الفصل السابع

الإنزيمات Enzymes

يتم تصنيع الإنزيمات داخل الخلايا الحية ، وهي مركبات ذات طبيعة بروتينية تدخل في تركيب الخلايا الحية جميعها ، وهي فعالة بكميات قليلة ، وتقوم بدور الحفازات (الوسطاء) البيولوجية في تسريع التفاعلات البيوكيميائية في الجسم الحي ، وتحتاج الخلايا الحية للعديد من الإنزيمات للقيام بالعمليات الحيوية المختلفة ، وتحتوي الخلية الواحدة على ما يقارب 10000إنزيم ، وتتراوح الكتلة الجزيئية للإنزيمات مابين 10000 ملايين وعدة .

لا تتم عمليات التبادل بين العضوية الحية والوسط الخارجي وعمليات هضم المركبات المختلفة إلا بتأثير الإنزيمات عليها .

مقارنة بين تأثير الإنزيمات و الحفازات غير البيولوجية:

الهدف من الاختبار The aim of test: مقارنة بين تأثير α – أميلاز اللعاب وحمض كلور الماء في حلمهة النشا,

مبدأ الاختبار Theory of the experiment: تملك الإنزيمات فعالية حفز عالية ، وتأثير خاص ، وقدرة على تسريع التفاعلات في ظروف سهلة خلافاً عن الحفازات غير البيولوجية (مثل المعادن ، الحموض ...).

تقوم هذه الطريقة على دراسة حلمهة النشا ، ثم تحديد زوال الركازة (النشا) عن طريق التفاعل مع محلول اليود ، أو عن طريق ازدياد الناتج المالتوز الذي يمكن الكشف عنه عن طريق التفاعل مع كاشف فهلينغ (ظهور راسب أحمر من أكسيد النحاسي).

Scanned by CamScanner

علاقة سرعة التفاعل الإنزيمي بكمية الإنزيم:

مبدأ الاختبار Theory of the experiment: تحديد سرعة حلمهة النشا بكمية الإنزيم المضافة من ألفا-أميلاز اللعاب.

طريقة العمل Experimental procedure: يتم حل اللعاب المخفف في الماء في 20 ، 40 ، 80 ، 160 مرة نأخذ أربعة أنابيب اختبار ونضع في كل منها 1 مل من محلول اللعاب ، ونضيف إلى الأنابيب من السحاحة 4 مل من محلول النشا ونضعهم بسرعة في حمام مائي بدرجة C 38° ونسجل زمن بداية التفاعل بعد كل 1 –2 دقيقة ، تؤخذ 2 قطرة من كل عينة ونضيف إليها قطرة من محلول اليود في يوديد البوتاسيوم تعطي العينة في البداية لوناً أزرق بعد ذلك يتراوح اللون بين البنفسجي والأحمروفي النهاية اللون الأحمر. يلاحظ خلال 0.5 دقيقة من بداية التفاعل حتى ظهور اللون الأحمر مراحل تشكل الاريترو ديكسترينات من النشا.

بعد ذلك نرسم منحنياً بيانياً يمثل محور العينات سرعة التفاعل (مقلوب زمن ظهور الاريترو‌ديكسترينات) وعلى محور السينات تركيز إنزيم الأميلاز.

علاقة سرعة التفاعل الإنزيمي بدرجة الحرارة :

مبدأ الاختبار Theory of the experiment: تحديد سرعة حلمهة النشا بإنزيم α – أميلاز اللعاب ارتباطها بدرجة الحرارة.

طريقة العمل Experimental procedure: يوضع في أنبوب اختبار خمس قطرات من اللعاب ونسخن الأنابيب من 1–2 دقيقة في حمام مائي ثم نبرد الأنابيب.نوضع في أنبوبين آخرين 5 قطرات من اللعاب (بدون تسخين) ، ثم نضع في جميع الأنابيب 10 قطرات من محلول النشا ونضع الأنبوب الأول والثاني في حمام مائي بدرجة 38 °م ونضع الأنبوب الثالث في بيشر يحوي ماء وجليداً أو ثلجاً لفترة 3 دقائق.

Scanned by CamScanner

نضيف إلى كل أنبوب قطرة من محلول اليود في يوديد البوتاسيوم ونقارن الألوان التي تظهر.تنظم النتائج في جدول كالآتي.

الإنزيم	الركازة	اللون مع اليود	درجة الحرارة

علاقة سرعة التفاعل الإنزيمي بدرجة pH الوسط :

مبدأ الاختبار Theory of the experiment: يعتمد مبدأ الاختبار على مقارنة سرعة الحلمهة تحت تأثير الإنزيم α – أميلاز اللعاب عند قيم مختلفة لـ pH ، وفي النتيجة التوصل للقيمة المثالية لـ pH لعمل الإنزيم.

طريقة العمل Experimental procedure: نأخذ خمسة أنابيب ونضع في كل منهم 10 قطرات من المحلول الموقي سترات فوسفات عند القيم الآتية المختلفة لـ pH (5.6 ، 6.4 ، 6.8 ، 7.2 ، 8.0).

ثم نضيف إلى جميع الأنابيب 5 قطرات من اللعاب المدد في 10 مرات ونضيف 10 قطرات من محلول النشا بعدها نضع الأنابيب في حمام مائي بدرجة 38 °م بعد 1–2 دقيقة يأخذ قطرة من كل أنبوب وتوضع في أنابيب أخرى ونضيف قطرة من محلول اليود في يوديد البوتاسيوم. ويلاحظ زمن ظهور اللون الأحمر (مراحل تشكل الأريتروديكسترينات) في كل من العينات الخمس.

يتم تنظيم النتائج من خلال رسم منحني بياني يتم تحميل قيم pH المختلفة على محور السينات ، ويتم تحميل الزمن اللازم لحلمهة النشا حتى مراحل تشكل الأريترو ديكسترينات على محور العينات(بالدقائق)، ونستنتج من المنحني قيمة pH المثالية لعمل إنزيم α – أميلاز اللعاب.

Scanned by CamScanner

إنزيم الكاتالاز

مبدأ الاختبار Theory of the experiment: يوجد إنزيم الكاتالاز تقريباً في جميع الخلايا النباتية والحيوانية ، يوجد في درنات البطاطا وفي أوراق بعض النباتات كالكرنب ، ويتركز في كريات الدم الحمراء وفي كلي الحيوانات الثديية وكبدها . يفكك إنزيم الكاتالاز فوق أوكسيد الهيدروجين إلى أوكسجين وماء .

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 2\,H_2O + O_2$$

ويحلل مول واحد من إنزيم الكاتالاز خمسة ملايين مول من فوق أوكسيد الهيدروجين في الدقيقة الواحدة في الدرجة صفر $^{\circ}C$ ، ويمكن استخدام فوق أكاسيد الالكيل ROOH كمادة تفاعل بدلاً من فوق أوكسيد الهيدروجين H_2O_2 ، وتنشط أيونات النحاس Cu^{+2} إنزيم الكاتالاز.

يتأثر نشاط إنزيم الكاتالاز كغيره من الإنزيمات بالعوامل التالية :

تركيز الإنزيم ، درجة الحرارة ، تركيز مادة التفاعل (فوق أكسيد الهيدروجين)، درجة pH ، زمن التفاعل، المثبطات يتابع نشاط الكاتالاز بقياس تركيز فوق أكسيد الهيدروجين المتبقي بعد انتهاء التجربة ، بالمعايرة بمحلول برمنغنات البوتاسيوم حسب التفاعل الآتي:

$$2\,KMnO_4 + 5\,H_2O_2 + 5\,H_2SO_4 \rightarrow 5O_2 + MnSO_4 + K_2SO_4 + 8\,H_2O$$

نعاير أولاً التجربة الشاهدة التي لم يضف إليها الإنزيم ، ثم تعاير كمية مماثلة أضيف إليها الإنزيم لتسريع التفاعل خلال فترة محددة من الزمن .

يعبر الفرق بين المعايرتين عن كمية فوق أكسيد الهيدروجين التي حللها الإنزيم في تلك الفترة.

Scanned by CamScanner

المواد Materials:

- حمض كبريت 1 عياري
- محلول برمنغنات البوتاسيوم 0.01 عياري
- محلول H_2O_2 (0.24 %) في محاليل منظمة عند pH 3 ، 5 ، 7 ، 9 .

تحضير المستحضر الإنزيمي: يعقم طرف الإصبع بقطعة قطن مبللة بالكحول ، بعد جفاف الإصبع يثقب الجلد بإبرة معقمة ويضغط على الإصبع ويجمع الدم في ماصة شعرية 0,2 مل . يضاف الدم إلى أنبوب يحوي ماء مقطراً 25 مل مبرد بالثلج.

تأثير تركيز الإنزيم :

- يوضع في ستة دوارق الكميات التالية من المستحضر الإنزيمي على التوالي 0.5 ، 1 ، 1.5 ، 2 ، 2.5 ، 3 مل في الدوارق الأول والثاني والثالث والرابع والخامس ، أما الأنبوب السابع يترك بدون إضافة الإنزيم.

المواد (مل)	رقم الدورق						
	1	2	3	4	5	6	7
حجم H_2O_2	25	25	25	25	25	25	25
حجم الإنزيم	0.5	1	1.5	2	2.5	3	-
حجم H_2SO_4	5	5	5	5	5	5	5
حجم البرمنغنات المستهلك في معايرة H_2O_2المتبقية	V_1	V_2	V_3	V_4	V_5	V_6	V
تركيز H_2O_2	$[H_2O_2]_1$						$[H_2O_2]$
V مولر / دقيقة							

- يضاف لكل دورق 25 مل من محلول فوق أكسيد الهيدروجين pH = 7
- يضاف إلى كل دورق 5 مل من حمض الكبريت بعد مرور خمس دقائق من إضافة H_2O_2 لإيقاف نشاط الإنزيم.

Scanned by CamScanner

- تعاير محتويات الدوارق بمحلول برمنغنات البوتاسيوم حتى ظهور اللون الوردي الخفيف ويسجل حجم البرمنغنات.
- يطرح ما يستهلكه كل دورق من الدوارق الستة 1 ، 2 ، 3 ، 4 ، 5 ، 6 من استهلاك الشاهدة رقم 7.
- نحسب تركيز فوق أوكسيد الهيدروجين في جميع الدوارق .
- نحسب سرعة النفاعل الإنزيمي في جميع الدوارق بتطبيق العلاقة الآتية

$$V = \frac{[H_2O_2]_1 - [H_2O_2]_5}{5 \text{ min}}$$

- يرسم الخط البياني الذي يربط بين سرعة التفاعل الإنزيمي وتركيز اللإنزيم.

إذ $[\ H_2O_2\ ]$: تركيز فوق أكسيد الهيدروجين الكلي.

$[\ H_2O_2\ ]_1$: تركيز فوق أكسيد الهيدروجين في الدورق الأول بعد مرور خمس دقائق من نشاط الإنزيم.

Scanned by CamScanner

	5	4	3	2	1
حجم الأوكسين					
حجم الأزيم	10	10	10	10	10
H_2SO_4 حجم	—	8	6	4	2
ماء	5	5	5	5	5
	10	2	4	6	8

حجم بوصفات
ml 0,1 البوتاسيوم
المستهلك في معايرة
المتبقي من H_2O_2

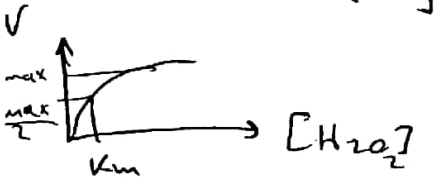
تركيز H_2O_2

$$\frac{NV_{KMnO_4}}{N'V'_{H_2O_2}} = \frac{2}{5} = \frac{1}{2.5}$$

$$2.5\, NV_{KMnO_4} = N'V'_{H_2O_2}$$

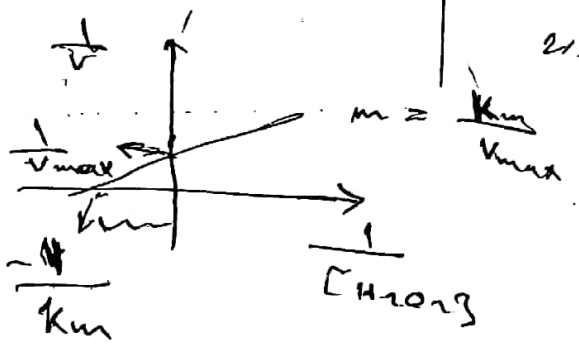
معادلة ميكايليس:

$$V = \frac{V_{max}[H_2O_2]}{K_m + [H_2O_2]}$$



معادلة لينويفر بارك:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[H_2O_2]} + \frac{1}{V_{max}}$$



$$2KMnO_4 + 5H_2O_2 + 3H_2SO_4 \longrightarrow 5O_2 + MnSO_4 + K_2SO_4 + 8H_2O$$

$$2MnO_4^- + 5H_2O_2 + 6H^+ \longrightarrow 5O_2 + 2Mn^{+2} + 8H_2O$$

1) حساب تراكيز $[H_2O_2]$ في اللحظات المختارة

$5\,mol\,H_2O_2 \equiv 2\,mol\,MnO_4^-$

$2.5\,(mol\,MnO_4^-) = (1\,mol\,H_2O_2)$

$5H_2O_2 \oplus 2MnO_4^-$

$\frac{5}{2}H_2O_2 \oplus MnO_4^-$

$0,01 \times V = (N.V)_{KMnO_4} = K_{MnO_4}$ بالمول

$= (N.V)_{H_2O_2} = H_{2O_2}$ بالمول

$(2,5) \times (0,01 \times V)_{KMnO_4} =$

$0.001\,V_{KMnO_4} = \frac{2,5 \times (0,01 \times V)}{10\ 2,5} = \frac{\text{عدد المولات}}{\text{الحجم الكلي}} = [H_2O_2]$ الباقي من $KMnO_4$

2) حساب السرعة:

سرعة التفاعل $v = \frac{[H_2O_2]_{\text{سابق}} - [H_2O_2]_{\text{لاحق}}}{5\,min}$

Scanned by CamScanner