.3}{k} \log \frac{S_0}{S_t}$$

$$t_{99} \cong \frac{2.3}{k} \log (100) \text{ min} = \frac{4.6}{k} \text{ min}$$

EJEMPLO

$$K_M = 0.7 \text{ mM} = 0.7 \text{ mmoles/litro} = 0.7 \text{ } \mu\text{moles/ml}$$

$$[S]_0 = 5 \cdot 10^{-2} \text{ mM} = 5 \cdot 10^{-2} \text{ } \mu\text{moles/ml}$$

$$[S]_f = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mM} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ } \mu\text{moles/ml}$$

$$k = \frac{x \frac{\mu\text{moles}}{\text{ml} \cdot \text{min}}}{0.7 \frac{\mu\text{moles}}{\text{ml}}} = x \cdot 1.43 \text{ min}^{-1}$$

Si deseamos que $t_{99} \cong 1 \text{ min}$; $k = 4.6 \text{ min}^{-1}$:

$$x = \frac{k}{1.43} = \frac{4.6}{1.43} = 3.2 \frac{\text{UI}}{\text{ml}}$$

METODOS DE PUNTO FINAL

Caso general

$$t = 2.3 \frac{K_m}{V_{max}} \log \frac{S_0}{S_t} + \frac{(S_0 - S_t)}{V_{max}}$$

para una conversión del 99%

$$t_{99} \cong 4.6 \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{S_0}{V_{max}}$$

si $S_0 \leq K_m$ entonces $\frac{S_0}{V} < \frac{K_m}{V}$ y por tanto

$$4.6 \frac{K_m}{V_{max}} < t_{99} < 5.6 \frac{K_m}{V_{max}}$$

Substrate	Enzyme	K_m (mol/l)	Enzyme concentration (μ cat/l)
Glucose	Hexokinase	$1.0 \cdot 10^{-4}$ (30 °C)	1.67
Glycerol	Glycerol kinase	$5.0 \cdot 10^{-5}$ (25 °C)	0.83
Uric acid	Urate oxidase	$1.7 \cdot 10^{-5}$ (20 °C)	0.28
Fumaric acid	Fumarase	$1.7 \cdot 10^{-6}$ (21 °C)	0.03

- ❖ Equilibrio favorable....y si no?
- ❖ Si el sustrato se consume solo parcialmente, el equilibrio se desplaza a favor de los productos por aumentando la concentración de reactivo (cosustrato) o por eliminando uno de los productos de la reacción (por pH, por ej).
- ❖ Si no es posible lograrlo, se debe preparar una curva estándar.
- ❖ En una reacción de dos sustratos, la enzima se satura con el segundo sustrato. La actividad catalítica de la enzima necesaria para el ensayo puede determinarse tanto para reacciones de uno como de dos sustratos.

METODOS DE PUNTO FINAL

Desplazamiento de equilibrio:

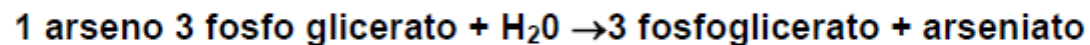
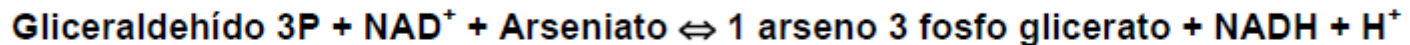
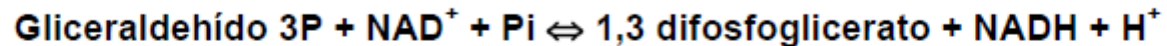
- 1)
 - a) Aumentado la concentración de co-sustrato
 - b) Variando el pH
 - c) Usando agentes químicos secuestradores del producto
- 2) Usando co-sustratos alternativos (análogos de NAD): Acetaldehído piridina adenindinucleótido (APAD):

Potenciales redox: NAD/NADH -320 mv
APAD/APADH -246 mv

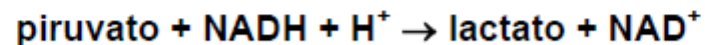
REACCION	NAD	APAD
Alcohol deshidrogenasa	10^{-11}	10^{-9}
Glutamato deshidrogenasa	$7 \cdot 10^{-14}$	$1.5 \cdot 10^{-12}$
Malato deshidrogenasa	10^{-12}	10^{-10}
Lactato deshidrogenasa	$2.5 \cdot 10^{-12}$	$5.6 \cdot 10^{-10}$

3) Sustitución por otro reactivo:

Gliceraldehído 3-P (Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa)

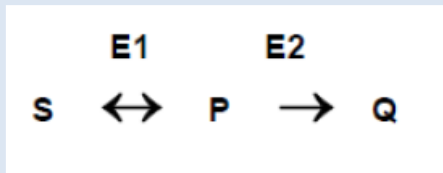


4) Uso de sistemas regenerantes:

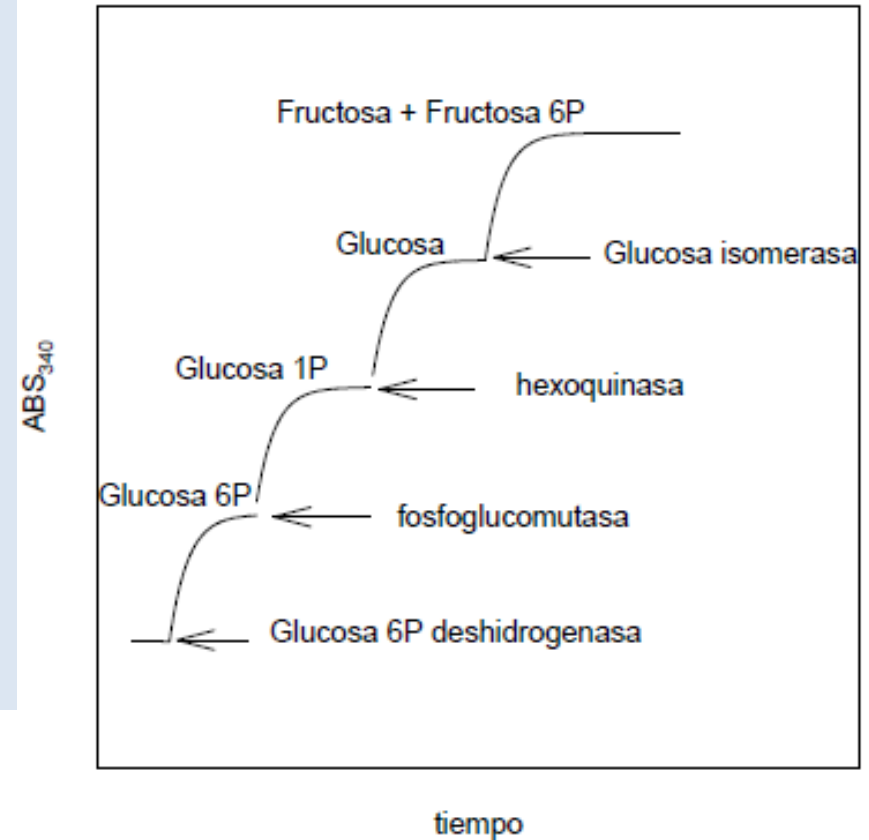


METODOS DE PUNTO FINAL

ENZIMAS ACOPLADAS



- ☐ Aumenta el numero de sustratos determinables enzimáticamente
- ☐ Desplaza la primera reaccion hacia la derecha
- ☐ Ambas enzimas contribuyen a la especificidad
- ☐ Una enzima para varias reacciones



Glucosa 6P deshidrogenasa: $\text{Glucosa 6P} + \text{NADP}^+ \rightarrow 6 \text{ fosfogluconato} + \text{NADPH} + \text{H}^+$

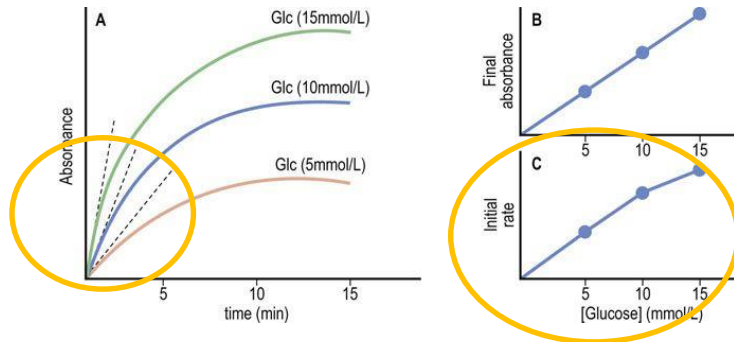
Fosfoglucomutasa: $\text{Glucosa 1P} \rightarrow \text{Glucosa 6P}$

Hexoquinasa: $\text{Glucosa} + \text{ATP} \rightarrow \text{Glucosa 6P} + \text{ADP}$

Hexoquinasa: $\text{Fructosa} + \text{ATP} \rightarrow \text{Fructosa 6P} + \text{ADP}$

Glucosa isomerasa: $\text{Fructosa 6P} \rightarrow \text{Glucosa 6P}$

METODOS CINETICOS



Reacciones de orden cero:

Determinación de activadores e inhibidores.

Ejemplo: Mg^{2+}

isocitrato deshidrogenasa
 Mg^{2+}

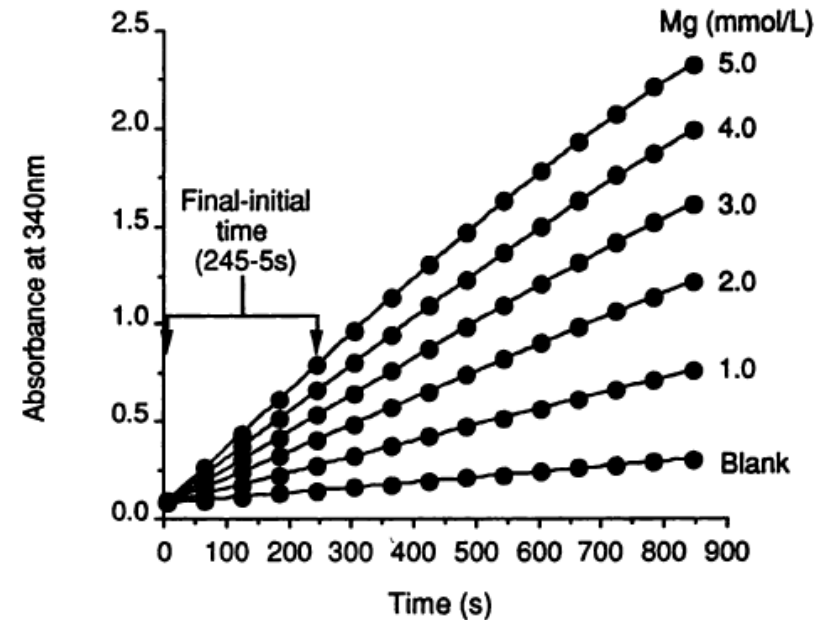
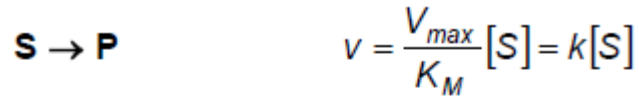


Fig. 1. Reaction profile with Mg calibrators 0–5 mmol/L over 15 min, showing the final–initial time of 245–5 s used in the assay protocol, where linearity of calibration is best.

Reacciones de orden uno:



$$S = S_0 e^{-kt}$$

$$t = t_1 \quad S_1 = S_0 e^{-kt_1}$$

$$t = t_2 \quad S_2 = S_0 e^{-kt_2}$$

$$S_1 - S_2 = S_0 (e^{-kt_1} - e^{-kt_2})$$

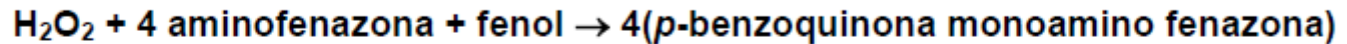
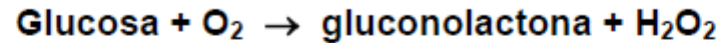
$$S_0 = \frac{\Delta S}{e^{-kt_1} - e^{-kt_2}}$$

CONSIDERACIONES PARA LOS ENSAYOS CINETICOS

- ☐ Concentraciones bajas de sustrato
- ☐ Enzimas con altos K_m
- ☐ Se puede aumentar la K_m con un inhibidor competitivo
- ☐ Con enzimas acopladas, siendo limitante la primera.

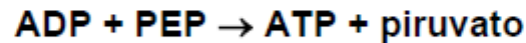
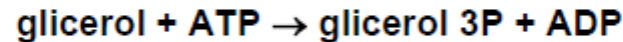
Ejemplos:

- Glucosa

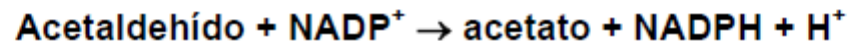
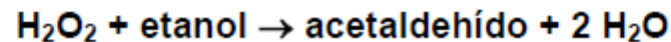
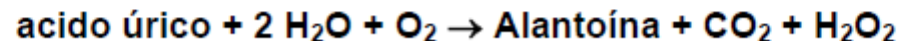


$K_m = 70 \text{ mM}$ producto coloreado.

- Glicerol



- Acido úrico



Se aumenta el K_m de la uricasa con xantina

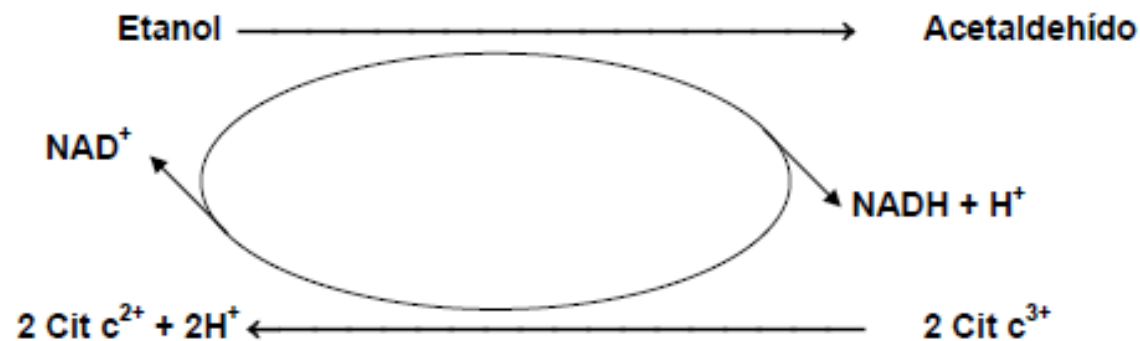
ENSAYOS CATALITICOS O DE CICLO DE SUSTRATO

$\text{NAD}^+ + \text{NADH}$

SENSIBILIDAD $2 \cdot 10^{-10}$ moles

$\lambda = 550 \text{ nm}$

Alcohol deshidrogenasa + citocromo c reductasa



APLICACIONES ANALITICAS DE ENZIMAS

Parte II

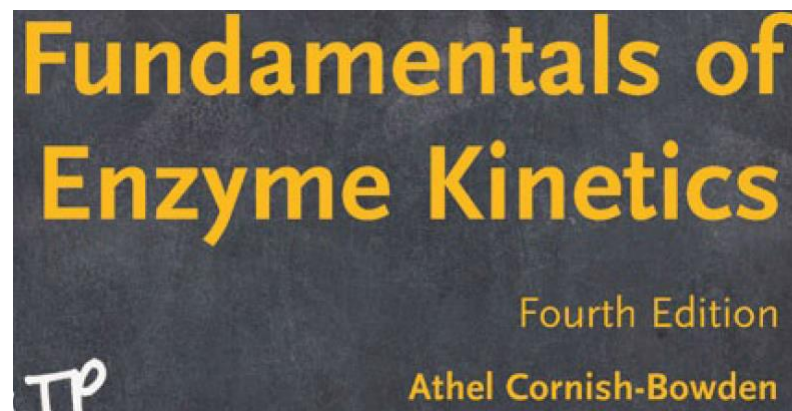
Determinación de la actividad enzimática

Medida de la concentración de metabolitos o moléculas de interés en mezclas complejas

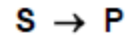
- Especificidad de las enzimas
- Aplicabilidad a sustancias que participan de una reacción catalizada por enzimas

BIBLIOGRAFIA.

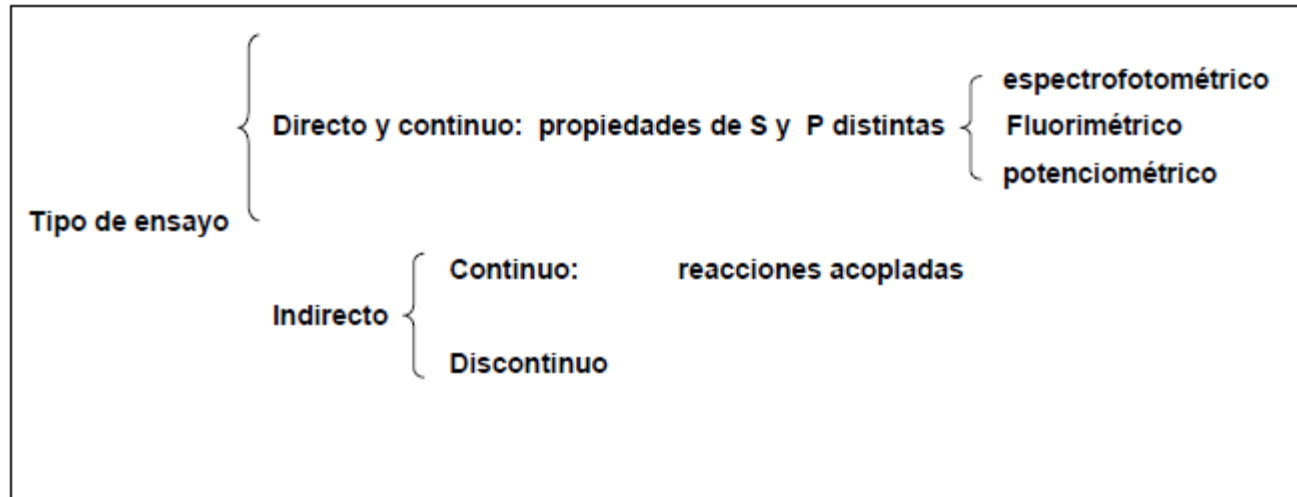
https://openwetware.org/wiki/Lidstrom:Enzyme_Assay_Basics#How_high_should_my_.5Benzyme.5D_be.3F



DETERMINACION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA



$$V = \frac{dP}{dt} = -\frac{dS}{dt}$$



Continuos espectrofotométricos

- NAD(P) o NAD(P)H
- Sustratos sintéticos colorimétricos :
 - nitrofenilos
 - reacciones químicas acopladas
 - reacciones enzimáticas acopladas

Figure 4.1. Discontinuous assay. Samples must be analyzed at intervals.

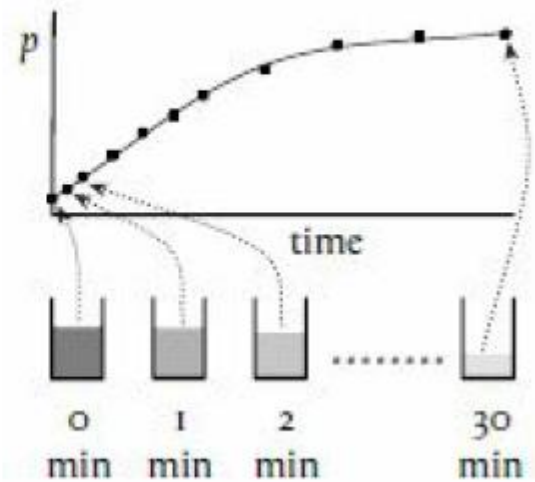
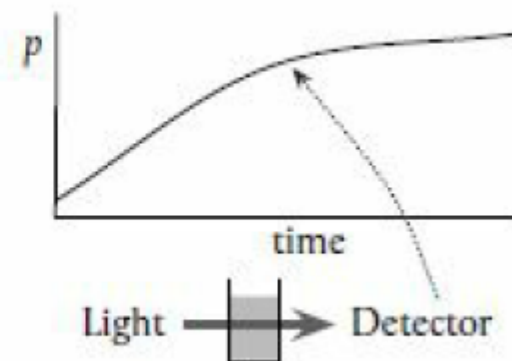
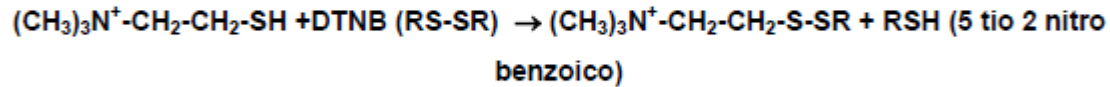
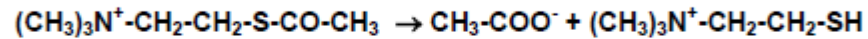


Figure 4.2. Continuous assay. The detection system generates a progress curve directly.



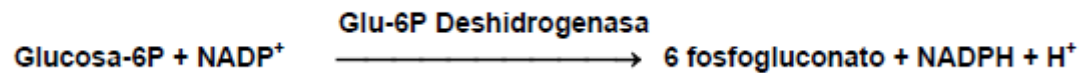
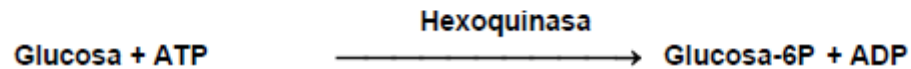
Ejemplos:

- Acetilcolinesterasa

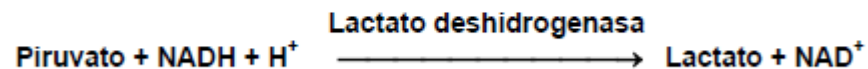
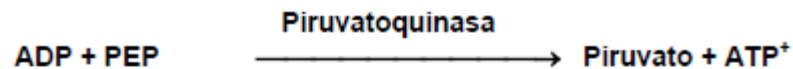
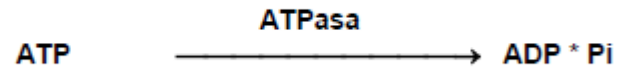


$$\lambda_{\text{max}} = 412 \text{ nm}$$

- Hexoquinasa



- ATPasa



OPTIMIZACION DE ENSAYOS

- pH óptimo
- temperatura: 25°C (IUB 1961)
30°C (IUB 1964 y IFCC 1975)
37°C (otros)
- concentración de sustratos

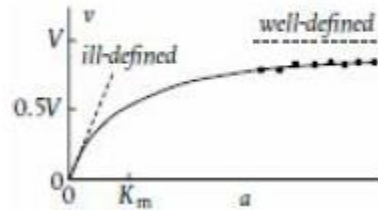
1 solo sustrato

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

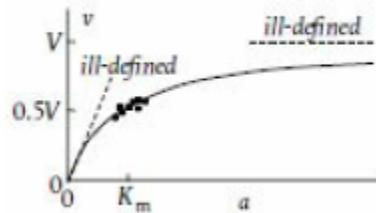
$$[S]_F = \frac{K_m F}{1 - F}$$

F	$\frac{F}{1-F}$
0.99	99
0.98	49
0.97	32.3
0.96	24
0.95	19

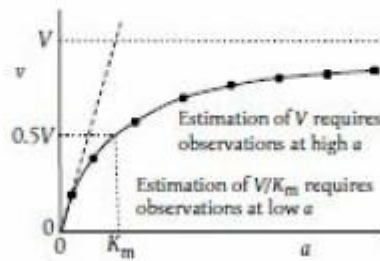
[Figure 4.11](#). Range of substrate concentrations too high. If all the concentrations are well above K_m it may be possible to estimate V adequately, but the experiment will yield very little information about V/K_m . This fault is much less common than the one illustrated in [Figure 4.10](#).



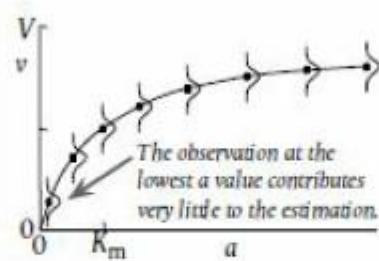
[Figure 4.12](#). Range of substrate concentrations too confined. If all the concentrations are tightly clustered around a single value the experiment can yield very little information about either V or V/K_m .



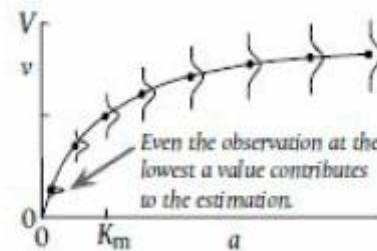
[Figure 4.13](#). The range of concentrations should range from as low as possible (to define V/K_m accurately) to as high as possible (to define V accurately). Experimental error and failure of the Michaelis–Menten equation may complicate matters.



[Figure 4.14](#). Effect of experimental error on the analysis in [Figure 4.13](#). If the dispersion of v is independent of v , the values at low v add very little to the information from the fixed point at the origin.

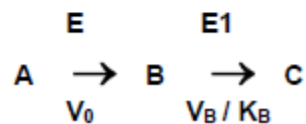


[Figure 4.15](#). Effect of experimental error on the analysis in [Figure 4.13](#). If the dispersion increases with v , the values at low v contribute useful information even though the origin provides a fixed point.



OPTIMIZACION DE ENSAYOS DE ENZIMAS ACOPLADAS

UNA ENZIMA



$$\frac{d[B]}{dt} = v_0 - \frac{V_B [B]}{K_B + [B]} \quad \frac{d[B]}{dt} \cong v_0 - \frac{V_B}{K_B} [B] \quad [B] = v_0 \frac{K_B}{V_B} \left(1 - e^{-\frac{V_B}{K_B} t} \right)$$

$$\frac{d[C]}{dt} = \frac{V_B}{K_B} [B] = v_0 \left(1 - e^{-\frac{V_B}{K_B} t} \right) \quad [C] = v_0 \left(t + \frac{K_B}{V_B} e^{-\frac{V_B}{K_B} t} - \frac{K_B}{V_B} \right)$$

$$[C]_{ss} = v_0 t - v_0 \frac{K_B}{V_B}$$

$$L = \frac{K_B}{V_B}$$

