# ٦- الانزيمات Enzymes

الاستاذ الدكتور/ محمد محمود يوسف

## مقدمة :

ان التفاعلات الكيماوية فى الانظمة الحيوية ـ تحدث فى غياب عوامل مساعدة catalysts، وهذة عبارة عن بروتينات متخصصة تعرف بالانزيمات enzymes وهذا الاسم مشتق من اللغة اللاتينية فالمقطع en يعنى "فى" والمقطع zyme يعنى الكائن الحى. وقد استخدم الاسم لأول مرة بواسطة Kuhne فى عام ١٨٧٨ لوصف مواد توجد فى الخلية الحية و تساعد على التخمر. والسمة العامة والأساسية التى تميزالانزيمات هى قدرتها على تحفيز (تنشيط) التفاعل وكذا تخصصها Specificity فى تحفيز تفاعل أو سلسلة تفاعلات محددة دون غيرها ، بمعنى أن كل انزيم يحفز (ينشط) تفاعلا معينا وبطريقة منتظمة. كذلك فان بعض الأنزيمات تشترك فى عمليات تحول الطاقة بصورها المختلفة. وبعد تنقية الانزيمات فانة يتم استخدامها فى دراسة والتعرف على ميكانيكية التفاعلات الميتابوليزمية وطرق التحكم فيها، وكذلك فانة يمكن استخدام المستلخصات الانزيمية فى عمليات التخليق الصناعى لبعض الهرمونات والعقاقير الطبية .

وفى الحقبة الأخيرة فلقد حدث تقدم ملحوظ فى تكنولوجيا الانزيمات enzyme technology حيث يتم استخدام الانزيمات فى عديد من التطبيقات الصناعية، ولقد ساعد على احراز هذا التقدم استخدام الانزيمات المثبتة immobilized enzymes (تثبيت الانزيم على دعامة خاملة داخل أعمدة مما يمكن من استخدام الانزيم بطريقة مستمرة ومتكررة ، ومن ثم سهولة اجراء التفاعل الانزيمى وبتكلفة أقل) . ولعل انتاج شراب الذرة عالى الفركتوز High Fructose Corn Syrup (HFCS) يعد مثالا تطبيقيا ناجحا فى مجال تكنولوجيا الانزيمات المثبتة .

ولقد تبين أن محتوى سيرم الدم للانسان يتغير جوهريا نتيجة لحدوث حالات مرضية معينة، ومن ثم فان قياس مستوى بعض الانزيمات فى سيرم الدم يعد الان بمثابة طريقة هامة من طرق التشخيص diagnosis لبعض الأمراض ، فعلى سبيل المثال يعتبر انخفاض مستوى انزيمات

الليبيز lipase والأميلاز amylase والكولين استيراز esterase choline وارتفاع مستوى التربسين trypsin فى بلازما الدم تعتبر بمثابة مؤشرات لبعض أمراض الكبد .

**الانزيمات كعوامل مساعدة Enzymes as catalysts:**

تؤدى الانزيمات الى زيادة معدل حدوث التفاعلات الحيوية بنحو مليون مرة، ويمكن القول باستحالة حدوث معظم التفاعلات فى النظم الحيوية بدون مساعدة الانزيمات، وينطبق هذا القول حتى بالنسبة للتفاعلات البسيطة، فعلى سبيل المثال فان تفاعل تأدرت hydration ثانى اكسيد الكربون على بساطتة يتطلب وجود انزيم يحفزه .

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$

وغياب الانزيم يعني عدم اكتمال نقل غاز ثانى اكسيدالكربون من أنسجة الكائن الحى الى الدم ثم الى الهواء الخارجى، اما اذا تواجد انزيم الكربونيك أنهيدريز carbonic anhydrase وهو الأنزيم الذى يحفزالتفاعل المذكور فان كل جزىء من الانزيم يساعد على تأدرت ١٠^٥ جزىء من ثانىاكسيد الكربون فى زمن لايزيد عن الثانية الواحدة، ومعدل التفاعل المنشط بالانزيم يكون ١٠ ^٧ مرة قدرنظيره للتفاعل فى عدم وجود الانزيم

ولتفهم دور الانزيم كعامل مساعد يزيد من معدل حدوث التفاعل فاننا نعلم أنه فى التفاعل الكيماوى التالى :

$$A \underset{-1}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} B$$

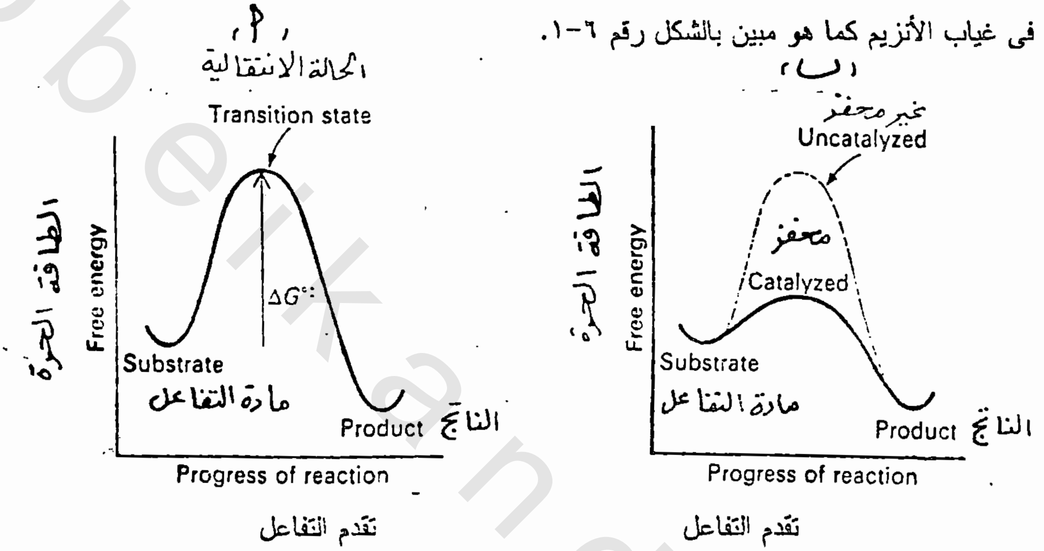
يحدث انتقال لمادة التفاعل (A) الى حالة تسمى بالحالة الانتقالية transition state لها مستوى طاقى أعلى عن نظيره لكل من مادة التفاعل (A) أو ناتج التفاعل (B). ومعدل التفاعل الأمامى (تفاعل رقم ١) يعتمد على درجة الحرارة ومدى الاختلاف فى الطاقة الحرة free energy لمادة التفاعل وهى فى حالتها الطاقية العادية وطاقتها وهى فى الحالة الانتقالية، وهذا الفرق فى الطاقة يعرف بطاقة التنشيط الحرة free energy of activation ويرمز لها بالرمز $\triangle G^*$

بمعنى أن :

$$\triangle G^* = G \text{ transition state} - G \text{ substrate}$$

الحالة الانتقالية　　　　مادة التفاعل

ويتناسب معدل التفاعل مع عدد الجزيئات التى لها طاقة حرة مساوية أو أعلى من قيمة $\Delta G^*$ ويزيد عدد هذه الجزيئات بزيادة درجة الحرارة. ويأتى الفعل التحفيزى للانزيمات من قدرتها على تقليل قيمة $\Delta G^*$ أى تقليل حاجز التنشيط وارتباط الأنزيم مع مادة التفاعل يؤدى الى تكوين معقد بينهما enzyme - substrate complex له طاقة انتقالية أقل عما لوحدث التفاعل فى غياب الأنزيم كما هو مبين بالشكل رقم ٦-١.



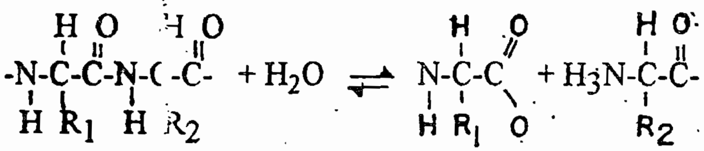

شكل ٦-١: (أ) يوضح تعريف طاقة التنشيط الحرة $\Delta G^*$

(ب) وجود الانزيم يسرع من حدوث التفاعل عن طريق تقليل قيمة $\Delta G^*$

**الانزيمات كعوامل مساعدة عالية التخصص :**

Enzymes as highly specific catalysts:

كما سبق القول فبالاضافة الى كون الانزيمات عوامل مساعدة فانها تتسم بتخصصها فى تحفيز أو تنشيط تفاعل محدد تشترك فيه مادة (مواد) تفاعل محددة، ولتوضيح ذلك نأخذ الانزيمات المحللة للبروتين proteolytic enzymes كمثال، فمن المعروف أن هذه الانزيمات تحفز تفاعل التحلل المائى للرابطة الببتيدية:



ببتيد مركب كربوكسيلى مركب أمينى (A)

Peptide Carboxyl component Amino component

obeikandl.com

ومعظم الانزيمات المحللة للبروتين يمكنها أيضا تحفيز تفاعلات تحلل رابطة الاستر:

$$R_1-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O-R_2 + H_2O \dashrightarrow R_1-C\begin{matrix} {}^{\nearrow\!\!\!\!\!/}O \\ \searrow O^- \end{matrix} + HO-R_2 + H^+$$

| أستير | حامض | كحول |
|---|---|---|
| Ester | Acid | Alcohol |

وتتفاوت الأنزيمات المحللة للبروتين كثيرا من حيث درجة تخصصها لمادة التفاعل فعلى سبيل المثال فان انزيم الستلزين subtilisin (وهو يحضر من مصدر بكتيرى) لايتطلب وجود تركيب كيماوى محدد للسلسلة المتصلة بالرابطة الببتيدية، فى حين ان انزيم التربسين trypsin فلكى يحفز من التحلل المائى للرابطة الببتيدية فانه يتحتم أن تكون هذه الرابطة متصلة من جانبها الكربوكسيلى بأى من الحمضين الأمينين ليسين او ارجنين، اما انزيم ثرومبين thrombin (وهو احد الانزيمات المساعدة على تجلط الدم) فهو أكثر تخصصا من التربسين اذ يتطلب هذا الأنزيم وجود حمض الأرجنين على الجانب الكربوكسيلى للرابطة الببتيدية وحمض الجليسين على الجانب الأمينى لها لكى يتم لانزيم الثرومبين تحفيز تحللها مائيا (شكل ٦-٢).

شكل ٦-٢: تخصص انزيم التربسين (الشكل الأيمن) وانزيم الثرومبين (الشكل الايسر) الخط الرأسى يمثل مكان حدوث الكسر فى الجزىء.

ولقد حاولنا فى هذه العجالة تفسير مفهوم تخصص الانزيمات وسنتحدث عن مستويات التخصص الأنزيمى المختلفة فيما بعد.

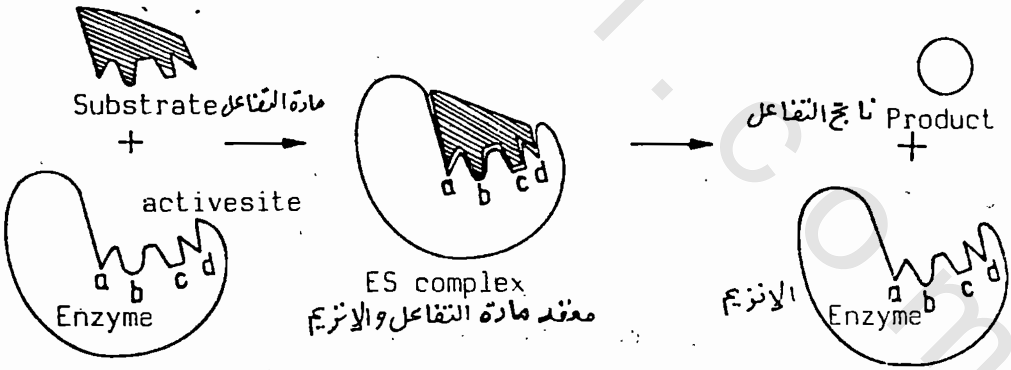
obeikandi.com

## المراكز الفعالة للأنزيم Active sites of enzyme:

فى التفاعلات الأنزيمية يرتبط الانزيم مع مادة التفاعل لينشطها مكونا معقد الانزيم ومادة التفاعل والذى يتحول فى خطوة تالية الى ناتج أو نواتج التفاعل ويتحرر الانزيم ويكون فى مقدوره تكرار تحفيز التفاعل بمعنى أن:

$$E+S \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} (ES) \xrightarrow{K_3} P+E$$

حيث: E الانزيم، S مادة التفاعل، (ES) معقد مادة التفاعل والانزيم، P ناتج التفاعل. والتفاعلات الانزيمية تتم فى الاتجاهين الامامى والخلفى أى أنها تفاعلات عكسية reversible reactions ولكل أنزيم تخصصه الذى يحدده البناء الكيماوى للبروتين الأنزيمى، اذ تتواجد مراكز active sites على سطح الانزيم. والمراكز الفعالة ماهى الا مجاميع وظيفية فى الاحماض الأمينية المكونة للبروتين الأنزيمى وهى لاترتبط الا بمادة تفاعل معينة تحتوى على مجاميع وظيفية يمكنها الارتباط بهذه المراكز الفعالة تماما كما أن المفتاح الواحد لايفتح الا كالونا واحدا lock and key كما هو مبين بشكل رقم (٦-٣).




شكل (٦-٣) شكل توضيحى يبين مفهوم التخصص الانزيمى والمراكز الفعالة على سطح الأنزيم.

ومما هو جدير بالذكر أن حجب أو استبدال أو تغيير مكان المراكز الفعالة الموجودة على سطح الأنزيم يؤدى الى وقف (تثبيط) النشاط الأنزيمى اذ أن هناك بعض الانزيمات المحللة

للبروتين كالببسين pepsin يمكن ازالة ٦٠٪ من الجزىء حول المراكز الفعالة للانزيم دون ما تأثير على نشاطه فى حين أن المساس بالمراكز الفعالة يؤدى الى فقد الانزيم لنشاطه .

**تقسيم وتسمية الأنزيمات Classification and nomenclature of enzymes**

أتبعت عدة قواعد لتسمية الانزيمات فيما مضى ، بعض هذه الاسماء يدل على نوع التفاعل مثل انزيمات التحلل المائى hydrolysis والتى تسمى hydrolases أوتشير الى مادة التفاعل مثل الانزيمات المحللة للبروتينات والتى تسمى proteases والمحللة لليبيدات والتى سميت lipases وكما هو ملاحظ فان كل الأسماء تنتهى بمقطع ase للتدليل على الأنزيم .

وقد وضع الاتحاد الدولى للكيمياء الحيوية International Union of Biochemistry (IUB) فى عام ١٩٥٤ قواعد عامة لتسمية الانزيمات بعد ان تزايد عدد ما أكتشف منها، وبمقتضى هذا التقسيم فان الانزيمات تقسم الى ستة اقسام رئيسية يضم كل قسم منها أنزيمات تحفز تفاعلات كيماوية محددة ويتم تقسيم كل قسم الى مجموعات يتم فيها تحديد التفاعل بدقة وتقسيم المجموعةالى تحت مجموعة تحدد فيها مادة التفاعل ثم رقم خاص بكل أنزيم ، ومن ثم فانة يمكن التعبير عن الانزيم باربعة أرقام ، يشير الاول منها الى رقم القسم والثانى الى مجموعة محددة لنوع التفاعل والثالث يدل على مادة التفاعل أما الرابع فخاص بالانزيم نفسه وبذا يمكن تحديد الانزيم دون أى تداخل مع غيرة من الانزيمات. والاقسام الستة التى تقسم على أساسها الانزيمات هى على الترتيب :

**١- أنزيمات الأكسدة والاختزال Oxidoreductases:**

ويضم هذا القسم كل الانزيمات التى تحفزتفاعلات الأكسدة والاختزال وتقسم الى تحت مجاميع تبعا للمجموعة المعطية والمجموعة المستقبلة للهيدروجين ويمكن التعبير عن هذا النوع من التفاعلات بالمعادلة التالية :

$$A-H_2 + B \overset{E}{\rightleftharpoons} A + BH_2$$

وكما هو معلوم فان هناك تلازما بين عمليتىالاكسدة والاختزال ففى هذا المثال أكسد المركب A فى حين اختزل المركب B . ومن أمثلة هذة الانزيمات الـ dehydrogenases . والانزيمات التى تتبع هذا القسم تأخذ رقم ١ وهو الرقم الدال على القسم وفقا للترتيب الذى وضعة الـ IUB وتبعا لنوع المجموعة التى يتم اكسدتها فانه يتم تحديد الرقم الثانى (رقم تحت القسم) اذ أن هناك مجاميع مثل:

1- CH - OH ,　　2- CH - CH,　　3- C = O,
4- $CH - NH_2$　　5- CH = NH.

يمكن اكسدتها ومن ثم فانة تبعا لطبيعة المجموعة التى تؤكسد يتم الترقيم لتحت القسم تبعا للمجموعات الكيماوية السابق ذكرها ولتوضيح ذلك نأخذ الامثلة التالية:

**المثال الاول :**

1.1.1.1 Alcohol; NAD oxido reductase
(Alcoholdehydrogenase).

وهذا الأنزيم يحفز التفاعل التالى :

$$\text{Alcohol} + NAD^+ \longrightarrow \text{Aldehyde or ketone} + NADH + H^+$$

وهذا الانزيم يعمل على مجموعة CH-OH كمجموعة معطية للاكترون electron doner ومن ثم فيرقم برقم تحت القسم الخاص بها .

**المثال الثانى :**

1.4.1.3 Glutamate : NAD (P) oxido reductase

هذا الانزيم يحفز نزع الهيدروجين (أكسدة) من االجلوتامات فى الكبد ويعمل $NAD^+$ أو $NADP^+$ كمستقبل للاكترون electron acceptor تبعا لهذا التفاعل:

$$\text{L- Glutamate} + H_2O + NAD(P)^+ \longrightarrow$$
$$\alpha\text{- Keto glutarate} + NH_4^+ + NAD(P) + H^+$$

وكما هو واضح من التفاعل فان الانزيم يعمل على المجموعة $CH\text{-}NH_2$ (المجموعة رقم ٤ فى ترتيب المجموعات التى تؤكسد ) ، ولذا فان رقم تحت القسم لهذا الانزيم يكون رقم ٤ ، وبديهى أن هناك مجاميع أو مركبات اخرى يمكن أكسدتها فعلى سبيل المثال يقوم أنزيم الكتاليز catalase بتحفيز استقبال فوق أكسيد الهيدروجين $H_2O_2$ للالكترون تبعا للتفاعل التالى:

$$H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2\,H_2O$$

ولهذا فان هذا الانزيم يرقم بالأرقام 1.11.1.6

**٢- انزيمات النقل Transferases**

وهى انزيمات متخصصة فى تحفيز التفاعلات التى يتم فيها نقل مجاميع كيماوية من جزىء لآخر ، وتقسم هذة المجموعة الى تحت مجموعات تبعا للتركيب العام للمجموعة التى يتم نقلها (مجموعة الأمين ، مجموعة فورمايل ، مجموعة اسيتايل ، مجموعة ميثايل . . الخ). ويمكن التعبير عن هذا النوع من التفاعلات بالمعادلة التالية:

obeikandi.com

$$A - G + B \underset{}{\overset{E}{\rightleftharpoons}} A + B - G$$

بمعنى أن المجموعة G تم نقلها من المركب A الى المركب B ومن أمثلة الانزيمات التى تندرج تحت هذا القسم انزيمات تفاعلات نقل مجموعة الأمين amino transferases وانزيمات تفاعلات نقل مجموعة الفوسفات phospho transferases وتحت الاقسام تحددها المجاميع الكيماوية التى يتم نقلها فهى اما مجموعة الدهيد أوكيتون أو أسيل أو الكيل أوجليكوسيد أوفوسفات أو مجاميع تحتوى على الكبريت، ولتوضيح طريقة ترقيم الانزيمات التى تندرج تحت هذا القسم نأخذ المثالين التاليين:

**المثال الاول:**

2.3.1.6- Acetyl CO A: Choline:O acetyl transferase (choline acyl transferase)

هذا الانزيم يحفز التفاعل التالي:

Acetyl- Co A + Choline ⟶ Co A + O-Acetyl choline

كما هو واضح من التفاعل فان الانزيم يحفز نقل مجموعة اسيتايل (ترتيبها الثالث فى النظام الذى وضعة الـ IUB ) ولهذا فان رقم تحت القسم يكون ٣.

**المثال الثانى:**

2.7.1.1. ATP: D-hexose 6 phosphate transferase

هذا الانزيم يحفز التفاعل التالى:

ATP + D-hexose ⟶ ADP + D-Hexose-6-phosphate

كما هو واضح فى التفاعل فان الانزيم يحفز نقل مجموعة الفوسفات (رقم ٧ فى ترتيب الـ IUB) ولذا فان رقم تحت القسم فىهذة الحالة يكون ٧.

**٣- انزيمات التحلل المائى Hydrolases**

يندرج تحت هذا القسم الانزيمات التى تحفز اضافة الماء بغية كسر رابطة معينة كالرابطة الجليكوسيدية أو الببتيدية أو الاسترية مثلا. ويتم تقسيم المجموعة الى تحت المجموعة تبعا لنوع الرابطة. ويمكن التعبير عن تفاعلات التحلل المائى بالمعادلة العامة التالية:

$$A - B + HOH \underset{}{\overset{E}{\rightleftharpoons}} AH + BOH$$

وبالاضافة الى الروابط سابقة الذكر والتى يمكن تحللها مائيا هناك انهيدريد الحامض ، الرابطة بين كربون وكربون ، الرابطة بين كربون وهالوجين ،الرابطة بين الفوسفور والنتروجين.

ولتوضيح طريقة ترقيم الانزيمات التابعة لهذا القسم نأخذ المثالين التاليين:

**المثال الاول :**

3.1.1.8 Acyl choline acyl-hydrolases

(Pseudocholine esterase)

هذا الانزيم يحفز التفاعل التالى:

$$\text{acylcholine} + H_2O \longrightarrow \text{Choline} + \text{acid}$$

**المثال الثانى:**

3.2.1.23 β- D-Galactoside galacto hydrolase

(β-Galactosidase)

وهذا الانزيم يحفز التفاعل التالى :

$$\beta\text{-D- Galactoside} + H_2O \longrightarrow \text{Alcohol} + \text{D - Galactose}$$

وكما هو واضح فان هذا الانزيم يحفز التحلل المائى للرابطة الجليكوسيدية التى جاء ترتيبها رقم ٢ فى نظام الـ IUB

وتجدر الاشارة الى أنه توجد عضيات بالخلية تسمى بالليسومات lysomes تحتوى على انزيمات التحلل المائى، وتلك العضيات تختلف عن الليوسوزيمات lysozymes وهى عبارة عن انزيمات التحلل المائى الموجودة فى السوائل الطبيعية كاللعاب والدموع واللبن ... الخ، وتعتبر هذه الانزيمات مسئولة عن تحلل البكتريا الموجبة لصيغة جرام وهى عبارة عن سلاسل من عديد الببتيد تتكون من نحو ١٢٩ حمض أمينى.

**٤- انزيمات الفصل والاضافة Lyases:**

يشتمل هذا القسم على الانزيمات التى تحفز فصل مجموعة كيماوية متصلة برابطة مزدوجة او اضافة مجموعة كيماوية الى هذة الرابطة وتقسم المجموعة الى تحت مجموعة تبعا لنوع الرابطة (رابطة بين كربون، كربون أو بين كربون وأكسجين أو بين كربون ونتروجين... الخ).

ويمكن التعبير عن هذا النوع من التفاعلات بالمعادلة العامة التالية :

$$\underset{\substack{|\\ C}}{X} - \underset{\substack{|\\ C}}{Y} \xrightarrow{\quad E \quad} X - Y + C = C$$

obeikandl.com

ويلاحظ أن هذة الانزيمات تحفز تفاعلات فصل المجموعات بميكانزم اخر يغاير ونظيره لعملية التحلل المائى مع ترك رابطة مزدوجة، ومن امثلة انزيمات هذا القسم نأخذ المثلين التاليين:

**المثال الاول :**

4.1.2.7. Ketose -1-phosphate aldehydelyase (Aldolase)

هذا الانزيم يحفز التفاعل التالى

Ketos-1 phosphate ⟶ Dihydroxy acetone phosphate + Aldehyde

**المثال الثانى :**

4.2.1.2.- Malate - hydrolyase (Fumarase).

وهذا الانزيم يحفز التفاعل التالى:

L-Malate ⟶ Fumarate + $H_2O$

**ه-انزيمات المشابهات Isomerases**

الانزيمات التى تتبع هذا القسم هى تلك التى تحفز تفاعلات المشابهات isomers سواء كانت مشابهات ضوئية optical isomers (D,L) أو هندسية geometrical isomers (سيس ، ترافس) أو وضعية positional isomers (الدهيد-كيتون) . وتقسم كل مجموعة الى تحت مجموعات تبعا للمركب أو المجاميع الكيماوية المشتركة فى التفاعل . وفى هذا النوع من التفاعلات يتم تحول المركب من مشابة ضوئى الى اخر أو من مشابة هندسى الى اخر ومثالها تحول الحمض الامينى الانين من المشابة الضوئى L الى المشابة الضوئى D بمساعدة انزيم alanine isomerase ، وكذلك فان الانزيم الذى يحفز التفاعل التالى:

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

يتبع أيضا انزيمات isomerases حيث يحفز نقل مجموعة الفوسفات داخل نفس الجزىء من الجلوكوز ، وللتفرقة بين مثل هذا الانزيم وتلك الانزيمات التى تساعد على تحول المركب من مشابة الى اخر فعادة تسمى الانزيمات التى تحفز تفاعلا مثل التفاعل المذكور انفا بالـ mutases ومن امثلة انزيمات هذا القسم نذكر المثالين التاليين :

obeikandi.com

**المثال الاول :**

5.2 1.3- All trans retinene II-cis trans isomerase

(Retinene isomerase)

وهو يحفز التفاعل التالى:

All trans- retinene ⟶ 11-cis retinene

**المثال الثانى:**

5.3.1.1. D-Glyceraldehyde 3 phosphate ketol isomerase

(Triose phosphate isomerase)

وهو يحفز التفاعل التالى:

D-Glyceraldehyde 3-phosphate ⟶ Dihydroxy acetone phosphate

**٦- انزيمات التخليق Ligases:**

وانزيمات هذا القسم تحفز تفاعلات ربط جزيئين معا ، وتستخدم فيها الروابط الغنية بالطاقة ، وتقسم المجموعة الى تحت مجموعة تبعا لنوع الرابطة المتكونة وكذا تبعا لنوع المركبات المرتبطة مع بعضها ، ويمكن التعبير عن هذا النوع من التفاعلات بالمعادلة العامة التالية

$$A + B \underset{}{\overset{E}{\rightleftharpoons}} AB$$

وانزيمات التخليق أو الربط تحفز التفاعلات التى تكون الروابط التالية:

C - O, C-S, C-N, C-C

ومن أمثلة هذة الانزيمات:

**المثال الاول:**

6.3.1.2. L-Glutamate- ammonia ligase (ADP)

(Glutamine Synthase).

وهذا الانزيم يحفز التفاعل التالى:

ATP + L-Glutamate + $NH_4^+$ ⟶ ADP + Orthophosphate + L-Glutamine

**المثال الثانى**

6.4.1.2- Acetyl- Co A . $CO_2$ ligase (ADP)

(Acetyl- Co A carboxylase)

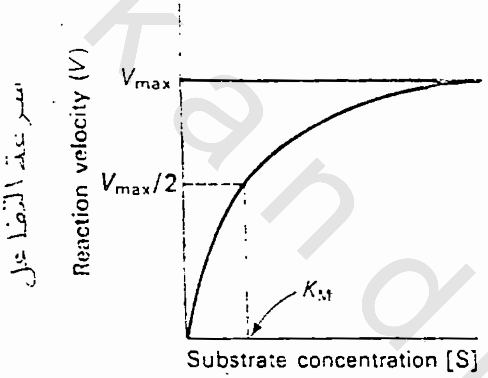
وهذا الانزيم يحفز التفاعل التالى:

$$ATP + Acetyl - Co\,A + CO_2 \longrightarrow ADP + Pi + Malonyl\text{-}CO\,A$$

وكما هو واضح من المثالين السابقين فان انزيمـات التخليق أو الربـط تحفز تفـعلات ربـط مركبين معا، والطاقة اللازمة لعملية الربط يتم التحصل عليها من الـATP.

### الصفات الحركية للانزيمات Kinetic properties of enzymes

بالنسبة للعديد من الانزيمات فان معدل النشاط الانزيمى او سرعتة V تتوقـف على تركيز مادة التفاعل (S) كما هو موضح بالشكل رقـم ٦-٤، وعند تركيز معين من الانزيم فان V تتناسب خطيا مع (S) عندما تكون (S) قيمـة صغيرة. أما عند قيم (S) أعلى فـن قيمة V لاتعتمد تقريبا على (S).




تركيز مادة التفاعل

شكل ٦-٤ : العلاقة بين تركيز مادة التفاعل وسرعتة

وقد تمكن العالمان ميكائيلس ومنتن Michaelis and Menten عام ١٩١٣ من وضع نموذج يمكن عـن طريقه حساب هذة الصفات الحركيـة (الكيناتيكيـة) للانزيمـات، وطبقـا لهذا النموذج فان التفاعل الأنزيمى يحدث طبقا للمعادلات التالية:

$$E + S \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{K_3} E + P \qquad (1)$$

بمعنى أن الانزيم E يرتبط مع مادة التفاعل S ليكون معقدا ES بثابت تفـاعل $K_1$ والمعقد ES أما ان ينحل الى E و S (التفاعل العكسى) ثابت تفاعل $K_2$ واما ان يعطى الناتج P بثابت

obeikandl.com

تفاعل $K_3$ . وعند افتراض انه لايحدث تحول لأية كميات من P الى S (فى بداية التفاعل وقبل تكون كميات محسوسة من P) فانة يمكننا التعبير عن العلاقة بين معدل التفاعل أو سرعته V وتركيز كل من الانزيم ومادة التفاعل كما يلى:

من المعادلة رقم ١ فان سرعة التفاعل تساوى ناتج ضرب (ES) فى الثابت $K_3$ .

$$\therefore V = K_3(ES) \quad \text{............ ...} \quad (2)$$

وللتعبير كميا عن قيمة (ES) هناك معدلان لذلك:

معدل تكوين ES وهو عبارة عن:

$$\text{Rate of formation of ES} = K_1\,(E)\,(S) \quad \text{...........} \quad (3)$$

معدل تكوين ES

ومعدل تحلل ES وهو عبارة عن:

$$\text{Rate of breakdown of ES} = (K_2 + K_3)\,(ES) \quad \text{.........} \quad (4)$$

معدل تحلل ES

وعند حالة الثبات steady state يكون تركيز (ES) ثابتا فى حين يتغير تركيز (S) وتركيز (P) وهذا يحدث عندما يتساوى معدل تكوين ES مع معدل تحلله، بمعنى أنه من المعادلتين ٣، ٤ يتضح أن:

$$K_1(E)\,(S) = (K_2 + K_3)\,(ES) \quad \text{...........} \quad (5)$$

وباعادة ترتيب المعادلة رقم (٥):

$$(ES) = \frac{(E)\ (S)}{(K_2 + K_3)/K_1} \quad \text{-------------} \quad (6)$$

هذا ويمكن تبسيط المعادلة رقم (٦) وذلك بادخال ثابت يسمى Michaelis constant ويرمز له بالرمز $K_M$ والذى يساوى :

$$K_M = \frac{K_2 + K_3}{K_1} \quad \text{................} \quad (7)$$

وبذلك تصبح المعادلة رقم (٦):

$$(ES) = \frac{(E)\,(S)}{K_M} \quad \text{-----------} \quad (8)$$

obeikandl.com

وعند تركيز مادة تفاعل حرة (S) يساوى التركيز الكلى لها فان تركيز الانزيم يكون أقل من تركيز S وتركيز الانزيم الحر (E) يكون مساويا ايضا للتركيز الكلى للانزيم $E_T$ مطروحا منه تركيز ES.

$$\therefore \quad (E) = (E_T) - (ES) \qquad \text{.............. (9)}$$

وبالتعويض بهذه القيمة فى المعادلة رقم ٨:

$$\therefore \quad (ES) = \{(E_T) = (ES)\}\ (S)/K_M \qquad \text{................ (10)}$$

وبحل المعادلة رقم ١٠ بالنسبة لـ (ES)

$$\therefore \quad (ES) = (E_T)\ \frac{(S)/K_M}{1+(S)/K_M} \qquad \text{.................. (11)}$$

أى أن:

$$(ES) = (E_T)\ \frac{(S)}{(S) + K_M} \qquad \text{.................... (12)}$$

وبالتعويض بهذه القيمة لـ (ES) فى المعادلة رقم ٢ فان:

$$V = K_3\ (E_T)\ \frac{(S)}{(S) + K_M} \qquad \text{.............. (13)}$$

وأقصى سرعة للتفاعل الانزيمى $V_{max}$ تحدث عندما يتم تشبيع كل المراكز الفعالة للأنزيم بمادة التفاعل أى عندما تكون (S) أكبر من $K_M$ ولذلك فان قيمة $(S)/(S) + K_m$ تقترب من الواحد الصحيح وبذلك فان:

$$V\ max = K_3\ (E_T) \qquad \text{.............. (14)}$$

وبالتعويض من معادلة ١٤ فى المعادلة ١٣:

$$V = V\ max\ \frac{(S)}{(S) + K_M}$$

obeikandi.com

وهذه المعادلة ماهى الا تعبير كمى عن العلاقة التى تربط معدل التفاعل بتركيز مادة التفاعل والتى سبق بيانها بالشكل رقم ٥-٤.

وعندما تكون (S) أقل من $K_M$ فان:

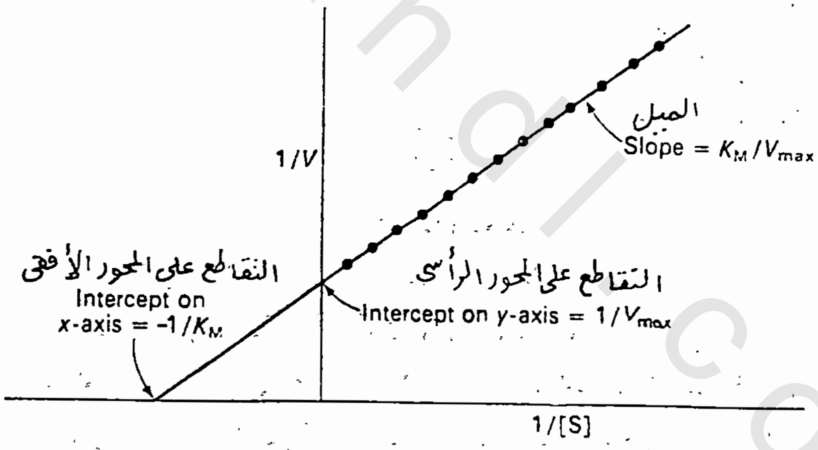
$$V = (S)\ V\ max / K_M$$

بمعنى أن V تتناسب مباشرة مع تركيز مادة التفاعل. أما اذا كانت (S) أكبر من $K_M$ فان:

$$V = V\ max$$

أى أن معدل التفاعـــــل يصل أقصاه ولايتأثر بتركيز مادة التفاعل. وعندما يكون (S) مساويا لـ $K_M$ فان $V = Vmax/ 2$ بمعنى أن $K_M$ هو عبارة عن تركيز مادة التفاعل الذى عنده يكون معدل التفاعل نصف قيمته القصوى.

ويمكن حساب قيمة $K_M$ عن طريق رسم العلاقة بين مقلوب سرعة التفاعل I/ V ومقلوب تركيز مادة التفاعل I/(S) كما هومبين بشكل ٦-٥.

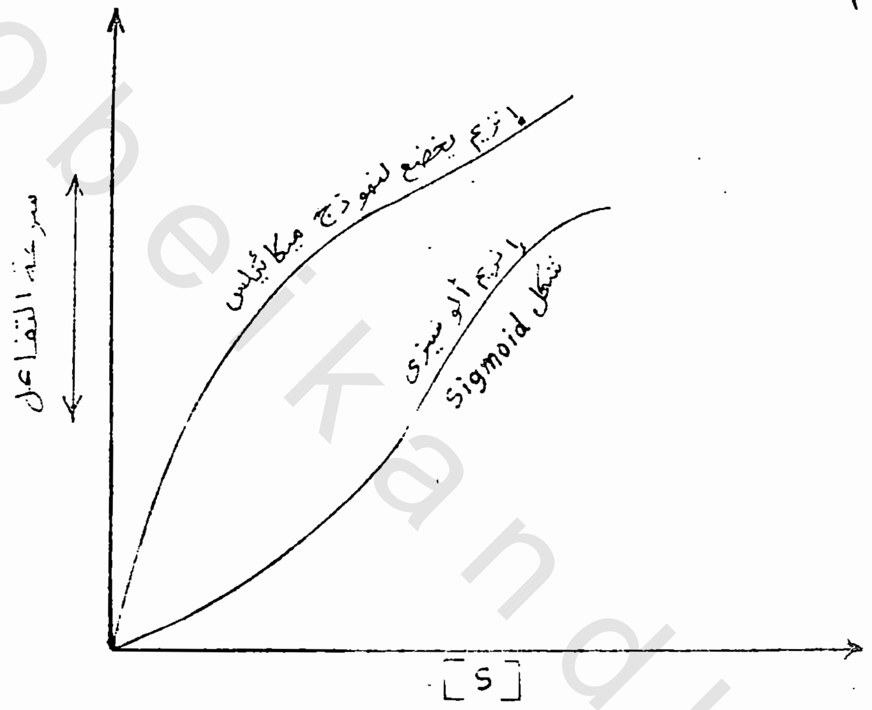



شكل ٦-٥: طريقة حساب ثابت ميكانيلس ($K_M$)

**الأنزيمات الالوسترية Allosteric enzymes:**

مما لاشك فيه أن النموذج الذى وضعه كل من Michaelis and Menten لتفسير ميكانيكية الربط بين الأنزيم ومادة التفاعل قد أدى الى تفهم كبير لكيمياء الأنزيمات، بيد أنه قد وجد أن الصفات الحركية لعديد من الأنزيمات لايمكن حسابها باستخدام هذا النموذج، وتعرف هذه الانزيمات التى لاتتفق مع نموذج ميكانيلس - منتن Michaelis-Menten Model

بالانزيمات الالوسترية والتى اذا مارسمت العلاقة بين سرعة التفاعلات التى تحفزها V وتركيز مادة التفاعل (S) أبدت شكلا مغايرا لنظيره للانزيمات التى تتفق ونماذج Michaelis-Menten (شكل ٦-٦)




تركيز مادة التفاعل

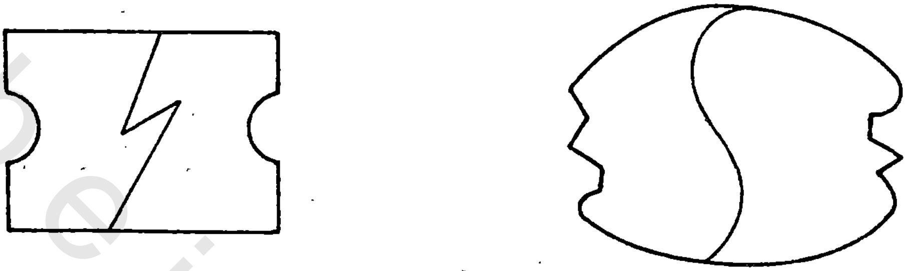
شكل ٦-٦: العلاقة بين تركيز مادة التفاعل وسرعة التفاعل للانزيمات التى تخضع لنموذج ميكائيلس - منتن والانزيمات الألوستيرية.

ويمكن تفسير شكل المنحنى sigmoid الذى يمثل العلاقة بين تركيز S وسرعة التفاعل للانزيمات الالوستيرية على أساس أن ارتباط جزىء واحد من S بالانزيم يؤدى الى تغير شكل conformation الجزىء مما يمكن الجزىء الثانى من الارتباط بالانزيم بسهولة.

وفى الانزيمات الألوسترية فان مركزا فعالا واحدا فى جزىء الانزيم يمكن أن يؤثر على مركز فعال آخر فى جزىء نفس الأنزيم ومن ثم يكون نتيجة ذلك أن الارتباط بين الأنزيم ومادة التفاعل يكون محصلة لتأثيرات المراكز الفعالة بالانزيم بعضها على بعض، كذلك فان الفعل التحفيزى للانزيمات الالوسترية يتأثر بانتظام الجزيئات التى ترتبط بالمراكز الأخرى فى الانزيم غير المراكز الفعالة. وقد وضع كل من Monod, Wyman and Changeux فى عام ١٩٦٥ نموذجا للانزيمات الألوسترية ومؤداه أن جزىء الانزيم يتكون من وحدتين subunits مميزتين

obeikandl.com

لكل منها المركز الفعال الخاص بها. واذا افترضنا أن وحدة من الوحدتين المكونتين للأنزيم يمكن أن توجد فى تركيبين conformation هما T, R وان R لها ميل قوى للارتباط بمادة التفاعل فى حين أن T لها ميل قليل للارتباط بمادة التفاعل.



الصورة R (ميل كبير للارتباط بمادةالتفاعل)

الصورة T (ميل قليل للارتباط بمادة التفاعل)

شكل ٦-٧: رسم تخطيطى يبين الصورتين T, R للأنزيمات الألوسترية.

والصورتان T, R يمكن تحول كل منهما للأخرى والافتراض الهام بالنسبة لهذا النموذج هو أن كلا من الوحدتين المكونتين لجزىء الأنزيم يجب أن تكونا فى نفس الحالة التركيبية conformational state ومن ثم يظل ثبات تناسق symmetry هاتين الوحدتين المكونتين لجزىء الأنزيم، وعليه يمكن أن يتكون جزىء من RR أو TT ولكن لايمكن تكون RT. وفى غياب مادة التفاعل فان الحالتين TT, RR يرمز لهما بالرمز $T_O$, $R_O$ فى حين يرمز للنسبة بين تركيزيهما بالرمز L أى أن:

$$R_O \rightleftharpoons T_O$$

$$L = T_O / R_O$$

ويمكن حساب التشبيع الجزئى fractional saturation (Y) للمراكز الفعالة بالانزيم من المعادلة التالية:

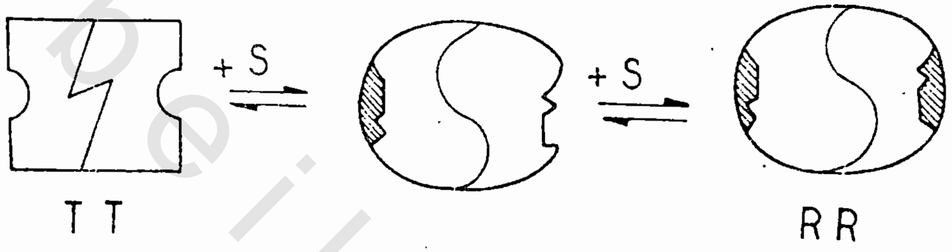
$$Y = \frac{\text{المراكز المشغولة (Occupied sites)}}{\text{المراكز الكلية (Total sites)}}$$

$$= \frac{(S)}{K_R} \quad \frac{1 + (S)/K_R}{L+(1+(S)/K_R)^2}$$

حيث $K_R$ هو ثابت الانحلال الميكروسكوبى Microscopic dissociation constant وفى هذه الحالة فان:

$$V = Y \; V_{max}$$

وهذا الميكانزم موضح بالشكل رقم ٦-٨.




شكل ٦-٨: الارتباط المتعاقب لمادة التفاعل بواسطة الانزيمات الالوسترية

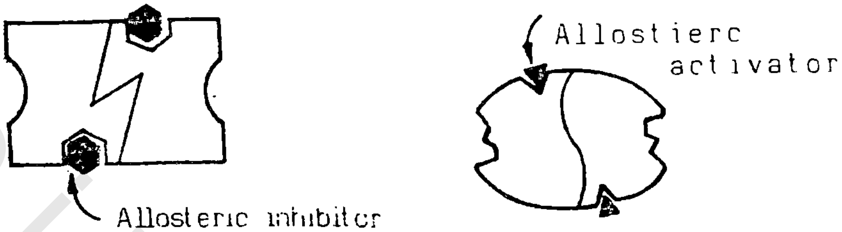
ويلاحظ أن الصورة TT (لها ميل منخفض للارتباط بمادة التفاعل) يتم تحولها الى الصورة RR (لها ميل مرتفع للارتباط بمادة التفاعل) بعد الارتباط بالجزىء الاول لمادة التفاعل.

وفى غياب مادة التفاعل فان جميع جزيئات الأنزيم تقريبا تكون فى الصورة T حيث يوجد جزىء واحد فى الصورة R من بين كل ١٠ آلاف جزىء توجد على الصورة T فى المثال السابق. بالاضافة الى النموذج السابق والمعروف بالنموذج المتعاقب sequential model لتفسير ميكانيكية عمل الانزيمات الألوستيرية فانه يوجد نموذج آخر يعرف باسم النموذج المتناسق concerted model. وتبعا لهذا النموذج فان التحول من الصورة T الى الصورة R وبالعكس يكون متناسقا concerted . حيث أن نسبة جزئيات الأنزيم فى الصورة R تزيد باضطراد كلما تمت اضافة مادة تفاعل أكثر ومن ثم يكون الارتباط مع مادة التفاعل ارتباطا متعاونا cooperative يساهم فيه الأنزيم ومادة التفاعل. وعندما يتم تشبيع كل المراكز الفعالة للأنزيم تماما فان كل جزيئات الأنزيم تكون فى الصورة R. وطبقا للنموذج المتناسق فان المثبطات inhibitors والمنشطات activators تلعب دورا فى ميكانيزم الانزيمات الألوستيرية، فالمثبط الالوستيرى تكون له أفضلية الارتباط بالصورة T فى حين أن المنشط الالوستيرى تكون له أفضلية الارتباط بالصورة R (كما هو موضح بالشكل رقم ٦-٩). وعلى ذلك يؤدى المثبط الألوستيرى الى تحول

$$R \rightleftharpoons T$$

obeikandi.com

مع بقاء الاتزان فى اتجاه T فى حين يؤدى المنشط الألوستيرى الى نقل الاتزان فى اتجاه الصورة R. مثل هذه التأثيرات يمكن التعبير عنها كميا بواسطة تغير ثابت الأتزان الألوستيرى allosteric equilibrium constant (L) ويؤدى المثبط الالوستيرى الى زيادة L فى حين يؤدى المنشط الالوستيرى الى خفض قيمة L.




شكل ٦-٩: النموذج المتناسق للانزيمات الالوستيرية وفيه يقوم مثبط الوستيرى (ممثل بالشكل المسدس) بتثبيت الصورة T فى حين يقوم منشط ألوستيرى (ممثل بالشكل المثلثى) بتثبيت الصورة R.

وجدير بالذكر أن ارتباط الانزيم الألوستيرى بالمنشطات أو المثبطات يعد بمثابة العامل الرئيسى لكون الانزيمات الالوستيرية عوامل تحكم رئيسية للتفاعلات الميتابولزمية.

وتجدر الاشارة الى أن الهيموجلوبين - على الرغم من أنه ليس أنزيما - يعتبر مثالا جيدا للبروتين الألوستيرى allosteric protein حيث يوجد بجزىء الهيموجلوبين أربعة أماكن للارتباط بالاكسجين، والسهولة النسبية لارتباط ذرات الأكسجين من الذرة الأولى الى الذرة الرابعة تخضع تقريبا للنسبة ١: ٤: ٢٤: ٩.

العوامل المؤثرة على سرعة التفاعل الأنزيمى:

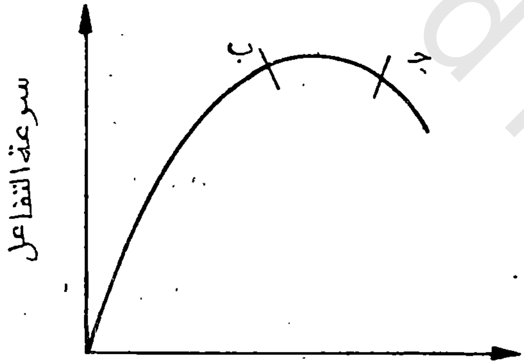
## Factors affecting velocity of the enzymatic reaction:

يمكن تقدير سرعة التفاعل الأنزيمى بطريقة من طريقتين هما قياس معدل اختفاء مادة التفاعل بالنسبة للزمن (-dS/dt) أو قياس معدل تكون ناتج التفاعل بالنسبة للزمن (+dP/dt) اذ أنه مع تقدم التفاعل الأنزيمى يزيد تحول مادة التفاعل S معطية ناتج التفاعل P . أما نشاط الأنزيم فيمكن قياسه عن طريق معرفة وحدة الأنزيم (U) enzyme unit والتى تعرف بأنها كمية الأنزيم اللازمة لتحفيز تحول ميكروجزيئى واحد من مادة التفاعل ($10^{-6}$ M) فى الدقيقة الواحدة عند ٢٥°م " وينطبق هذا التعريف على الأنزيمات التى تهاجم رابطة واحدة. أما اذا كان لأنزيم من الأنزيمات التى تهاجم أكثر من رابطة واحدة فى جزىء مادة التفاعل فان وحدة

obeikandi.com

الأنزيم فى هذه الحالة تكون عبارة عن "كمية الأنزيم التى تلزم لتحفيز تحول ميكرومكافىء "واحد من مادة التفاعل فى الدقيقة الواحدة عند ٢٥°م ، وتقاس وحدة الأنزيم تحت الظروف المثلى للتفاعل الأنزيمى من درجة الحرارة ، pH ..... الخ. أما نقاوة المستحضر الأنزيمى فيعبر عنها بالنشاط النوعى specific activity ويعرف بأنه "عدد وحدات الأنزيم الموجود فى المليجرام الواحد من البروتين" . ويمكن التعبير أيضا عن النشاط الانزيمى برقم يسمى رقم التجول turnover number وهو عدد المكافئات من مادة التفاعل التى تتحول الى ناتج التفاعل (أو عدد المكافئات من الناتج التى تتكون) لكل واحد مكافىء من الأنزيم / وحدة الزمن. ولحساب قيمة الـ turnover number فانه يجب معرفة الوزن الجزيئى للأنزيم. وتتفاوت قيمة turnover number كثيرا فهى ١١٥٠/دقيقة لأنزيم succinate dehydrogenase فى حين تصل الى ٣٦ مليون/دقيقة لأنزيم carbonic anhydrase.

واذا ماتم تتبع العلاقة بين زمن التفاعل الأنزيمى وسرعته لوجدناها علاقة خطية فى بداية التفاعل (أ ب) تتزايد الى ذروة منحنى تثبت عندها (ب جـ) ثم تبدأ فى الانخفاض (جـ د) كما هو مبين فى شكل ٦-١٠




شكل ٦-١٠: العلاقة بين سرعة التفاعل الأنزيمى وزمن التفاعل.

معنى ذلك أن سرعة التفاعل الأنزيمى تقل مع الزمن ويعزى ذلك الى احد الأسباب التالية:

١- انخفاض تركيز مادة التفاعل (S).

٢- ازدياد سرعة تحلل المركب (ES).

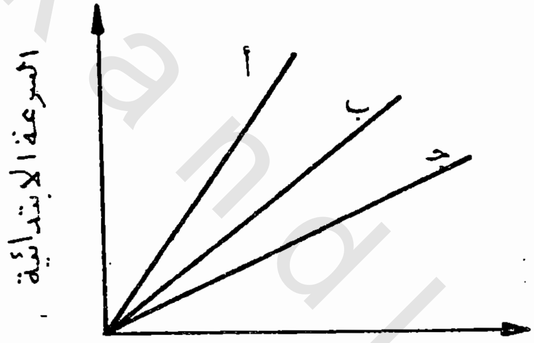
٣- أن يكون لنواتج التفاعل تأثير مثبط للأنزيم.

٤- تحول الأنزيم بتقدم التفاعل الى صورة غير فعالة.

والخط المستقيم أ ب فى المنحنى رقم ٦-١٠ يسمى بالسرعة الابتدائية للتفاعل وهى لاتتأثر بأى من العوامل الأربعة السابق ذكرها والتى من شأنها خفض سرعة التفاعل الانزيمى، غير أن هناك عوامل أخرى تؤثر على السرعة الابتدائية للتفاعلات الأنزيمية وأهمها تركيز الأنزيم، تركيز مادة التفاعل، ورقم الاس الهيدروجينى pH ، درجة الحرارة ، المثبطات ، المنشطات. وفيما يلى شرح موجز لتأثير كل من هذه العوامل على السرعة الابتدائية للتفاعل الأنزيمى:

## ١- تركيز الأنزيم Enzyme concentration:

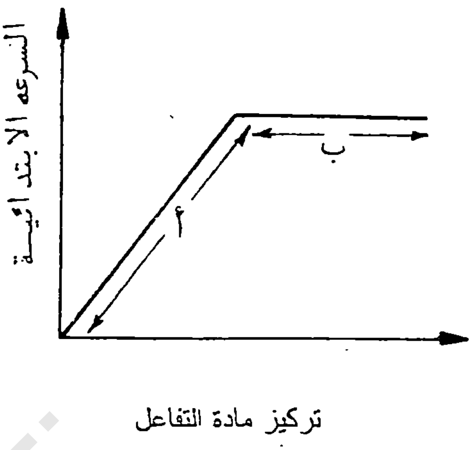
تتناسب السرعة الابتدائية للتفاعل الأنزيمى طرديا مع تركيز الانزيم وذلك عند الظروف المثلى للتفاعل. ولكل انزيم سرعة تختلف عن الأنزيمات الأخرى عند نفس التركيز (كما هو موضح بالنسبة للأنزيمات الثلاثة أ ، ب ، جـ بشكل ٦-١١).




شكل ٦-١١: العلاقة بين تركيز الانزيم وسرعة التفاعل الانزيمى (أ ، ب ، ج ثلاثة أنزيمات مختلفة).

## ٢- تركيز مادة التفاعل Substrate concentration:

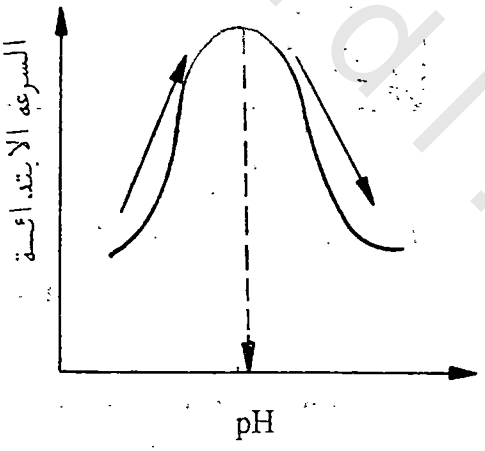
تتناسب السرعة الابتدائية للتفاعل الانزيمى طرديا مع تركيز مادة التفاعل الى حد معين تبدأ عنده سرعة التفاعل فى الثبات وذلك تحت الظروف المثلى للتفاعل (شكل رقم ٦-١٢) وفى المرحلةالأولى للتفاعل ( أ فى المنحنى) يكون تركيز مادة التفاعل أقل من عدد وحدات الأنزيم (المراكز الفعالة) مما يؤدى الى زيادة سرعة التفاعل ، أما فى المرحلة الثانية (ب فى المنحنى) فان تركيز مادة التفاعل يكون من الوفرة بحيث يتم شغل جميع المراكز الفعالة للأنزيم بواسطة مادة التفاعل ، ومن ثم فان زيادة تركيز مادة التفاعل لايؤثر على سرعته.




شكل ٦-١٢: العلاقة بين تركيز مادة التفاعل وسرعة التفاعل.

**٣- رقم الأس الهيدروجينى pH :**

لكل أنزيم رقم أس هيدروجينى أمثل optimum pH تكون سرعة التفاعل الأنزيمى عنده فى أقصاها فى حين تقل عند رقم أقل أو أعلى من قيمة الـ pH المثلى ، كما هو موضح بشكل ٦-١٣.



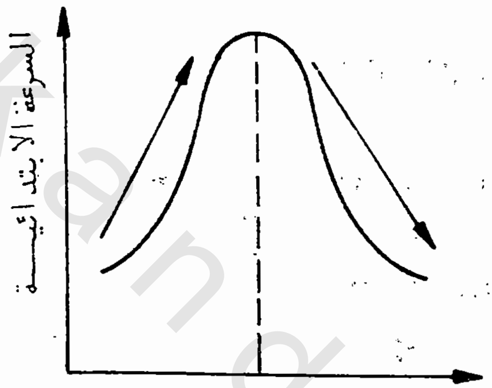

شكل ٦-١٣: العلاقة بين رقم الأس الهيدروجينى pH والسرعة الابتدائية للتفاعل الأنزيمى.

ووجود قيم pH مثلى لكل أنزيم يرجع الى التأثير على تأين المجاميع الفعالة فى الانزيم أو مادة التفاعل مما يؤثر على قوة ارتباط مادة التفاعل بالانزيم وكذا على وظيفة المراكز الفعالة للأنزيم، ولذا فانه عند دراسة أى أنزيم لابد من استخدام محلول منظم (بفر) يعمل على الاحتفاظ بالانزيم دائما عند الـ pH الامثل لنشاطه. والاخير يتحدد تبعا لعوامل أهمها نوع البفر المستخدم ، مصدر الأنزيم وطبيعة مادة التفاعل.

obeikandi.com

٤- درجةالحرارة **Temperature**:

لكل أنزيم درجة حرارة مثلى optimum temperature تصل سرعة التفاعل الأنزيمى عندها الى قيمتها القصوى ، أما بعيدا عن هذه الدرجة سواء بالانخفاض أو بالارتفاع فان سرعة التفاعل تنخفض (شكل ٦-١٤). وتعزى زيادة سرعة التفاعل فى المرحلة الأولى قبل الوصول الى درجة الحرارة المثلى الى تقليل الطاقة الحرة للتنشيط free energy of activation أما انخفاض سرعة التفاعل بارتفاع درجة الحرارة أعلى من المثلى فمرجعه حدوث دنترة للبروتين الانزيمى.




شكل ٦-١٤: العلاقة بين درجة الحرارة والسرعة الابتدائية للتفاعل الانزيمى.

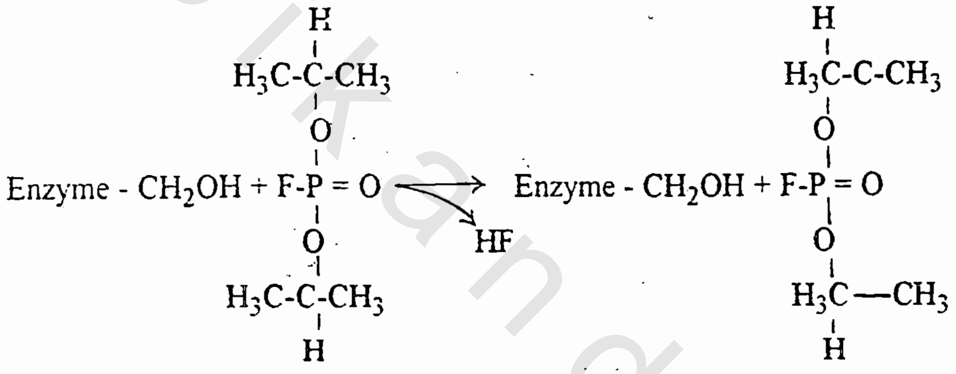
وعادة فان درجة الحرارة المثلى للأنزيمات ذات المصدر الحيوانى تتراوح بين ٤٠-٥٠ °م حين تصل الى ٥٠-٦٠ °م للأنزيمات النباتية. ومعظم الأنزيمات يتم دنترتها (أى فقد قدرتها على التحفيز) عند درجات حرارة أعلى من ٦٠ ° م ، ويلعب زمن التعرض لدرجة الحرارة المرتفعة دورا فى هذا الصدد فهناك بعض الأنزيمات التي يمكنها تحمل درجات الحرارة العالية لزمن قصير دون أن تدنتر.

٥- المثبطات **Inhibitors**:

فى مقدور بعض المركبات ذات الوزن الجزيئى المنخفض وكذا بعض الأيونات تثبيط التفاعل الأنزيمى inhibition، وتأتى أهمية هذه العملية من كونها طريقة رئيسية من طرق التحكم الحيوى، والتثبيط الأنزيمى نوعان هما التثبيط العكسى وغير العكسى.

### أولا: التثبيط غير العكسى Irreversible inhibition:

فى هذا النوع من التثبيط يتم ارتباط المثبط بالانزيم بقوة تحول دون تحـرر الأنزيم، ومـن ثم يفقد فعله كعامل مساعد ، ومن أمثلة التثبيط غير العكسى تثبيط غازات الأعصاب (التى تحرم الاتفاقيات الدولية استخدامها فـى الحـروب) أنزيـم الاسـيتايل كوليـن اسـتيريز acetyl choline esterase والذى يلعب دورا هاما للغاية فى نقل الاشارات العصبيـة. وأحـد غـازات الأعصـاب وهو ثنائى ايزبروبايل فوسفو فولريدات diisopropyl phospho fluoridate (DIPF) يتفـاعل مع المجموعة الايدروكسيلية لحمض السيرين الموجود بالمركز الفعال للانزيم مكونا صورة غـير فعالة للأنزيم كما هو مبين بالشكل ٦-١٥.



(DIPF)

صورة فعالة للأنزيم      صورة غير فعالة للأنزيم

شكل ٦-١٥: تثبيط أنزيم الأستيايل كولين استيريز acetyl cholin esterase بواسطة مركب DIPF.

### ثانيا: التثبيط العكسى Reversible inhibition:

يتميز هذا النوع من التثبيط بحدوث تـوازن سـريع بيـن المثبـط والانزيـم. والمثبـط فـى هـذه الحالة أما أن يكون مثبطا تنافسيا competitive أو غير تنافسي non-competitive.

### ١- التثبيط التنافسى Competitive inhibition:

تتشابه المواد المثبطة inhibitors مع مادة التفاعل فى تركيبها الكيماوى، ومن ثم يحـدث تنافس بينهما على المراكز الفعالة للأنزيم مما يؤدى الى نقص جزيئات (المراكز الفعالة) الأنزيـم

obeikandl.com

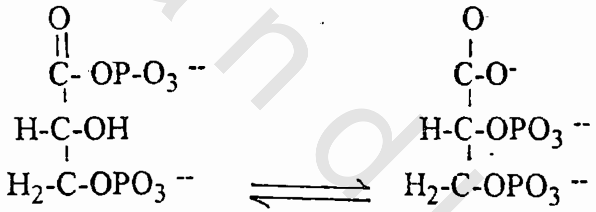
التى يمكنها الارتباط بمادة التفاعل فيقل معدل التفاعل الأنزيمى ، ومن أمثلة التثبيط التنافسى تأثير المالونات malonate على أنزيم السكسنيك ديهيدروجينيز succinate dehydrogenase

Succinate سكسينات                    Malonate مالونات

(مادة التفاعل)                    (مثبط)

شكل ٦-١٦: المالونات كمثبط تنافسى مع السكسينات.

فالمالونات لاتختلف عن السكسينات الا فى احتوائها على مجموعة ميثيلينية واحدة بدلا من مجموعتين (شكل ٦-١٦). ومن الأمثلة ذات الأهمية الفسيولوجية للتثبيط التنافسى تثبيط أنزيم ثنائى فوسفو جليسرات ميوتيز diphospho glycerate mutase والذى يحفز التفاعل التالى:



1,3-Diphospho glycerate                    2,3-Diphospho glycerate

١ر٣ ثنائى فوسفوجليسرات                    ٢ر٣ ثنائى فوسفوجليسرات

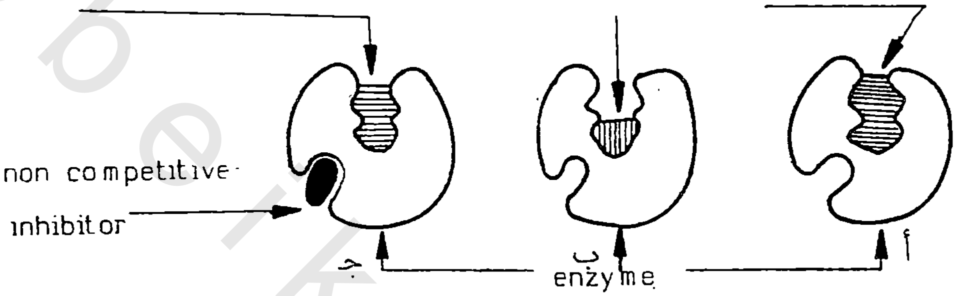
فى هذا التفاعل يمكن حدوث تثبيط تنافسى للأنزيم اذا ماتواجد ناتج التفاعل وهو ٢ر٣ ثنائى فوسفوجلسيرات 2,3 diphospho glycerate بتركيز مرتفع.

**٢- التثبيط اللاتنافسى Non-competitive inhibition:**

فى هذا النوع من التثبيط يمكن لمادة التفاعل الارتباط بالمراكز الفعالة للأنزيم فى حين يرتبط المثبط بعيدا عن مادة التفاعل - ويتأتى تأثير المثبط اللاتنافسى من ارتباطه بالانزيم مما يحول دون فعل الأنزيم كعامل مساعد. ويرجع تأثير التثبيط اللاتنافسى الى خفض قيمة رقم التحول turnover number للأنزيم أكثر من كونه راجعا الى تقليل عدد جزيئات الأنزيم القادرة على الارتباط بمادة التفاعل. والمثبط اللاتنافسى لايتشابه فى تركيبه مع مادة التفاعل. ومن أمثلة التثبيط اللاتنافسى خلب chelation أيونات المعادن الموجوده فى تركيب بعض الأنزيمات والتى تلزم لنشاطها فعلى سبيل المثال يعمل السيانيد كمثبط لاتنافسى يخلب الحديد

obeikandi.com

الموجود ضمن تركيب البروتين لبعض الأنزيمات مثل cytochrome C oxidase. ويوضح شكل (٦-١٧) الفرق بين التثبيط التنافسى واللاتنافسى للأنزيمات.




شكل ٦-١٧: التثبيط التنافسى (ب) والتثبيط غير التنافسى (ج) مقارنة بتفاعل الأنزيم ومادة التفاعل فى حالة عدم وجود مثبط ( أ ).

كذلك فيمكن حدوث تثبيط للأنزيمات عن طريق ارتباط المثبطات بوحدات subunits مختلفة من الأنزيم محدودة البلمرة oligomeric enzyme ويسمى هذا النوع من التثبيط باسم التثبيط الألوستيرى allosteric inhibition وهو ذو أهمية فسيولوجية فائقة، ولقد سبق لنا أن شرحنا هذا النوع من التثبيط عند تناولنا لموضوع الأنزيمات الألوستيرية.

**٦- المنشطات Activators:**

تتطلب بعض الأنزيمات لكى تنشط وجود بعض الأيونات أو المركبات التى تحتوى على مجاميع كيماوية معينة ، اذ أنه فى غياب مثل هذه المركبات ينخفض معدل النشاط الأنزيمى. ومن أمثلة الأيونات فى هذا الصدد الكالسيوم . النحاس . الماغنسيوم – أما المركبات المنشطة فمنها تلك المحتوية على مجاميع سلفاهيدريل SH – مثل الحمض الأمينى سيستئين.

**مستويات تخصص الأنزيمات Levels of enzymes specificity**

سبق وأن تحدثنا عن تخصص specificity الأنزيمات فى سياق تعريفنا للأنزيم. والآن نحاول القاء بعض الضوء على مستويات التخصص الانزيمى. فالانزيمات وأن كانت تشترك فى كونها عوامل مساعدة متخصصة الا أنها تتفاوت فيما بينها من حيث درجة أو مستوى تخصصها لتحفيز تفاعلات بذاتها. ومن هذه الوجهة يوجد مستويان للتخصص هما:

**أولا: التخصص البنائى Structural specificity:**

يندرج تحت هذا النوع من التخصص ثلاث درجات هى

**أ- تخصص الرابطة :**

حيث يتطلب الأنزيم وجود رابطة معينة ففى حالة أنزيمات التحلل المائى hydrolases مثلا يتطلب كل أنزيم وجود رابطة بذاتها لكى يتم التحلل مائيا (رابطة ببتيدية، رابطة جليكوسيدية ، رابطة استرية ، رابطة أميدية..... الخ) .

**ب - تخصص المجاميع :**

في هذه الحالة يتطلب الأنزيم وجود مجاميع معينة تتصل بأحد جانبى الرابطة التى يحللها الأنزيم لكى يقوم بعمله ، ولقد أعطينا مثالا فى هذا الصدد لأنزيم التربسين الذى يحلل الرابطة الببتيدية على شريطة أن تكون هذه الرابطة متصلة من طرفها الكربوكسيلى بأى من الحامضين الأمينيين ليسين أوأرجنين.

**ج- تخصص مطلق :**

ويتطلب الأنزيم لكى يعمل وجود مجموعتين على الأقل على جانبى الرابطة التى يحللها الأنزيم، وعدم وجود أحدى المجموعتين يحول دون عمل الإنزيم ، ولعل أنزيم اليوريز urease يعطى مثالا واضحا لهذه الدرجة من التخصص فالانزيم يحفز التحلل المائى للرابطة C=O –على شريطة أن تكون متصلة بمجموعتى $NH_2$ على جانبيها أى أنه يحفز تفاعل التحلل المائى لليوريا فقط .

$$\underset{\text{يوريا}\ \ \text{Urea}}{(HN_2)(NH_2)C=O} + 2HOH \xrightleftharpoons{\text{Urease يوريز}} \underset{\text{حمض الكربونيك}\ \ \text{Carbonic acid}}{(OH)_2C=O} + 2NH_3$$

**ثانيا: تخصص المشابهات Isomerism specificity:**

**١- تخصص بصرى (ضوئى)**

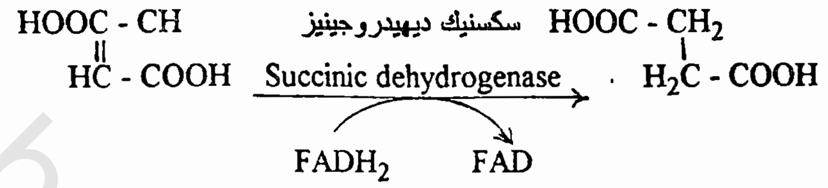
يعمل الأنزيم على مشابه ضوئى واحد اما المشابه D أو المشابه L

$$\underset{\text{L-lactic acid}\ \ \text{حمض اللاكتيك (L)}}{HO-\overset{CH_3}{\underset{COOH}{C}}-H} \xrightarrow[\text{NAD} \ \to\ \text{NADH+H}^+]{\text{لاكتيك ديهيدروجينيز}\ \ \text{Lactic acid dehydrogenase}} \underset{\text{Pyruvic acid}\ \ \text{حمض البيروفيك}}{\overset{CH_3}{\underset{COOH}{C}}=O}$$

obeikandl.com

ففى هده الحالة فان انزيم ديهيدروجينير حمض اللاكتيك لايعمل الا على المشابه L فقط.

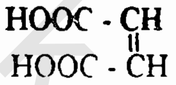
**٢- تخصص هندسي:**




(Trans) Fumaric acid — Succinic acid

حمض الفيوماريك (ترانس) — حمض السكسنيك

الانزيم لايعمل على الصورة الهندسية الأخرى وعى الـ cis أي لايعمل على المركب:




حمض الماليك (سيس) (Cis) Maleic acid

**مرافقات الأنزيمات Co-enzymes:**

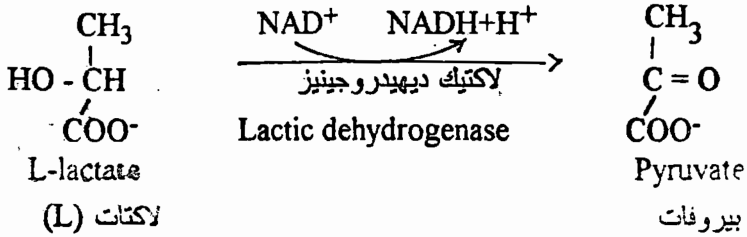
عديد من الانزيمات لكى تحفز تفاعلات مواد تفاعلها يلزم لها وجود جزيئات عضوية معينة لها ثبات حرارى heat stable وذات أوزان جزيئية منخفضة وتسمى co-enzymes وفى هذه الحالات فان نظام التحفيز holoenzymes يتكون من جزء بروتينى يسمى apoenzyme مرتبطا بالـ co-enzyme . وارتباط الـ co-enzyme بالـ apoenzyme يمكن أن يكون ارتباطا تعاونيا covalent أو غير تعاونى non-covalent ولقد استخدم قديما تعبير المجموعة المرافقة prosthetic group لتمييز الارتباط التعاونى للـ co-enzyme.

ويمكن القول بأن الانزيمات التى تتطلب وجود co-enzymes هى انزيمات الأكسدة والاختزال oxidoreductases والانزيمات الناقلة transferases وانزيمات المشابهات isomerases والتفاعلات التى تكون روابط تعاونية (الاقسام ١، ٢، ٥، ٦ فى تقسيم الانزيمات تبعا لنظام الـ IUB) أما تفاعلات التحلل ومنها تفاعلات التحلل المائى والتى تحفز بواسطة الانزيمات الهاضمة digestive enzymes فتلك لاتحتاج لمرافقات أنزيم (أقسام ٣، ٤ فى تقسيم الانزيمات تبعا لنظام الـ IUB) .

ومن المفيد غالبا اعتبار الـ co-enzyme بمثابة مادة تفاعل ثانية أو مرافق لمادة التفاعل co-substrate وذلك لسببين:

١- التغير الذى يحدث فى مرافق الأنزيم يكون متمشيا مع ذلك الحادث فى مادة التفاعل ، فعلى سبيل المثال فى التفاعل التالى:

obeikandl.com




نجد أن $NAD^+$ يعمل كمرافق لمادة التفاعل خلال تفاعل الأكسدة والاختزال، بمعنى أن جزيئا واحدا من مادة التفاعل يؤكسد (dehydrogenated) وجزىء واحد من مرافق الانزيم يختزل (hydrogenated).

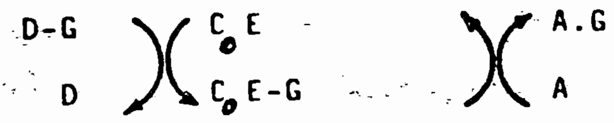
٢- السبب الثانى الذى يجعلنا نعطى اهتماما متساويا لتفاعل الـ co-enzyme أن انزيم أحد التفاعلات قد يكون له أهمية فسيولوجية أساسية فعلى سبيل المثال فان أهمية قدرة عمل العضلات تحت ظروف لاهوائية anaerobic لتحويل البيروفات الى لاكتات لاتتعلق مباشرة بأى من البيروفات أو اللاكتات فالتفاعل يتم أساسا لتحويل NADH الى $NAD^+$ وبدون $NAD^+$ فان عملية الـ glycolysis لايمكن أن تستمر ومن ثم فان تخليق الـ ATP تحت ظروف لاهوائية (ومن ثم الطاقة) لاتتم وتتضح أهمية مثل هذا التفاعل بجلاء فى حالة البكتريا أو الخميرة التى تنمو تحت ظروف لاهوائية.

**دور مرافق الأنزيم كمجموعة ناقلة للمواد فى تفاعلات ألايض (الميتابوليزم)الوسطية :**

تفاعلات نقل المجاميع الكيموحيوية تتم وفقا للمعادلة التالية:

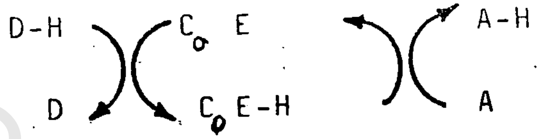
$$D\text{-}G + A \rightleftharpoons A\text{-}G + D$$

حيث تنقل المجموعة G من الجزىء المعطى D-G الى الجزىء المستقبل A وعادة ماتتم فى هذا التفاعل مساهمة مرافق الانزيم أما كمستقبل نهائى ultimate acceptor (مثل تفاعلات الاكسدة عن طريق نزع الهيدروجين) أو كمجموعة وسطية حاملة carrier (مثل تفاعلات نقل مجموعة الأمين transamination ويتم التفاعل كما يلى:




obeikandl.com

ويمكن لعديد من المركبات الوسطية CoE - G الاشتراك فى تفاعلات معينة (مثل تفاعلات نقل مجموعة الأمين transamination) كما يمكن أن تكون المجموعة التى يتم نقلها هى الهيدروجين H.




ويمكن على هذا الاساس تقسيم مرافقات الانزيمات الى مجموعتين:

أولا: المجموعة الناقلة لمجاميع غير الهيدروجين :

وتشتمل على:

| | |
|---|---|
| فوسفات السكر | Sugar phosphate |
| مرافق الأنزيم أ | Co A - SH |
| الثيامين بيروفوسفات | Thiamine pyrophosphate |
| البيريدوكسال فوسفات | Pyridoxal phosphate |
| الفولات | Folate |
| البيوتين | Biotin |
| الكوباميد (ب ١٢) | Cobamide (B12) Co |
| حمض الليبويك | Lipoic acid |

ثانيا: المجموعة الناقلة للهيدروجين :

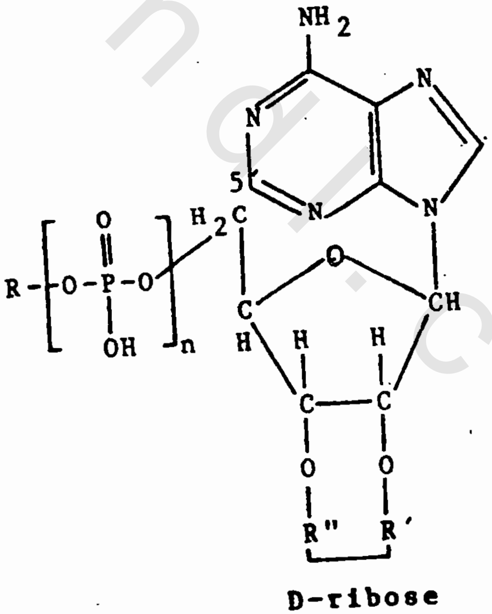
| | |
|---|---|
| نيكوتين ادنين ثنائى نكليونيد | $NAD^+$ , $NADP^+$ |
| نيكوتين ادنين ثنائى نكليونيد فوسفات | |
| فلافين أحادى النكليوتيد فلافين | FMA . FAD |
| ثنائى النكليوتيد | |
| حمض الليبويك | Lipoic acid |
| مرافق الأنزيم Q | Coenzyme Q |

obeikandi.com

**مشتقات فيتامينات B كمرافقات انزيمية:**

تكون فيتامينات B جزءا من بناء عديد من مرافقات الانزيمات فعلى سبيل المثال فان العديد من الأنزيمات المشتركة فى تفاعلات ميتابوليزم الاحماض الأمينية تحتاج الى فيتامين B6. كذلك فان النيكوتين أميد nicotinamide والثيامين thiamin والريبوفلافين riboflavin وحمض البانتوثينيك panthothenic تعتبر مكونات ضرورية لمرافقات أنزيمات الأكسدة والاختزال الحيوية أما حمض الفوليك folic acid والكوباميد cobamide فتعمل كمرافقات أنزيمات فى ميتابوليزم ذرة الكربون الواحدة.

والتركيب الشائع لعديد من مرافقات الانزيمات هو حلقة الأدنين مرتبطة بسكر D-ribose وفوسفات غير عضوية ولذا فانه يمكن اعتبار العديد من مرافقات الأنزيمات كمشتقات للـ adenosine mono phosphate (AMP).

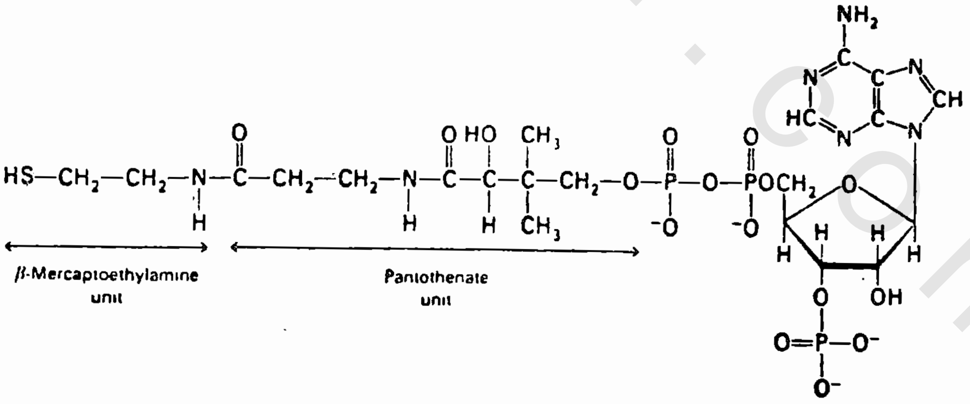



شكل ٦-١٨: عديد من مرافقات الانزيمات والمركبات المرتبطة عبارة عن مشتقات للأدينوزين احادى الفوسفات Adenosine mono phosphate (AMP)

جدول ٦-١: المجاميع الفعالة فى بعض مرافقات الانزيمات المشتقة من الـAMP

| مرافق الأنزيم | R | R` | R | n |
|---|---|---|---|---|
| مثيونين نشط Active methionine | مثيونين | H | H | صفر |
| Amino acid adenylate | حمض امينى | H | H | ١ |
| Active sulfate | $SO_3H_2$ | H | $PO_3H$ | ١ |
| 3, 5 Cyclic AMP | H | H | $PO_3H$ | |
| $NAD^+$ | + | H | H | ٢ |
| $NADP^+$ | + | $PO_3H$ | H | ٢ |
| FAD | + | H | H | ٢ |
| Co A - SH | + | H | $PO_3H$ | ٢ |

ويعتبر مرافق الأنزيم Co-enzyme A أ (شكل ٦-١٩) من أهم المرافقات الانزيمية من الوجهة الحيوية كما سيتضح لنا عند تناولنا لموضوعات الميتابوليزم.




وحدة ادينوزين — وحدة بانتوثينات — وحدة مركابتوايثايل أمين

ثنائ فوسفات ADP

شكل ٦-١٩: التركيب البنائى لمرافق الانزيم أ (Co-enzyme A)

opelkanal.com

**الايزوانزيمات (Isozymes (Isoenzymes:**

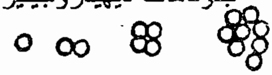
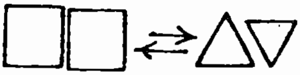
عندما تم تحضير وتنقية أنزيم مالات ديهيدروجينيز malate dehydrogenase عام ١٩٣٠ من مصادر مختلفة (كبد الفأر - بكتريا *Escherichia coli* اتضح أنه على الرغم من الانزيم المستخلص من هذين المصدرين يحفزان ذات التفاعل (أكسدة المالات الى أكسالواسيتات) فان البروتين الأنزيمى لكل مصدر كان متميزا ببعض الصفات الفيزيقية والكيماوية التى تختلف جوهريا عن نظيرتها للبروتين الأنزيمى المستخلص من المصدر الآخر. وعلى الرغم من ذلك فانه لم يكن مقبولا حتى نهاية ١٩٥٠ امكانية التفريق فيزيقيا بين صور نفس الأنزيم (والذى له نفس الفعل التحفيزى) والتى قد تتواجد فى أنسجة مختلفة لنفس الكائن الحى أو فى خلايا مختلفة لنفس النسيج الا بعد أن اتضح ذلك بجلاء عن طريق طرق الفصل بالهجرة الكهربية electrophoresis . وكأساس علمى فان تعبير isoenzyme أو isozyme يستخدم للتدليل على كل صور الأنزيم التى تختلف فيزيقيا وكيماويا لكنها تشترك فى أن لها فعلا تحفيزيا واحدا. وقد تأكد وجود isozymes لكل من أنزيمات - dehydrogenases - oxidases transminases - phosphatase - transphosphorylases - proteolytic enzymes. وذلك فى عديد من الأنسجة الحيوانية والنباتية والكائنات وحيدة الخلية.

ومن الجدير بالذكر أن الـ isozymes تستخدم كأداة تشخيصية هامة فى مجال الطب، فقد تبين عام ١٩٥٧ أن سيرم دم الانسان يحتوى على عديد من ايزوانزيمات اللاكتيك ديهيدروجنيز lactic dehydrogenase isozymes وأن نسب هذه الـ isozymes الى بعضها تختلف جوهريا فى حالات مرضية معينة.

ويمكن القول بأن الـ isoenzymes عبارة عن صور جزيئية متعددة multiple molecular forms لذات الأنزيم الذى له فعل تحفيزى واحد ، ولقد أمكن بواسطة طرق الهجرة الكهربية electrophoresis وطرق الكروماتوجرافيا chromatography فصل الـ isoenzymes بطريقة قاطعة ومحددة (finger print) أكدت اختلاف هذه الصور فى صفاتها الفيزيوكيماوية physicochemical properties.

ويوضح الجدول رقم ٦-٢ أمثلة للـ isoenzymes لبعض الأنزيمات وأسباب تعدد صور هذه المركبات. ومن الجدير بالذكر أن معظم الأنسجة الحيوانية تحتوى على نحو خمس صور للـ iso-enzymes لانزيم ديهيدروجينيز اللاكتيك lactate dehydrogenase وهذه يمكن بسهولة فصلها والتعرف عليها بواسطة طرق الهجرة الكهربية باستخدام جل البولى اكريل أميد polyacrylamide .

جدول ٦-٢: تقسيم الأيزوأنزيم iso-enzymes.

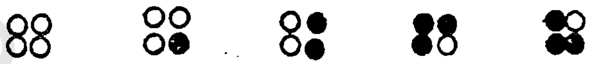
| المجموعة | أسباب تعدد الصور | أمثلة |
|---|---|---|
| ١ | وجود بروتينات مستقلة وراثيا genetically independent | Malate dehydrogenase مالات ديهيدروجينيز فـــى الميتوكندريا والسيتوبلازم. |
| ٢ | بوليمرات غير متجـــــــــانسة heteropolymers (بوليمـــرات لاثنين أو أكثر من سلاسل البولى ببتيد لاترتبط ببعضها تعاونيا). | Lactate dehydrogenase لاكتات ديهيدروجنيز |
| ٣ | اختلافات وراثيــة (allelic) | Glucose-6-phosphate dehydrogenase جلوكوز-٦-فوسفات ديهيدروجنيز |
| ٤ | بروتينات مرتبطة conjugated proteins. | Alkaline phosphatase الفوسفاتيز القلوى فى الثدييات. |
| ٥ | بروتينات مشتقة من سلسلة بولى ببتيد واحدة | Chymotrypsin family عائلة الكيموتربسين |
| ٦ | بوليـمرات متجانســة homopolymers (بوليمر لوحدة مفردة لاترتبط الوحدات فيه تعاونيا). | Glutamate dehydrogenase جلوتامات ديهيدروجينيز  |
| ٧- | صور تركيبية مختلفة | جميع التحويرات الألوسترية Allosteric modifications  |

المصدر : Plummer (1978).

obeikandl.com

وقد تم ترقيم هذه الصور الخمس تبعا لسرعة هجرتها تجاه القطب الموجب (الأنود) حيث أن الصورة $LD_1$ أسرع هذه الصور الخمس فى حين رقمت أبطأ هذه الصور فى معدل هجرتها بالرقم $LD_5$ (لاحظ أن حرفى LD هما اختصار لاسم الأنزيم (lactate dehydrogenase).

وتتكون الـ iso-enzymes من ارتباطات مختلفة لوحدتين لتكوين تركيب مع أربع وحدات tetramers كما يبين الشكل رقم ٦-٢٠



$LD_1$ $LD_2$ $LD_3$ $LD_4$ $LD_5$

شكل رقم٦-٢٠: تركيب iso-enzymes لأنزيم lactate dehydrogenase

ويبلغ الوزن الجزيئى للتركيب الرباعى tetramer ١٣٦ ألف. وتعتبر كمية وتوزيع هذه الصور الانزيمية مميزة لأنسجة كل عضو، ومن ثم فان فصل هذه الصور يعد بمثابة طريقة تحديد دقيق finger printing للنسيج.

## عزل وتنقية الأنزيمات Isolation and purification of enzymes:

لاشك أن المعلومات المتعلقة بالتفاعلات الايضية (الميتابولزمية) والمركبات الوسطية التى تتكون خلالها قد أمكن الحصول عليها من دراسة الأنزيمات النقية. كذلك فان دراسة حركية الأنزيمات ومراكزها الفعالة وطرق بنائها وميكانيكية فعلها تتطلب ايضا أنزيمات على درجة عالية من النقاوة. والهدف من تنقية الأنزيمات هو عزل بروتين انزيم معين من مستخلص الخلايا الكلية والذى يحتوى على مركبات عديدة أخرى. وعن طريق الانتشار الغشائى أو الديلسة dialysis أو الترشيح الجلى gel filtration يمكن ازالة بعض الجزيئات الصغيرة فى حين يمكن ترسيب الاحماض النووية nucleic acids باستخدام المضاد الحيوى ستربتوميسين streptomycin.

والمشكلة تكمن فى فصل الأنزيم المرغوب من خليط يتكون من مئات البروتينات التى تتشابه كيماويا وفيزيقيا.

## الطرق التقليدية Classic techniques:

والطرق التقليدية المفيدة فى تنقية الانزيمات تشتمل على الترسيب بواسطة تركيزات متباينة مع الاملاح (عادة كبريتات الأمونيوم أو الصوديوم) أو المذيبات (الأسيتون أو الايثانول).

obeikandl.com

## طرق الهجرة الكهربية باستخدام جل البولى أكريل أميد :

## Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) techniques

تعتبر طرق الهجرة الكهربية باستخدام جل البولى اكريل أميد أفضل طرق قياس تجانس البروتين. ويمكن اجراء الفصل فى بعد واحد one-dimensional PAGE حيث يعكس البروتين الطبيعى native اذا توافرت كمية كافية من العينة – وجود البروتينات السائدة والثانوية التى توجد بنسبة قليلة. كذلك فيمكن اجراء الفصل فى بعدين باستخدام two dimensional PAGE حيث يتم فى البعد الأول فصل البروتينات المدنترة denature على أساس نقط التعادل الكهربى $P_I$ وذلك باستخدام أمفوليت يؤدى الى قيم الـ pH متدرجة gradient للجل ، أما البعد الثانى فيتم فيه فصل البروتينات بعد الدنترة مع كبريتات دودىسيل الصوديوم sodium dodecyl sulphate (SDS) على أساس الاختلاف فى الوزن الجزيئى MW.

وحديثا أمكن التعرف visualization على الأنزيمات بعد اجراء عملية الفصل بطريقة الهجرة الكهربية ولهذه الطريقة العديد من التطبيقات الحيوية والطبية. ولقد استخدم فى هذه الطرق جل النشا والاجاروز agarose وأغشية خلات السليلوز cellulose acetate وجل البولى اكريل أميد poly acrylamide gel . ولقد تمكن Kinzkofer and Radola من جامعة ميونخ بألمانيا الغربية ١٩٨٣ من استخدام طريقة iso-electric focusing (IEF) فى زيادة سرعة وضوح الفصل الى نحو ١٠-٢٠ مرة عما هو معروف بالنسبة لطرق الهجرة الكهربية الأخرى ، وتعتمد الطريقة الجديدة على اجراء فصل للانزيمات بطريقة (IEF) iso-electric focusing تحت ظروف معينة وباستخدام جل اجاروز أو بولى اكريل أميد ذى سمك متناهى فى الصغر (٥٠-٢٠٠ مللى ميكرون) وبعد اجراء عملية الفصل الكهربى يتم تركيب غشاء سبق تشبيعه بمادة التفاعل والبفر مع الجل على هيئة ساندوتش ويتم تجفيفهما لفترة ٢-٥ ق على ٨٠°م بعدها تظهر مناطق ملونة (يحدد لونها نوع الأنزيم ومادة التفاعل) على الغشاء نتيجة للتفاعل الأنزيمى المتخصص مع مادة التفاعل فاذا ماتم قياس شدة لون هذه المناطق بواسطة جهاز densitometer فان عمق اللون يكون دالة لتركيز الأنزيم وتسمى هذه الطريقة بطريقة طبع الغشاء membrane printing وقد أمكن استخدام تكنيك ترسيب البروتين بالتمليح الخارجى salting out معا وفى آن واحد مع طريقة طبع الغشاء أو باستخدام الحرارة أو الـ pH لاحداث دنترة تفريقية أو باستخدام الطرد المركزى أو الترشيح الجلى أو الهجرة الكهربية، ولقد

obeikandi.com

استخدم تكنيك التمليح الخارجى وطبع الغشاء salting out and membrane printing فى فصل والتعرف على بعض الأنزيمات حيث تمكن Kinzkofer and Radola باستخدام طريقة طبع الغشاء من التعرف وتقدير كل من أنزيمات البيروكسيديز peroxidase، لاكتيك ديهيدروجينيز lactic dehydrogenase والكحول ديهيدروجينيز alcohol dehydrogenase والفوسفوجلوكوميوتيز phosphoglucomutase ، والاستيريز esterases والبروتيز protease ، وكما سبق القول فان هذه الطريقة فى الفصل تعد من الطرق السريعة والدقيقة اذ يمكن التعرف على الأنزيم المفصول على الجل فى غضون ٢-٥ ق، ومن ثم فانه يمكن التعرف على مئات من العينات فى أقل من ساعة بمجهود وتكاليف أقل.

طرق التبادل الأيونى Ion exchange:

يمكن استخدام طرق الامتصاص باستخدام مبادل انيونى مثل ثنائى ايثايل امينو سليلوز diethyl amino ethyl cellulose أو مبادل كاتيونى مثل كربوكسيل ميثايل سليلوز carboxy methyl cellulose (CMC)، وقد استخدمت هذه الطرق بنجاح فى عمليات التنقية المكثفة والسريعة. كذلك تم استخدام الغربلة الجزيئية باستخدام مواد مثل السفادكس sephadex حيث يتم الفصل بناء على الحجم الجزيئى، وهذه تعتبر من الطرق الناجحة وذائعة الاستخدام فى هذا الصدد.

ومع ذلك فان هذه الطرق تعتبر غير متخصصة نسبيا اذ لايمكن عن طريقها (الا اذا استخدمت أكثر من طريقة فى عملية التنقية) فصل بروتين معين من كل البروتينات الأخرى.

طرق الكروماتوجرافيا التى تعتمد على ميل الارتباط :

**Affinity chromatographic techniques**

أساس التنقية بهذا التكنيك تعتمد على الازالة الاختيارية لبروتين معين أو عدد محدد من البروتينات) موجود فى خليط معقد من البروتينات، ويتم الفصل عن طريق ربط أو تثبيط مادة متخصصة للانزيم المراد فصله تسمى immobilized ligand بالمادة الحاملة الموجودة بعامود الكروماتوجرافيا، وعند امرار مخلوط البروتينات خلال هذا العامود فان البروتين الوحيد الذى سيتم ارتباطه هو الانزيم المراد فصله. وبعد ازالة البروتينات غير المرغوبه فانه يتم ازاحة الأنزيم المراد فصله تحت ظروف معينة حيث يتحرر الأنزيم ، وعادة ماتتم عملية الازاحة هذه عن طريق احداث تنافس بين تركيزات عالية من الـ ligand الذائبة . واذا ماتمت عملية التنقية

بواسطة الـ affinity chromatography بنجاح فان نقاوة الانزيم المعزول تكون عالية جدا اذا ماقورنت بالنقاوة المتحصل عليها من الطرق التقليدية الأخرى.

ولما كانت الأنزيمات تبدى تخصصا specificity عاليا ازاء مواد التفاعل ومرافقات الآنزيمات coenzymes لهذا فان أكثر المواد الـ ligands المفضلة هي مواد التفاعل ومرافقات الأنزيمات حيث يتم ربطها تعاونيا بالمادة الخاملة مثل السفادكس sephadex والربط يكون اما مباشرة أو من خلال جزىء رابط linker molecule يتكون من سلسلة كربونية طولها ٣-٨ ذرات كربون ، ومن التطبيقات الناجحة لاستخدام هذا التكنيك تنقية عديد من أنزيمات dehydrogenases على مواد خاملة مربوطة بالـ $NAD^+$.

obeikandl.com

# المراجع

1- Kinzkofor, A. and Rodola, B.J. (1983). Fast and high resolution enzyme visualization in ultrathin layer isoelectric focusing, Eectrophoresis, 4: 408-417.

2- Plummer, D.T.(1978). An introduction to practical biochemistry, 2nd edition. Mc Graw Hill Book Company (UK) Limited.

3- Radola, B.J. (1984). High resolution analytical and preparative isoelectric focusing. Electrophoresis Seminar held at Alexandria University (March 31-April, 12, 1984).

4- Rodwell, V.W. (1985). Regulation of enzyme activity. In: Martin, D.W., Mayes, P.A. Rodwell, V.W. and Granner, D.K., Harper's Review of Biochemistry, Twentieth Edition. Lange Medical Publications. Los Anglos, California, USA.

5- Rodwell, V.W. (1985). Kinetic properties of enzymes. In: Martin, D.W. Mayes, P.A., Rodwell, V.W. Granner, D.K. Harpers. Review of Biochemistry Lange Medical Publications, Los Anglos, California, USA.

6- Stryer, L. (1981). Biochemistry. W.H. Freeman and Company, San Francisco.

7- Wiseman, A. Ed. (1985). Handbook of enzyme. biotechnology, 2nd Edition. Ellis Horward Ltd., England pp. 162.

obeikandi.com