الفصـــــل الخامس

الأنزيمات Enzymes

هي محفزات بروتينية للتفاعلات الحياتية, تعمل بتخصص عالي على جزئ(المادة الأساس Substrate) معين أو على صنف من الجزيئات المعينة وتحوي الخلية الحية الواحدة على ما يقارب 1000 من الأنزيمات المختلفة. وهذا ما يجعلها تعمل بكفاءة عالية.

الأنزيمات تشبه المحفزات غير العضوية في كونها لاتستنفذ ولاتتغير بعد تحفيزها لتفاعل معين وهي تخفض طاقة التنشيط اللازمة لذلك التفاعل.

الطبيعة الكيمياوية للأنزيمات

الأنزيمات: هي بروتينات تتألف من الأحماض الأمينية نفسها الموجودة في البروتين. وتتكون بوساطة الخلايا الحية وتستطيع أن تعمل بصورة مستقلة خارج الخلايا الحية, إن الأشكال المجسمة الخاصة بالأنزيمات تعود الى وجود التعاقب (التسلسل) المعين لمخلفات الأحماض الأمينية التي تؤلف كل أنزيم. كلمة أنزيم مشتقة من الكلمة اللاتينية (in yeast) والتي تعني الخميرة. يمكن تمثيل التفاعل الأنزيمي بالتفاعل العام الآتي:

$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} [ES] \overset{k_2}{\rightleftharpoons} E + P$$

E = Enzyme
S = Substrate
ES = Enzyme- Substrate complex
P = Product

معقد أنزيم- مادة أساس [ES]

هو مركب وسطي قد يحتوي على طاقة تنشيط كافية ليكون الناتج (P) او قد يتفكك الى المادة الأساس و الأنزيم (E+S). هناك أدلة ثبت وجود المركب الوسطي (معقد أنزيم- مادة أساس) فمثلاً أنزيم Catalase (بني اللون) يقوم بتحويل بيروكسيد الهيدروجين الى أوكسجين وماء، حسب التفاعل الآتي:

$$\underset{\text{(E) بني اللون}}{\text{Catalase}} + \underset{\text{(S) بني اللون}}{H_2O_2} \rightleftharpoons \underset{\text{(ES) احمر اللون}}{\text{Catalase}\sim H_2O_2} \longrightarrow \underset{\text{(E) بني اللون}}{\text{Catalase}} + H_2O + 1/2\ O_2$$

العوامل المساعدة Co- factors

هي عوامل مساعدة كيميائية غير بروتينية تحتاج إليها بعض الأنزيمات للقيام بالعمل التحفيزي. تقسم العوامل المساعدة الأنزيمية الى:

1. المجاميع المرتبطة Prosthetic groups

تتميز بعض الأنزيمات بأنها عبارة عن بروتينات مركبة أي إن بروتين الأنزيم يرتبط بقوة مع مركب غير بروتيني يطلق عليه إسم المجموعة المرتبطة.

Enzyme = Protein + Prosthetic group

تقوم هذه المجاميع المرتبطة في بعض الأنزيمات بالمشاركة في نقل المجاميع الكيميائية من مركب الى آخر أثناء التفاعلات الأنزيمية. مثل مجاميع Prophrine(Heme) المرتبطة بأواصر تساهمية قوية مع الجزء البروتيني في أنزيمات الـ Peroxidase,Catalase.

مصدرهما فيتامين B_2 يشاركان في نقل H^+

FMN= Flavin Mononucleotide

FAD= Flavin Adenine Dinucleotide

2.المرافقات الأنزيمية Coenzyme

يطلق عليها carier لطبيعة عملها في التفاعلات الأنزيمية، هي جزئيات عضوية غير بروتينية مستقرة حراريا أي لاتتفكك بالحرارة ويمكن فصلها عن الأنزيمات المرتبطة معها. لاتستطيع الأنزيمات القيام بعمليات التحفيز بدون هذه المرافقات الأنزيمية.

تقسم المرافقات الأنزيمية الى:

أ- **حاملات الهيدروجين**: وهي تلك التي تشارك في عمليات التأكسد والأختزال التي تجري فيها نقل الهيدروجين من مركب الى آخر.

NAD= Nicotin Amide Adnine Dinucleotide

NADP= Nicotin Amide Adnine Dinucleotide Phosphate

GSH= Glutathione

Ascorbic acid= Vitamin C

ب- **نيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات**: مثل

نقل الكليسريدات(تخليق الدهون الفسفورية)	CTP= Cytidine Triphosphate
نقل الفوسفات (الفسفرة)	ATP= Adenosine Triphosphate.
نقل جذر الكلايكوسيل(تخليق الكاربوهيدرات)	UTP= Uridine Triphosphate

3. الفلزات أو الأيونات (المنشطات اللاعضوية Activators):

مثل (Zn^{+2},Ca^{+2},Mn^{+2},Mg^{+2},K^{+1}) فمثلا انزيم ATP يحتاج الى وجود أيونات Mg^{+2} في الخلية ليرتبط مع جزئيات ATP مما يساعد عمل الأنزيم.

$$H_2O + ATP \xrightarrow{ATP_{ase}/Mg^{+2}} ADP+Pi$$

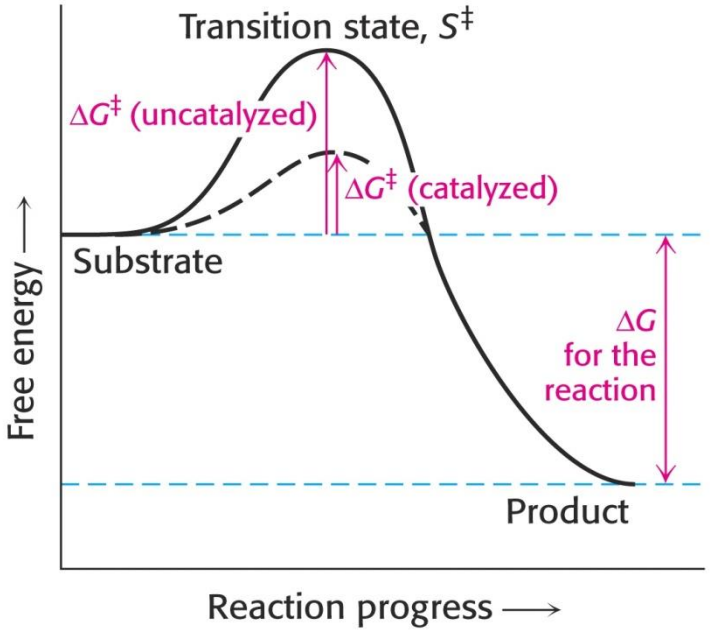
إستعمالات الأنزيمات Uses of Enzymes

تستخلص الأنزيمات في الوقت الحاضر من الأنسجة الحيوانية أو النباتية على نطاق واسع ثم تنقى للأغراض الآتية:

1. لدراسة مسار من مسارات التفاعلات البايولوجية metabolic pathway وتنظيم التفاعلات الجارية في ذلك المسار.
2. لدراسة تركيب عمل الأنزيمات وآليتها mechanism of action.
3. تستعمل في الصناعة كعوامل مساعدة بايولوجية لتصنيع الهورمونات والعقاقير.
4. تستعمل لدراسة فعالية الأنزيمات الموجودة في مصل الدم سريرياً كمؤشر لمعرفة حدوث حالة مرضية معينة.

التفاعلات الأنزيمية وطاقة التنشيط Enzymatic Reaction and Activation

في التفاعلات الكيميائية عند تحول المادة الأساس (S) الى ناتج(P) يحتاج الى طاقة تنشيط Activation energy لتكوين الناتج خلال عبور التفاعل في منطقة الحالة الأنتقالية Transition state وقد يحتاج التفاعل الى طاقة عالية للوصول الى هذه الحالة (تسخين المواد المتفاعلة).هذا غير ممكن في الخلايا، لأن التفاعلات تجري داخل الخلايا الحية بدرجات حرارة واطئة نسبياً وثابتة وهي غير قادرة على رفع درجة حرارتها، لذلك تستخدم الأنزيمات للتقليل من طاقة تنشيط التفاعلات عند درجة الحرارة الفسيولوجية.



الطاقة الحرة: تشير إلى أقصى شغل مفيد يمكن الحصول عليه من نظام ما عند ضغط ودرجة حرارة وحجم ثابت.

طاقة التنشيط Activation Energy

هي كمية الطاقة اللازمة لجلب جميع الجزئيات الموجودة في وزن جزيئي غرامي للمادة المتفاعلة الى الحالة الانتقالية.

الحالة الأنتقالية Transition state

هي الحالة الغنية بالطاقة عند قمة منحني التفاعل وتكون عندها المركبات غير مستقرة سرعان ما تتحلل لتعطي النواتج.

إذن فعمل الأنزيم هو تسهيل التفاعلات التي تجري داخل الخلايا الحية وذلك بتخفيض طاقة التنشيط إذ يتحد الأنزيم مع المواد المتفاعلة لتكوين الحالة الإنتقالية التي تختلف عن الحالة الإنتقالية في حالة عدم وجود العامل المساعد. إذ تكون الحالة الإنتقالية بوجود العامل المساعد مستقرة نسبياً وبالتالي تحوي على طاقة أقل.

الإنزيمات لا تقوم بتغيير التوازن بل تسريع الوصول الى حالة التوازن وجعل التفاعل ممكناً. فمثلاً إتحاد CO_2 مع الماء والذي يحدث داخل الأنسجة الحية، إذ ينتقل CO_2 من الأنسجة الى الدم ومنها الى الهواء داخل الحويصلات الهوائية والذي يتم بوساطة أنزيم Carbonic anhydrase الذي يعد من أسرع الأنزيمات المعروفة، إذ إن كل جزيئة أنزيم تمكن من إتحاد ($10x6^{5}$)جزيئة CO_2 مع الماء في الثانية الواحدة. هذه السرعة تعادل أكثر من مليون مرة سرعة نفس التفاعل بدون العامل الأنزيمي.

$$CO_2 + H_2O \xleftrightarrow{\text{carbonic anhydrase}} H_2CO_3$$

<u>وجود الأنزيمات</u> :

توجد الأنزيمات في جميع الخلايا الحية، هناك نوعان من الأنزيمات من حيث موقع عملها:

1. الأنزيمات الداخلية Endoenzymes

وهي الأنزيمات التي تعمل داخل الخلية نفسها وليس لها القابلية على التنافذ من خلال غشاء معين مثل الأنزيمات التأكسدية.

2. الأنزيمات الخارجية Exoenzymes

وهي الأنزيمات التي تعمل خارج الخلية بعد إفرازها من الأنسجة مثل الأنزيمات الهاضمة.

<u>الموقع الفعال للأنزيم Active site</u>

هو المركز الذي يتحد فيه الأنزيم Enzyme (E) مع المادة الأساس Substrate(S) التي يعمل عليها الأنزيم ، يكون هذا الموقع على شكل حفرة أو التفاف لسلسة متعدد الببتيد، إذ إن لكل انزيم

مركز نشط واحد او أكثر مسوؤل عن قيام الأنزيم بعمله. ويحدد المركز النشط نوع وترتيب وتعاقب الأحماض الأمينية في سلسلة الببتيد ، أي إن إختلافها يؤدي الى إختلاف المراكز النشطة.

مثال/ أنزيم Pepsin يحتوي على مركز نشط واحد أما أنزيم Urease فيحتوي على أربع مراكز نشطة. وكذلك أنزيم Catalase .

$$Urea + H_2O \xrightarrow{Urease} NH_3 + CO_2$$

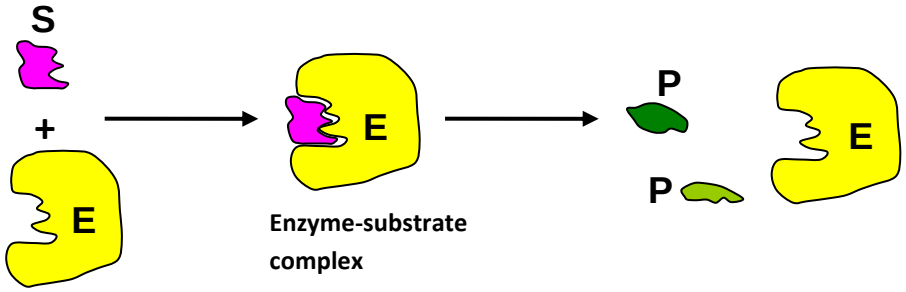
$H_2N-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-NH_2$ (يوريا)

ميكانيكية عمل الأنزيمات:

يرتبط الأنزيم بالمادة الأساس من خلال الموقع الفعال وتكوين معقد وسطي من الأنزيم والمادة الأساس Enzyme- Substrate Complex[E-S] وهناك نظريات عدة لتفسير طبيعة المعقد (ES)أهمها:

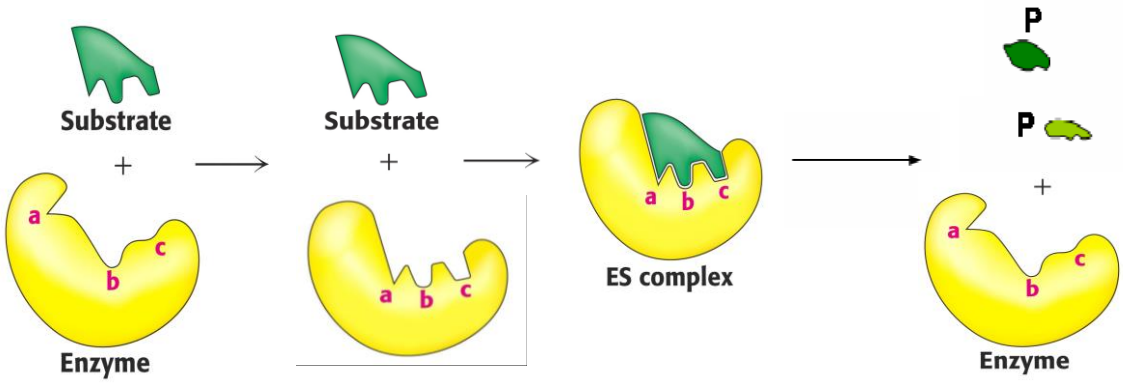
1. نظرية القفل والمفتاح Lock & Key theory

تفسر هذه النظرية كيفية إرتباط الأنزيم بالمادة الأساس بشكل يشبه القفل والمفتاح. أي إن الموقع الفعال الثلاثي الأبعاد يكون في شكله مكملاً لشكل جزيئة المادة الأساس فيتكون المعقد الوسطي [ES].



2. نظرية التوافق المستحث Induced- Fit theory

تفترض هذه النظرية إن الموقع الفعال للأنزيم يكون بشكل معين في جزئية الأنزيم وعند وجود جزئيات المادة الأساس قريبة من الموقع الفعال يتغير شكل الموقع الفعال ليتلائم للإرتباط مع جزئية المادة الأساس وتكوين المعقد [ES].



مستويات بناء الأنزيمات : تتكون الأنزيمات من الأحماض الأمينية من نوع α –amino acid والتي ترتبط مع بعضها بروابط أو أواصر ببتيدية مكونة سلاسل طويلة. وتختلف الأنزيمات في تركيبها الكيميائي حسب:

1. عدد ونوع الأحماض الأمينية في كل سلسلة ببتيدية.
2. تتابع الأحماض الأمينية في كل سلسلة ببتيدية.
3. التوزيع الفراغي للذرات والمجموعات بالنسبة لبعضها من السلسة الببتيدية وهذا يتوقف على درجة الألتفاف و الألتواء على طول السلسلة والذي يؤدي الى الشكل الحلزوني.

<u>تكوين الجسم الثلاثي الأبعاد لجزيئة الأنزيم</u>

الأواصر التي تثبت جزئ الأنزيم هي:

1) الأواصر الأيونية.
2) الأواصر الهيدروجينية.
3) الأواصر ثنائية الكبريت.
4) قوى فاندر فالز.

ولهذا فإن مستويات بناء الأنزيمات هي:

1) البناء الأولي Primary structure

يحدد نوع الأحماض الأمينية وتتابع ترتيبها في السلسلة الببتيدية.

2) البناء الثانوي Secondary structure

يحدد إلتفاف السلاسل الببتيدية مع بعضها على شكل حلزون α-helix أو صفائح مطوية β- Plated sheet ويثبت هذا البناء بالأواصر الهيدروجينية.

3) البناء الثالثي Tertiary structure

يمثله شكل جسم ثلاثي الأبعاد للأنزيم ويحدده إلتفاف السلاسل الببتيدية على بعضها ويثبت هذا البناء بالروابط الثانوية وكذلك الأصرة ثنائية الكبريت.

4) البناء الرابعي Quaternary structure

وهو البناء الناتج عن تجمع بعض جزئيات الأنزيم مع بعض. وهذا البناء يتوقف على نوع الشحنات الكهربائية ودرجة حموضة المحلول، تعمل الروابط ثنائية الكبريت على تثبيت هذا البناء.

تخصص عمل الأنزيم:

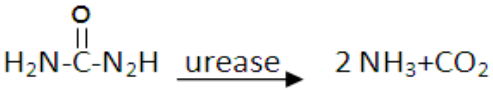
الأنزيمات لها تخصص دقيق في التفاعلات وهي أهم صفة من صفات الأنزيم ويعود ذلك الى طبيعة جزئ الأنزيم البروتيني ونقصد به الموقع النشط أو الفعال وكذلك التركيب الترتيبي لجزئ المادة الأساس وعليه فأن الأنزيم يختار عدد معين ومحدود من المواد التي يعمل عليها إذ يحفز تفاعل كيمياوي محدد.

أنواع التخصص:

1. **التخصص المطلق Absolute specificity**:

هو الأنزيم الذي يعمل على مادة أساس معينة ولايعمل على أية مادة أساس أخرى حتى لو كانت تشابه المادة الأساس في التركيب.

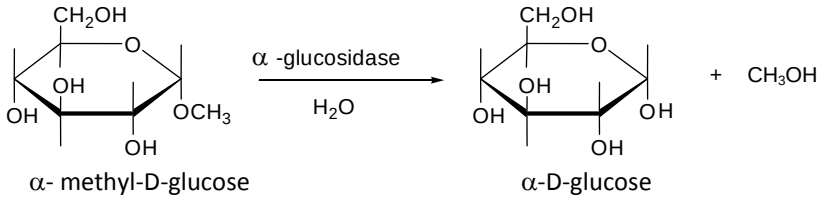
مثال/ سايتوكروم أوكسديزCytochrome oxidase الذي يبدي تخصصه المطلق تجاه المادة الأساس Cytochromec وكذلك أنزيم Urease الذي يحلل اليوريا الى أمونيا وCO_2.



2. التخصص النسبي لمجموعة Relative Group Specificity

يكون تخصص الأنزيم على مجموعة معينة واحدة من المادة الأساس ونوعاً محدداً من الأواصر .

مثال/ أنزيم α-glucosidase الذي يعمل على مجموعة($-OCH_3$) في جزيئة الفا-ميثوكسي كلوكوسايد.



α- methyl-D-glucose α-D-glucose

3. تخصص الرابطة أو الأصرة Linkage Specificity

هذا النوع من الأنزيمات يتخصص على نوع معين من الأواصر بغض النظر عن المجاميع المجاورة لها.

مثال/ أنزيم Peptidase الذي يعمل على Polypeptide وأنزيم اللايبيزLipase الذي يعمل على الدهون.

Polypeptide $\xrightarrow{\text{Peptidase}}$ Amino acid + peptide

Triglyceride $\xrightarrow{\text{Lipase}}$ Fatty acid + Glycerol

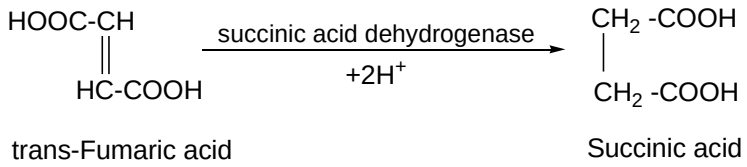
4. التخصص على الأشباه الجزيئية(التخصص الفراغي) Sterospecificity:

بعض الأنزيمات لها تخصص على الأشباه الجزيئية مثل L و D.

مثال/

L-Amino acid $\xrightarrow{\text{L- Amino oxidase}}$ keto acid $+NH_3 + H_2O$

أو بصيغة Cis أو trans مثل أنزيم Succinic dehydrogenase الذي يعمل على trans حامض الفيوماريك ولا يعمل على نظيره الـcis الذي يسمى حامض الماليك



trans-Fumaric acid Succinic acid

<u>سرعة التفاعل الأنزيمي:</u>

هي كمية المادة المتفاعلة (S) أو الناتجة (P) في وحدة الزمن في ظروف معينة ومثبتة من حامضية معينة (pH) ودرجة حرارة (T) وعوامل مساعدة (تراكيزها) ان وجدت.

وبصورة أدق فإن سرعة التفاعل الأنزيمي هي كمية المادة الأساس (S) المتناقصة أو كمية المادة الناتجة (P) المتزايدة والمقدرة بـgm، mg، µg أو mole أو µmole في وحدة الزمن بالثواني أو الدقائق أو الساعات.

بما إن التفاعلات الأنزيمية تعتمد على ظروف التفاعل من pH ودرجة حرارة وتركيز الأيونات المنشطة(Activators) إن وجدت، إذ توجد عدة وحدات مستخدمة لذلك لجئ الأتحاد العالمي للكيمياوين الحياتيين (IUB) الى وضع وحدة عالمية قياسية للأنزيمات هي:

I.U(International Unit):

وهي كمية الأنزيم التي تحفز أو تساعد على تحول واحد مايكرومول (µmole) من المادة الأساس الى ناتج في الدقيقة الواحدة في درجة 25°م وظروف قياسية مثالية لقياس الفعالية الأنزيمية.

الفعالية النوعية Specific Activity:

وهي عدد وحدات الأنزيم (I.U) لكل ملغم من البروتين . يستفاد من الفعالية النوعية في قياس نقاوة الأنزيم إذ تزداد الفعالية النوعية بزيادة نقاوة الأنزيم.

تسمية وتصنيف الأنزيمات عالمياً:

تسمية الأنزيمات كانت تعتمد على المادة الأساس مضافاً اليها المقطع (ase-) وكانت تسمية كثير من الأنزيمات تتقاطع مع تسمية أنزيمات أخرى أو لاتفسر عمل الأنزيم بشكل دقيق. أحياناً أخرى يسمى الأنزيم نفسه بعدة أسماء من قبل الباحثين لذلك في عام 1972 أعتمد الإتحاد العالمي للكيميائيين الحياتيين- لجنة الأنزيمات Enzyme Commission of International Union of Biochemistry ترقيم وتصنيف وتسمية الأنزيمات بطريقة علمية تفسر نوع الأنزيم والأصرة أو المجموعة التي يعمل عليها وإن كان بحاجة الى عوامل مساعدة أم لا وغيرها من الصفات لذلك أعطي لكل أنزيم رقم أنزيمي خاص به وهذا الرقم الأنزيمي مؤلف من أربعة أرقام وهذه الأرقام لاتتكرر لأنزيمات أخرى و يعرف الأنزيم من رقمه .

يدل الرقم الأول على المجاميع الستة الرئيسة للأنزيمات (Class).
يدل الرقم الثاني على المجاميع الثانوية (Subunit).
يدل الرقم الثالث على المجاميع تحت الثانوية (Sub- Subunit).
أما الرقم الرابع فيدل على تسلسل الأنزيمات نسبة الى تركيب المادة الأساس وهذا الرقم يأتي بالنسبة الى أسبقية الأنزيمات المكتشفة ويكون إعتباطي.
إن Subunit تشير الى المجموعة التي يطرأ عليها التفاعل مثل:
$-CHNH_2$ أو CH_3OH أو $CH_2=OH$
والـ Sub- Subunit تشير الى نوع مساعد الأنزيم .
تقسم الأنزيمات الى ستة مجاميع رئيسة Classes وهذا هو الرقم الأول من الرقم الأنزيمي وهي:

1. أنزيمات الأكسدة والأختزال Oxidoreductase
2. الأنزيمات الناقلة Transferases
3. أنزيمات التحلل المائي (التميؤ) Hydrolases
4. أنزيمات الفصل والأضافة Lyases
5. أنزيمات الأشباه الجزيئية Isomerases
6. أنزيمات التركيب الحياتي (التخليق) Ligases(Synthetases)

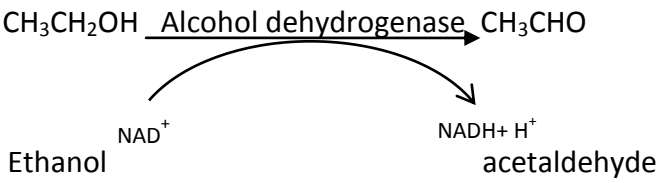
1.<u>أنزيمات الأكسدة والأختزال *Oxidoreductases*</u>

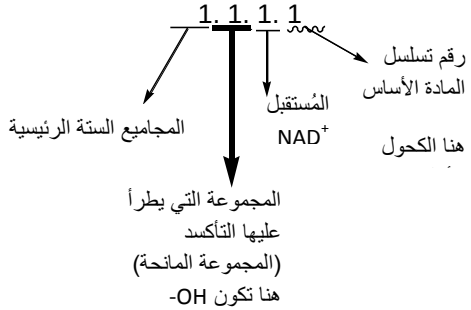
إن الطاقة التي تحتاجها الأجسام الحية تحصل عليها من أكسدة الأغذية بعد هضمها وأن هذه الأكسدة تجري بثلاث طرق هي:

أ- إضافة الأوكسجين .
ب- فصل الهيدروجين من المواد الأساس.
ج- فصل الألكترون.

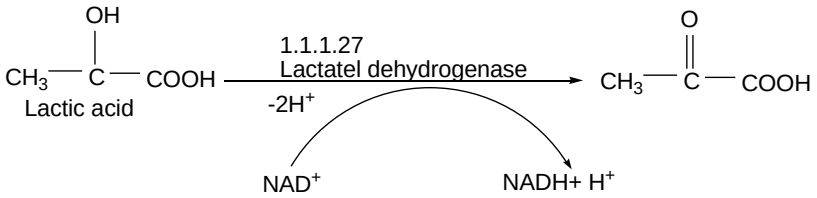
وجميع هذه الطرق تشمل على فقدان الألكترونات

مثال/ Alcohol dehydrogenase (1.1.1.1)





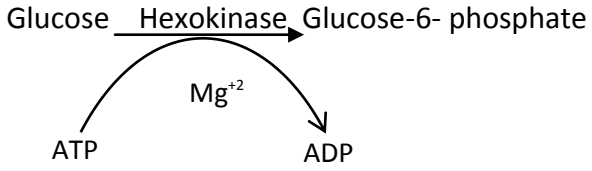
مثال/ Lactate dehydrogenase(1.1.1.27)



2. <u>*الأنزيمات الناقلة Transferase*:</u>

وهي تشمل جميع الأنزيمات التي تعمل على نقل مجموعة كيمياوية من مادة أساس لأخرى. مثل نقل مجاميع الأمين ، المثيل ، الألكيل، الأسيل أو نقل مجاميع تحتوي على فسفور أو كبريت.

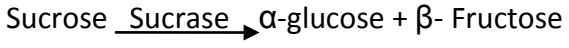
مثال/ أنزيم Kinase يقوم بنقل مجموعة الفوسفات بين المركبات ,أنزيم Hexokinase (2.7.2)



3. أنزيمات التحلل المائي (التميؤ) Hydrolases:

وتشمل جميع الأنزيمات التي تعمل في تفاعلات التحلل المائي وتحفز هذه الأنزيمات إنشطار الروابط (C-C,C-N,C-O) وذلك بإضافة عناصر الماء تقسم هذه المجموعة وفقاً لنوع الرابطة التي تتحلل مائياً مثل الروابط الأسترية للدهون (الأنزيمات) التي يحللها Lipase والروابط الكلايكوسيدية للسكريات الأنزيمات التي تحللها α-Glucosidase والروابط الببتيدية للبروتينات Peptidase.

مثال/ أنزيم Sucrase الذي يعمل على السكروز (3.2.1.26)

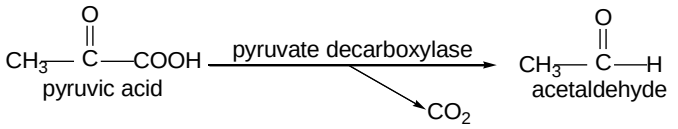


أما الأنزيمات التي تحلل النيوكليوتيدات مائيا تسمى nucleases.

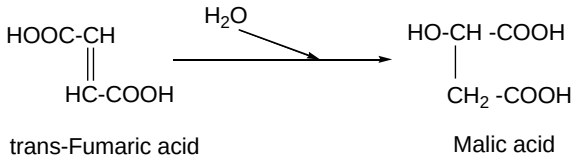
4. أنزيمات الحذف والأضافة (بدون تحلل مائي) Lyases:

تشمل جميع الأنزيمات التي تعمل في تفاعلات تفكيك أجزاء من مركب مثل فصل مجموعة أمين على شكل أمونيا أو نزع عناصر الماء مع مجموعة الأمين وتحفز هذه الأنزيمات إنفصال الروابط (C-C, C-O, C-N) فضلا عن روابط أخرى إذ تقسم الى مجاميع تبعاً للأواصر التي تعمل عليها .

مثال/ Pyruvate decarboxylase (4.1.1.1)



تفاعل حذف



تفاعل إضافة

5. أنزيمات الأشباه الجزيئية Isomerases:

تشمل الأنزيمات التي تعمل على تغير أحد متناظرات مركب ما الى متناظر آخر له. كأنزيمات cis- trans isomerases و أنزيمات epimerases.

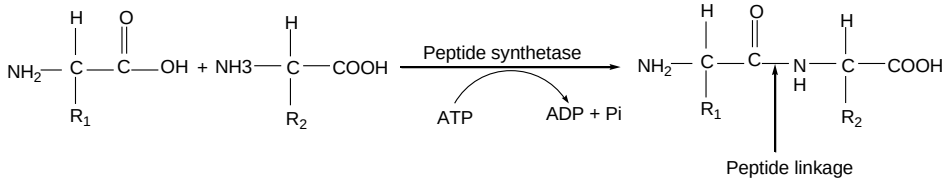
مثال/ أنزيم الريتينال أيزوميريز retinal isomerase الذي يتعلق بعملية الأبصار، Glucose racemase (5.1.3) ، أنزيم Mutase(5.4.3)

D- Glucose $\xrightarrow{\text{Glucose rasemase}}$ L- Glucose

Glucose-6- phosphate $\xrightarrow{\text{Mutase}}$ Glucose-1-phosphate

6. أنزيمات التركيب الحياتي (التخليق- تكوين الأصرة) Ligases (Synthetases)

هي الأنزيمات التي تعمل على ربط (تكوين الأصرة) بين جزيئتين معاً أو ربط نهايتي جزئ واحد لتكوين شكل حلقي. وتقترن التفاعلات المحفزة بهذه الأنزيمات بكسر أصرة بايروفوسفات Pyrophosphate bond للـATP. لأعطاءالطاقة اللازمة لعملية البناء (تكوين الأصرة).



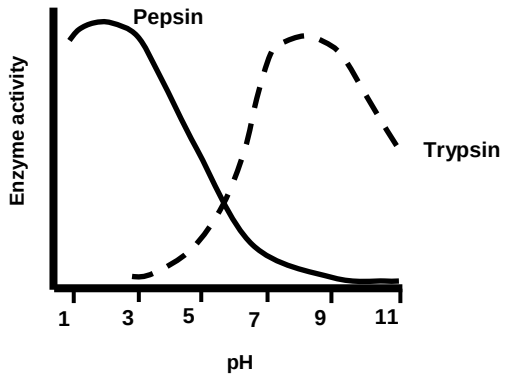
العوامل التي تؤثر على فعالية الأنزيم Factores effecting enzyme activity

1.تأثير الأس الهيدروجيني على فعالية الأنزيم Effect of pH on enzyme activity

إن لكل أنزيم رقم هيدروجيني pH عنده يبدي الأنزيم أقصى فعاليته ويسمى الرقم الهيدروجيني الأمثل pH optimum . يترواح الرقم الهيدروجيني الأمثل لأغلب الأنزيمات مابين (5-9). وغالباً ماتكون الـpH المثلى قيمتها مقاربة من لتلك الـpH للنسيج الذي يحوي ذلك الأنزيم. مثلاً أنزيم الببسين Pepsin الذي يفرز من داخل المعدة له درجة pH مثلى قيمتها 2(وقيمة الـpH المعدية= 2,3) يؤثر الرقم الهيدروجيني في مناطق معينة من الأنزيم منها:

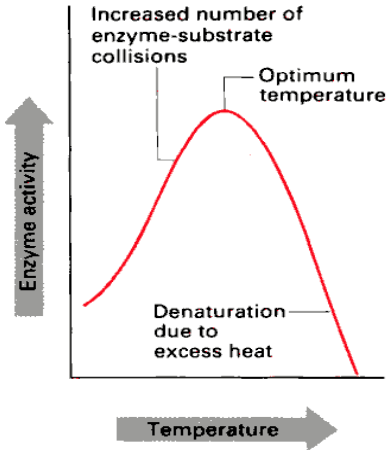
أ- الصفات الأيونية للمجاميع الأمينية والكربوكسيلية للأنزيم.
ب- الصفات الأيونية للمجاميع الجانبية لوحدات الأحماض الأمينية.
ج- الصفات الأيونية لوحدات الأحماض الأمينية الكائنة في الموقع المسؤول عن التحفيز.

وقد لوحظ إستعمال pH عال أو واطئ جداً يؤدي الى تشويه طبيعة الأنزيم Denaturation, مما يؤدي إلى فقدان فعاليته.
قد تكون هناك شحنات كهربائية لمجاميع R المتأينة بالقرب من الموقع الفعال للأنزيم عند قيم pH عالية أو واطئة مما يؤدي الى وجود أواصر أيونية أو تجاذب أو تنافر كهربائي من شأنه أن يعمل على زيادة أو تقليل أو منع إقتران المادة الأساس بالأنزيم.



2. تأثير درجة الحرارة على فعالية الأنزيم Effect of temperature on enzyme activity

إن إرتفاع درجة الحرارة يزيد من فعالية الأنزيم بشرط أن لايصل هذا الأرتفاع للحد الذي يؤدي الى مسخ الأنزيم. إذ إن إرتفاع درجة الحرارة مبدئياً يعمل على زيادة الطاقة الحركية لجزئ الأنزيم، بالتالي الى إزدياد الأحتكاك بين الأنزيم والمادة الأساس مما يسبب زيادة سرعة التفاعل. إن مدى الفعالية لمعظم الأنزيمات يقع (10-50)°م وعندما تزيد درجة الحرارة أكثر فإن الأنزيم يبدأبفقدان خواصه الطبيعية إذ تتفكك الأواصر الهيدروجينية والقوى الأخرى المسؤولة عن ثباتية البناء المحدد لذلك البروتين وبالتالي يترسب فاقداً فعاليته. وإن الدرجة الحرارية التي يكون عندها التفاعل الأنزيمي في سرعته القصوى تطلق عليها درجة الحرارة المثلى لذلك الأنزيم.



3. تأثير تركيز المادة الأساس على فعالية الأنزيم

Effect of substrate concentration on enzyme activity

عند إبقاء تركيز الأنزيم ثابتاً، وعند التركيز الواطئ من المادة الأساس، فإن سرعة التفاعل الأنزيمي (السرعة الأولية initial velocity) تزداد بزيادة تركيز المادة الأساس. لكنه عند الأستمرار في زيادة تركيز المادة الأساس فإن الزيادة في معدل السرعة تتباطئ الى أن تصبح السرعة ثابتة، بالرغم من زيادة تركيز المادة الأساس أكثر ويطلق على هذه السرعة الثابتة عند التركيز العالي للمادة الأساس، بالسرعة القصوى ويرمز لها بالرمز V_{max} . maximum velocity.

لقد قام العالمان (Michaels- Menten) عام 1918 بتفسير العلاقة بين سرعة التفاعل الأنزيمي وتركيز المادة الأساس، فعند إستخدام تراكيز واطئة جداً من المادة الأساس في بداية التفاعل ، تكون المواقع الفعالة لجزئيات الأنزيم غير مشبعة بجزئيات المادة الأساس، وعليه فإن سرعة التفاعل (السرعة الأولية) تعتمد على تركيز المادة الأساس ، ويعبر عنها بحركية إحادي الرتبة First order kinetic وعند زيادة تركيز المادة الأساس الى درجة كبيرة، بحيث تصبح المواقع الفعالة لجزئيات الأنزيم مشبعة دائماً بجزئيات المادة الأساس وتكون

سرعة التفاعل في هذه الحالة غير معتمدة على تركيز المادة الأساس، ويعبر عنها بحركية صفر الرتبة zero order kinetic .

وإن الرسم البياني بين تركيز المادة الأساس وسرعة التفاعل يكون بشكل منحني ذي قطع مخروطي (hyperbolic)،هذه الخاصية تتميز بها الأنزيمات فقط دون غيرها من المحفزات.

والمعادلة الآتية توضح العلاقة بين سرعة التفاعل الأنزيمي وتركيز المادة الأساس والتي تحقق شكل منحني ذي قطع مخروطي hyperbolic ويطلق عليها بمعادلة ميكاليس-منتن Mechaelis- Menten eqution:

$$V= \frac{Vmax\ [S]}{Km+\ [S]}$$

إذ إن:

V= سرعة التفاعل (السرعة الأولية)

[S] = تركيز المادة الأساس

V_{max} = السرعة الأولية القصوى

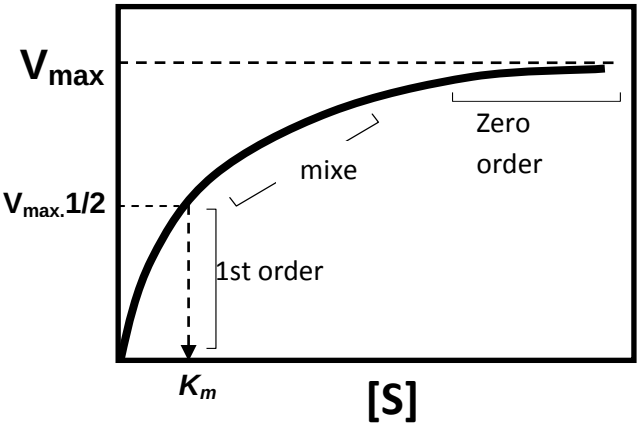
Km= ثابت ميكاليس

Km= هو عبارة عن تركيز المادة الأساس عندما تكون سرعة التفاعل تساوي نصف السرعة القصوى. ويمكن بيان ذلك كما يأتي:

عندما يكون [S] =Km فإن:

$$V= \frac{V_{max}\ Km}{Km+\ Km}$$

$$= \frac{V_{max}\ Km}{2Km} = \frac{V_{max}}{2}$$

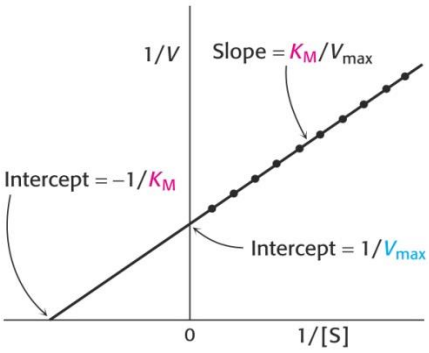


رسم لينويفر-بيرك البياني The Linoweaver-Burk polt

عند أخذ القيم العكسية لطرفي معادلة ميكاليس-منتن وإعادة ترتيبها نحصل على معادلة لينويفر-بيرك **Linoweaver-Burk eqution**

$1/V= Km/V_{max}(1/[S]+1/[V_{max}]$

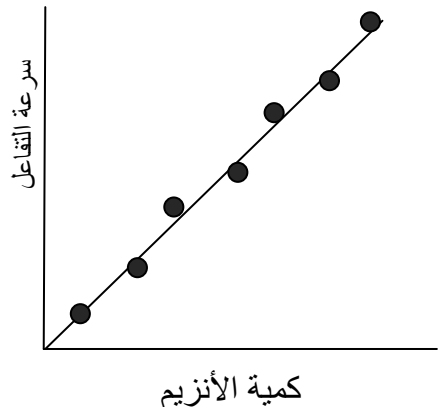
وتمثل هذه المعادلة خطاً يحصل عليه بوساطة رسم 1/V مقابل 1/[S] ويمكن إيجاد كلا من V_{max} وKm بدقة من الرسم دون الحاجة الى إيجادها بالطريقة المختبرية ويستفاد من الرسم عند دراسة المثبطات و أنواعها.



إن القيمة العالية لـKm تشير الى إن الأنزيم له ميلاً (ألفة affinity) قليلة للمادة الأساس ، في حين القيم الواطئة للـKm ، تشير الى إن للأنزيم ميلاً كبيراً للمادة الأساس، تعتمد قيمة Km على نوعية المادة الأساس والدالة الحامضية pH لمحلول التفاعل ودرجة الحرارة تتراوح قيم Km لمعظم الأنزيمات بين (10^{-1}-10^{-6}) مولار.

4. تأثير كمية الأنزيم على الفعالية الأنزيمية Effect of enzyme concentration on enzymatic activity

إن سرعة التفاعل تتناسب طردياً مع تركيز الأنزيم ضمن مدى واسع وفي هذه الحالة يستعمل تركيز ثابت من المادة الأساس وبمقدار فائض عن حاجة الأنزيم. يمكن استخدام العلاقة هذه لقياس كمية الأنزيم في مستخلص لنسيج معين أو في سائل بايولوجي معين. فعند ظروف ملائمة تشتمل على تركيز المادة الأساس(Kmx100) ودرجة الحرارة و pH مثلى فإن سرعة الفعالية تتناسب مع كمية الأنزيم الموجود.



تثبيط الأنزيم Enzyme Inhibition:

المثبطات هي مركبات كيمياوية تخفض من معدل سرعة التفاعل المحفز بالأنزيم. وتؤدي المثبطات فعلها على عامل أو أكثر من العوامل الأتية:

أ- الموقع الفعالactive site من الأنزيم.
ب- الجزء البروتيني من الأنزيم والمسمى Apoenzyme.
ج- مرافق الأنزيم Coenzyme.
د- المجموعة الرابطة في الأنزيمProsthetic group .

ويمكن تصنيف مثبطات الأنزيم الى ثلاثة أصناف:

1. المثبط التنافسي Competitive inhibitor

يحدث هذا النوع من التثبيط عندما يتنافس المثبط مع المادة الأساس على الأتحاد مع الموقع الفعال للأنزيم. ويكون هذا النوع من التثبيط عكسيا، يعتمد على تركيز المثبط والمادة الأساس. وعادة تتشابه التراكيب الكيمياوية للمثبط التنافسي والمادة الأساس. يمكن تقليل نسبة التثبيط للأنزيم بزيادة تركيز المادة الأساس ، وبأستعمال الرسم البياني لـ لاينويفر-بيرك بوجود وعدم وجود المثبط التنافسي يمكن إستخلاص المعلومات الأتية:

أ- تبقى السرعة القصوى V_{max} ثابتة.
ب- تزداد قيمة Km.
ج-تنخفض ألفة affinity الأنزيم للمادة الأساس.
د- التغلب على التثبيط بزيادة تركيز المادة الأساس.

مثال/ المثبط التنافسي سلفانيل أمايد sulfanil amide تركيبه مشابه للمركب حامض بارا- أمينو بنزويك P-amino benzoic (عامل نمو البكتريا) وهو المادة الألأساس للأنزيمات المشاركة في تخليق المرافق الأنزيمي الفعال تترا هايدروفوليت tetrahydrofolate في البكتريا وبهذا يستخدم كعلاج للحد من نمو البكتريا.

2. المثبط غير التنافسيNon-Competitive inhibitor

لا يوجد أي نوع من التنافس بين المثبط والمادة الأساس على الأتحاد مع الموقع الفعال للأنزيم ، إذ إن المثبط يتحد مع موقع آخر في الأنزيم غير الموقع الفعال وقد يكون المثبط مشابهاً أو غير مشابه في التركيب الكيمياوي للمادة الأساس . يقسم المثبط غير التنافسي الى نوعين:

أ- المثبط غير التنافسي العكسيReversible non-competitive inhibition

بما أن كلاً من المثبط والمادة الأساس يتحد مع مواقع مختلفة في الأنزيم فهناك إحتمال تكوين معقدين بوجود المثبط وهما EI و EIS .

ب- المثبط غير التنافسي غير العكسيIrreversible non-competitive inhibitor

يرتبط المثبط مع وحدة الحامض الأميني للأنزيم بوساطة آصرة تساهمية Covalent bond بحيث لايمكن فصل المثبط عن الأنزيم بوساطة التخفيف أو الديلزة . يقال عن الأنزيم في هذا النوع من التثبيط أنه قد تسمم بالمثبط ، مثال على ذلك السيانيد Cyanide، أيودو سيانيد Iodo acetamide أيونات المعادن الثقيلة (Ag^{+},Hg^{+2}) التي تتحد بقوة مع مجاميع الثايول لبعض الأنزيمات). إن المثبطات غير العكسية تتحد بقوة مع الأنزيم وهذا الأرتباط يؤول الى تحريف الأنزيم وخفض فعاليته ثم توقفها كلياً. إن لكل من التثبيط غير التنافسي العكسي وغير العكسي نفس الحركية .

ومن رسم لاينويفر-بيرك نستنتج المعلومات الأتية:

أ- تنخفض السرعة القصوى V_{max}.

ب- تبقى Km ثابتة، ذلك لأن زيادة [S] ليس لها تأثير في تقليل التثبيط.

ج-تبقى الألفة affinity الأنزيم للمادة الأساس ثابتة.

د- لا يمكن التغلب على التثبيط بزيادة تركيز المادة الأساس.

3. <u>التثبيط اللاتنافسي Uncompetitive Inhibition</u>

يتحد المثبط اللاتنافسي في هذه الحالة مع المعقد ES لتكوين EIS .

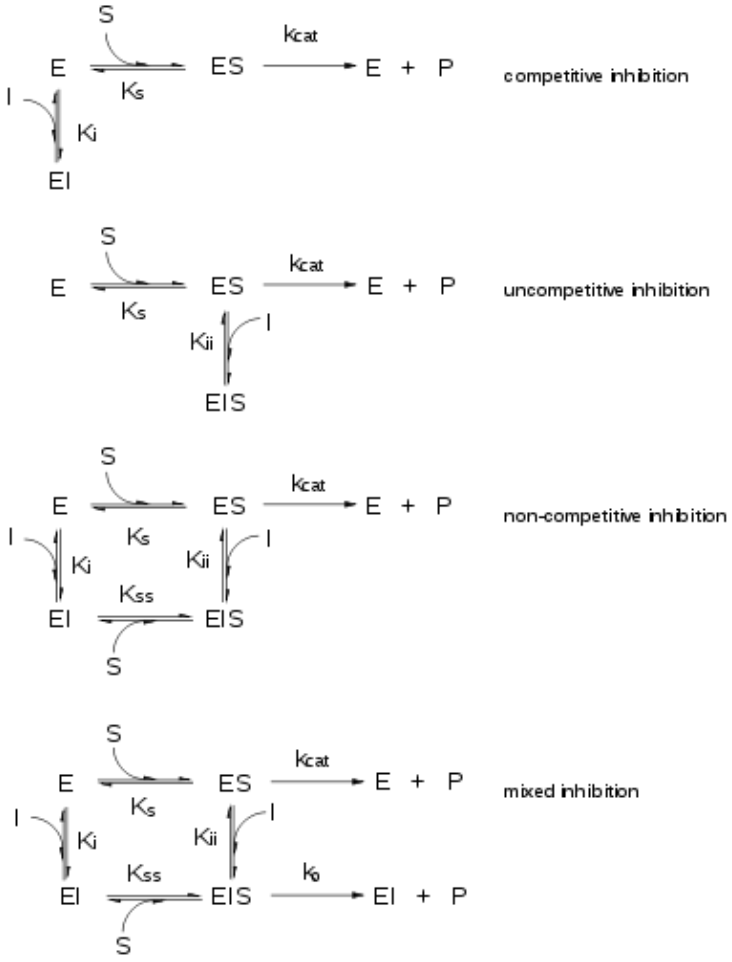
يعد المثبط اللاتنافسي جزءاً من المثبط غيرالتنافسي العكسي إذ كلاهما يحتويان على المعقدEIS . أما الرسم البياني لـ لاينويفر-بيرك بوجود المثبط اللاتنافسي أو عدم وجوده يوضح المعلومات الأتية:

أ- انخفاض قيمة السرعة القصوى V_{max}.

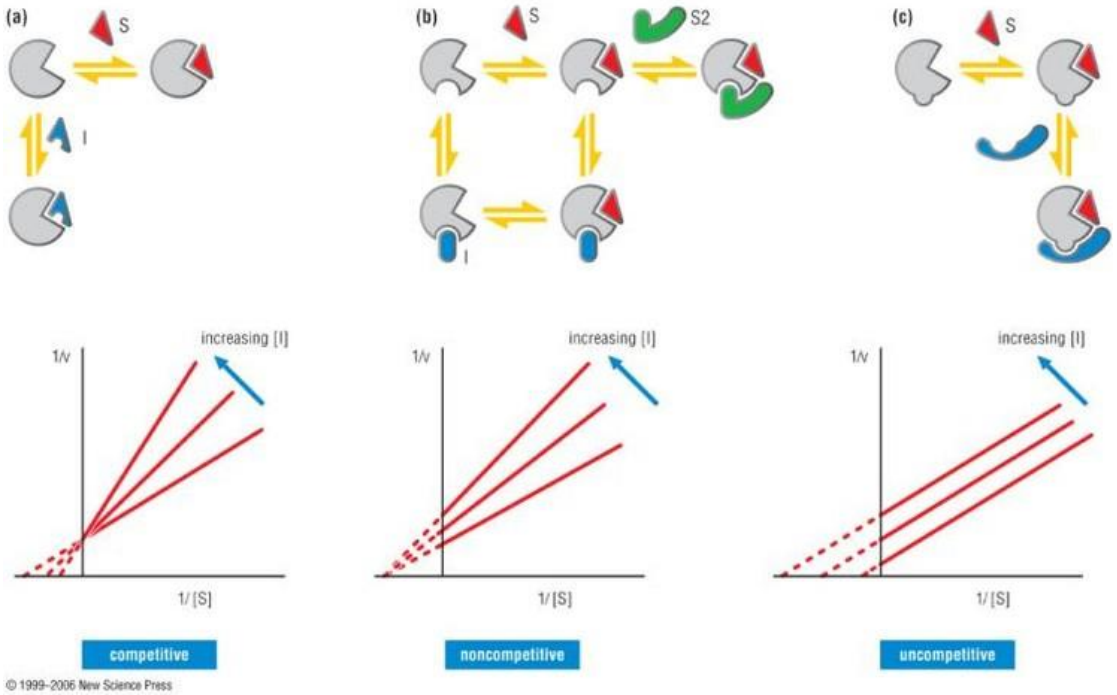
ب- انخفاض قيمة Km.

ج-لا يمكن التغلب على التثبيط بزيادة تركيز المادة الأساس

ويمكن توضيح ميكانيكيات التثبيط بالأشكال الأتية:



From **Protein Structure and Function 2005-2006 Online Update**
by Gregory A Petsko and Dagmar Ringe



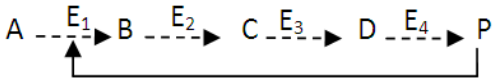
© 1999–2006 New Science Press

الأنزيمات المنظمة أوالألوستيرية Allosteric Regulatory enzymes:

توجد أنزيمات معينة لاتخضع لحركية ميكاليس- منتن فالرسم البياني لتركيز المادة الأساس مقابل معدل السرعة للأنزيم لايكون بشكل منحني ذي قطع مخروطي Hyperbolic ففي هذه الحالة يكون الرسم أما منحني شبيه بالحرف Sigmoidal S أو منحني مسطح Flatt end ويطلق على هذين النوعين من الأنزيمات بالمنظمة أو الألوستيرية.

تعني كلمة ألوستيرية الموقع (الطرف) الأخر another site وللأنزيمات الألوستيرية طرف أو موقع آخر منظم يختلف عن الطرف المحفز ترتبط فيه المواد المؤثرة أو المعدلة modifiers effector او modulater وتتكون الأصرة التساهمية بين المادة المؤثرة والأنزيم. تتألف الأنزيمات الألوستيرية من وحدات عدة لسلاسل ببتيدية وتعمل هذه الأنزيمات على تنظيم المسارات الأيضية حسب حاجة الخلية ولهذا تسمى الأنزيمات الألوستيرية المنظمة.

إن المؤثر أو المحفز الموجب Positive or stimulating effector هو مركب يعزز إقتران المادة الأساس بالأنزيم .
في حين المؤثر السالب Negative effector مركب يقلل من إقتران المادة الأساس بالأنزيم. إذ أن أقتران المؤثرات بالطرف المنظم يغير من التركيب الرباعي للأنزيم الألوستيري وبالتالي يغير خواص الموقع الفعال للاقتران بالموقع الفعال.
تعمل نظم الأنزيمات المتعددةmultienzyme system بصورة متسلسلة إذ يكون فيها ناتج التفاعل للأنزيم الأول مادة أساس للأنزيم الذي يليه وهكذا. غالبا ماتقع الأنزيمات الألوستيرية في الخطوة الأولى أو في بداية المسار الطويل للعملية الأيضية، إذ يعمل الناتج النهائي للمسار مؤثراً سالباً للأنزيم المنظم وهذا مايدعى بتثبيط الناتج النهائي end product inhibition أو تثبيط التغذية المرتدة feedback inhibition.



تمتاز الأنزيمات الألوستيرية بمايأتي:

1. وزنها الجزيئي عال.
2. إحتوائها على مواقع Active site وهي أكثر نشاطاً من الأنزيم الطبيعي.
3. لها أهمية كبيرة في عملية الأيض الغذائي.
4. الرسم البياني لايخضع لمعادلة ميكاليس-منتن.

الأنزيمات المتماثلة الأصل Isoenzymes:

هي أنزيمات تتشابه من حيث عملها على نفس المادة الأساس، ولكنها تختلف بالنسبة للسرعة القصوى V_{max} وثابت ميكاليس Km وتختلف أيضاً من حيث قيم Rf المختلفة عند فصلها بوساطة الهجرة الكهربائية Electrophoresis . وتحتوي على سلسلتين أو أكثر من سلاسل متعدد الببتيد وتختلف هذه السلاسل في مكوناتها من الأحماض الأمينية وتسلسلها. توجد هذه الأنزيمات بشكلين أو أكثر إذ أن ذلك يتوقف على عدد سلاسل متعدد الببتيد في الأنزيم.

من الأمثلة على ذلك ، أنزيم اللاكتيت ديهيدروجينيز Lactate dehydrogenase موجود في الأنسجة الحيوانية بخمسة أشكال. وقد تكون هذه الأنزيمات الخمس المتماثلة الأصل من إتحاد نوعين مختلفين من سلاسل متعدد الببتيد.

سلاسل M تعود للعضلات Muscles.

سلاسل H تعود للقلب Heart.

إذ إن الأنزيم السائد في العضلات يحتوي على أربعة سلاسل M متطابقة (M4). والأنزيم السائد في القلب يحتوي على أربعة سلاسل H متطابقة(H4). وأنزيمات اللاكتيت ديهيدروجينيز في الأنسجة الأخرىتكون هجينة وتتكون من خليط من سلاسل M وسلاسل H كالأتي: M3H, M2H2, MH3

يمكن توضيح الشرح أعلاه كما يأتي:

أشكال أنزيم LD الخمسة ومكان وجودها.

1. LD1 (H4) أربعة سلاسل ببتيدية توجد في القلب Heart.
2. LD5 (M4) أربعة سلاسل ببتيدية توجد في العضلات Muscles.
3. LD4 (M3H)
4. LD3 (M2H2) سلاسل هجينة توجد في القلب والعضلات
5. LD2 (MH3)

يستفاد من دراسة حركية هذه الأنزيمات في تشخيص بعض الأمراض مثل القلب والكبد من خلال إختلاف توزيعها فتعطي أشكالاً مختلفة عند تحللها بالهجرة الكهربائية ودراسة فعاليتها في مصل الدم فإنها تعطينا مؤشرات قيمة لغرض تشخيص هذه الأمراض.

الهجرة الكهربائية: هجرة الجزيئات المشحونة تحت تأثير تيار كهربائي . وهي طريقة لفصل مزيج من الجزئيات المشحونة إستناداً الى شحنات الجزيئة وشكل وحجم الجزيئة.