حركية التفاعلات الإنزيمية: Enzyme Kinetics

تتأثر سرعة التفاعلات الإنزيمية بعدة عوامل:

١- درجة الحرارة.

٢- الـ PH.

٣- تركيز السبسترات.

٤- كمية الإنزيم المستخدم.

٥- المواد المثبطة.

ودراسة الـ Enzyme Kinetics بجانب تحديد تركيز الإنزيم والمركز النشط للإنزيم وتخصص الإنزيم هام جداً في تحديد ميكانيكية الإنزيم كعامل مساعد حيوي.

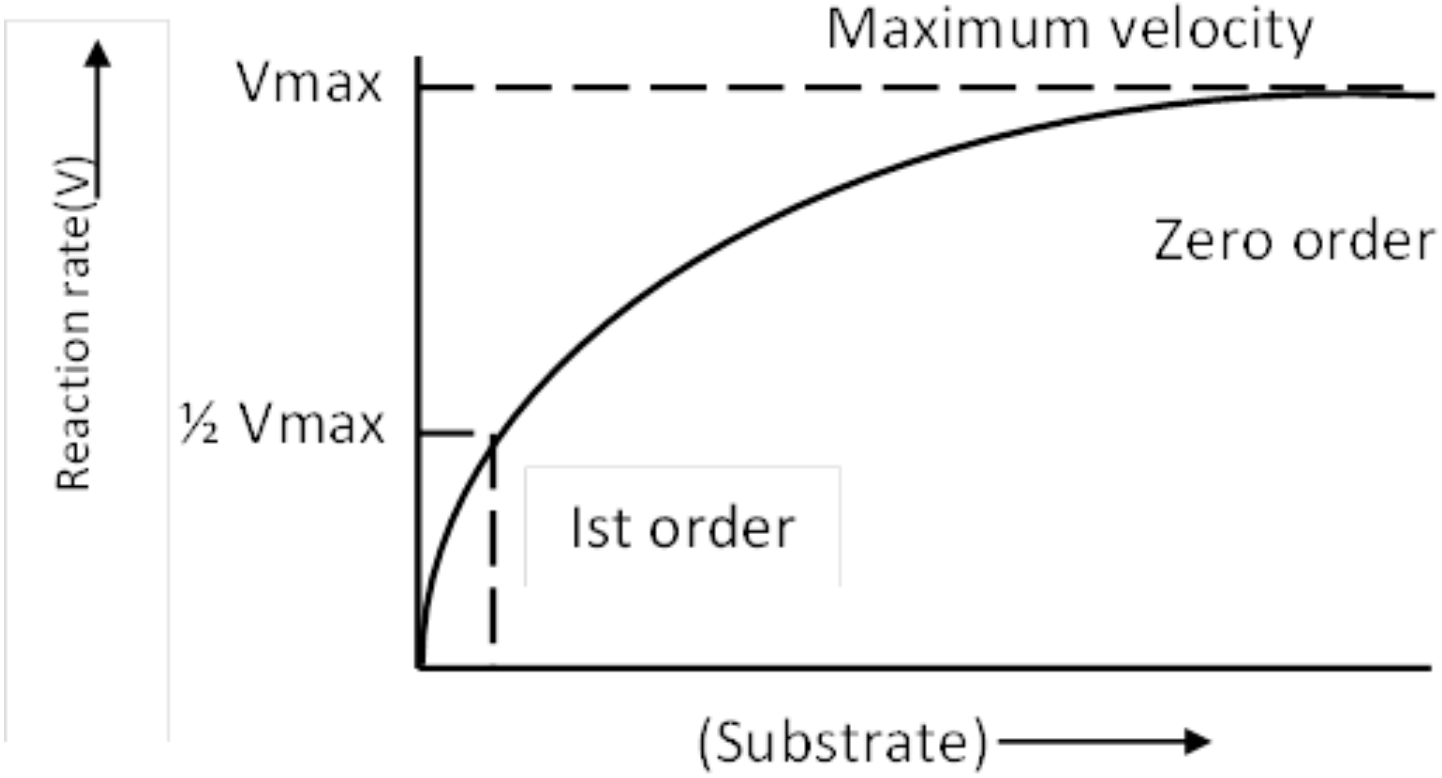
ومعرفة تأثير هذه العوامل له أهمية كبيرة فى استخدام الطرق الإنزيمية وذلك للنقاط الآتية:-

- اختيار الظروف المثلي للتفاعلات الإنزيمية ومن ثم الوصول لسرعة التفاعل القصوى في وقت قصير.
- ملاحظة النقاط الهامة في طرق التحليل بواسطة الإنزيمات.
- دراسة خواص الإنزيمات
- تحديد بعض النتائج التي توضح Mechanism- Regulation – Function of Enzyme
- توضيح بعض العمليات الحيوية في الخلايا الحية

معدلات سرعة التفاعل الإنزيمى:

يتم تقدير كمية النشاط الإنزيمي عن طريق تقدير معدل اختفاء الـsubstrate لكل وحدة زمن أو يتم تقدير معدل ظهور الناتج product لكل وحدة زمن وتعتبر الطريقة الثانية أسهل في عملية التقدير حيث يمكن قياس الناتج مباشرة بطريقة لونية وتقاس معدل سرعة التفاعل الإنزيمي velocity ويرمز لها بالرمز V بعدد ملليمولات الناتج في الدقيقة وقد بدأت دراسة سرعة التفاعل الإنزيمي عام ١٩٠٢ بواسطة العالم Advain Brown عندما حلل السكروز مائيا في وجود إنزيم الخميرة(الذي عرف فيما بعد بإنزيم الفركتوفيورانوسيديز fructofuranosidase) إلي جلوكوز وفركتوز

وتزداد سرعة التفاعل الإنزيمى مع الزيادة فى تركيز الـ substrate حتي تصل إلي أقصي سرعة وعندها يثبت معدل سرعة التفاعل بالرغم من حدوث زيادة مطردة في تركيز الـsubstrate ويسمي معدل سرعة التفاعل في هذه الحالة بسرعة التفاعل القصوى maximum velocity ويرمز لها بالرمز Vmax



معادلة ميكاليس – متن:- Michaelis-Menten- -

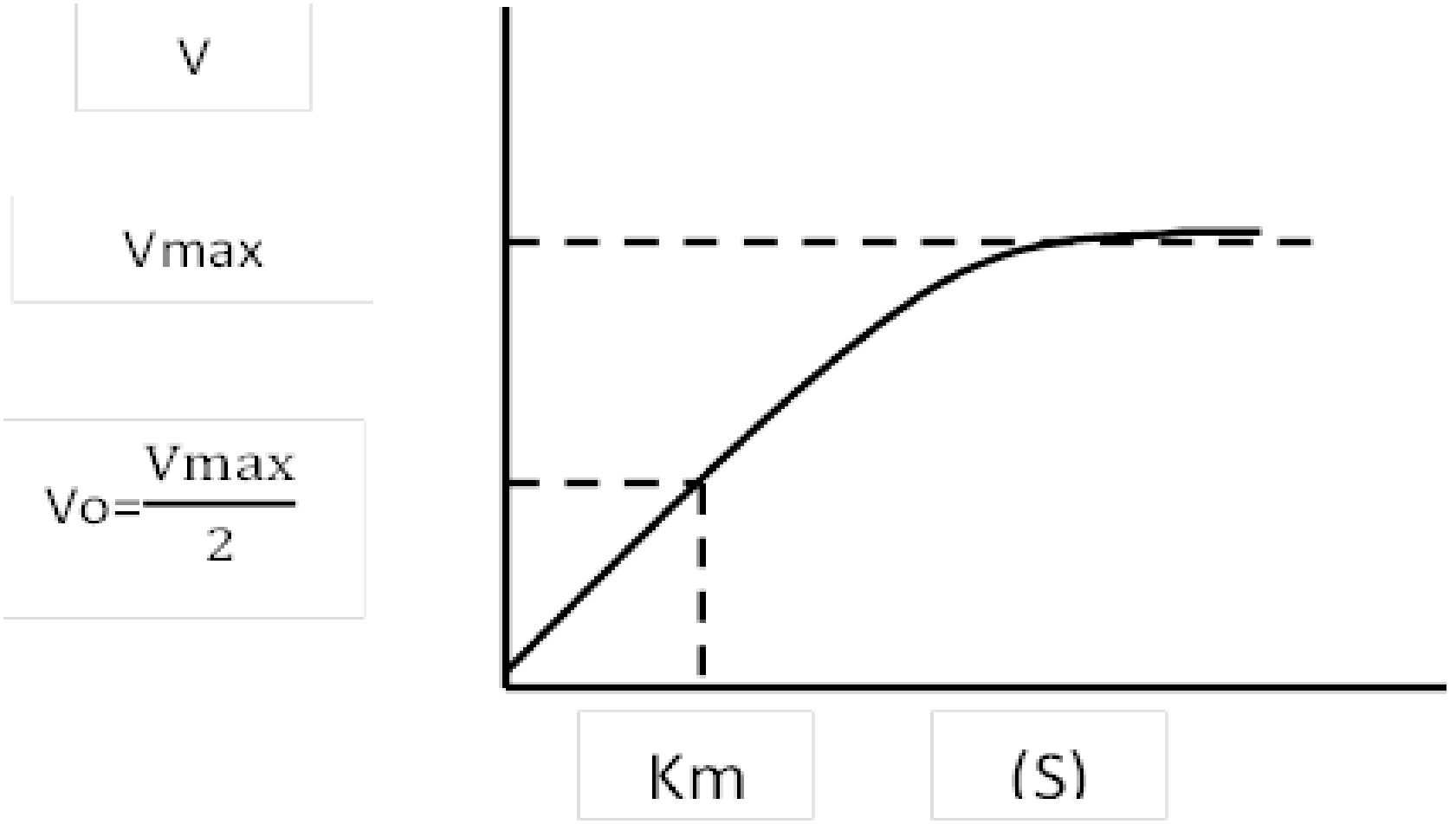
هي معادلة توضح العلاقة بين تركيز مادة التفاعل $[S]$ ومعدل سرعة التفاعل الإنزيمى V

$$V = \frac{Vmax[S]}{Km + [S]}$$

حيث V معدل سرعة التفاعل الإنزيمي ، Vmax سرعة التفاعل القصوي ، KM ثابت ميكاليس

معادلة مكياليس و منتن: Michaelis-Menten

اشتقت هذه المعادلة من نظرية التشبع بالسبسترات Saturatiom of substrate وهي معادلة تدرس العلاقة بين تركيز المادة (S) وسرعة التفاعل الإنزيمي V

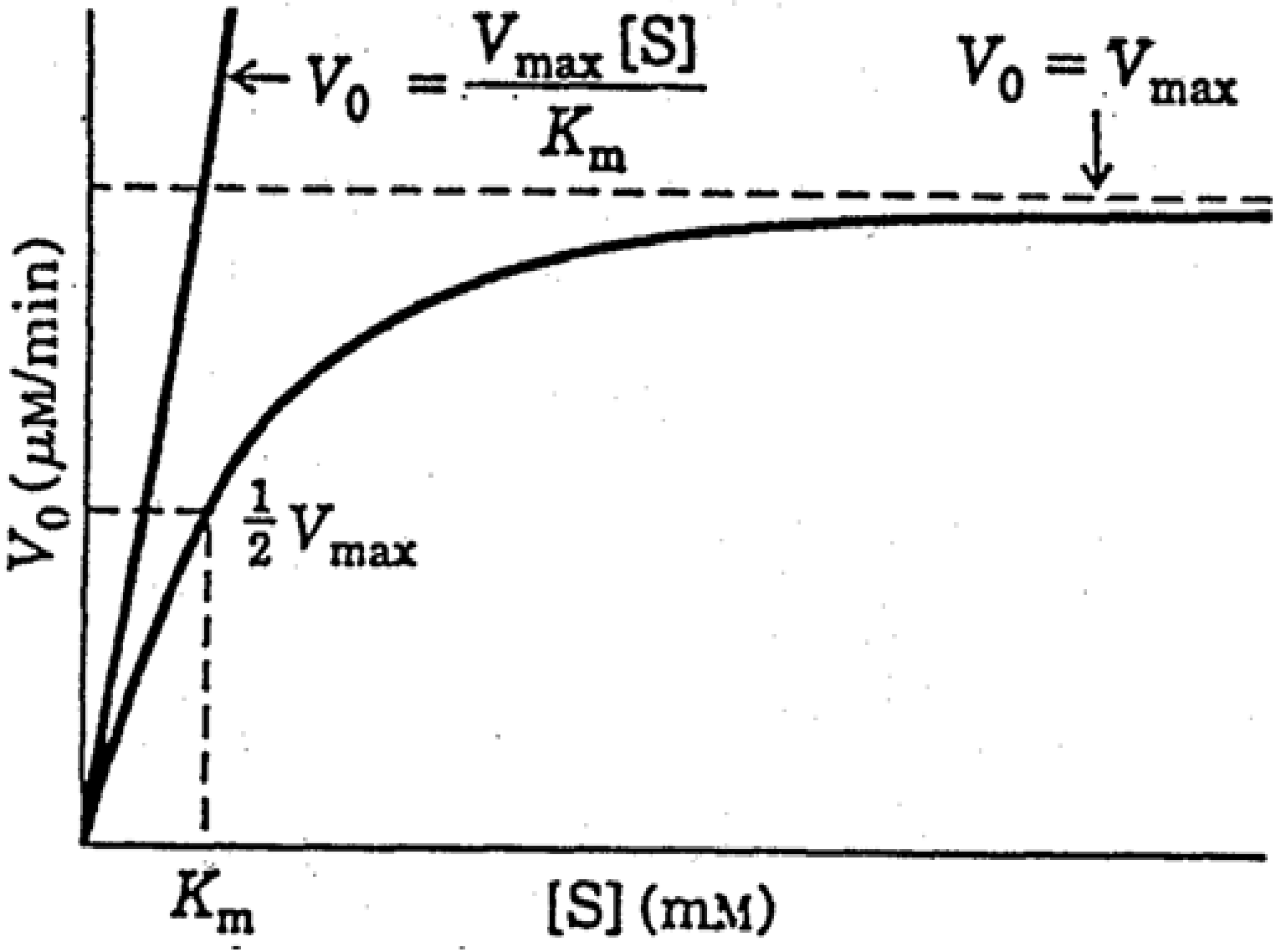


ويمكن استنتاج معادلة ميكاليس – منتن كالتالي:-

فعند وضع كمية ثابتة من الإنزيم وزيادة في تركيز السبسترات (S) تدريجياً نجد أن منحي التفاعل الإنزيمي يأخذ الشكل المبين بمعني أنه في بداية التفاعل تكون هناك علاقة طردية بين السرعة وتركيز المادة (S) ثم تقل الزيادة في سرعة التفاعل تدريجياً مهما زاد تركيز السيترات (S) ومن الرسم يتضح أن:

V Velocily(سرعة التفاعل) ، Vmax (السرعة القصوى للتفاعل) وإلتى عندها يصل التفاعل إلي أقصى نشاط له أي كل كمية الإنزيم توجد في صورة معقد من الإنزيم والسبسترات ES و Km: ثابت ميخائيل وهو تركيز المادة عند منتصف السرعة القصوى للتفاعل أي عند Vo وكلما قلت قيمة Km كلما دل ذلك علي أن التفاعل سريع وأن هناك قابيلة للاتحاد بين الإنزيم والسبسترات

منحنى معادلة ميكاليس – منتن



وبالنظر الى الى المعادلة الاتية

$$[E] + [S] \underset{K-1}{\overset{K+1}{\rightleftharpoons}} [ES] \underset{K-2}{\overset{K+2}{\rightleftharpoons}} [E] + [P]$$

نجد ان تكوين معقد ES يتحكم فيه عاملين:

K+1 ثابت الاتزان او التكوين: Equilibrum contstant

K-1 ثابت الانحلال: Dissociation constant

كذلك تكوين (P) + (E) يتحكم فيه عاملين:

K+2 ثابت الانحلال المسئول عن تكوين (P) + (E)

K-2 ثابت الاتزان والمسئول عن تكوين (ES)

ثابت الاتزان وثابت الانحلال

بطبيق قانون فعل الكتلة على المواد الداخلة والناتجة من التفاعل

Equilibrium constant Keq $\frac{[\mathrm{E}\,S]}{[E][S]} = \frac{\mathrm{K}+1}{K-1}$

Dissociation constant Ks $= \frac{[E][S]}{[\mathrm{E}\,S]}$

نظرية Michaelis–Menten تفترض أن الإنزيم يكون مع السبسترات معقد والذي يتحلل إلي إنزيم حر [E] وناتج تفاعل P [P] ويراعي أن الـ S الذي يرتبط بالإنزيم هو الذى يتحول الى ناتج تفاعل

وكما سبق $$K\ S = \frac{[E][S]}{[E\ S]}$$

$$Et = [E] + [E\ S]$$

$$Vo = K + 2\ [E\ S]$$

$$E\ S \ \frac{K+2}{K-2}\ \ E\ +\ P$$

$$K\ +2 = \frac{[E][P]}{[E\ S]}$$ طرفين * وسطين ينتج التالى:

$$K+2\ [E\ S] = [E]\ [P]$$

$$KS = \frac{[E][S]}{[E\ S]}$$ ثابت الانحلال $$KS = \frac{[[Et]-[ES]\ [S]]}{[ES]}$$

$$KS\ [E\ S] = [[Et] - [ES][S]]$$ طرفين * وسطين

$$[Et]\ [S] = [ES]\ [KS + [S]] \qquad [ES] = \frac{[Et][S]}{KS+[S]}$$

$$Vo = K + 2\ [E\ S]$$ = وحيث أن بداية سرعة التفاعل

$$Vo = K + 2\ \frac{[Et][S]}{KS+[S]}$$ بالتعويض ينتج

وبما أن كمية الإنزيم ثابتة فمعني ذلك أنه بزيادة تركيز الـ S فإن هناك فرصة كبيرة لوجود كل الإنزيم فى صورة ES أي أن الإنزيم قد تشبع بالسبسترات $[S]$

وعند هذه النقطة يصل التفاعل إلى أقصاه حيث أنه عند Vmax لا يوجد أي إنزيم حر ولكن كله مرتبط مع $[S]$ في صورة $[ES]$

$$[ES] = [Et] - [E] \quad ، \quad Vmax = K+2\,[Et]$$

عندما تكون $Vmax = 0$ وحيث أنه $Vmax = K + 2\,[Et]$

وبما ان: $Vo = K + 2\,\frac{[Et][S]}{KS+[S]}$ كما سبق

$$\therefore \quad Vo = \frac{Vmax\,[S]}{KS+\,[S]}$$

وبالقسمة علي $[S]$ ينتج أن: $Vo = \frac{Vmax}{\frac{Km}{[S]}+1}$ او $Vo = \frac{Vmax\,[S]}{Km+\,[S]}$

ثابت ميخائيل Km

ثابت ميخائيل Km عبارة عن تركيز السبسترات عند منتصف السرعة القصوى للتفاعل وتسمي هذه المعادلة بمعادلة ميخائيل منتن وهي معادلة لقياس سرعة تفاعل إنزيم واحد مع السبسترات (واحد) وهذه المعادلة تربط بداية سرعة التفاعل Vo والسرعة القصوى Vamx وتركيز السيترات $[S]$ مع ثابت ميخائيل Km

وبالرغم من ان هذه المعادلة لم تتضمن تركيز الانزيم الا ان ذلك يوجد ولكن بطريقة غير مباشرة فى صورة Vmax

أثبات أن Km= تركيز السبسترات عند منتصف السرعة القصوى للتفاعل

$$Vo = \frac{Vmax\,[S]}{Km + [S]}$$

وحيث أن $Vo = \frac{Vmax}{2}$

$$\frac{Vmax}{2} = \frac{Vmax\,[S]}{km + [S]}$$

وبقسمة طرفي المعادلة علي Vmax ينتج :

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{Km + [S]} \quad \therefore \quad Km + [S] = 2\,[S]$$

وبالتالى فإن: $Km + [S] - 2\,[S]$

$$Km = [S]$$

∴ km = تركيز السبسترات عند منتصف السرعة القصوى للتفاعل

∴ km = تركيز السبسترات عند منتصف السرعة القصوى للتفاعل

<u>ولذلك يمكن تعريف Km</u> بأنه: عبارة عن تركيز السبسترات عند منتصف السرعة القصوى للتفاعل $\frac{1}{2}$ Vmax وفي هذه الحالة فإن قيمة Km ثابتة .

$$Km = \frac{K-1+K+2}{K+1}$$ ثابت الانحلال / ثابت التكوين

حالة الـ Steady state :

$$Km = \frac{K-1+K+2}{K+1}$$

حالة الـ Steady stat: إذا كانت سرعة تكوين معقد ES مساوية لسرعة تفككه إلي هذا يسمي $[[E]] + [P]$ التفاعل Steady state وفي هذه الحالة يمكن تطبيق المعادلة التالية:

سرعة تكوين معقد = سرعة تفككه وتسمي Steady stat

$$K + 1\left[[Et] - [ES][S]\right] = K\text{-}1[ES] + K + 2\,[ES]$$

سرعة تكوين ES مساوية لسرعة تفككه إلي $[E] + [P]$

وبقسمه طرفي المعادلة علي $K+1[ES]$

$$K+1\ \frac{[Et]-[ES][S]}{K+1\ [ES]} = \frac{K-1\ [ES]+\ K+2\ [ES]}{K+1\ [ES]}$$

$$Km = \frac{K-1+K+2}{K+1}$$

$$\therefore \frac{[Et]-[ES][S]}{[ES]} = \frac{K-1+K+2}{K+1}$$

في بعض التفاعلات الإنزيمة: نجد أن قيمة K -1 (ثابت الانحلال) بالمقارنة بقيمة K + 2 (ثابت الانحلال إلي ناتج تفاعل) تكون كبيرة وفي هذه الحالة فإن ثابت سرعة K + 2 يمكن إهمالها

ويصبح في هذه الحالة Km = $\frac{K-1}{K+1}$ $\frac{\text{ثابت الانحلال}}{\text{ثابت التكوين}}$

وتحت هذه الظروف نجد أن: Km = KS تقريبا وذلك عندما تكون قمية K+2 قليلة بالمقارنة بـ K -1

وبالتالي : Km = $\frac{K-1}{K+1}$ ، KS = $\frac{[E][S]}{[ES]}$ وبما أن KS = Km

وللأسف فإن البعض يعتبر أن قيمة KS = Km في جميع الحالات ولكن الواقع أن KS = Km عندما يكون قيمة K +2 قليلة بالنسبة لقيمة K-1.

أهمية ثابت ميخائيل Km

١- ثابت ميخائيل Km عبارة عن عدد أو قيمة توضح القابلية Affinitate بين الإنزيم و السبسترات.

٢- قيمة Km لا تعتمد علي ما إذا وجد في وسط التفاعل S أخر.

٣- ثابت ميخائيل Km تساوي تركيز السبسترات عند منتصف السرعة القصوى للتفاعل وعموماً فإن قيمة Km للتفاعل الذي يكون به سبسترات واحد يعبر عنه بالمول/ لتر وهذه القيمة لا تتوقف علي تركيز الإنزيم.

٤- قيمة Km لا تكون ثابتة لنفس E ، S إلا تحت الظروف الواحدة التي يقاس عندها فهي تتغير بتغير الحرارة والـ PH كما أن تغير قيمة Km تتغير بتركيز السبسترات $[S]$

٥- في حالة الإنزيمات التي تعمل علي مواد مختلفة في هذه الحالة يوجد Km لكل S

٦- قياس الـ Km له أهمية في حالة التقدير الكمي لنشاط الإنزيم في الأنسجة وكذلك في حالة تنقية الإنزيمات.

٧- عندما يكون التفاعل في حالة Steady state فإن قيمة $Km = \frac{K+2+K-1}{K+1}$

٨- عندما تكون قيمة K +2 صغيرة بالنسبة لقيمة K-1 فإن Km= $\frac{K-1}{K+1}$ وفي هذه الحالة أيضا فإن قيمة KS = Km

٩- كلما كانت قيمة Km اقل كلما دل ذلك علي زيادة نشاط الإنزيم ومن ثم سرعة التفاعل بينما زيادة قيمة Km تدل علي بطء التفاعل وقلة نشاط الإنزيم.

معادلات مشتقة من معادلة ميخائيل ومنتن:

معادلة: Lineweaver Burk Blot of Michealis menten Equation

لقد أمكن وضع معادلة ميخائيل منتن في صورة أخري عكسية ثم رسمها بصورة منتظمة علي هيئة خط مستقيم ولقد اشتقت الصورة الأخري والتي تسمي: Linewer & Burk Equation بأخذ مقلوب المعادلة

$$Vo = \frac{Vmax\,[S]}{Km + [S]}$$

$$\frac{1}{Vo} = \frac{Km + [S]}{Vmax\,[S]} = \frac{Km}{Vmax\,[S]} + \frac{[S]}{Vmax\,[S]}$$

ثم تشتق المعادلات التالية بأخذ $\frac{Km}{Vmax}$ عامل مشترك

$$\frac{1}{Vo} = \frac{Km}{Vmax} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{Vmax}$$

وبأخذ $\frac{Km}{Vmax}$ من الجزء $\frac{Km}{Vmax[S]}$ يصبح:

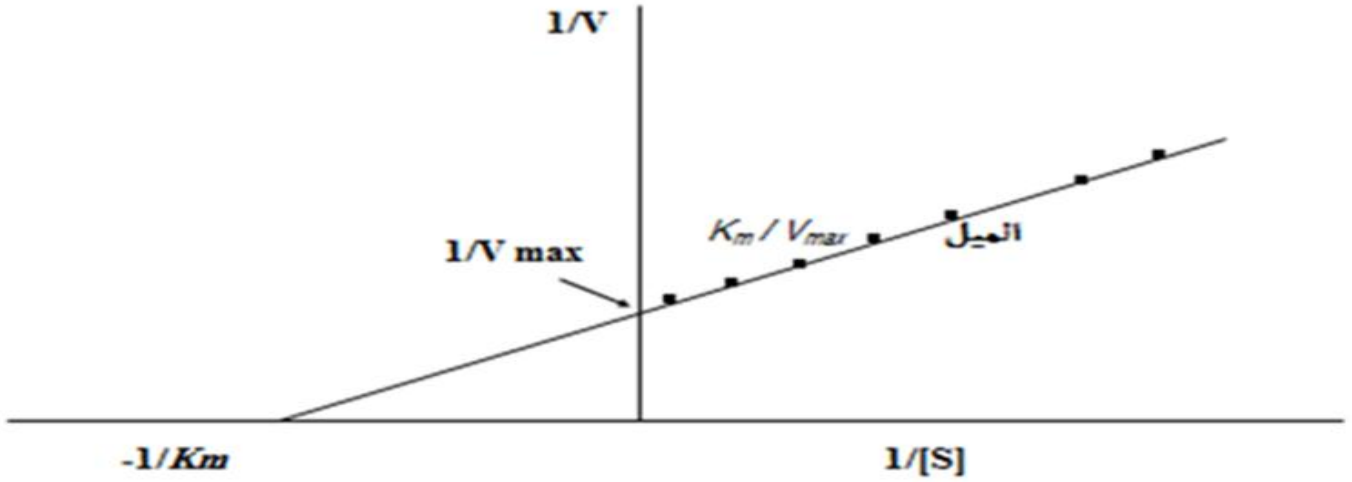
$$\frac{1}{Vo} = \frac{Km}{[S]} \times \frac{1}{Vmax} + \frac{1}{Vmax}$$

ووتسمى هذه المعادلة بمعادلة Lineweaver & Burk

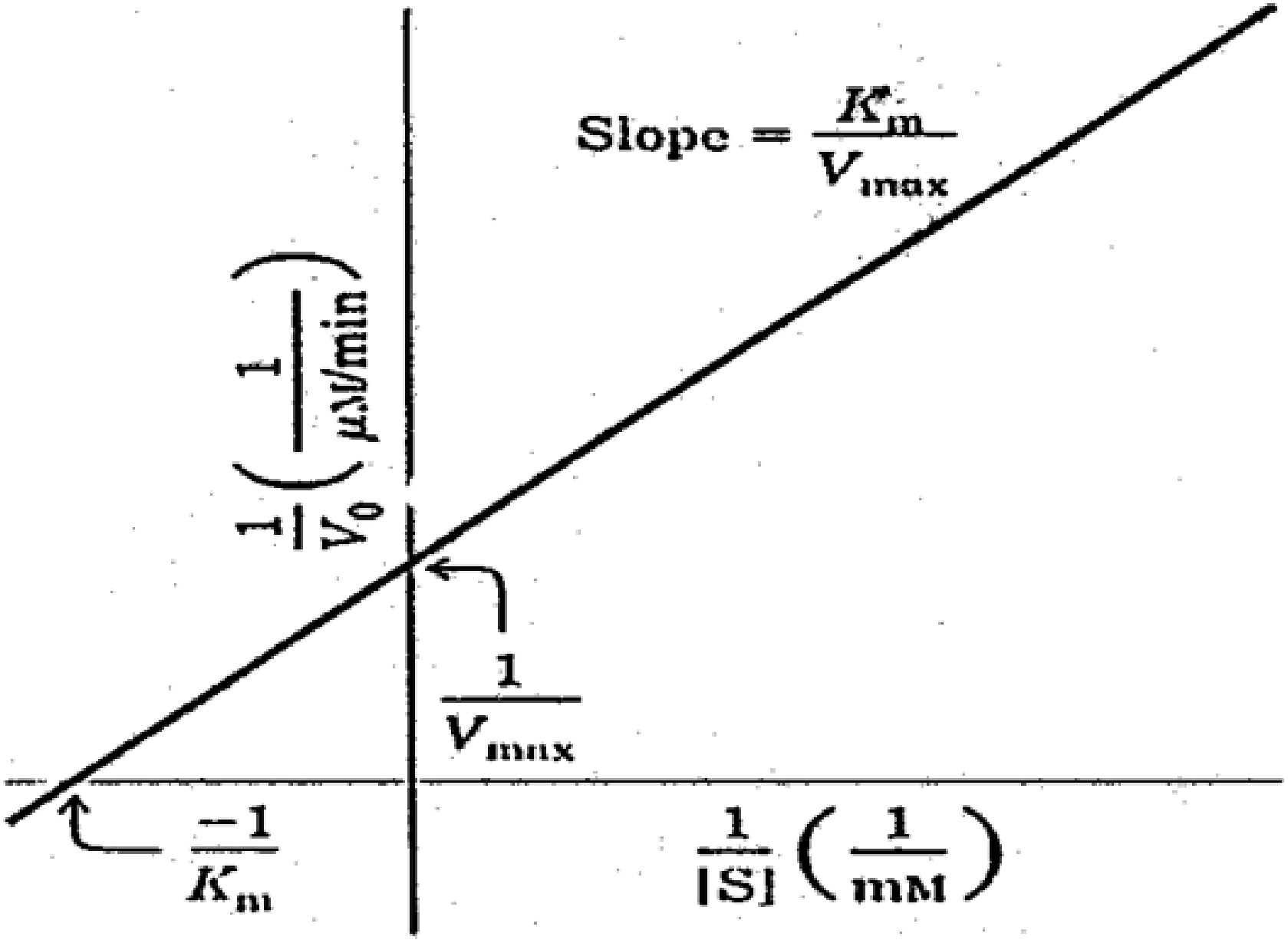
وعند رسم هذه المعادلة بيانياً نحصل علي خط مستقيم ميله slope= $\frac{Km}{Vmax}$

ويقطع المحور الرأسي بحيث يكون الجزء المقطوع يساوي $\frac{1}{Vmax}$ ويكون الجزء المقطوع من المحور الأفقي = - $\frac{1}{Km}$ وذلك للحصول علي هذا الرسم بيانياً عندما نرسم $\frac{1}{S}$ مقابل العلاقة $\frac{1}{Vo}$

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$$



Lineweaver Burk plot رسم لاين ويفر برك


Slope = $\frac{K_m}{V_{max}}$
$\frac{1}{V_0}\left(\frac{1}{\mu M/min}\right)$
$\frac{1}{V_{max}}$
$\frac{-1}{K_m}$
$\frac{1}{[S]}\left(\frac{1}{mM}\right)$

ومن مميزات الرسم البياني السابق ومن ثم معادلة Lineweaver & Burk أنه يمكن تحديد قيمة Vamx بالضبط وذلك بعكس تحديد قيمة Vamx في الرسم البياني البسيط من خلال V ، $[S]$

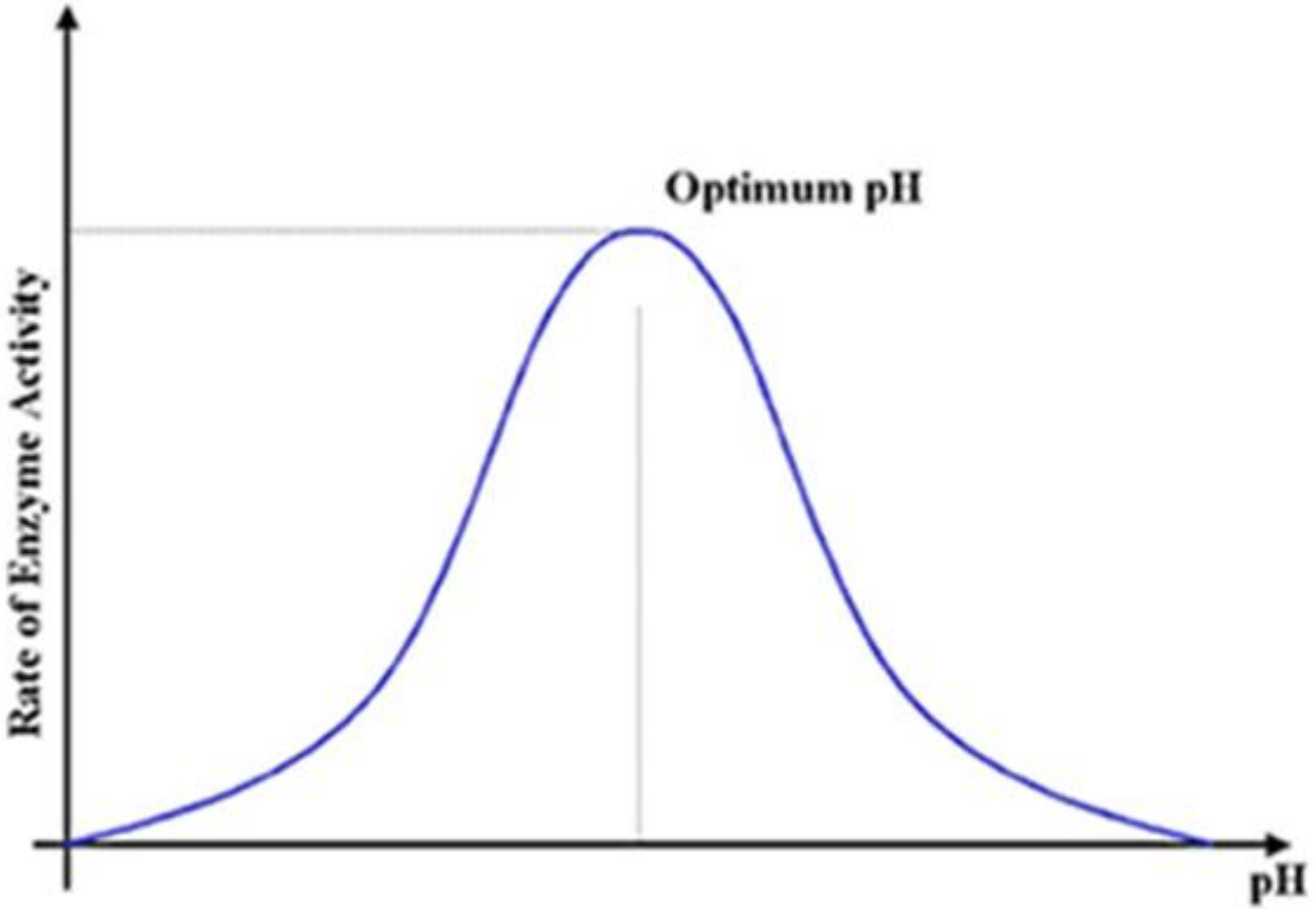
ولسوف نري فيما بعد قيمة النتائج الخاصة بالـ Enzyme Kinetic الخاصة بالصورة البيانية تعطينا بيانات في منتهي الأهمية وخاصة فيما يتعلق بالمثبطات الإنزيمة

العوامل التي تؤثر علي سرعة التفاعل الإنزيمي:

١- درجة الحموضة (درجة الـ pH):

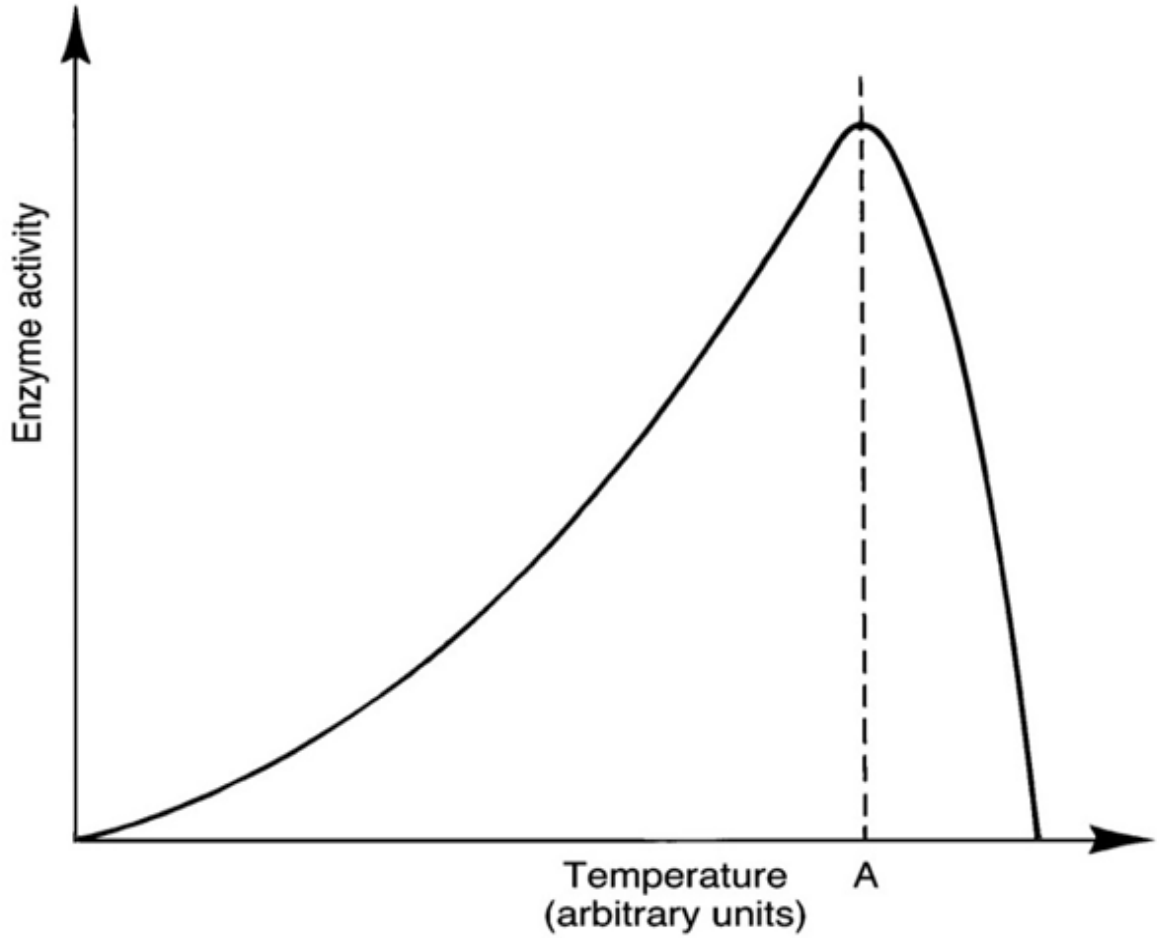
لكل إنزيم درجة pH مثلي يعمل عندها فهناك إنزيمات لا تعمل إلي في الوسط الحمضي مثل الببسين الذي ينشط عند pH من ١,٥ -٢,٥ وإنزيمات تعمل في الوسط المتعادل مثل اليورييز حيث ينشط عند pH ٧، وأخري تعمل في الوسط القاعدي مثل الأرجينيز والذي يعمل عند pH من ٩,٥- ٩,٩ والشكل التالى يوضح تأثير درجة الـ pH علي معدل سرعة التفاعل الإنزيمي لثلاثة إنزيمات مختلفة

تأثير درجة الـ pH على معدل التفاعل الإنزيمي.



درجة الحرارة Temperature

تزيد درجة الحرارة من معدل التفاعل الإنزيمي ولكن إلي حد معين بعده يقل معدل سرعة التفاعل الإنزيمي مع زيادة درجة الحرارة لأن الإنزيم بروتين فهو يحدث له دنترة وعندها يفقد الإنزيم نشاطه وقد يتوقف تماماً



تركيز الإنزيم Enzyme concentration

يزداد معدل سرعة التفاعل الإنزيمي بزيادة تركيز الإنزيم فإذا كانت كمية الإنزيم هي علي الترتيب x ، 2x ، 3x ، 4x وبمرور الزمن فإن معدل سرعة التفاعل الإنزيمي تكون أعلي تركيز الإنزيم 4x فأقل للتركيز 3x، ثم 2x ثم x (والشكل التالى يوضح ذلك) وبوضع كميات الإنزيم السابقة علي المحور الأفقي نحصل علي خط مستقيم

تأثير تركيز الإنزيم على معدل سرعة التفاعل الإنزيمي