

(5)
الإنزيمات
Enzymes

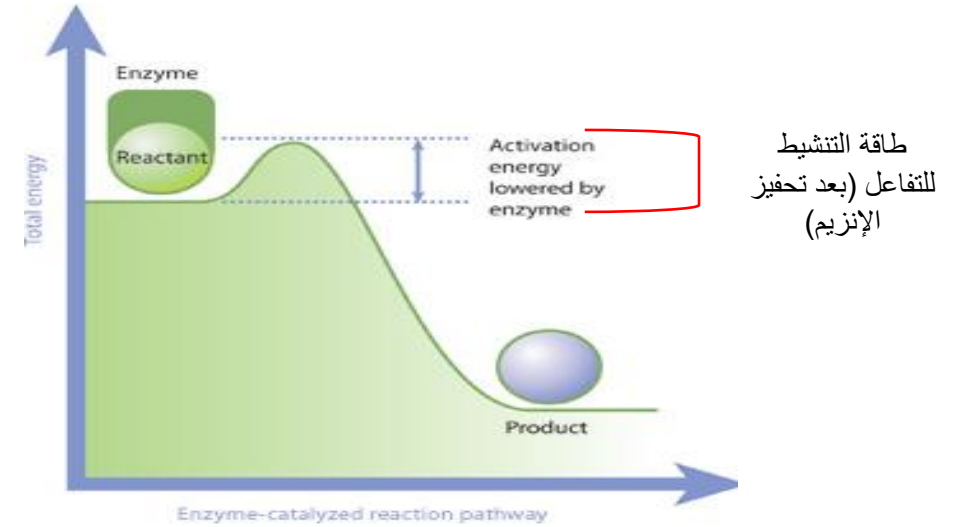
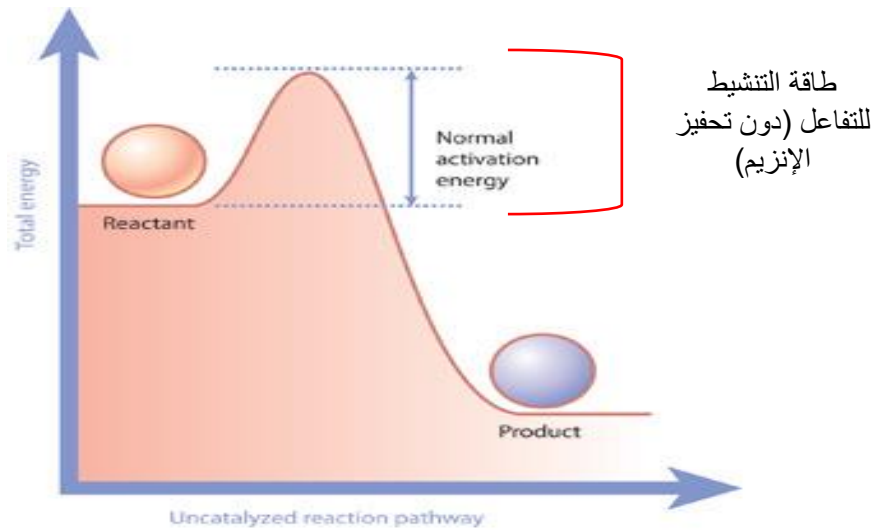
ما هي الإنزيمات (Enzymes) ؟

- **الوظيفة الأساسية** التي تقوم بها الخلايا الحية في الكائن الحي هي إنشاء مركبات معقدة من مواد بسيطة والعكس ، أي تفكيك تلك المركبات المعقدة إلى مواد أبسط.
- إن هذه القدرة التي تتمتع بها الخلايا على تكوين مواد عضوية معقدة من مواد أخرى أبسط تركيباً (أو العكس) تحتاج لعدد كبير من التفاعلات الكيميائية المختلفة، وتخضع هذه التفاعلات لآليات تتحكم في سرعتها واتجاهها عن طريق جزيئات متخصصة تسمى **الإنزيمات**.

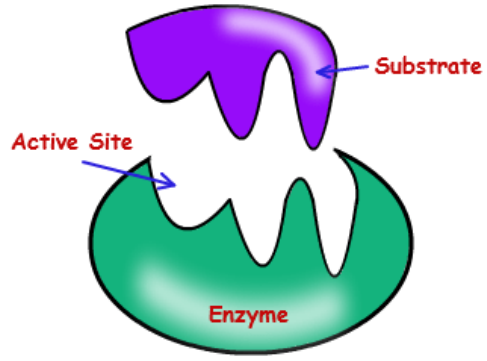


ما هي الإنزيمات (Enzymes) ؟

- الإنزيمات نوع من أنواع البروتينات تعمل على تسريع التفاعلات الكيميائية داخل الخلية وتنظيمها بدقة بحسب حاجة الخلايا.

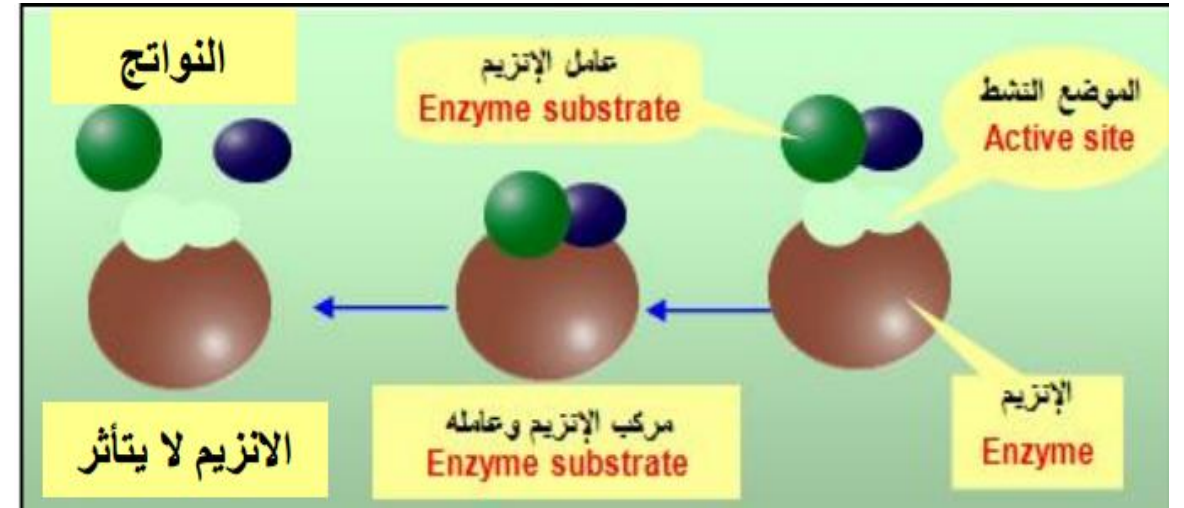
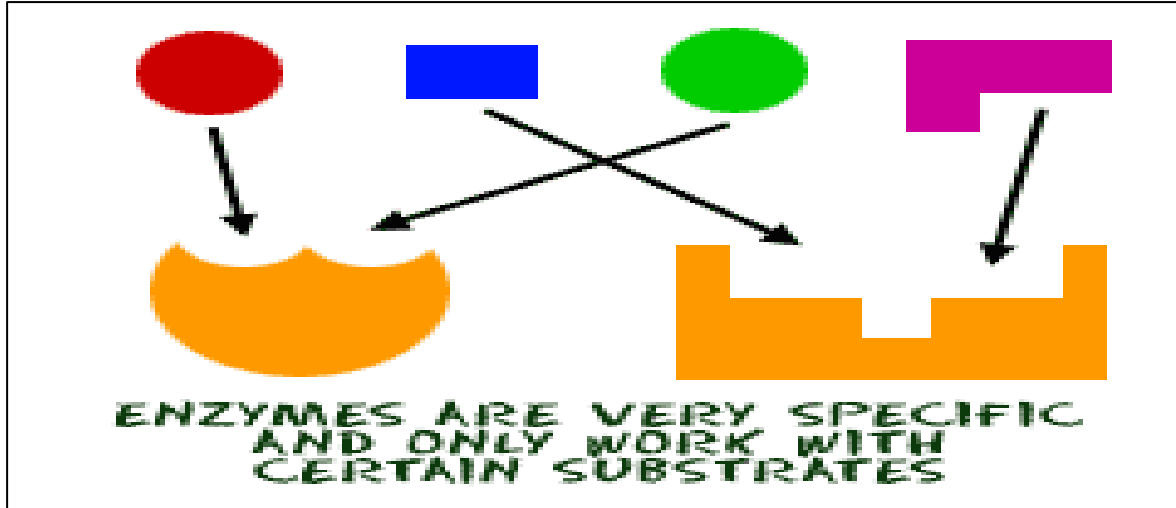


- فالإنزيمات عوامل مساعدة عضوية حيوية تصنع داخل الخلية ، تقوم بعملها من خلال تحفيز التفاعلات داخل الخلية بطريقة «تخصصية» ← أي أن كل إنزيم يقوم بتنشيط تفاعل محدد أو أكثر من خلال العمل على مادة معينة تسمى المادة الأساس (Substrate) أو مجموعة مواد متشابهة كيميائياً دون غيرها.



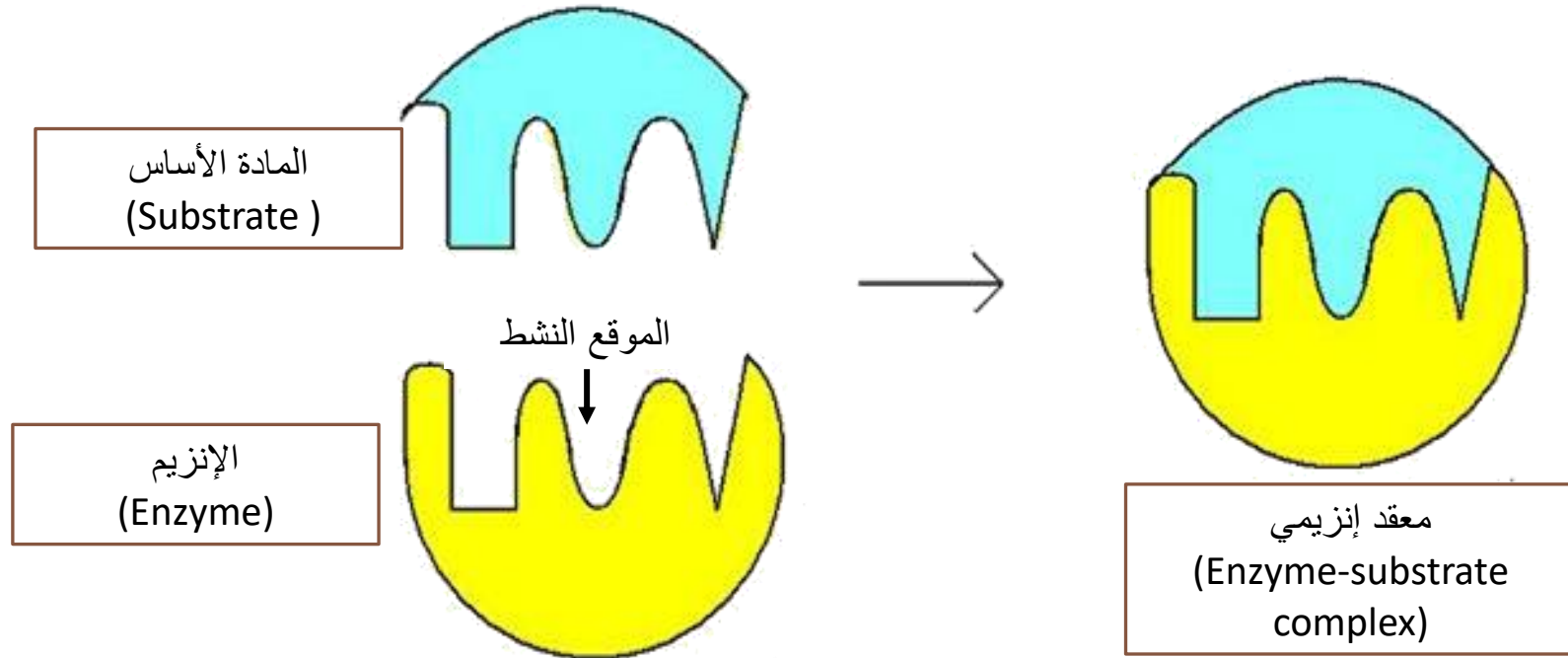
- درجة التخصص تتفاوت من إنزيم لآخر.

- إن عملية التنشيط التي يقوم بها الإنزيم تعني أن الإنزيم لا يتفاعل بنفسه ولا يتأثر بنتائج التفاعل.



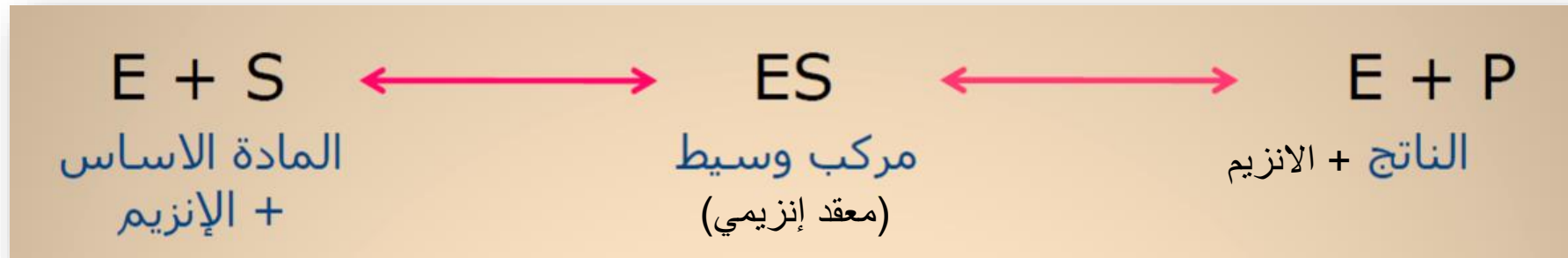
الموقع النشط للإنزيم والمادة الأساس:

- السمة المميزة للتفاعل المحفز بالإنزيم هي إنه يحدث بموقع معين على سطح الإنزيم يسمى بالموقع النشط.
- كي يقوم الإنزيم بتنشيط تفاعل محدد أو أكثر يجب أن يرتبط بمادة معينة تسمى المادة الأساس (Substrate) مكوناً ما يسمى بالمعقد الإنزيمي (ES).



التفاعلات الإنزيمية:

- التفاعلات الإنزيمية تتضمن تكوين مركب وسيط (E-S).



أنواع الإنزيمات من حيث التركيب:

- تتركب الإنزيمات في تكوينها من **بروتينات** بغض النظر عن اسمها ويمكن تقسيمها من حيث التركيب إلى نوعين :

1- إنزيمات بسيطة (Simple enzymes):

وهي كأي بروتينات بسيطة عبارة عن سلسلة من الأحماض الأمينية المتتالية (ولا تحتوي على جزء غير بروتيني).

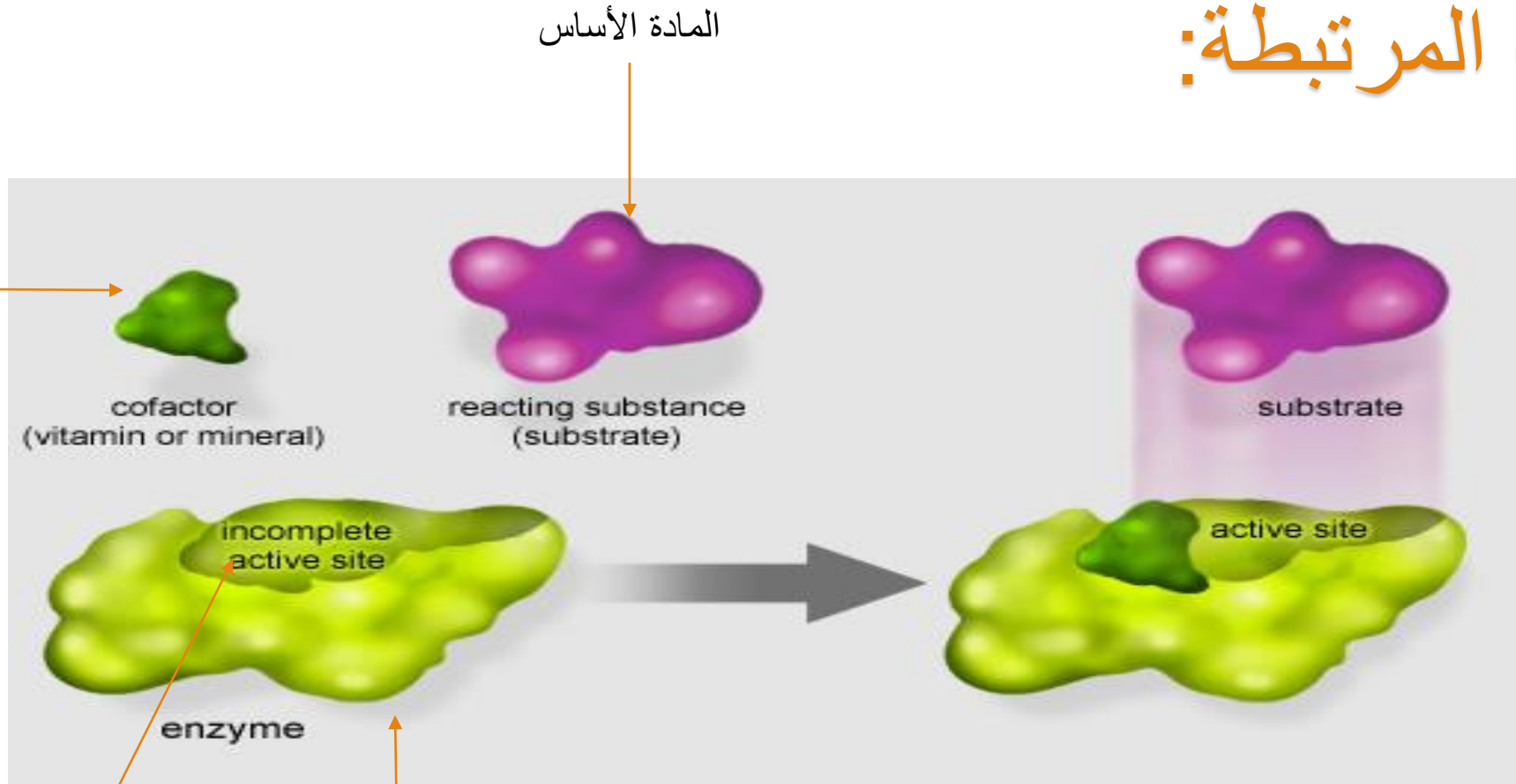
2- إنزيمات مرتبطة (Conjugated enzymes) :

وهي التي تتكون من شقين ، أحدهما بروتيني والآخر غير بروتيني.

علما بأن المجموعات الغير بروتينية هي جزء من المركز الفعال «موقع التنشيط» (Active site) في البروتين، وتسمى في هذه الحال «المرافق الإنزيمي» (Co-enzyme) أو العامل المعاون (Co-factor) ، وهذه الأجزاء الغير بروتينية ضرورية لنشاط الإنزيمات ولا يعمل من غيرها.

الإنزيمات المرتبطة:

العامل المساعد
أو المرافق
الإنزيمي

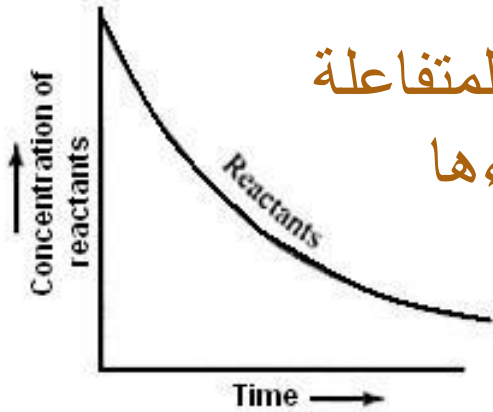


موقع التنشيط

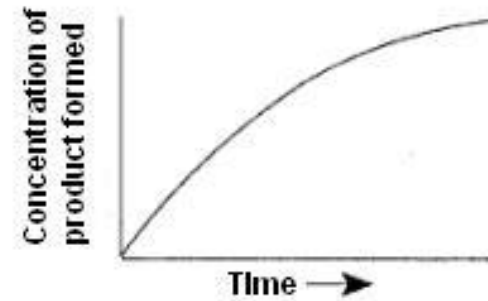
الإنزيم

مبدأ دراسة نشاط الإنزيمات بطريقة عملية:

- من المهم أن نعلم أن الإنزيم لا يدخل في التفاعل، ولهذا فإن دراسة نشاطه عملياً تتم من خلال قياس وتتبع المواد المتفاعلة ومدى نقصها أو اختفائها، وكذلك باختبار ظهور نواتج التفاعل أو زيادتها، فمن الواضح أن اختفاء المواد المتفاعلة أو نقصها، وظهور نواتج التفاعل أو تزايدها يدل على أن الإنزيم نشط في تحفيزه للتفاعل في الظروف المناسبة للتفاعل .

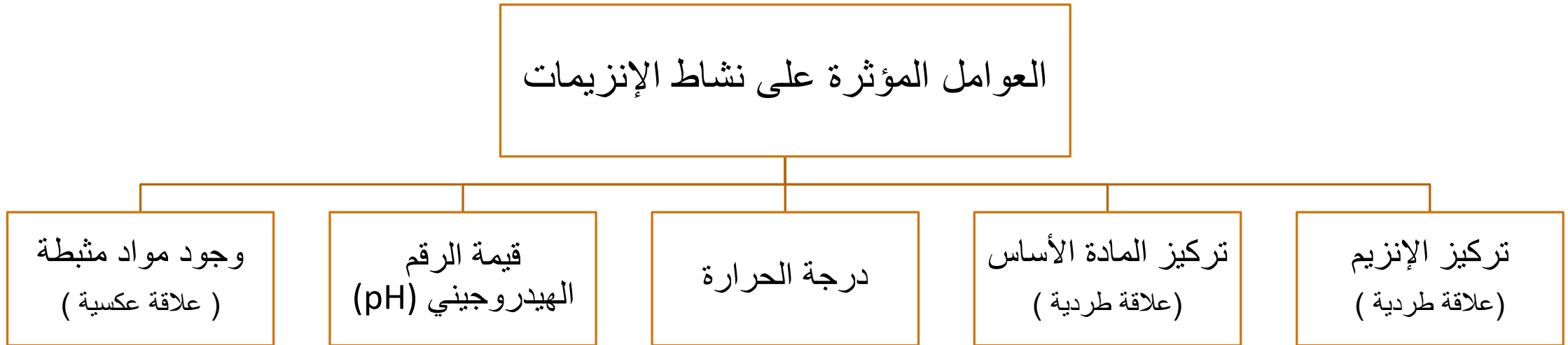


نقص المواد المتفاعلة
أو اختفاءها



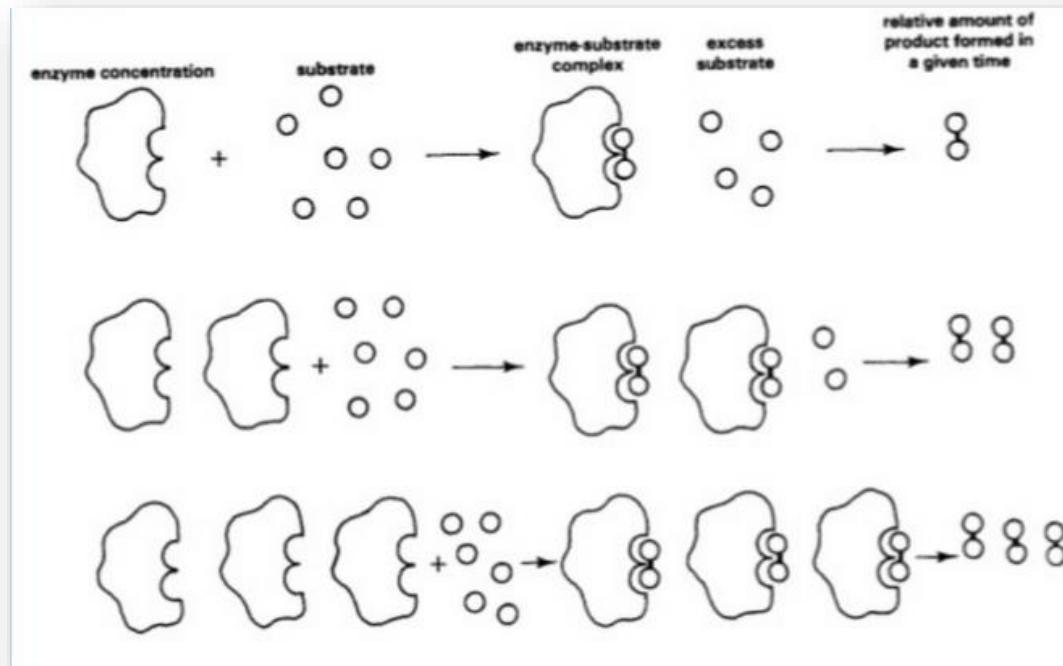
ظهور نواتج التفاعل
أو زيادتها

العوامل المؤثرة على نشاط الإنزيم :



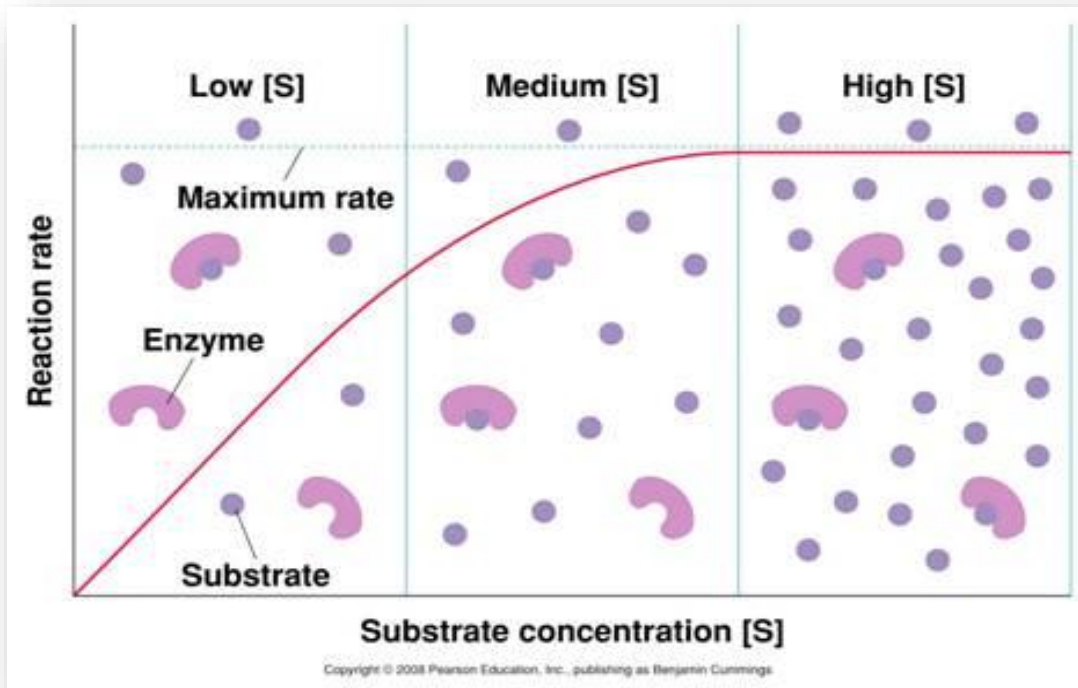
العوامل المؤثرة على نشاط الإنزيم :

1. تركيز الإنزيم (علاقة طردية).



العوامل المؤثرة على نشاط الإنزيم :

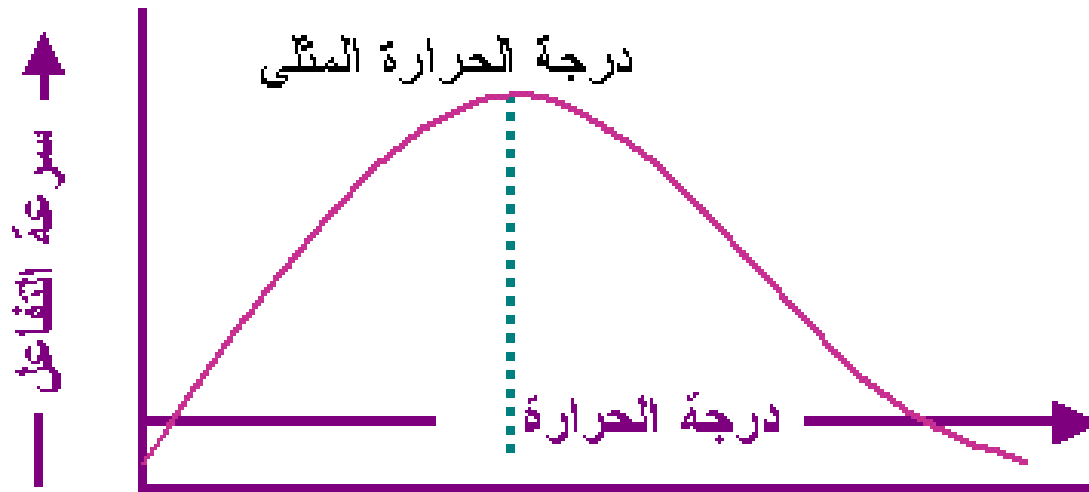
2. تركيز المادة الأساس (Substrate) التي يعمل عليها ذلك الإنزيم (علاقة طردية).



العوامل المؤثرة على نشاط الإنزيم :

3. درجة الحرارة التي يحدث فيها التفاعل:

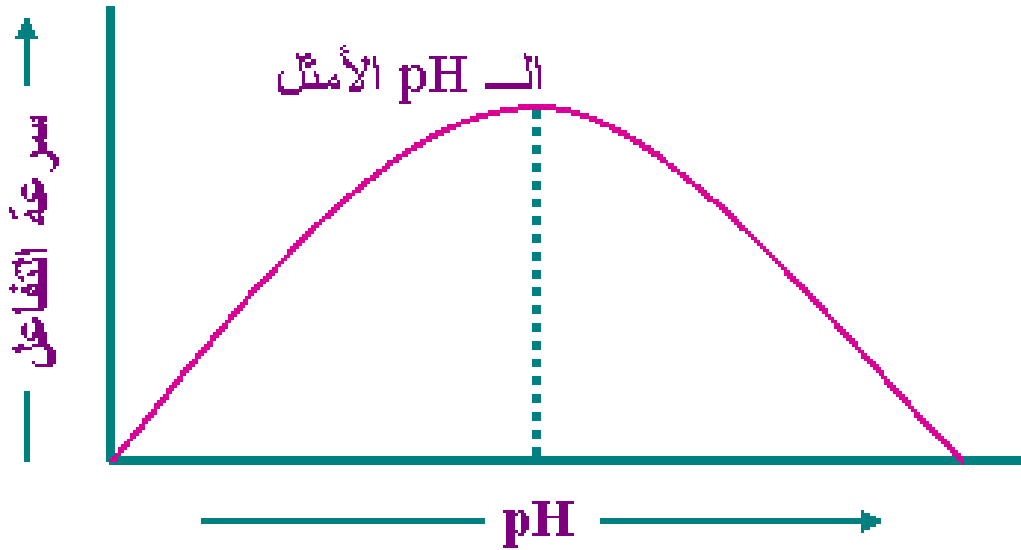
لكل إنزيم درجة حرارة **مثلى** تختلف عن الآخر ، مثال ذلك: معظم إنزيمات جسم الإنسان تعمل عند درجة حرارة ٣٧ درجة مئوية.



العوامل المؤثرة على نشاط الإنزيم :

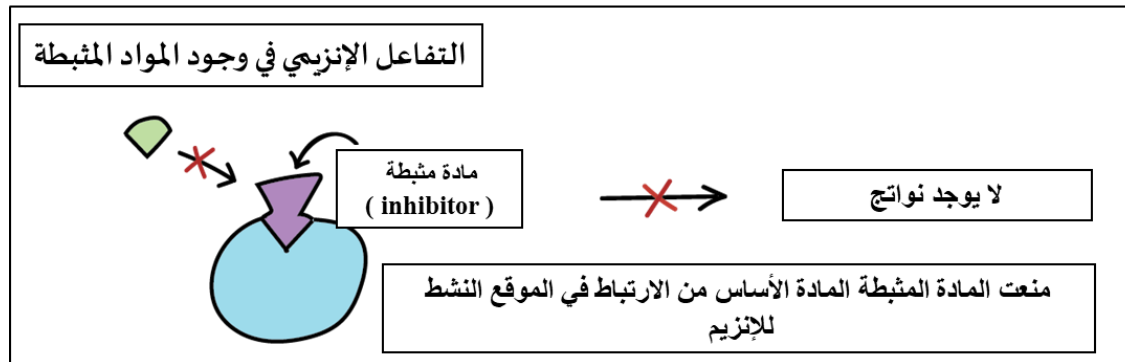
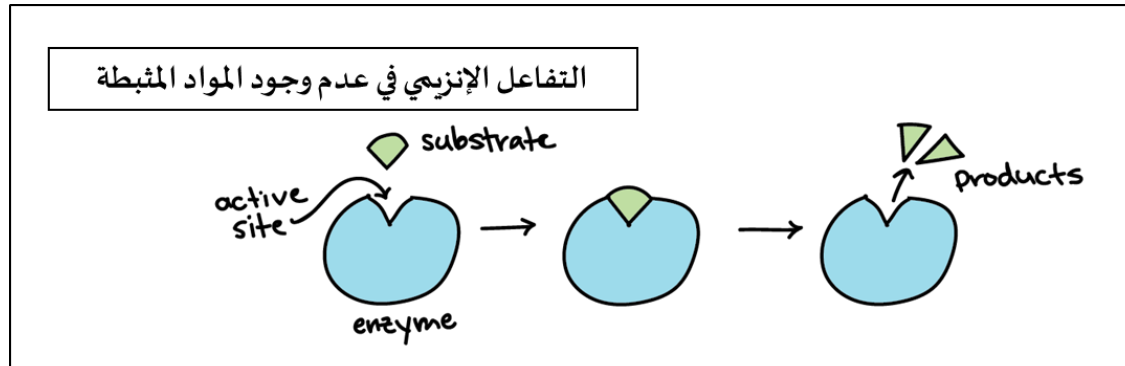
4. درجة الأس لهيدروجيني للوسط (قيمة pH):

لكل إنزيم قيمة pH **مثلى** تختلف عن الآخر تعتمد على الوسط الذي يعمل فيه الإنزيم، مثال ذلك: إنزيمات المعدة تعمل عند $pH=2$.



العوامل المؤثرة على نشاط الإنزيم :

5. وجود مواد مثبطة (Inhibitors) تعيق عمل الإنزيم أو تقلل من نشاطه الحيوي (علاقة عكسية).

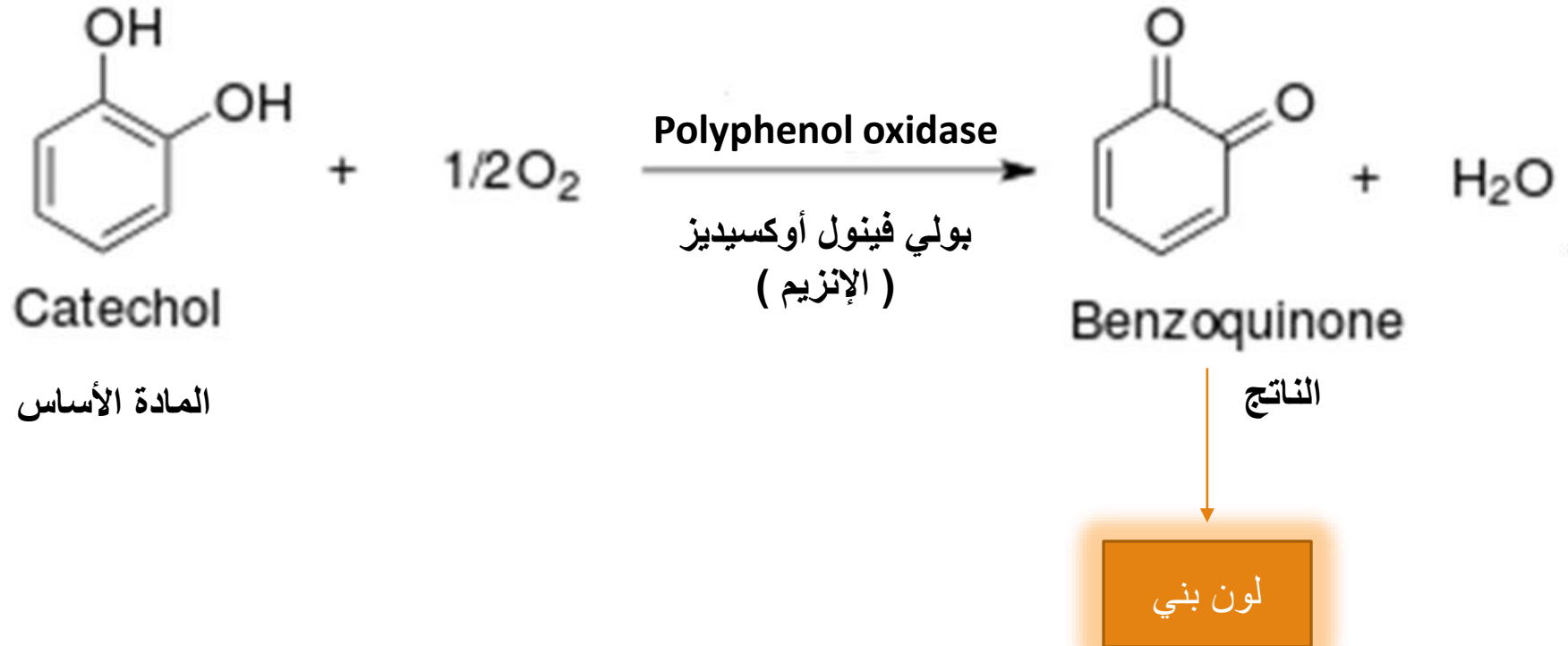


الجزء العملي

- في هذه التجربة سوف يتم تحضير مستخلص خام من إنزيم بولي فينول أوكسيديز (Polyphenol oxidase) من البطاطس، يحتوي هذا الإنزيم على النحاس في موقع التنشيط (عامل معاون) ، والأس الهيدروجيني الأمثل لنشاطه هو 6.7 والدرجة الحرارة المثلى هي 37°C.



- هذا الإنزيم يحفز عملية الأكسدة لثاني وثلاثي هيدروكسي فينول إلى (quinons) كما في التفاعل الآتي:





الاختبارات الوصفية للكشف عن الإنزيمات
(Qualitative tests of Enzyme
(activity

اختبار تأثير الحرارة
على نشاط البولي فينول
أوكسيديز

اختبار خصوصية
المادة الأساس (أو
المتفاعلة)

اختبار الطبيعة
الكيميائية للبولي فينول
أوكسيديز

اختبار النشاط الإنزيمي
للبولي فينول أوكسيديز

الكشف عن الطبيعة
الكيميائية للإنزيمات
(الإنزيمات عامة)

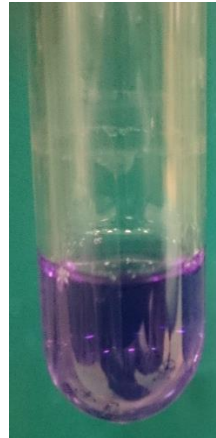
أولاً: الكشف عن الطبيعة الكيميائية للإنزيمات :

النظرية العلمية للاختبار:

من المعلوم سابقاً أن الإنزيمات هي من أنواع البروتينات ، وفي دراستنا للبروتينات تعرفنا على الكاشف العاف لها وهو اختبار بيوريت ، والمبدأ هنا أن نجري التجربة المذكورة على محاليل إنزيمات، فإن ظهرت نتيجة إيجابية نكون قد تحققنا من الإنزيم عبارة عن بروتين في طبيعته الكيميائية (المبدأ العلمي لتجربة بايوريت).

طريقة العمل :

- ضعي 1 مل من المستخلص الإنزيمي.
- ضعي 2 مل من محلول بيوريت.



النتائج:

الاستنتاج	الأنبوبة
	مستخلص إنزيمي + بيوريت

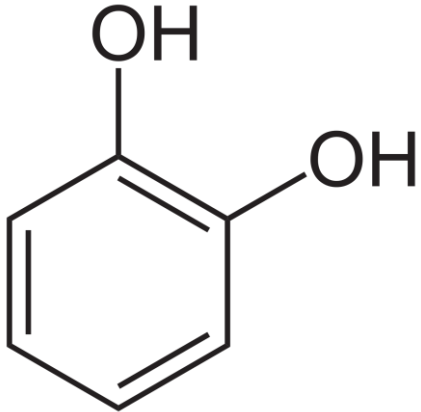
المناقشة:

اكتبي تعليقك على كل نتيجة حصلت عليها مع ذكر السبب وعلى ماذا تدل النتيجة.

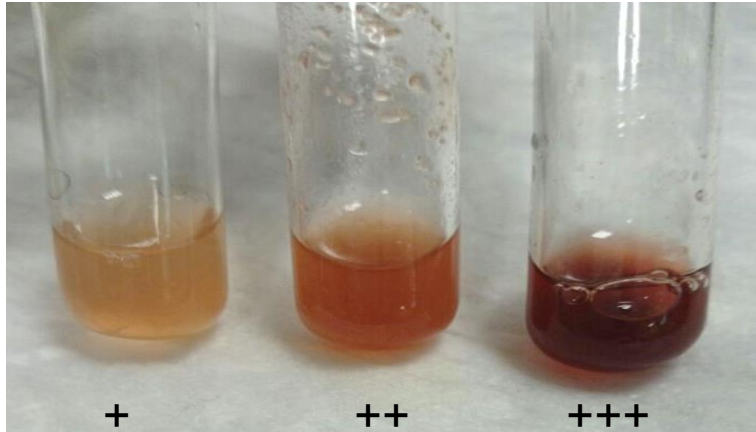
ثانياً: اختبار النشاط الإنزيمي للبولي فينول أكسيديز :

النظرية العلمية للاختبار:

- تتم دراسة النشاط الإنزيمي عملياً عن طريق تتبع إحدى الأمرين: نقص و اختفاء المتفاعلات أو ظهور وزيادة النواتج.
- تفاعل الأكسدة والاختزال يصاحبه تغير في اللون، كما أن هذا التفاعل نصادفه كثيراً في الطبيعة حيث هو المسؤول عن اللون البني الذي يظهر على البطاطا وبعض الفواكه بعد تقشيرها.
- في هذا التفاعل يحفز إنزيم البولي فينول أكسيدز أكسدة الكاتيكول (ثنائي هيدروكسي فينول) بوجود الأوكسجين إلى بنزوكوينون المسؤولة عن ظهور اللون البني. وعليه سيتم تتبع النشاط الإنزيمي اعتماداً على تتبع ظهور اللون البني.
- وبما أن اللون البني الظاهر يمثل تكون الناتج ، فإن كثافة اللون تتناسب طردياً مع النشاط الإنزيمي (كلما كان الانزيم نشيطاً ← زادت كثافة اللون).



الكاتيكول (المادة الأساس)



الرمز	درجة كثافة اللون
-	عديم اللون
+	باهت اللون
++	واضح اللون
+++	غامق اللون

نشاط الإنزيم



طريقة العمل :

- حضري ثلاث أنابيب A,B,C:

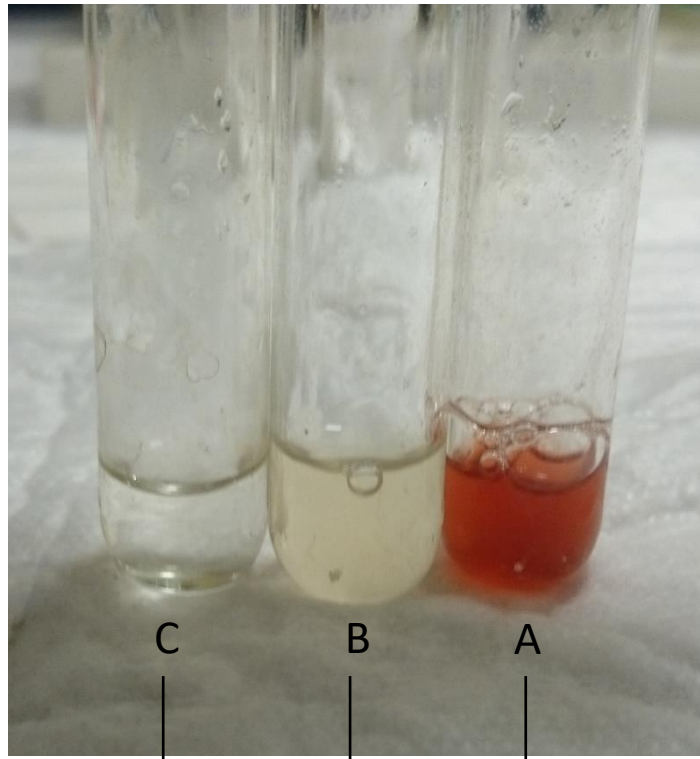
الأنبوبة A : مقياس (CONTROL) 15 نقطة من المستخلص الإنزيمي + 15 نقطة من الكاتيكول (المادة الأساس).

الأنبوبة B : 15 نقطة من المستخلص الإنزيمي + 15 نقطة من الماء المقطر.

الأنبوبة C : 15 نقطة من الكاتيكول + 15 نقطة من الماء المقطر.

- ضعي الأنابيب في حمام مائي عند 37°C (الدرجة المثلى للإنزيم).
- رجي كل أنبوبة لمدة 5 دقائق لتهوئتها و وذلك لإدخال الأوكسجين .
- دوني اللون الظاهر.

النتائج:



- تفتقد الإنزيم
- تفتقد المادة الأساس
+ مقياس

كثافة اللون (+++ أو ++ ، + ، -)			زمن التحضير بالدقائق
C	B	A	
			0
			5
			10
			15
			20
			25

ما الذي تتوقعين حدوثه في الأنبوبين (B) و (C) ؟ لماذا؟

المناقشة:

اكتبي تعليقك على كل نتيجة حصلت عليها مع ذكر السبب في ظهور النتيجة الإيجابية أم السلبية ، والتعليق على درجة اللون مع مرور الوقت.

ثالثاً: اختبار الطبيعة الكيميائية للبولي فينول أكسيديز :

النظرية العلمية للتجربة:

- الإنزيمات عبارة عن مركبات بروتينية تتأثر بالعوامل التي تؤثر على البروتين.
- فمثلاً عند إضافة **التريسن** (هو إنزيم يعمل على تحلل البروتينات) بواسطة تحليله للروابط الببتيدية) إلى إنزيم البوليفينول أو أكسيديز ، فإن الإنزيم يتحلل ويفقد قدرته على تحفيز التفاعل (لا يحول المواد المتفاعلة إلى نواتج).
- وعند إضافة أحماض قوية **كثلاثي كلورو حمض الخليك (TCA)** (والذي يستخدم عادةً لإيقاف التفاعلات الإنزيمية) فإنه يعمل على مسخ أو تخثير البروتينات (Denaturation) وبالتالي يفقد قدرته على تحفيز التفاعل.
- كما أنه يوجد مواد مثبطة كـ **Phenylthiourea** لها ميل كيميائي قوي تجاه النحاس (الذي يعتبر عامل معاون للبوليفينول أو أكسيديز) فبإمكانه الارتباط به حتى لو كان مرتبطاً ، وحينها يفقد الإنزيم قدرته على تحفيز التفاعل .

طريقة العمل :

- حضري ثلاث أنابيب A,B,C :

الأنبوبة A :

15 نقطة من المستخلص الإنزيمي + 15 نقطة من الكاتيكول. وضعيها في حمام مائي عند $37^{\circ}C$ لمدة 10 دقائق واستخدميها كمقياس (Control).

الأنبوبة B :

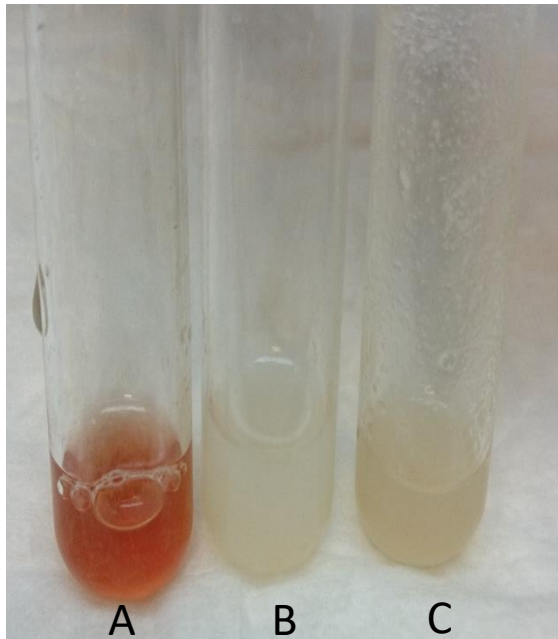
15 نقطة من المستخلص الإنزيمي + 15 نقطة من ثلاثي كلوريد حمض الخليك (TCA). رجي الأنبوبة جيداً ثم انتظري 5 دقائق ثم أضيفي 15 نقطة من الكاتيكول ، وضعيها في حمام مائي عند $37^{\circ}C$ لمدة 10 دقائق ، قارني بالأنبوبة A.

الأنبوبة C :

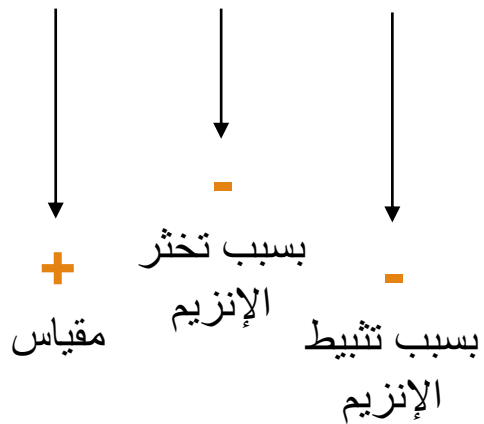
15 نقطة من المستخلص الإنزيمي + بضعة بلورات من Phenylthiourea استمري بالرج لمدة 5 دقائق وبعد ذلك أضيفي 15 قطرة من الكاتيكول ، وضعيها في حمام مائي عند $37^{\circ}C$ لمدة 10 دقائق ، قارني بالأنبوبة A.

النتائج:

كثافة اللون (+ , - , ++ أو +++)	المادة المضافة	الأنبوبة
	مقياس (CONTROL)	A
	ثلاثي كلوريد حمض الخليك (TCA)	B
	Phenyl thiourea	C



ما الذي تتوقعين حدوثه في الأنبوبين (B) و (C)؟ لماذا؟



المناقشة:

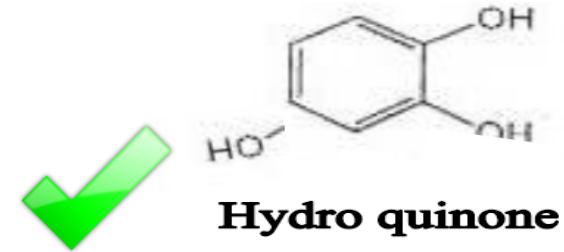
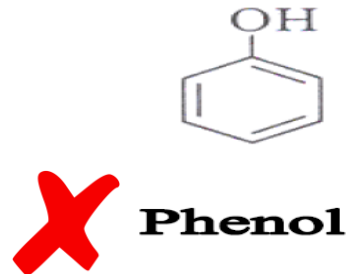
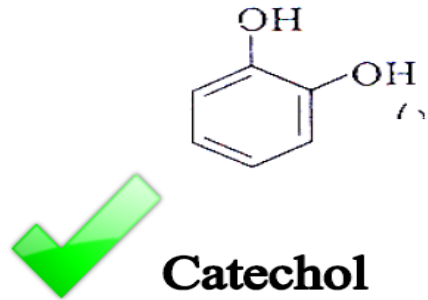
اكتبي تعليقك على كل نتيجة حصلت عليها مع ذكر السبب السبب في ظهور النتيجة الإيجابية أم السلبية وأثر كل عامل على نشاط الإنزيم وطبيعته البروتينية.

رابعاً: اختبار الخصوصية للمادة الأساس (أو المتفاعلة):

النظرية العلمية للاختبار:

- تقوم الإنزيمات بتحفيز التفاعلات بطريقة **تخصصية**، أي أن كل إنزيم يقوم بتنشيط تفاعل محدد أو أكثر من خلال العمل على مادة معينة تسمى المادة الأساس أو مجموعة مواد متشابهة كيميائياً دون غيرها.
- يحفز إنزيم البولي فينول أوكسيداز عملية الأكسدة لمجموعة من المواد المتقاربة في تركيبها الكيميائي وهو احتوائها على **حلقة بنزين مرتبطة بمجموعتين هيدروكسيل أو أكثر** ، كالكاتيكول والهيدروكونين.

التركيب الكيميائي للثلاث مركبات متقاربة



طريقة العمل :

-حضري أنبوتين A,B:

الأنبوبة A :

15 نقطة من المستخلص الإنزيمي + 15 نقطة من الكاتيكول.

الأنبوبة B :

15 نقطة من المستخلص الإنزيمي + 15 نقطة من الفينول.

← رجي الأنابيب وضعيها في حمام مائي عند $37^{\circ}C$ لمدة 5 دقائق.

النتائج:



كثافة اللون (+ , - , ++ أو +++)	الأنبوبة
	A (كاتيكول)
	B (فينول)

ما الذي تتوقعين حدوثه في الأنبوبة (B) ؟ لماذا؟

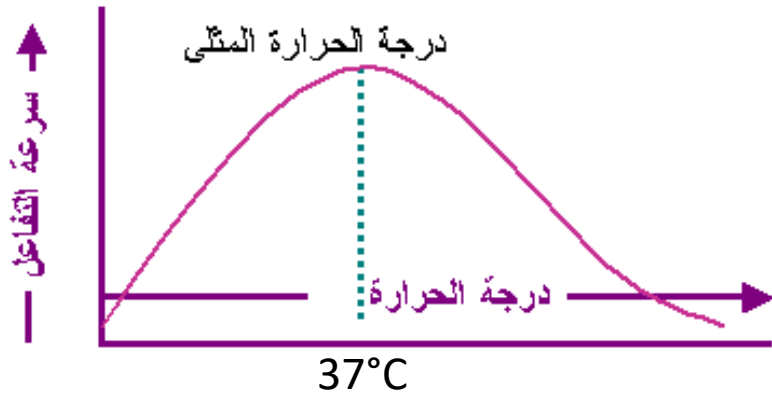
المناقشة:

اكتبي تعليقك على كل نتيجة حصلت عليها مع ذكر السبب في ظهور النتيجة الإيجابية أم السلبية ، والتعليق على تخصصية الإنزيم.

رابعاً: اختبار تأثير الحرارة على نشاط بولي فينول أوكسيديز:

النظرية العلمية للاختبار:

- لكل إنزيم درجة حرارة مثلى، يعمل عندها الإنزيم بكفاءة وتكون سرعة التفاعل عندها أعلى ما يكون.
- عند درجات حرارة أعلى أو أقل من درجة الحرارة المثلى للإنزيم فإن النشاط الإنزيمي يقل ويقل تبعاً لذلك سرعة التفاعل، إلى أن يفقد الإنزيم نشاطه عند درجات حرارة عالية جداً أو منخفضة جداً (صفر درجة مئوية).
- الدرجة الحرارة المثلى للبولي فينول أوكسيديز هي 37°C .



طريقة العمل :

-حضري ثلاث أنابيب A,B,C:

أضيفي 15 نقطة من المستخلص الإنزيمي وضعيها لمدة 10 دقائق عند:

الأنبوبة A :

0 °C

الأنبوبة B :

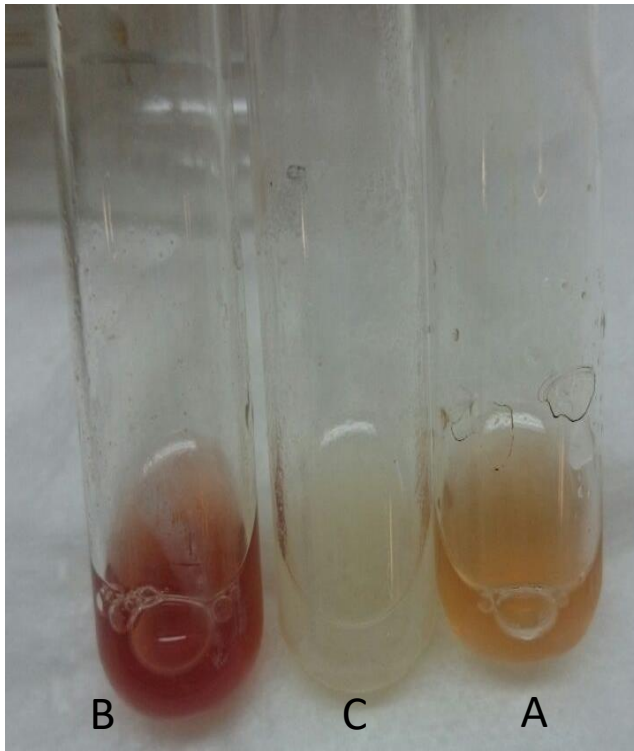
37 °C

الأنبوبة C :

90 °C

- بعد انتهاء العشرة دقائق أضيفي 15 نقطة من الكاتيكول في كل أنبوبة مع الرج.
- انتظري 5 دقائق ثم افحصي الأنبوبة (دون إخراجها).

النتائج:



↓
+
درجة حرارة
مثلى

↓
-
بسبب تخثر
الإنزيم

↓
-
بسبب تثبيط
الإنزيم

كثافة اللون (+ + + أو + + ، + ، -)	الأنبوبة
	A (°0 C)
	B (°37 C)
	C (°90 C)

المناقشة:

اكتبي تعليقك على كل نتيجة حصلت عليها مع ذكر السبب في ظهور النتيجة الإيجابية أم السلبية ، والتعليق على أثر كل درجة حرارة على طبيعة الإنزيم ونشاطه.