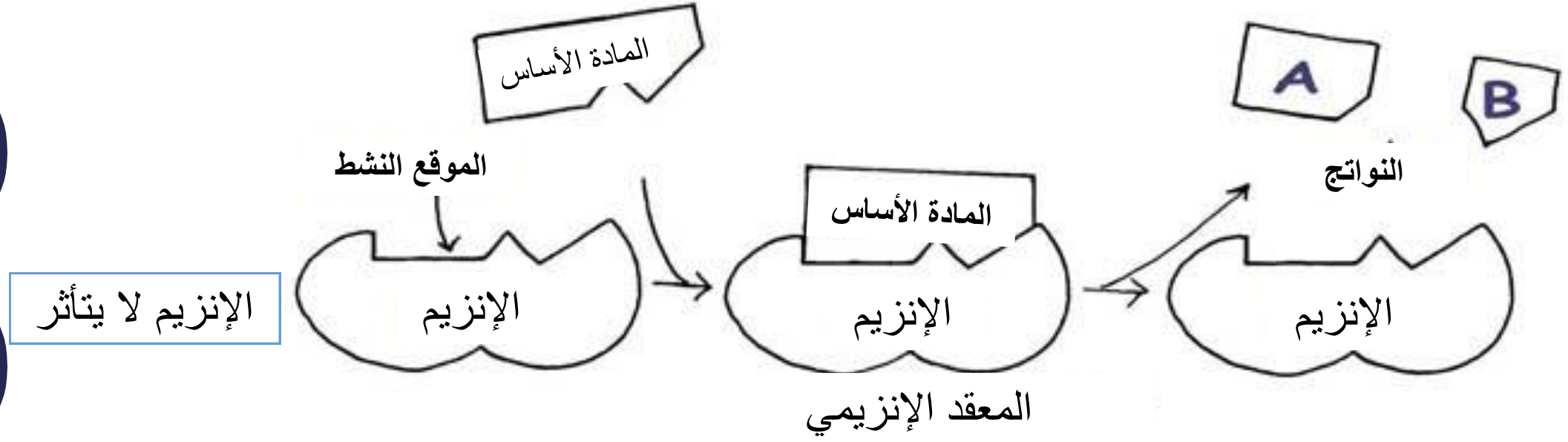
المعمل (٥)

الإنزيمات Enzymes

ما هي الإنزيمات (Enzymes) ؟

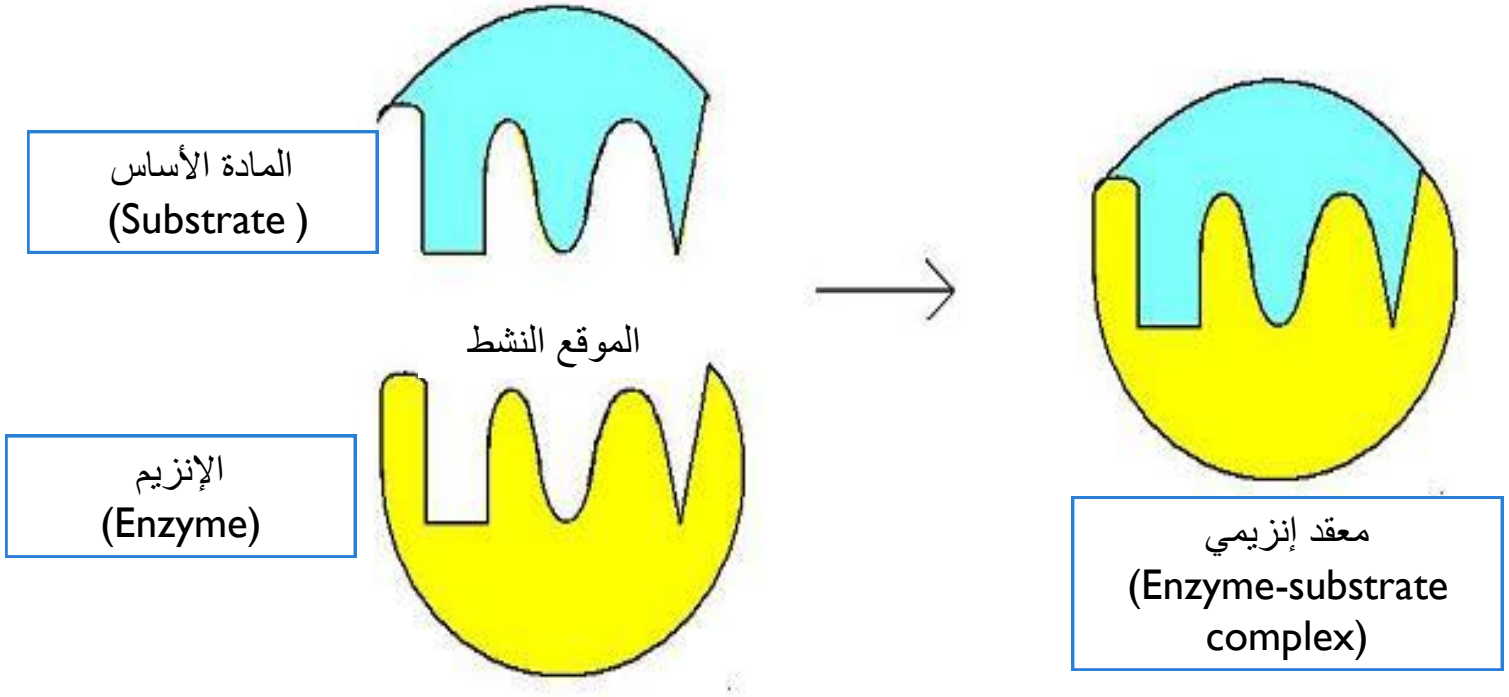
- **الإنزيمات** هي نوع من أنواع البروتينات، تعمل على (تسريع) التفاعلات الكيميائية داخل الخلية وتنظيمها بدقة بحسب حاجة الخلايا.
- فالإنزيمات عوامل مساعدة عضوية حيوية تصنع داخل الخلية ، تقوم بعملها من خلال **تحفيز التفاعلات** داخل الخلية بطريقة «تخصصية» .

- ملاحظة: إن عملية التنشيط التي يقوم بها الإنزيم تعني **أن الإنزيم لا يتفاعل بنفسه، ولا يستهلك خلال التفاعل.**



الموقع النشط للإنزيم و المادة 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 آن يرتبط بمادة معينة تسمى المادة الأساس (Substrate) مكوناً ما يسمى بالمعقد الإنزيمي (ES).

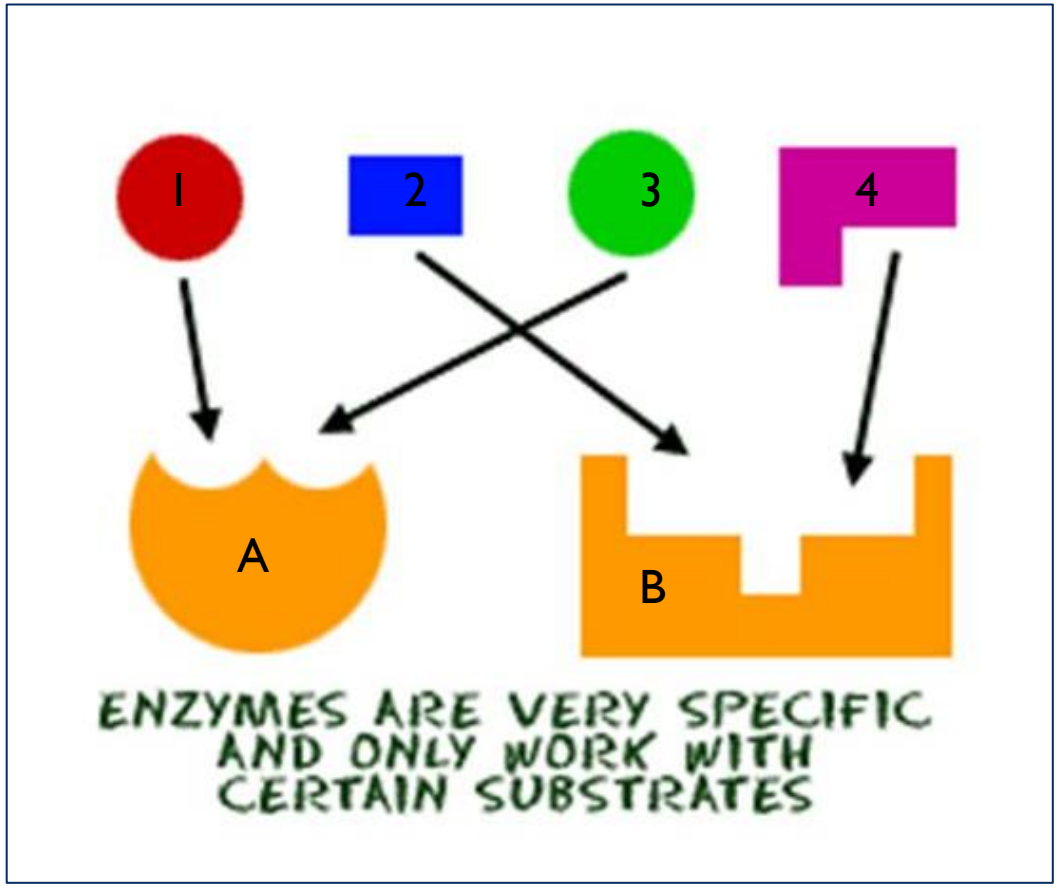


التفاعل الإنزيمي :

التفاعلات الإنزيمية تتضمن تكوين وسيط هو مركب E-S

E+S ⟷ ES ⟷ E+ P

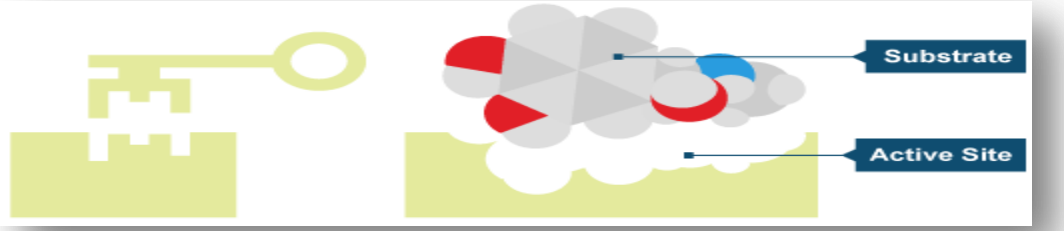
المادة الأساس+ الإنزيم | مركب وسيط | الناتـــج + الإنزيم

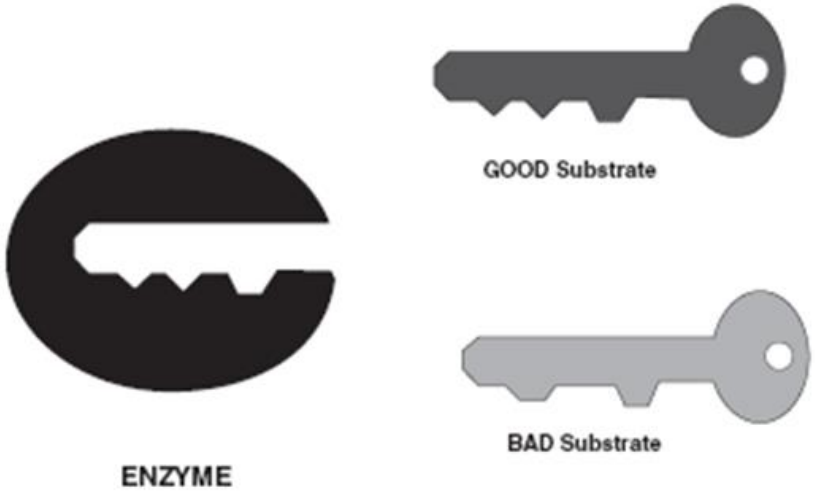


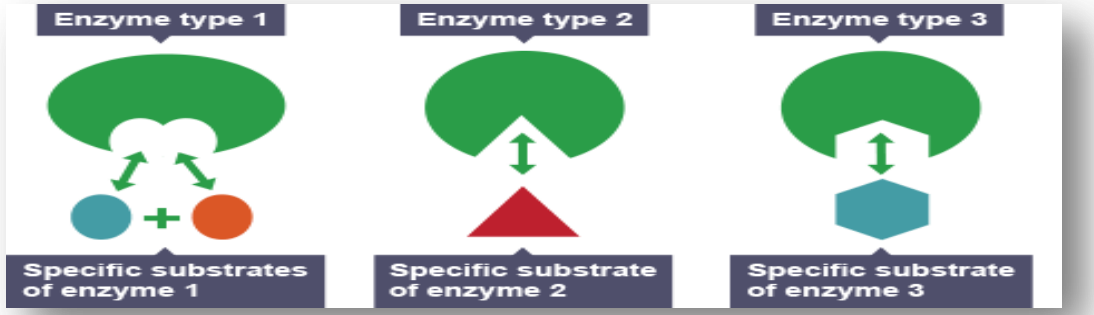
درجة التخصص للإنزيم تتفاوت من إنزيم لآخر.

كيف يمكن تفسير خصوصية الإنزيم للمادة الأساس:

- **فرضية القفل والمفتاح :** تفترض أن الشكل الثلاثي الأبعاد لسطح الموقع النشط مكمل ومطابق لشكل المادة الأساس.





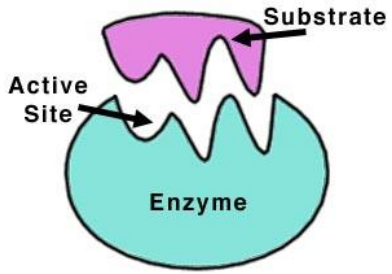


أنواع الإنزيمات من حيث التركيب :

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

١- إنزيمات بسيطة (Simple enzymes):
وهي كأي بروتينات بسيطة عبارة عن سلسلة من الأحماض الأمينية المتتالية (ولا تحتوي على جزء غير بروتيني).

٢- 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.



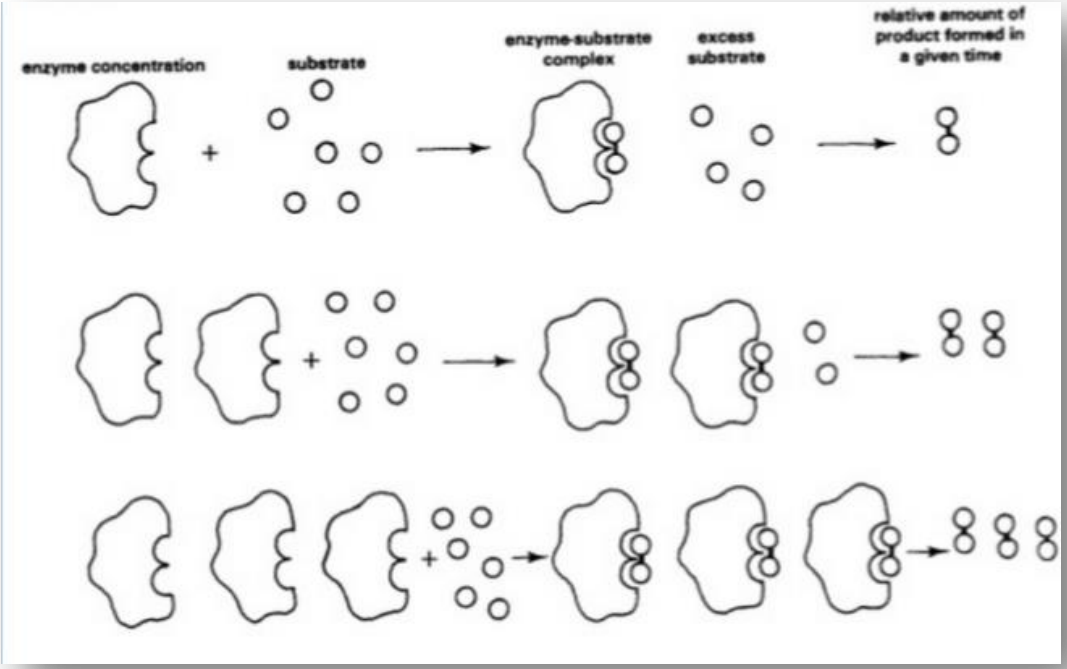
العوامل المؤثرة على نشاط الإنزيمات

- تركيز الإنزيم. (علاقة طردية)
- تركيز المادة الأساس. (علاقة طردية)
- درجة الحرارة.
- درجة الأس الهيدروجيني للوسط (قيمةpH).
- وجود مواد مثبطة. (علاقة عكسية)

العوامل المؤثرة على نشاط الإنزيم :

١- تركيز الإنزيم

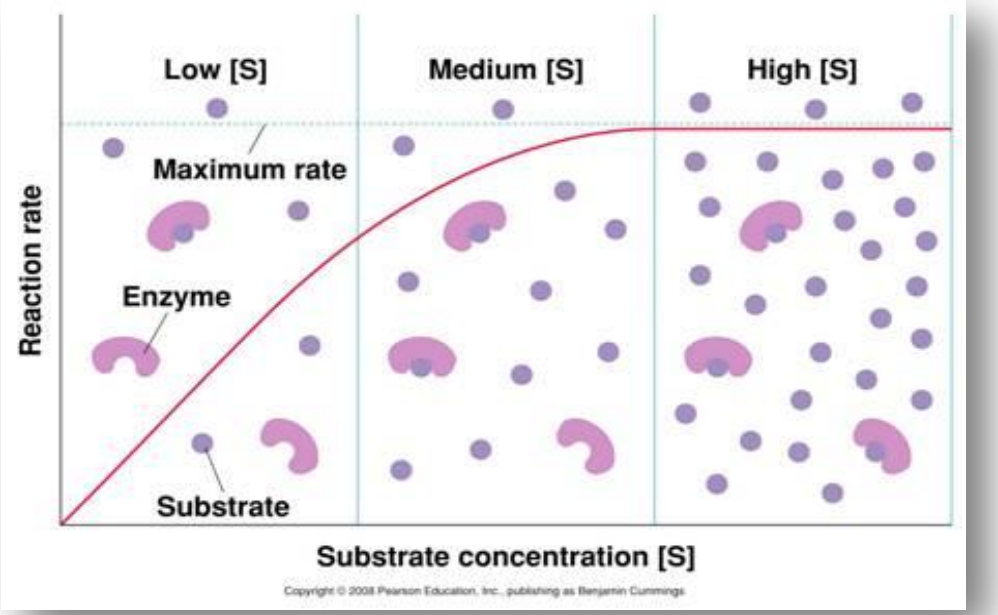
تزيد سرعة التفاعل بزيادة تركيز الإنزيم (علاقة طردية).



العوامل المؤثرة على نشاط الإنزيم :

٢- تركيز المادة الأساس (Substrate) التي يعمل عليها ذلك الإنزيم

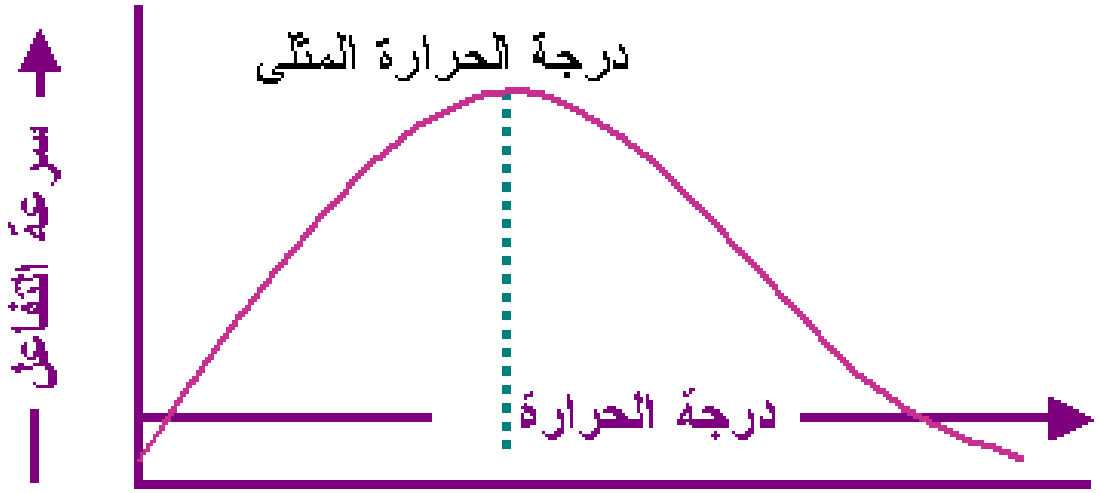
كلما زاد تركيز المادة الأساس زادت سرعة التفاعل الإنزيمي. (علاقة طردية).



العوامل المؤثرة على نشاط الإنزيم :

٣ـ درجة الحرارة التي يحدث فيها التفاعل

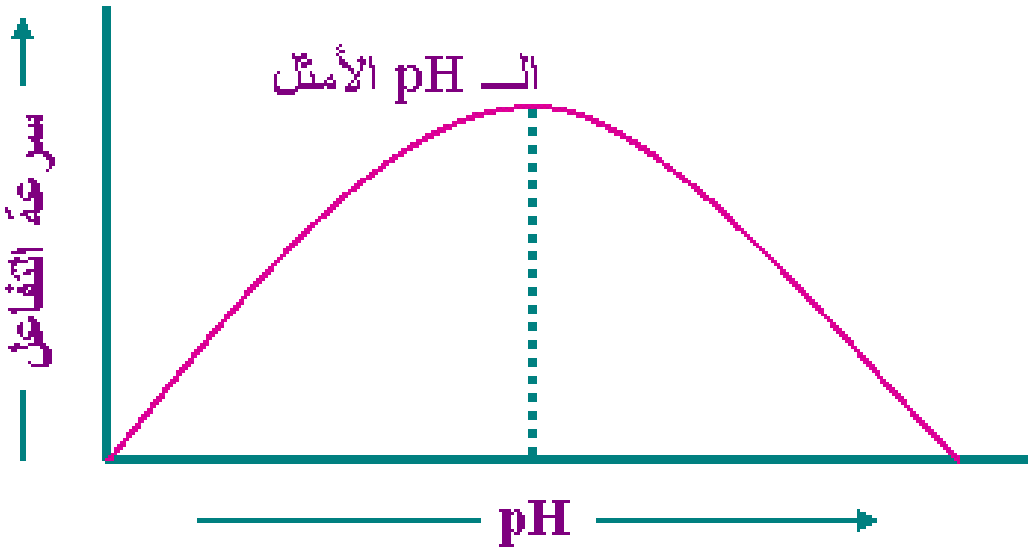
لكل إنزيم درجة حرارة مثلى تختلف عن الآخر ، مثال ذلك: معظم إنزيمات جسم الإنسان تعمل عند درجة حرارة ٣٧ درجة مئوية.



العوامل المؤثرة على نشاط الإنزيم :

٤- درجة الأس لهيدروجيني للوسط (قيمة pH)

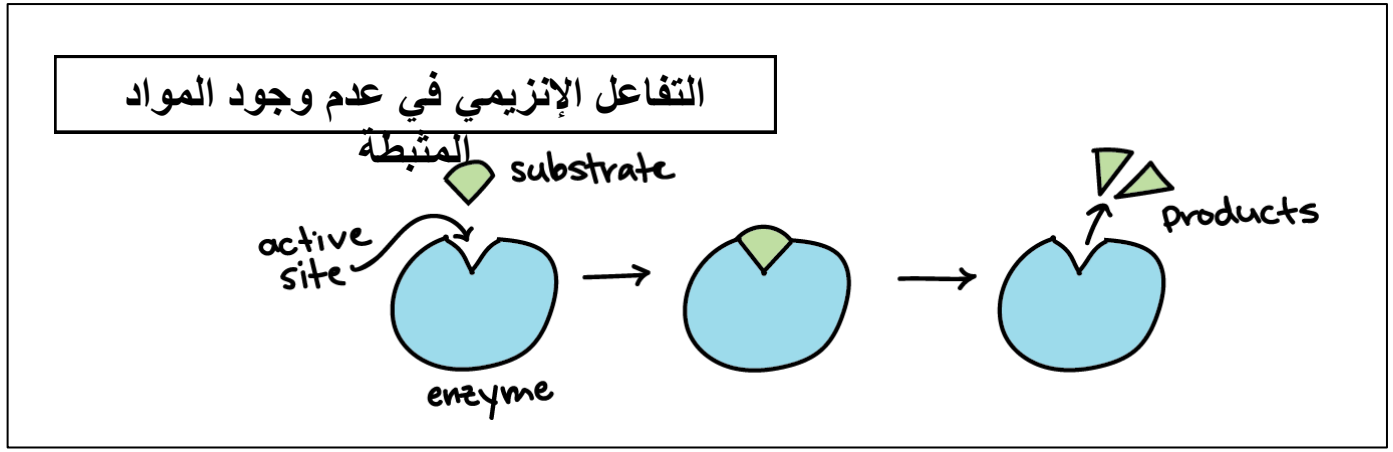
لكل إنزيم قيمة pH مثلى تختلف عن الآخر تعتمد على الوسط الذي يعمل فيه الإنزيم، مثال ذلك: إنزيمات المعدة تعمل عند pH=2.



العوامل المؤثرة على نشاط الإنزيم :

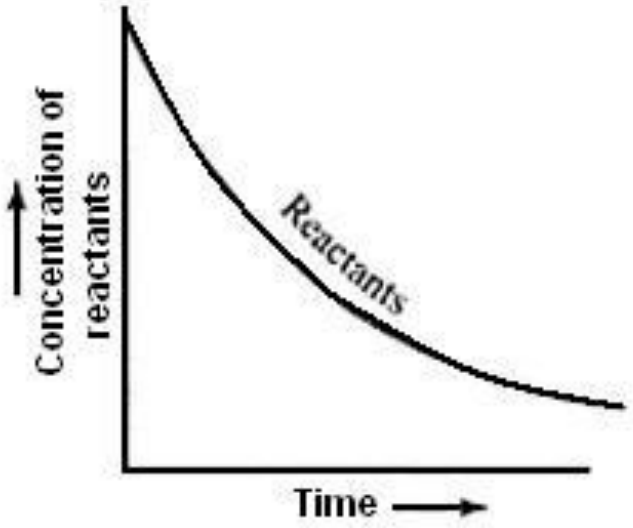
٥- وجود مواد مثبطة (Inhibitors)

تعيق المواد المثبطة عمل الإنزيم أو تقلل من نشاطه الحيوي (علاقة عكسية).

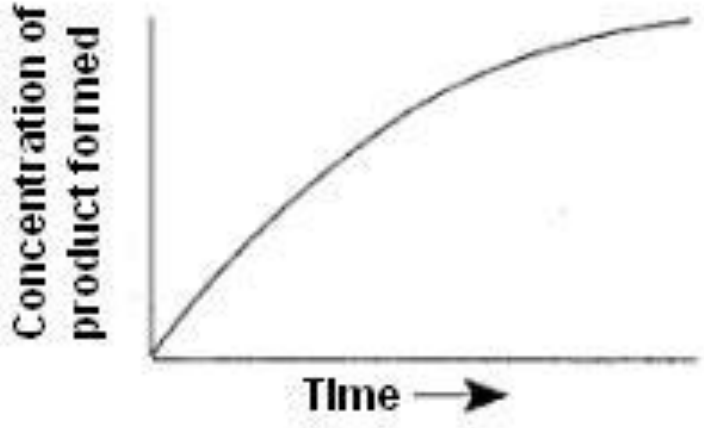


مبدأ دراسة نشاط الإنزيمات بطريقة عملية:

- 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

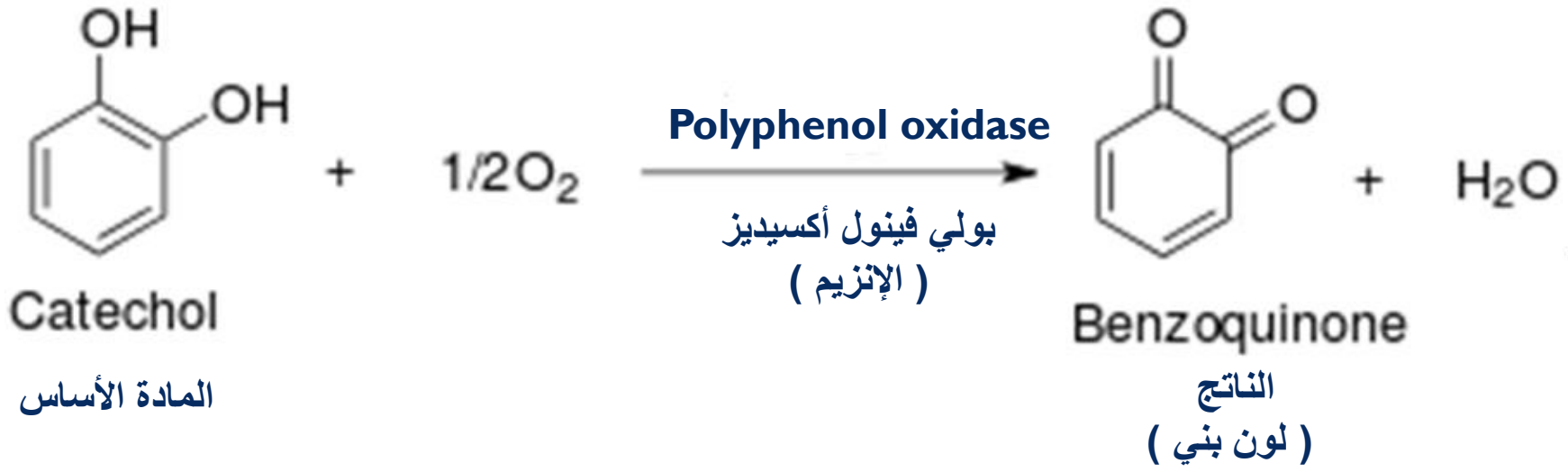


ظهور نواتج التفاعل أو زيادتها

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 ٦.٧ والدرجة الحرارة المثلى هي 37°C.

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



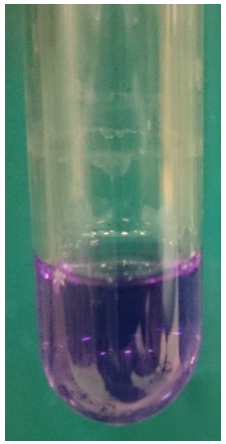
الاختبارات الوصفية للكشف عن الإنزيمات (Qualitative tests of Enzyme activity)

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

أولًا: الكشف عن الطبيعة الكيميائية للإنزيمات :

النظرية العلمية للاختبار:

من المعلوم سابقاً أن الإنزيمات هي من أنواع البروتينات ، وفي دراستنا للبروتينات تعرفنا على الكاشف العام 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 ١ مل من المستخلص الإنزيمي.
- ضعي ٢ مل من محلول بيوريت.

النتائج:

الأنبوبة	الاستنتاج
مستخلص إنزيمي + بيوريت	

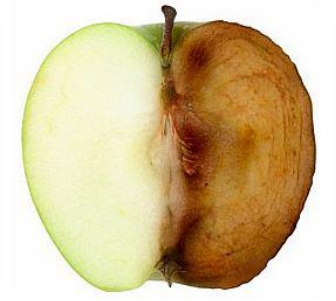
المناقشة:

اكتبي تعليقك على كل نتيجة حصلتي عليها مع ذكر السبب.

ثانيًا: اختبار النشاط الإنزيمي للبولي فينول أكسيديز :

النظرية العلمية للاختبار:

تفاعل الأكسدة والاختزال يصاحبه تغير في اللون، تفاعل إنزيم البولي فينول أكسيديز نصادفه كثيراً في الطبيعة و هو المسؤول عن **اللون البني** الذي يظهر على البطاطا و بعض الفواكه بعد تقشيرها و ذلك لتكون المادة الناتجة من الأكسدة و هي quinon.

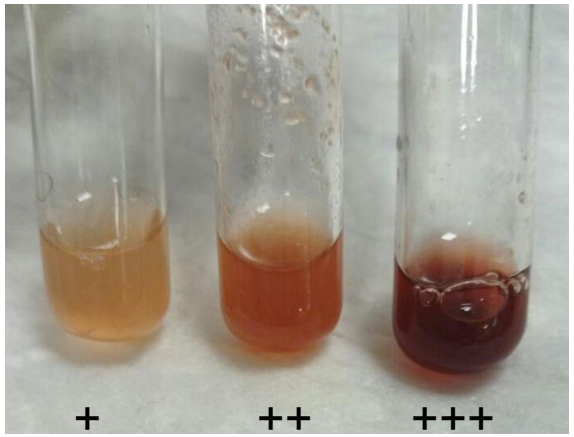


سنتابع في هذه التجربة تطور التفاعل الإنزيمي بطريقة بسيطة وهي **التغير في اللون**.

و كثافة اللون تتناسب طردياً مع نشاط الإنزيم،

(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)

١٥ نقطة من المستخلص الإنزيمي + ١٥ نقطة من الكاتيكول (المادة الأساس).

الأنبوبة B :

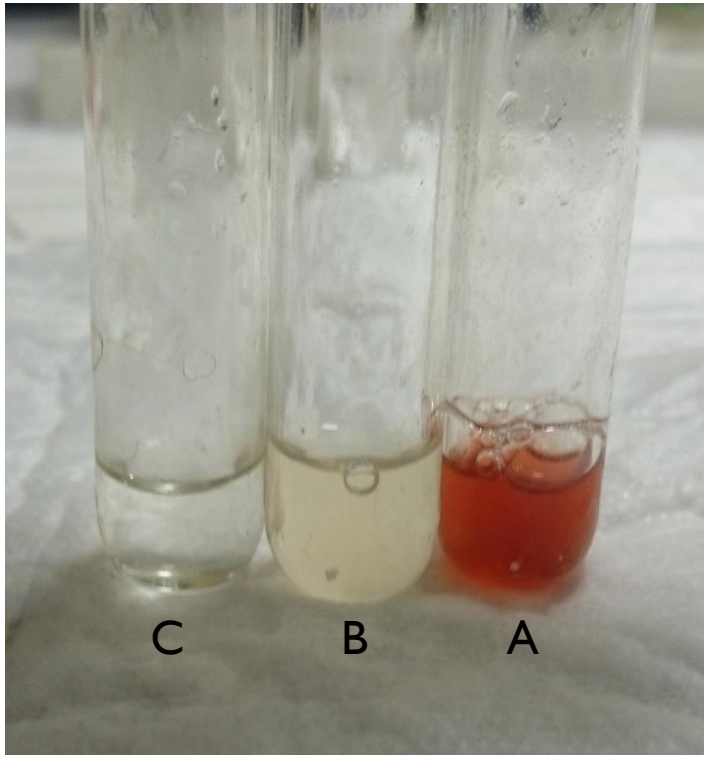
١٥ نقطة من المستخلص الإنزيمي + ١٥ نقطة من الماء المقطر.

الأنبوبة C :

١٥ نقطة من الكاتيكول + ١٥ نقطة من الماء المقطر.

- ضعي الأنابيب في حمام مائي عند ٣٧ °C.
- رجي كل أنبوبة لمدة ٥ 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.

ثالثًا: 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 (TCA)** (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 أربع أنابيب A,B,C,D

الأنبوبة A :

١٥ نقطة من المستخلص الإنزيمي + ١٥ نقطة من الكاتيكول.

وضعيها في حمام مائي عند ٣٧ ° C لمدة ١٠ دقائق واستخدميها كمقياس (Control).

الأنبوبة B :

١٥ نقطة من المستخلص الإنزيمي + ١٥ نقطة من التربسن(Trypsin).

رجي الأنبوبة جيدا ثم أضيفي بعد ذلك ١٦ نقطة من الكاتيكول وضعيها في حمام مائي عند ٣٧ ° C لمدة ١٠ دقائق ، قارني بالأنبوبة A.

الأنبوبة C :

١٥ نقطة من المستخلص الإنزيمي + ١٥ نقطة من ثلاثي كلوريد حمض الخليك (TCA).

رجي الأنبوبة جيداً ثم انتظري ٥ دقائق ثم أضيفي ١٥ نقطة من الكاتيكول ، وضعيها في حمام مائي عند ٣٧ ° C لمدة ١٠ دقائق ، قارني بالأنبوبة A.

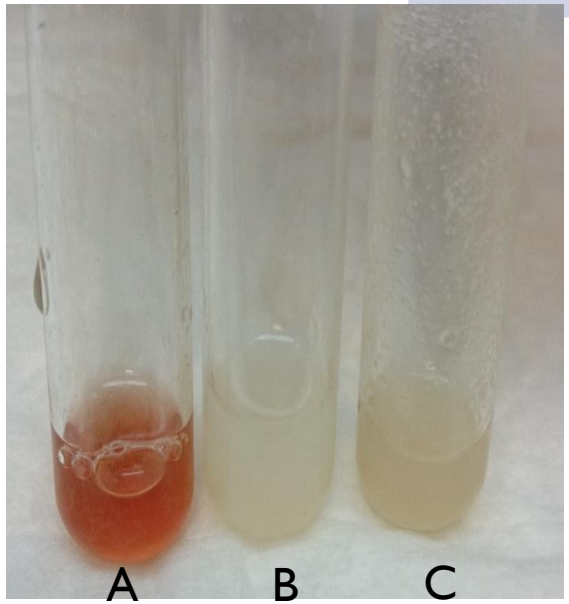
الأنبوبة D :

١٥ نقطة من المستخلص الإنزيمي + بضعة بلورات من Phenyl thiourea

استمري بالرج لمدة ٥ دقائق وبعد ذلك أضيفي ١٥ قطرة من الكاتيكول ، وضعيها في حمام مائي عند ٣٧ ° C لمدة ١٠ 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.

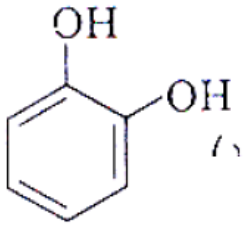
رابعًا: اختبار خصوصية المادة الأساس (أو المتفاعلة):

النظرية العليمة للاختبار:

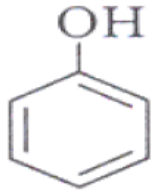
تقوم الإنزيمات بتحفيز التفاعلات بطريقة تخصصية، أي أن كل إنزيم يقوم بتنشيط تفاعل محدد أو أكثر من خلال العمل على مادة معينة تسمى المادة الأساس أو مجموعة مواد متشابهة كيمائياً دون غيرها.

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.

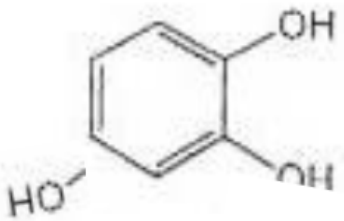
التركيب الكيميائي للثلاث مركبات متقاربة



Catechol



Phenol



Hydro quinone

طريقة العمل :

حضري أربع أنابيب A,B,C,D

الأنبوبة A :

١٥ نقطة من المستخلص الإنزيمي + ١٥ نقطة من الكاتيكول.

الأنبوبة B :

١٥ نقطة من المستخلص الإنزيمي + ١٥ نقطة من الفينول.

الأنبوبة C :

١٥ نقطة من المستخلص الإنزيمي + ١٥ نقطة من الهيدروكوينون.

← رجي الأنابيب وضعيها في حمام مائي عند ٣٧ ° C لمدة ٥ دقائق.

النتائج:

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

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

المناقشة:

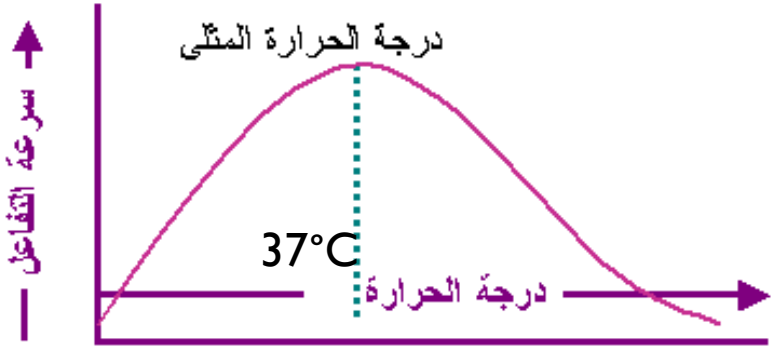
اكتبي تعليقك على كل نتيجة حصلتي عليها مع ذكر السبب.

خامسًا: 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).

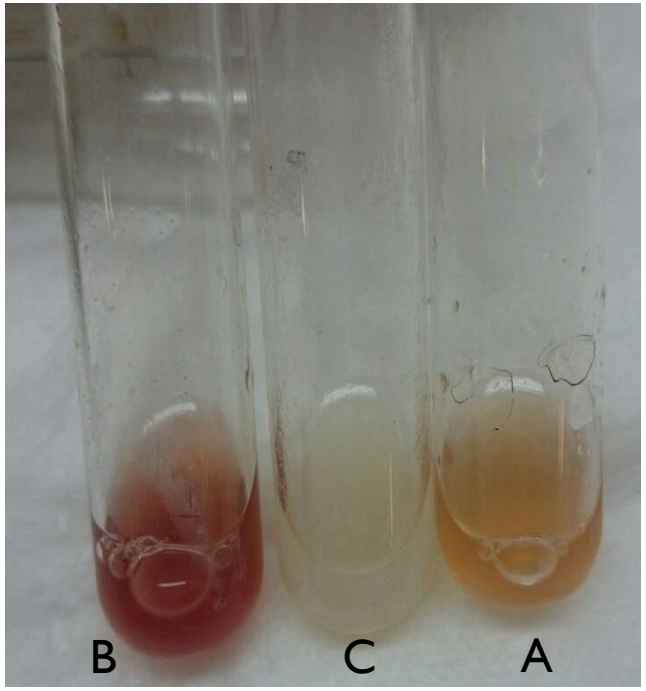
الدرجة الحرارة المثلى للبولي فينول أوكسديز هي 37°C.



طريقة العمل :

حضري أربع أنابيب A,B,C
أضيفي ١٥ نقطة من المستخلص الإنزيمي وضعيها في حمام مائي لمدة ١٠ دقائق عند:
الأنبوبة A :
٠ °C
الأنبوبة B :
٣٧ °C
الأنبوبة C :
٩٠ °C

- أضيفي ١٥ نقطة من الكاتيكول في كل أنبوبة مع الرج.
- انتظري ١٠ دقائق ثم أفحصي الأنبوبة (دون إخراجها من الحمام المائي).



النتائج:

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

المناقشة:

اكتبي تعليقك على كل نتيجة حصلتي عليها مع ذكر السبب.

الأسئلة

اختبار النشاط الإنزيمي للبولي فينول أكسيديز :

١- تتم دراسة النشاط الإنزيمي عملياً عن طريق تتبع :

..... أو .....

اختبار الطبيعة الكيميائية للبولي فينول أكسيديز :

١- هل يمكن للإنزيم أن يحفز التفاعل الكيميائي دون وجود عامله المساعد ؟ دعمي إجابتك مع خلال تجربة في المعمل؟

اختبار خصوصية المادة الأساس (أو المتفاعلة):

١- لماذا تختلف الخصوصية تجاه المادة الأساس من إنزيم لآخر ؟

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

اختبار تأثير الحرارة على نشاط بولي فينول أوكسيديز:

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

الكشف عن الطبيعة الكيميائية للإنزيمات :

١- الكاشف العام على البروتينات هو اختبار .....

تم بحمد الله ....