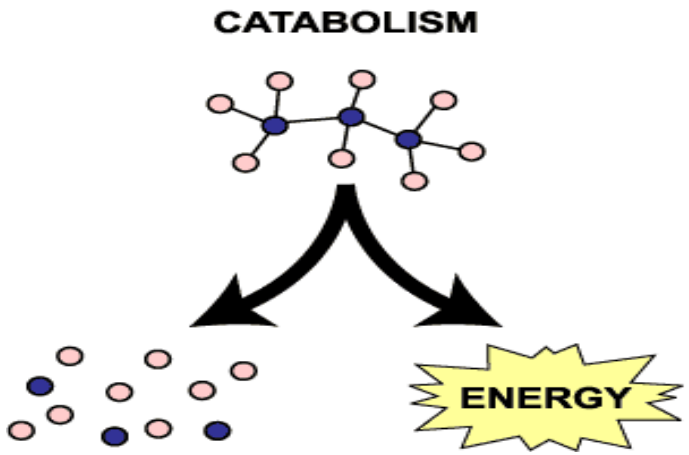
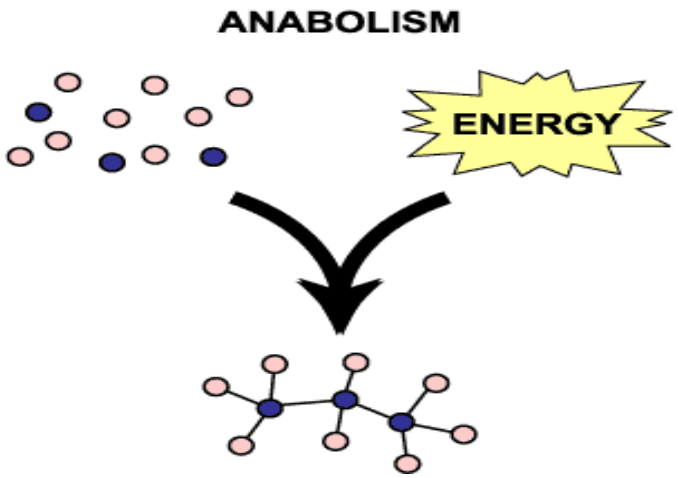
(8)
الإنزيمات
Enzymes

ما هي الإنزيمات (Enzymes) ؟

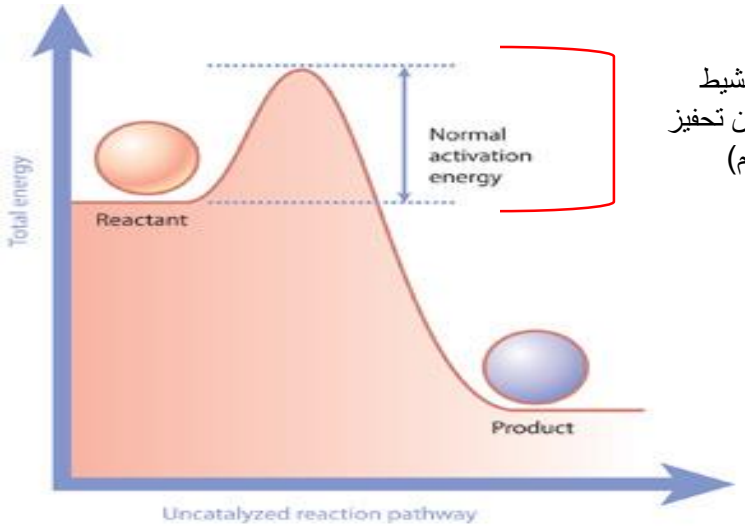
- **الوظيفة الأساسية** التي تقوم بها الخلايا الحية في الكائن الحي هي إنشاء مركبات معقدة من مواد بسيطة والعكس ، أي تفكيك تلك المركبات المعقدة إلى مواد أبسط.
- إن هذه القدرة التي تتمتع بها الخلايا على تكوين مواد عضوية معقدة من مواد أخرى أبسط تركيباً (أو العكس) تحتاج لعدد كبير من التفاعلات الكيميائية المختلفة،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



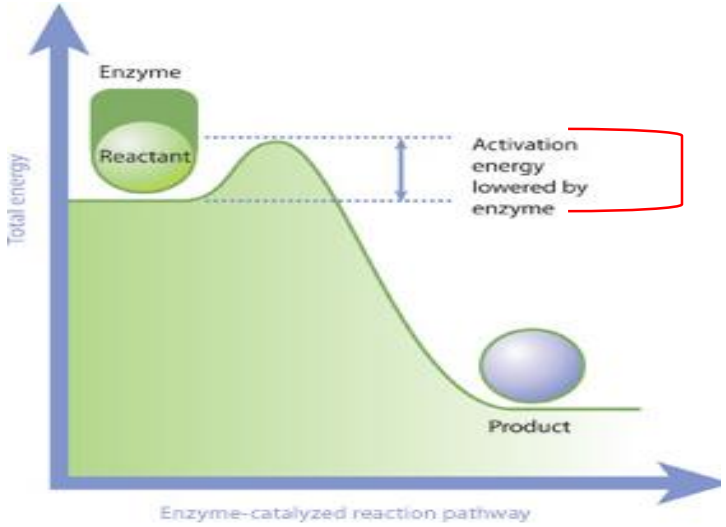


ما هي الإنزيمات (Enzymes) ؟

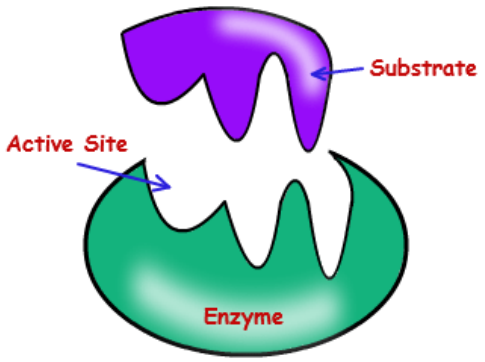
- هي نوع من أنواع **البروتينات**، و يعتمد عملها على (**تسريع**) التفاعلات الكيميائية داخل الخلية وتنظيمها بدقة بحسب حاجة الخلايا.



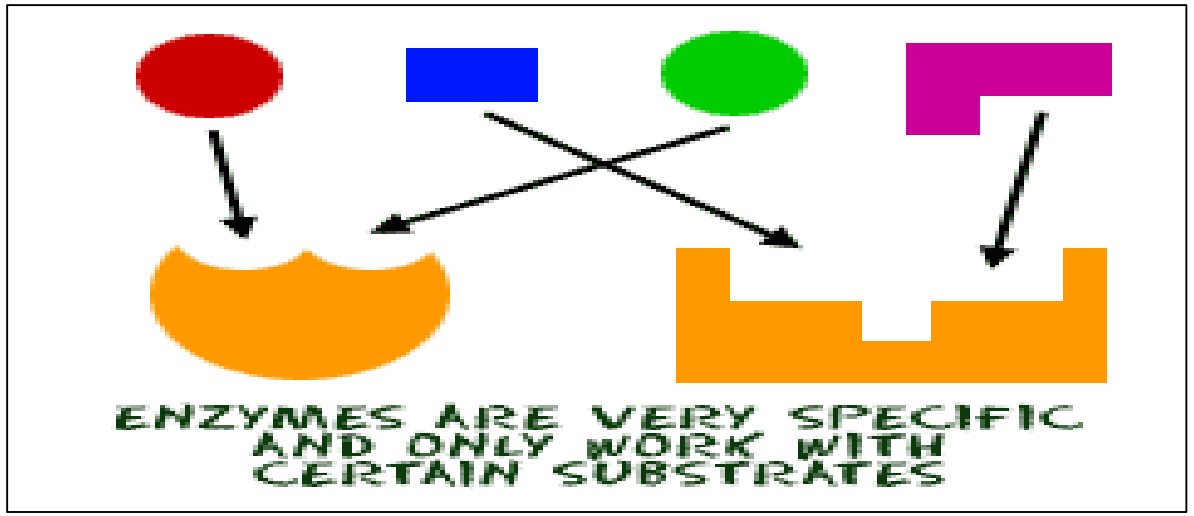
طاقة التنشيط للتفاعل (دون تحفيز الإنزيم)

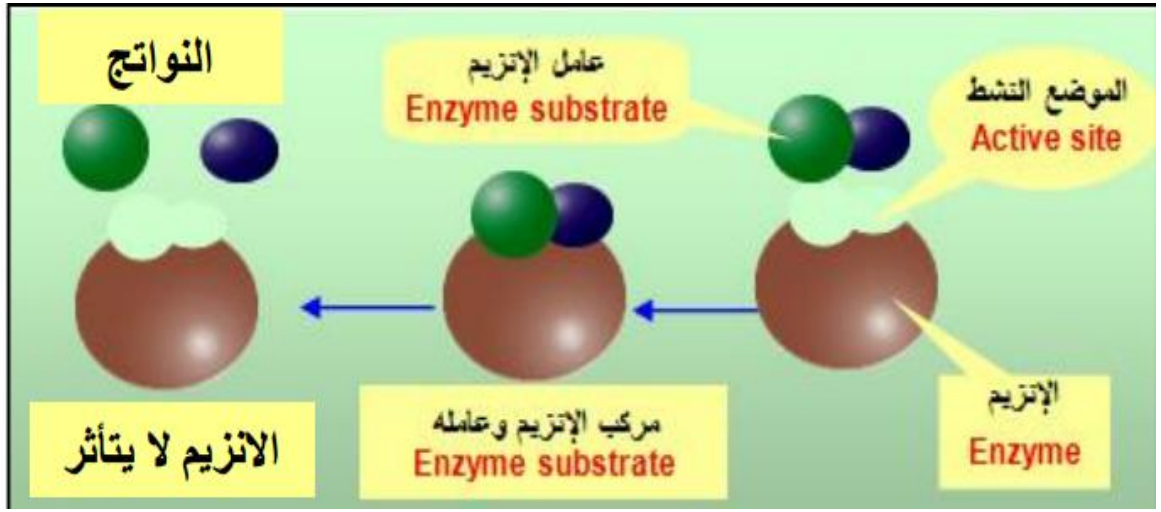


طاقة التنشيط للتفاعل (بعد تحفيز الإنزيم)

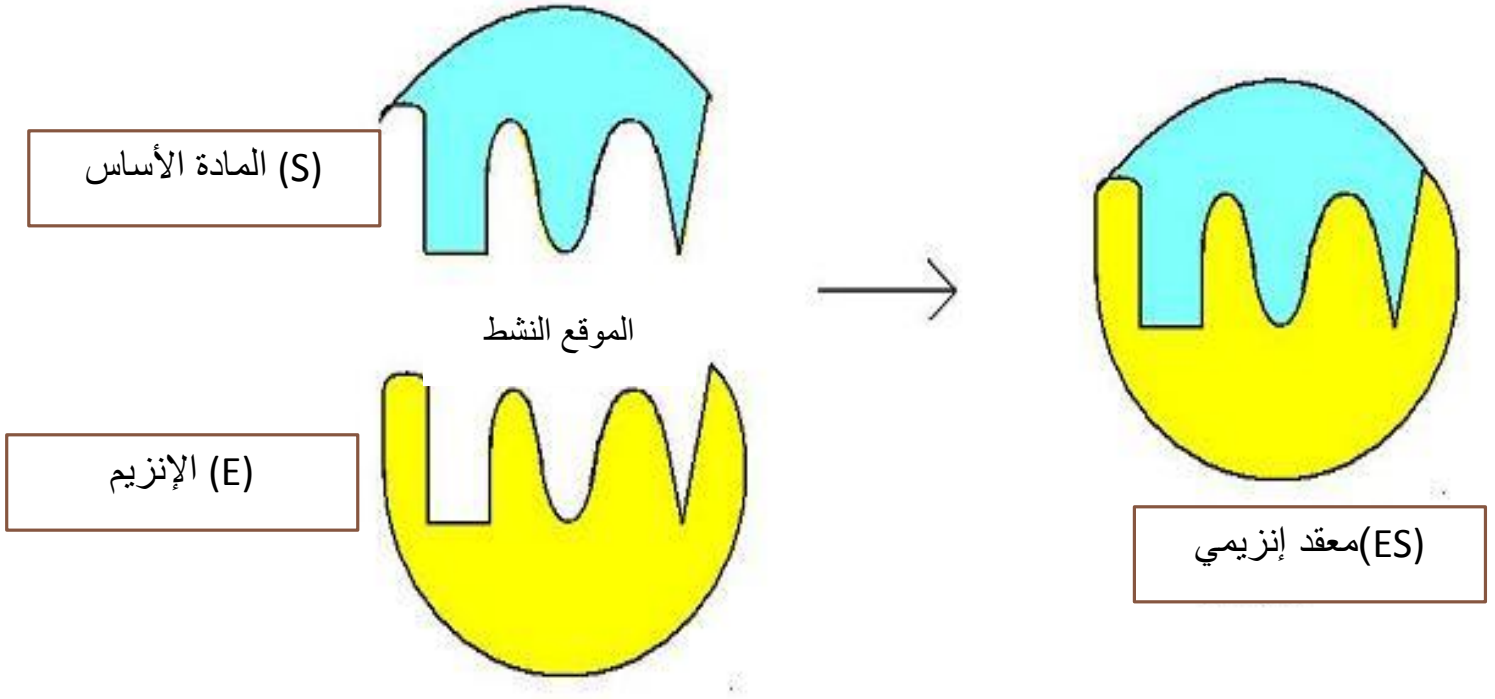


- فالإنزيمات عوامل مساعدة عضوية حيوية تصنع داخل الخلية ، تقوم بعملها من خلال **تحفيز التفاعلات** داخل الخلية بطريقة «تخصصية» ← أي أن كل إنزيم يقوم بتنشيط تفاعل محدد أو أكثر من خلال العمل على مادة معينة تسمى **المادة الأساس (Substrate)** أو مجموعة مواد متشابهة كيميائياً دون غيرها.
- درجة التخصص تتفاوت من إنزيم لآخر.
- ملاحظة: إن عملية التنشيط التي يقوم بها الإنزيم **تعني أن الإنزيم لا يتفاعل بنفسه ولا يتأثر بناتج التفاعل.**



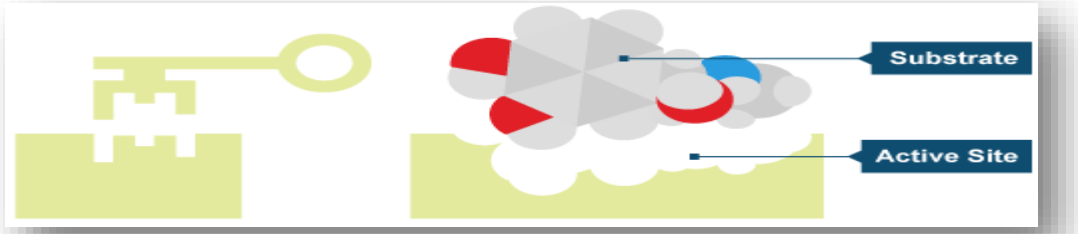


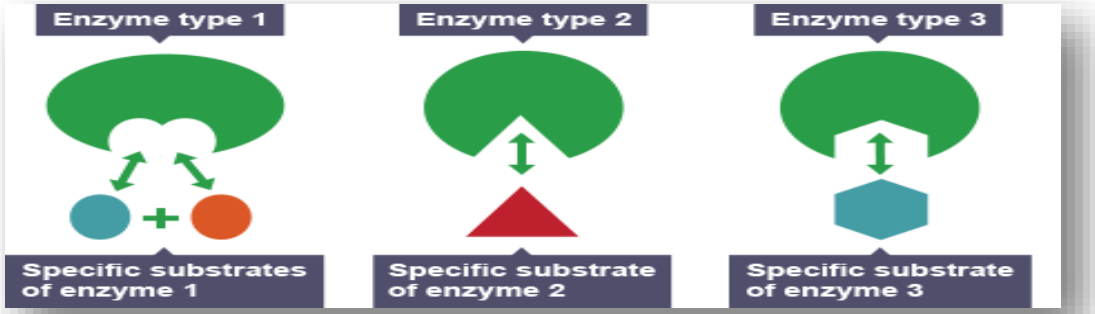
- ترتبط مادة التفاعل (مادة الأساس) بموقع معين على سطح الانزيم يسمى **بالموقع النشط** (Active site) ، مكوناً ما يسمى بالمعقد الأنزيمي (E-S).

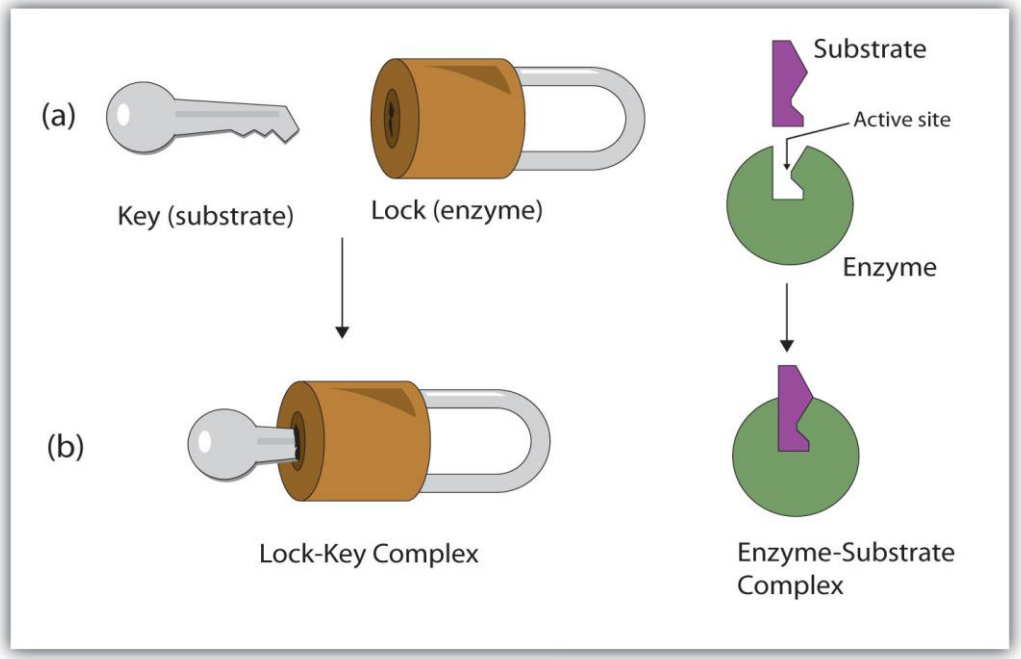


كيف يمكن تفسير خصوصية الإنزيم للمادة الأساس:

- **فرضية القفل والمفتاح :** تفترض أن الاختلافات في الشكل الثلاثي الأبعاد لسطح الموقع النشط أساسي لخصوصية الإنزيم أي أنه يوجد نوع معين من المادة التفاعل (مادة الأساس) تستطيع أن تحقق **التطابق** مع نوع معين من الإنزيمات.



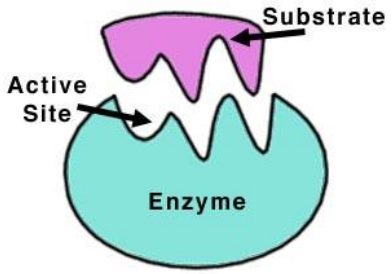




تقسم الإنزيمات:

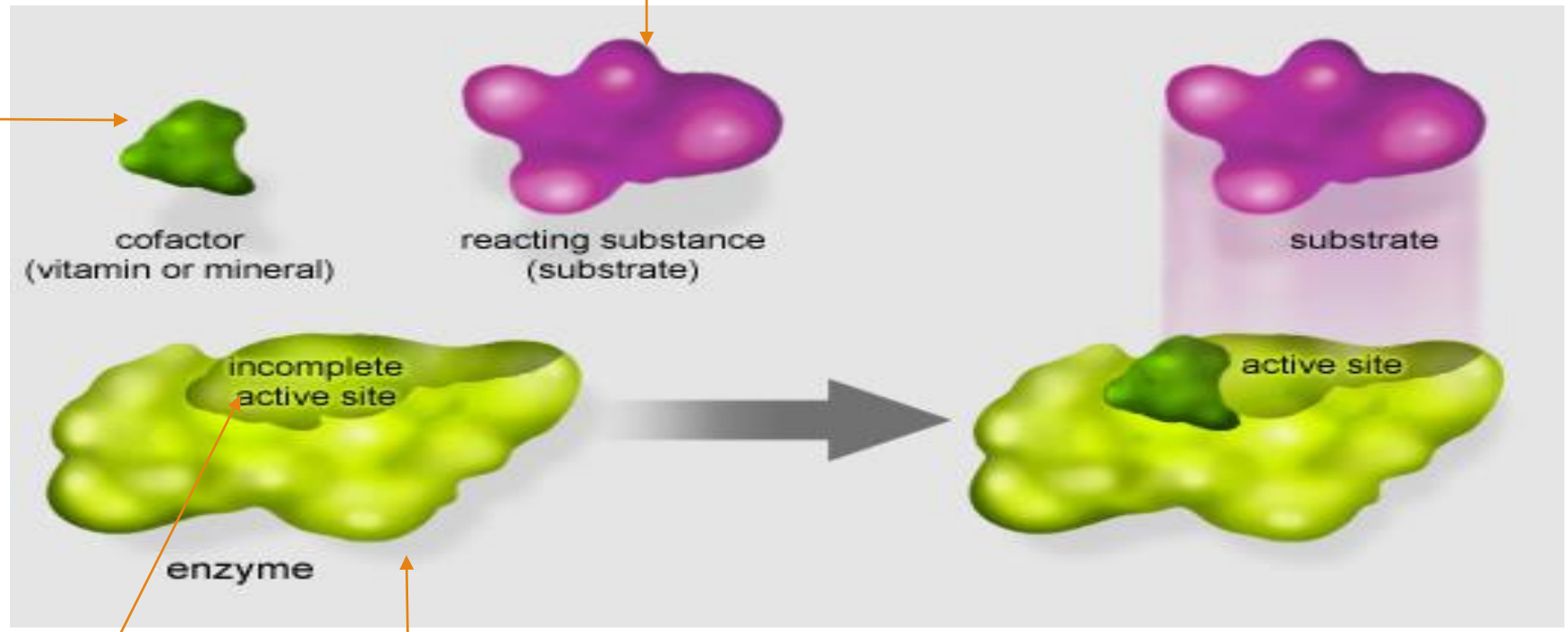
- تتركب الإنزيمات في تكوينها من **بروتينات** بغض النظر عن اسمها ويمكن تقسيمها من حيث التركيب إلى نوعين :

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.

الإنزيمات المرتبطة:



التفاعلات الإنزيمية:

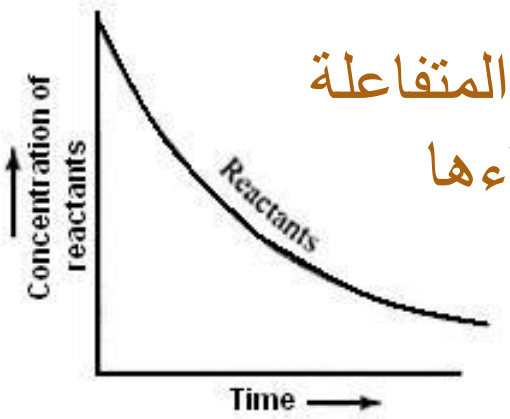
- بعض التفاعلات الانزيمية تكون عكسية وتتضمن تكوين مركب وسيط (E-S).

- كما أن جزئ الانزيم الواحد على الرغم من أنه يستطيع أن يتفاعل المرة تلو الأخرى إلا أنه **لا يستطيع أن يرتبط إلا مع عدد معين من جزيئات المادة المتفاعلة** في الدقيقة الواحدة وهذا يسمى بـ عدد التحول (turnover number) وعدد التحول يختلف من إنزيم إلى آخر.

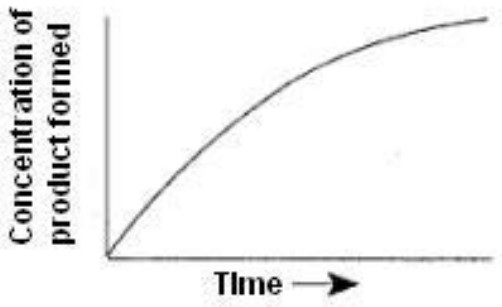
مبدأ دراسة نشاط الإنزيمات بطريقة عملية:

- 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

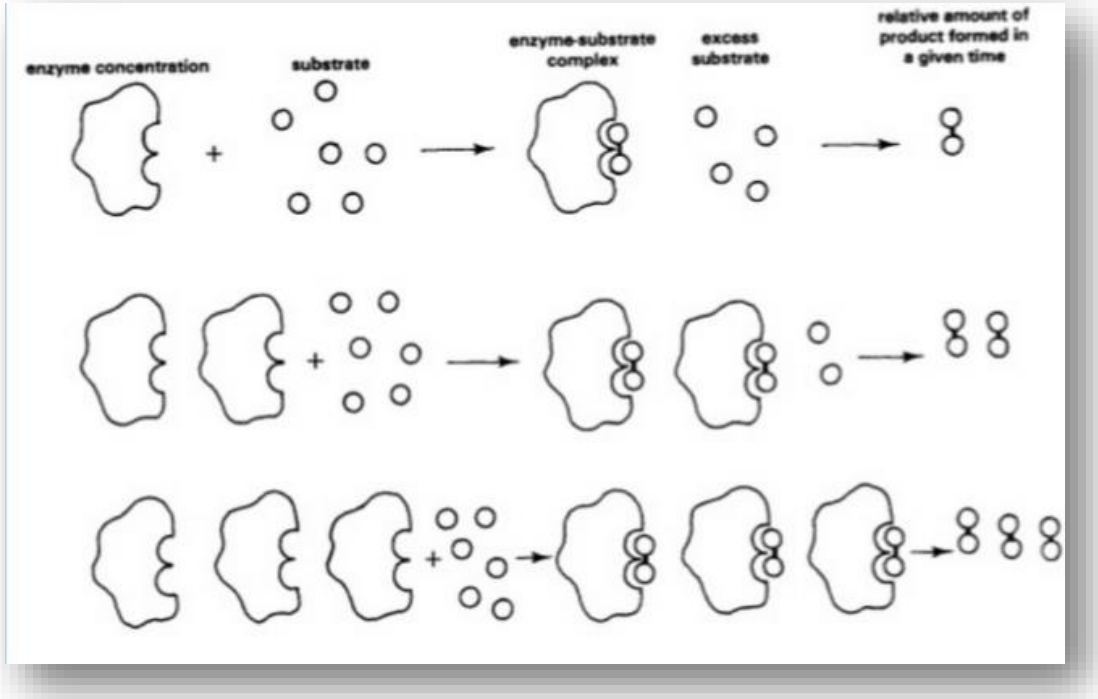


ظهور نواتج التفاعل
أو زيادتها



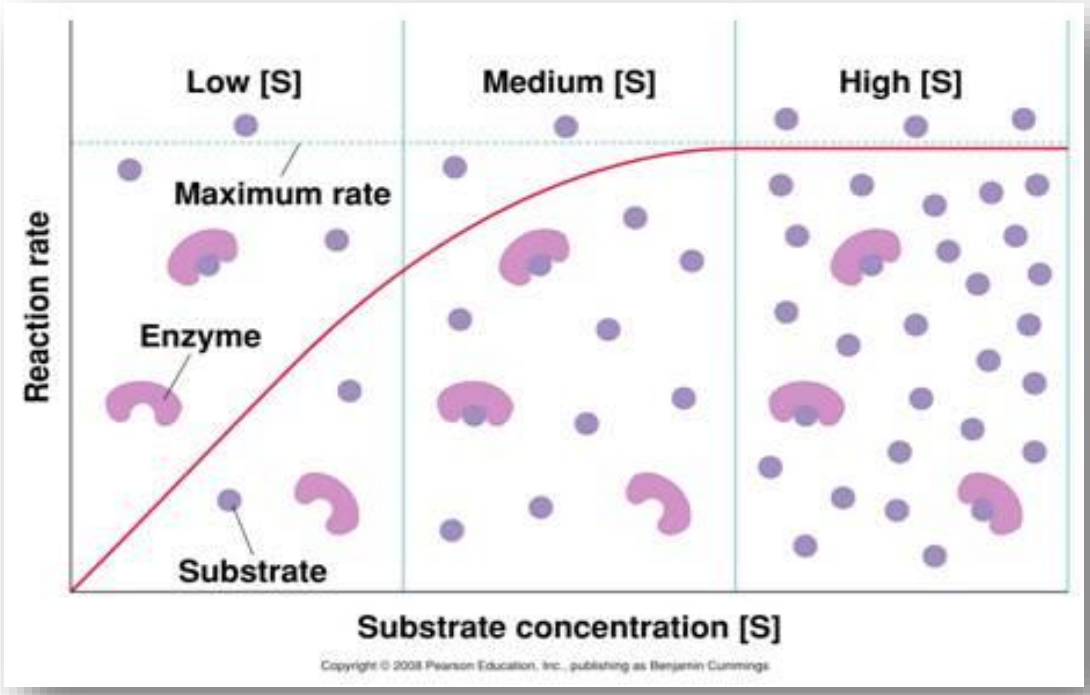
العوامل المؤثرة على نشاط الإنزيم :

1. تركيز الإنزيم (علاقة طردية).



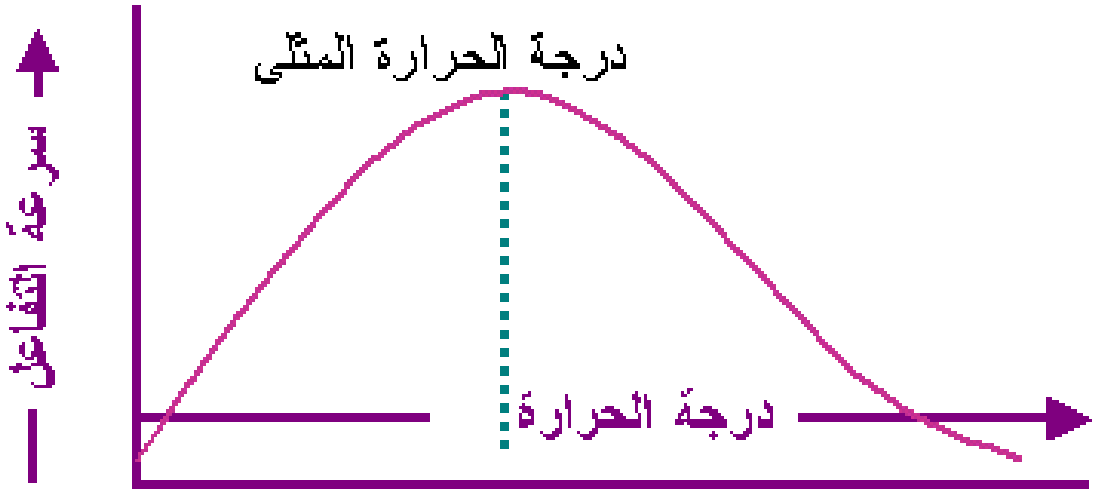
العوامل المؤثرة على نشاط الإنزيم :

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



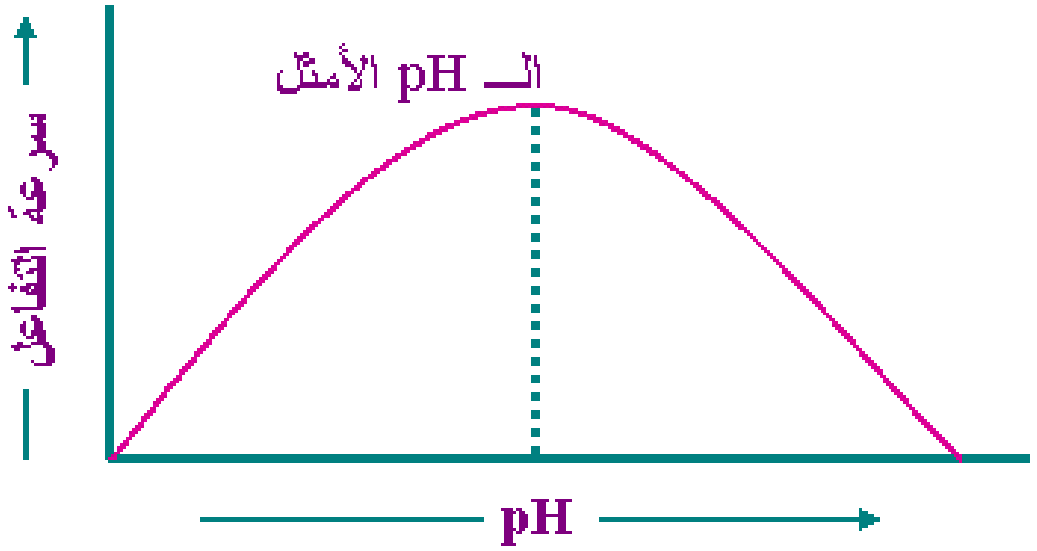
العوامل المؤثرة على نشاط الإنزيم :

3. درجة الحرارة التي يحدث فيها التفاعل (لكل إنزيم درجة حرارة مثلى تختلف عن الآخر).



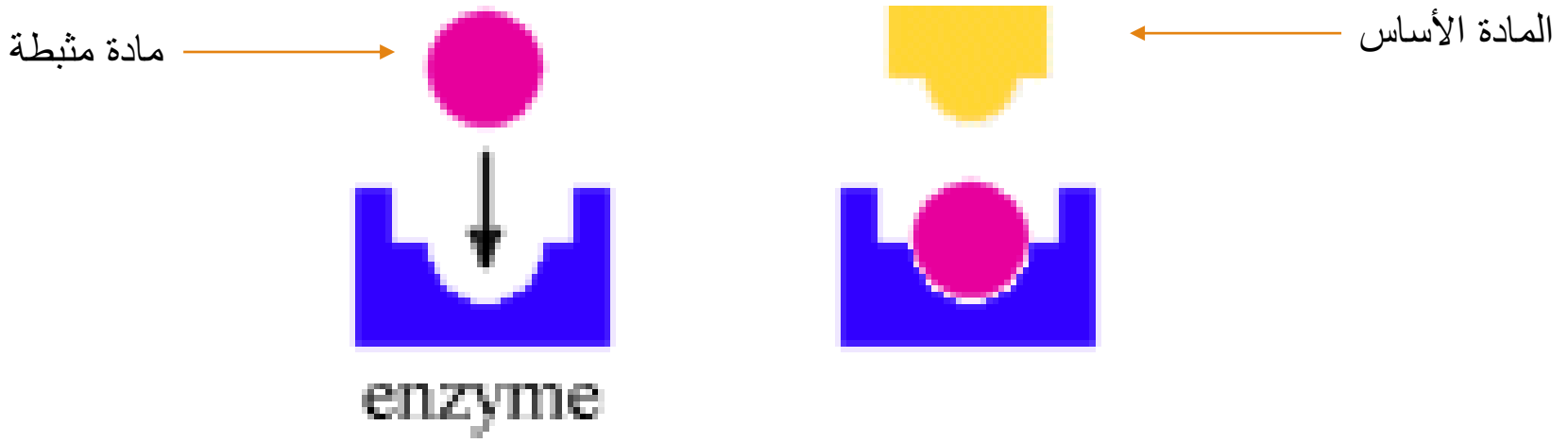
العوامل المؤثرة على نشاط الإنزيم :

4. درجة الأس لهيدروجيني للوسط (قيمة pH) (لكل إنزيم قيمة pH مثلى تختلف عن الآخر).



العوامل المؤثرة على نشاط الإنزيم :

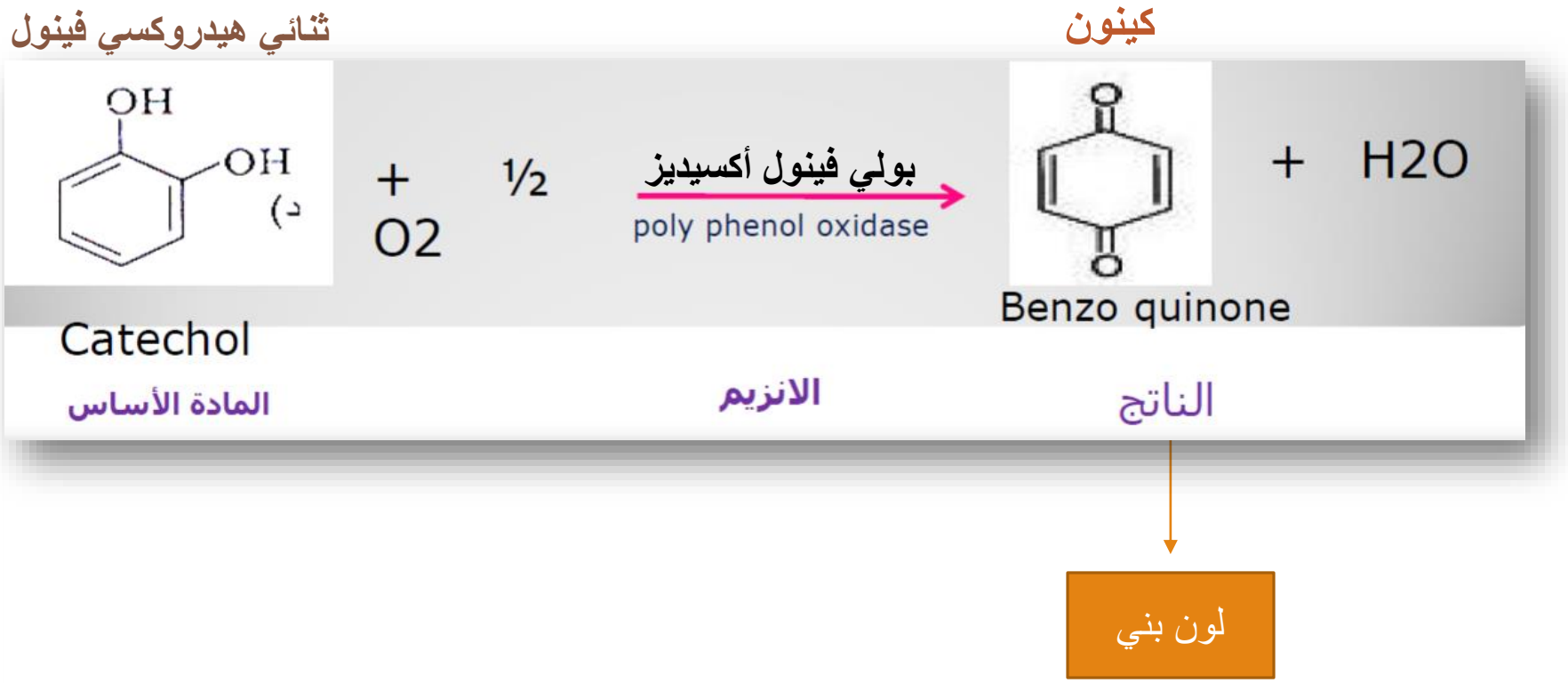
5. وجود مواد مثبطة (Inhibitors) تعيق عمل الإنزيم أو تقلل من نشاطه الحيوي (علاقة عكسية).

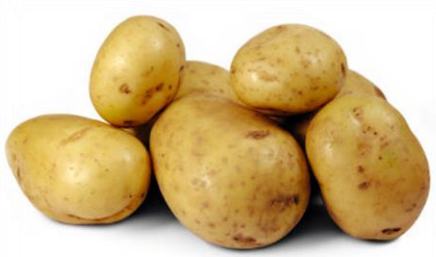


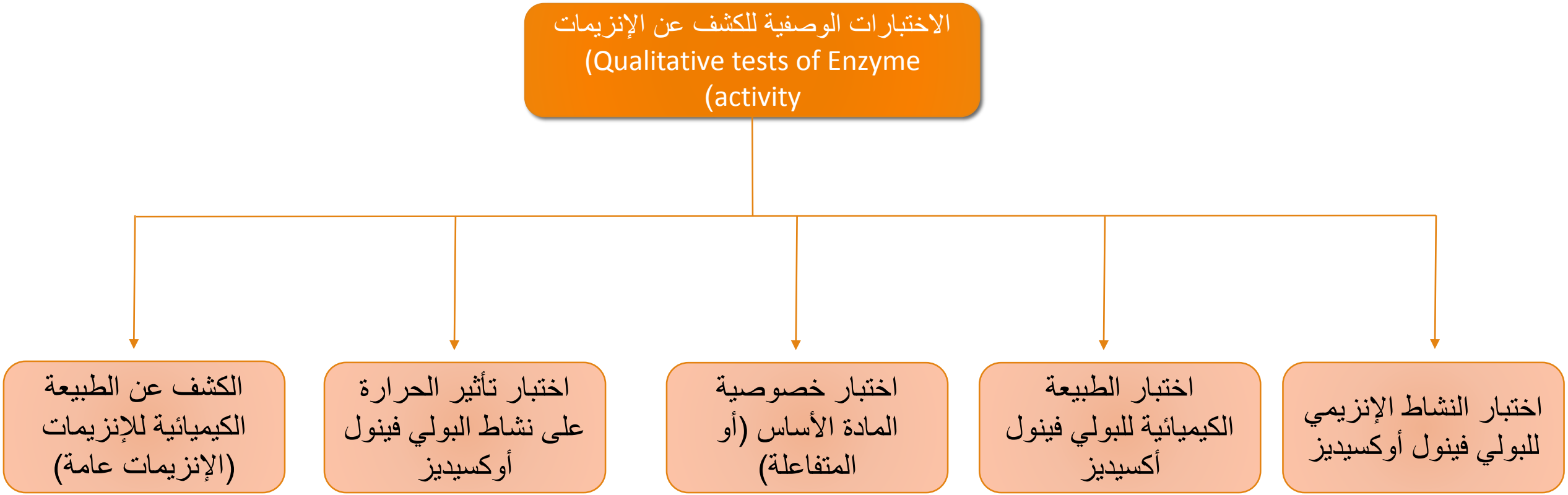
الجزء العملي

- 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)

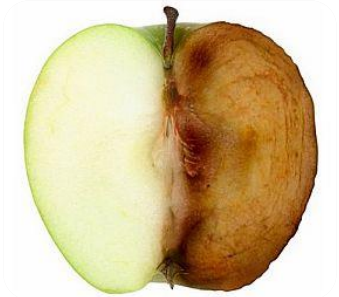
- اختبار النشاط الإنزيمي للبولي فينول أوكسيديز
- اختبار الطبيعة الكيميائية للبولي فينول أكسيديز
- اختبار خصوصية المادة الأساس (أو المتفاعلة)
- اختبار تأثير الحرارة على نشاط البولي فينول أوكسيديز
- الكشف عن الطبيعة الكيميائية للإنزيمات (الإنزيمات عامة)

أولاً: 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.

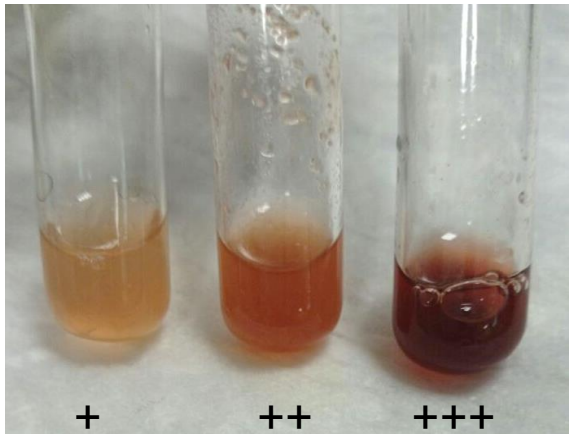
تفاعل الأكسدة والاختزال يصاحبه تغير في اللون، كما أن هذا التفاعل نصادفه كثيراً في الطبيعة حيث هو المسؤول عن اللون البني الذي يظهر على البطاطا وبعض الفواكه بعد تقشيرها.



في هذا التفاعل يحفز إنزيم البولي فينول أكسيدر أكسدة الكاتيكول (ثنائي هيدروكسي فينول) بوجود الأوكسجين إلى بنزو كوينون المسؤولة عن ظهور اللون البني.

🡸 في هذه التجربة سندرس نشاط الإنزيم عن طريق التغير في اللون (ظهور اللون البني من عدمه).

وبما أن اللون البني الظاهر يمثل تكون الناتج ، فإن كثافة اللون **تتناسب طردياً** مع النشاط الإنزيمي
(كلما كان الانزيم نشيطا 🡸 زادت كثافة اللون).



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

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 :

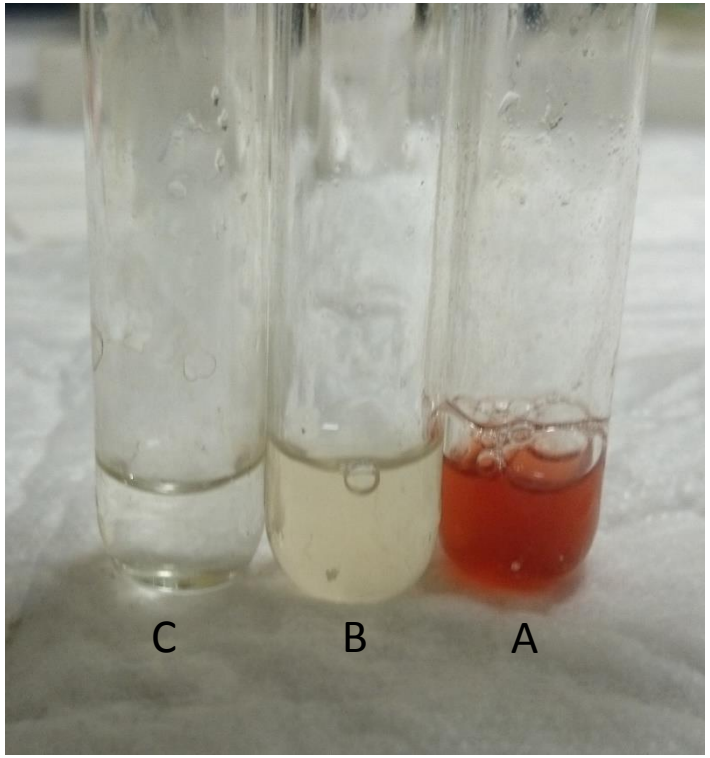
15 نقطة من المستخلص الإنزيمي + 15 نقطة من الماء المقطر.

الأنبوبة C :

15 نقطة من الكاتيكول + 15 نقطة من الماء المقطر.

- ضعي الأنابيب في حمام مائي عند 37 °C.
- رجي كل أنبوبة لمدة 5 دقائق لتهويتها و وذلك لإدخال الأوكسجين .
- دوني اللون الظاهر.

النتائج:



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

ما الذي تتوقعين حدوثه في الأنبوبتين (B) و (C) ؟

المناقشة:

اكتبي تعليقك على كل نتيجة حصلتي عليها مع ذكر السبب.

ثانياً: اختبار الطبيعة الكيميائية للبولي فينول أكسيديز :

النظرية العلمية للتجربة:

- الإنزيمات عبارة عن مركبات بروتينية تتأثر بعوامل مختلفة.
- فمثلا عند إضافة **التربسن** (هو إنزيم يعمل على تحلل البروتينات بواسطه تحليله للروابط الببتيدية) إلى إنزيم البولي فينول أوكسيديز ، فإن الإنزيم يتحلل ويفقد قدرته على تحفيز التفاعل (تحويل المواد المتفاعلة إلى نواتج).
- وعند إضافة أحماض قوية **كثلاثي كلورو حمض الخليك** (والذي يستخدم عادة لإيقاف التفاعلات الإنزيمية) فإنه يعمل على مسخ أو تغيير طبيعة البروتينات (Denaturation) وبالتالي يفقد قدرته على تحفيز التفاعل.
- كما أنه يوجد مواد كـ Phenyl thiourea لها ميل كيميائي قوي تجاه النحاس (الذي يعتبر عامل معاون للبولي فينول أوكسيديز) 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 ° C لمدة 10 دقائق واستخدميها كمقياس (Control).

الأنبوبة B :

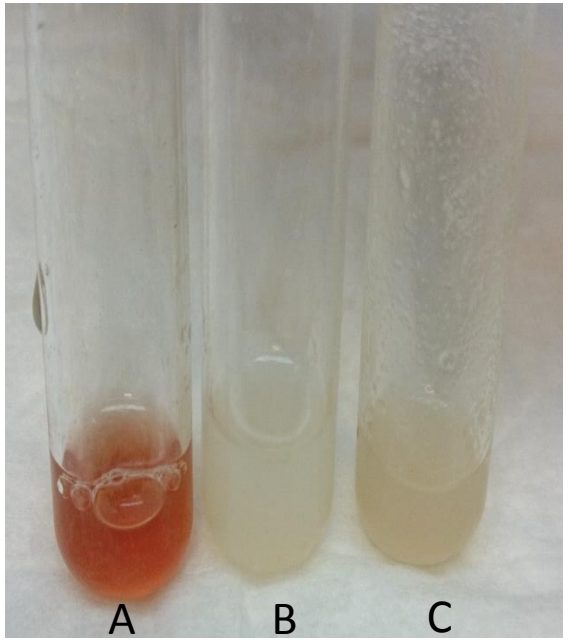
15 نقطة من المستخلص الإنزيمي + 15 نقطة من ثلاثي كلوريد حمض الخليك (TCA).

رجي الأنبوبة جيداً ثم انتظري 5 دقائق ثم أضيفي 15 نقطة من الكاتيكول ، وضعيها في حمام مائي عند 37 ° C لمدة 10 دقائق ، قارني بالأنبوبة A.

الأنبوبة C :

15 نقطة من المستخلص الإنزيمي + بضعة بلورات من Phenyl thiourea

استمري بالرج لمدة 5 دقائق وبعد ذلك أضيفي 15 قطرة من الكاتيكول ، وضعيها في حمام مائي عند 37 ° C لمدة 10 دقائق ، قارني بالأنبوبة A.



النتائج:

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

ما الذي تتوقعين حدوثه في الأنبوبتين (B) و (C)؟

المناقشة:

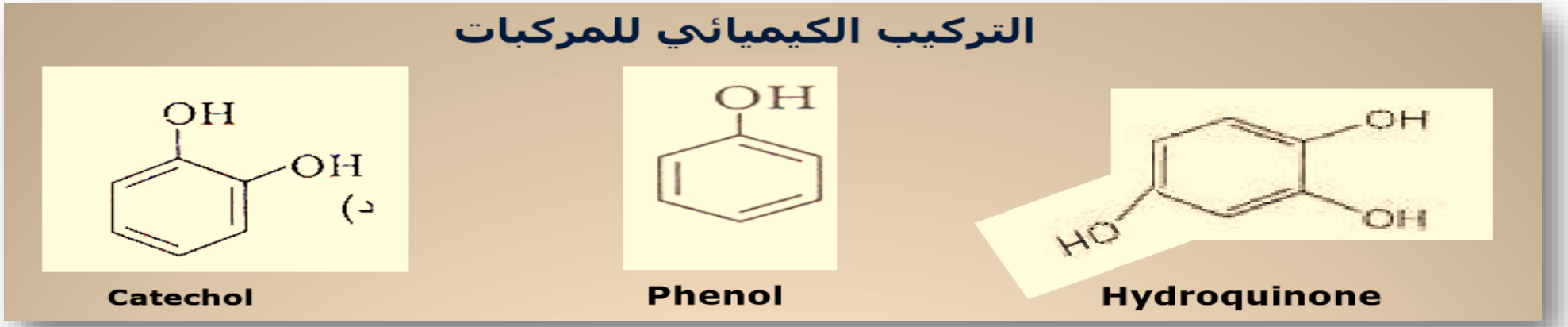
اكتبي تعليقك على كل نتيجة حصلتي عليها مع ذكر السبب.

ثالثاً: اختبار خصوصية المادة الأساس (أو المتفاعلة):

النظرية العليمة 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 كيمائياً دون غيرها.

يحفز إنزيم البولي فينول أوكسديز عملية الأكسدة لمجموعة من المواد المتقاربة في تركيبها الكيميائي وهو احتوائها على **حلقة بنزين مرتبط بمجموعتين هيدروكسيل أو أكثر** ، كالكاتيكول والهيدروكونين.



طريقة العمل :

حضري أربع أنابيب A,B,C,D

الأنبوبة A :

15 نقطة من المستخلص الإنزيمي + 15 نقطة من الكاتيكول.

الأنبوبة B :

15 نقطة من المستخلص الإنزيمي + 15 نقطة من الفينول.

الأنبوبة C :

15 نقطة من المستخلص الإنزيمي + 15 نقطة من الهيدروكوينون.

⬅ رجي الأنابيب وضعيها في حمام مائي عند 37 ° C لمدة 5 دقائق.

النتائج:

الأنبوبة	كثافة اللون (-، +، ++ أو +++)
A (كاتيكول)	
B (فينول)	
C (هيدروكويونون)	

ما الذي تتوقعين حدوثه في الأنبوبتين (B) و (C)؟

المناقشة:

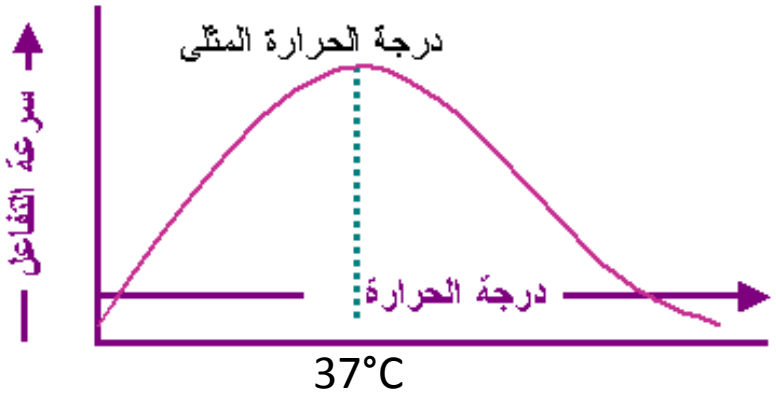
اكتبي تعليقك على كل نتيجة حصلتي عليها مع ذكر السبب.

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 تبعا لذلك سرعة التفاعل.
إلى أن يفقد الإنزيم نشاطه عند درجات حرارة عالية جداً أو منخفضة جداً (صفر درجة مئوية).

الدرجة الحرارة المثلى للبولي فينول أوكسديز هي 37°C.



طريقة العمل :

حضري أربع أنابيب A,B,C
أضيفي 15 نقطة من المستخلص الإنزيمي وضعيها في حمام مائي لمدة 10 دقائق عند:
الأنبوبة A :
0 °C
الأنبوبة B :
37 °C
الأنبوبة C :
90 °C

- أضيفي 15 نقطة من الكاتيكول في كل أنبوبة مع الرج.
- انتظري 10 دقائق ثم أفحصي الأنبوبة (دون إخراجها من الحمام المائي).

النتائج:

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

المناقشة:

اكتبي تعليقك على كل نتيجة حصلتي عليها مع ذكر السبب.

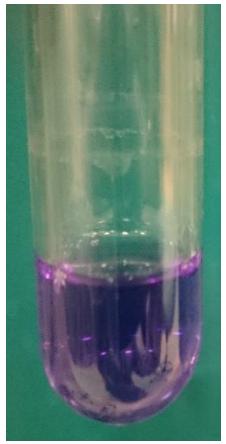
خامساً: الكشف عن الطبيعة الكيميائية للإنزيمات :

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.**

طريقة العمل :

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



النتائج:

الأنبوبة	الاستنتاج
مستخلص إنزيمي + بيوريت	

المناقشة:

اكتبي تعليقك على كل نتيجة حصلتي عليها مع ذكر السبب.

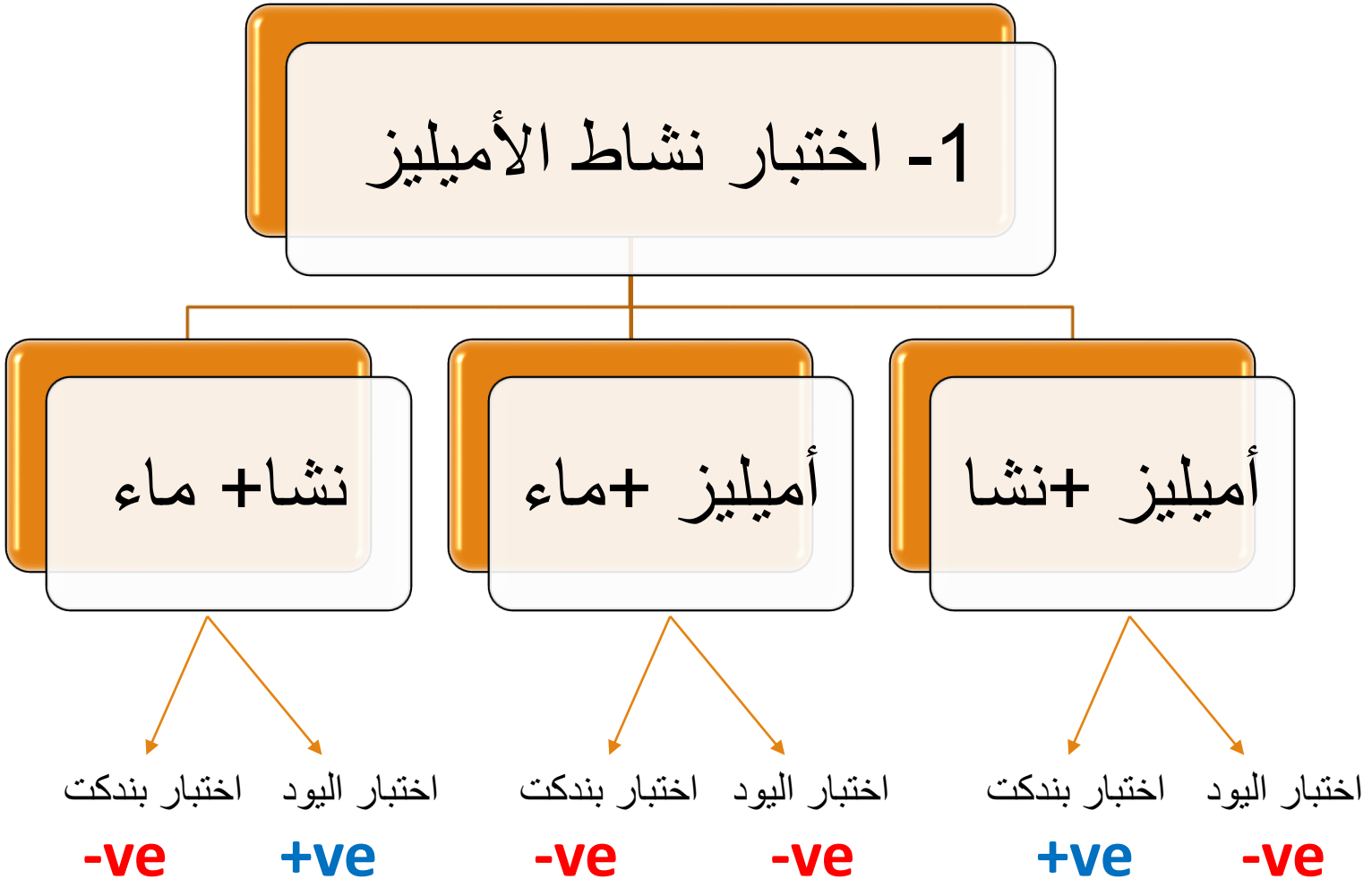
أمثلة على الإنزيمات

1- إنزيم ألفا أميليز (α-amylase):

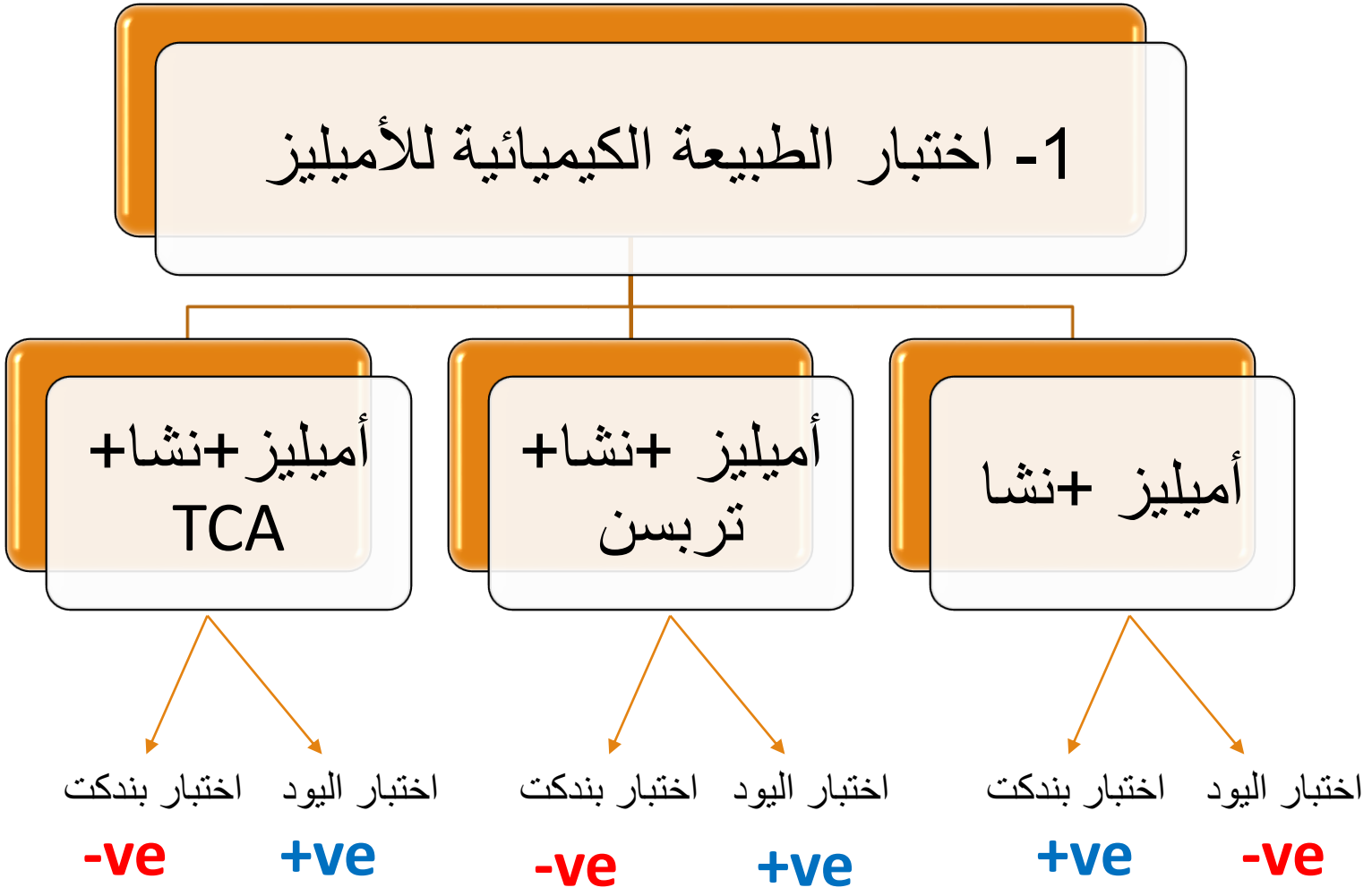
تفرزه الغدد اللعابية في الفم، ليقوم بتحليل النشا والجلايكوجين إلى سكريات أحادية (جلوكوز).

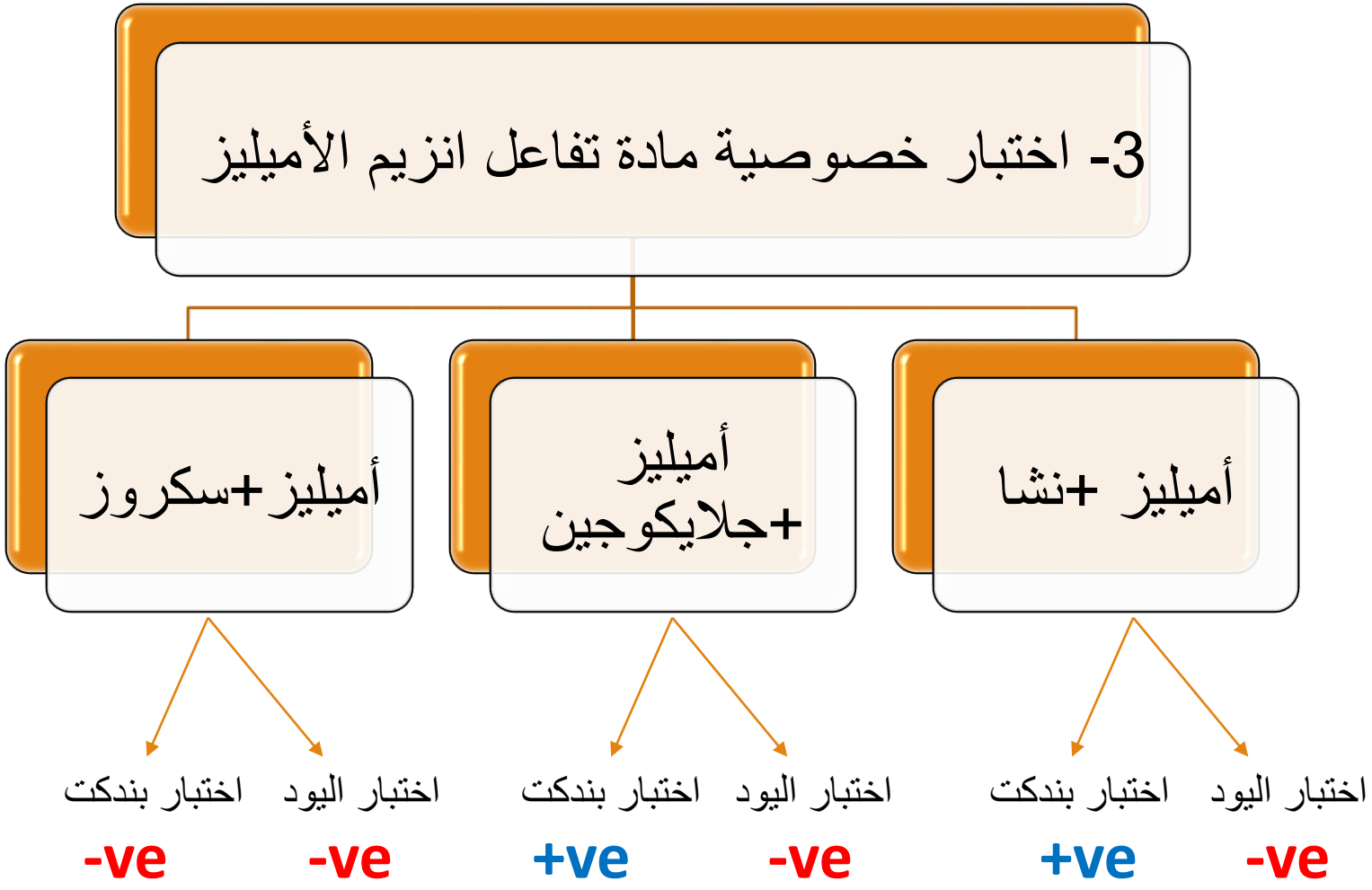
النظرية العلمية للتجربة:

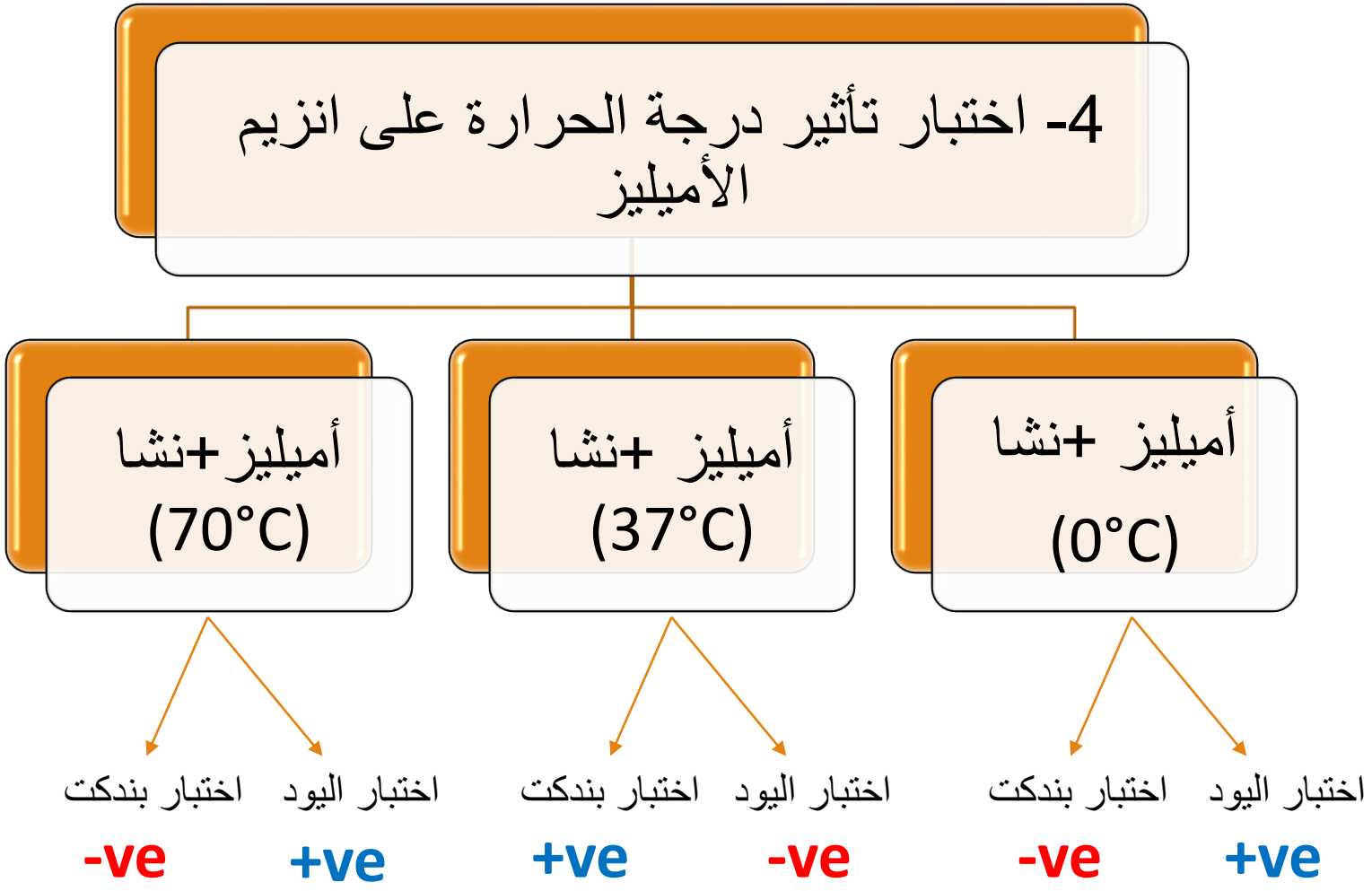
يتم تحضير مستخلص خام من إنزيم الاميليز من اللعاب ، والأس الهيدروجيني الأمثل لنشاطه هو 6.7 ونختبر بقاء النشا أو اختفاءه ، وكذلك نختبر ظهور الجلوكوز من عدمه، وسبق أن درسنا اختبار اليود لفحص وجود النشا ، واختبار بنديكت للسكر الأحادي المختزل .



يجرى اختبار اليود لمعرفة بقاء النشا من اختفاءه ، واختبار بندكت بمعرفة ظهور الجلوكوز من عدمه.


1- اختبار الطبيعة الكيميائية للأميليز
أميليز +نشا
أميليز +نشا+ تربسن
أميليز +نشا+ TCA
اختبار اليود
اختبار بندكت
+ve
-ve
اختبار اليود
اختبار بندكت
+ve
-ve
اختبار اليود
اختبار بندكت
-ve
+ve


3- اختبار خصوصية مادة تفاعل انزيم الأميليز
أميليز +نشا
أميليز +جلايكوجين
أميليز+سكروز
اختبار اليود
اختبار بندكت
-ve
+ve
-ve
اختبار اليود
اختبار بندكت
-ve
+ve
-ve
اختبار اليود
اختبار بندكت
-ve
-ve

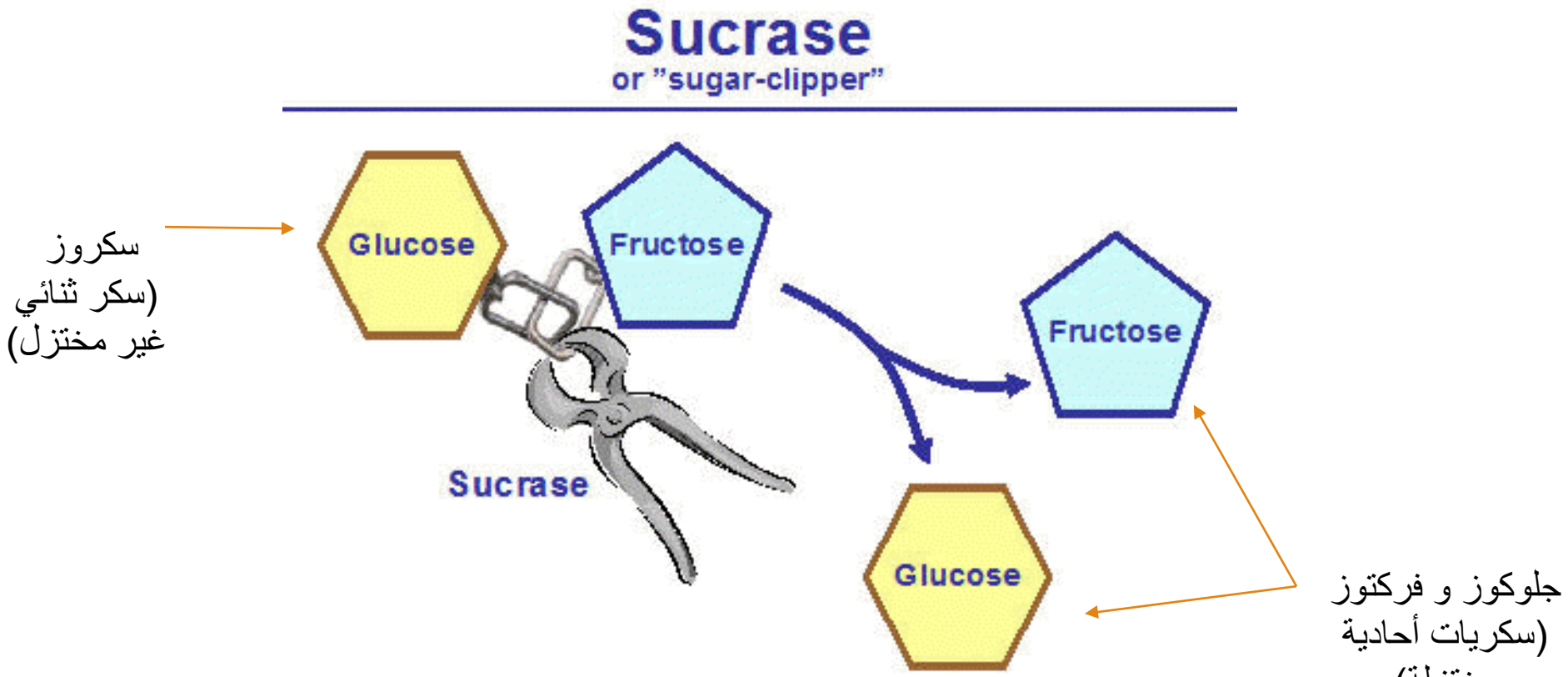

4- اختبار تأثير درجة الحرارة على انزيم الأميليز
أميليز +نشا (0°C)
أميليز +نشا (37°C)
أميليز+نشا (70°C)
اختبار اليود
+ve
اختبار بندكت
-ve
اختبار اليود
-ve
اختبار بندكت
+ve
اختبار اليود
+ve
اختبار بندكت
-ve

2- إنزيم السكريز (sucrase):

أحد إنزيمات العصارة المعويّة التي تفرزها خلايا الأمعاء الدقيقة ليقوم بتحليل السكروز (سكر ثنائي) إلى الجلوكوز والفركتوز (سكريات أحادية.)

النظرية العلمية للاختبار:

السكروز سكر ثنائي غير مختزل ناتج عن ارتباط سكرين احاديين مختزلين هما الجلوكوز والفركتوز، وعند تحلل السكروز بواسطه انزيم السكريزفإنه يكتسب خواص اختزاليه،ومن ثم يتم الكشف عن نشاط الإنزيم بالكشف عن تكوين سكريات مختزلة بواسطة تجربة بندكت.


Sucrase
or "sugar-clipper"
Glucose
Fructose
Sucrase
Fructose
Glucose
سكروز
(سكر ثنائي
غير مختزل)
جلوكوز و فركتوز
(سكريات أحادية
مختزلة)

الأسئلة:

اختبار الطبيعة الكيميائية للبولي فينول أكسيديز :

1- هل يمكن للإنزيم أن يحفز التفاعل الكيميائي دون وجود عامله المساعد ؟ ادعمي إجابتك من خلال تجربة في المعمل؟

اختبار خصوصية المادة الأساس (أو المتفاعلة):

1- يحفز إنزيم البولي فينول أوكسيديز عملية الأكسدة للمواد الكيميائية التي تحتوي على .....

اختبار تأثير الحرارة على نشاط بولي فينول أوكسيديز:

1- لماذا يفقد الإنزيم نشاطه عند درجات الحرارة عالية جداً ؟

الكشف عن الطبيعة الكيميائية للإنزيمات :

1- لماذا تعطي الانزيمات نتيجة إيجابية مع اختبار بيوريت؟