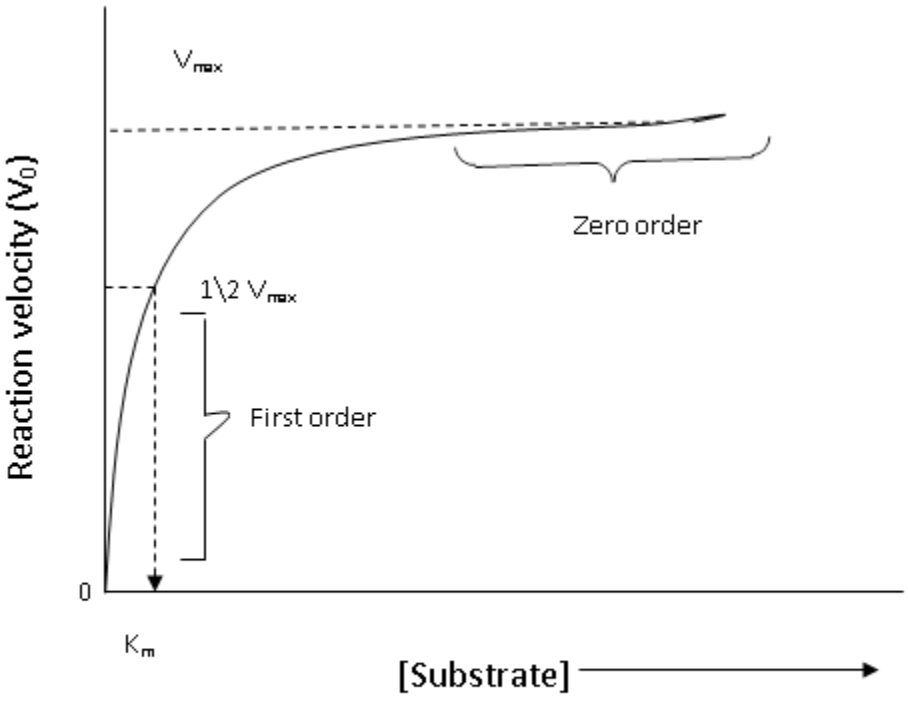
العوامل التي تؤثر على فعالية الانزيم

هناك خمسة عوامل تؤثر على فعالية الانزيم هي:

1- الأس الهيدروجيني pH : لكل انزيم pH مثلى تكون فعاليته أقصى ما يمكن فيها مثال : ال pH المثلى لانزيم الببسين الذي يفرز داخل المعدة حواي 2 و ال pH المثلى لانزيم الأميليز الذي يفرز داخل الأمعاء حوالي 7 . وتقل فعالية الانزيم فوق أو تحت ال pH المثلى.

2- درجة الحرارة: بشكل عام الدجات الحرارية المثلى التي تعمل بها الانزيمات بفعاليتها القصوى بين 10-50 °م . وعموماً تزداد فعالية الانزيمات مع ارتفاع درجة الحرارة (تتضاعف كل عشر درجات مئوية) بشرط عدم الوصول الى الدرجة الحرارية التي يحدث فيها مسخ للانزيم .

3- تركيز المادة الأساس: عند اضافة المادة الأساس للانزيم، واذا كان تركيز الانزيم ثابت وتركيز المادة الأساس قليل جداً، فان سرعة التفاعل الانزيمي V_0 تتناسب طردياً مع زيادة تركيز المادة الأساس، حتى الوصول الى سرعة تفاعل ثابتة لاتتغير مع زيادة تركيز المادة الأساس والتي يكون عندها كل جزيئات الانزيم قد تشبعت بالمادة الأساس، وتسمى هذه بسرعة التفاعل القصوى V_{max} . والمنحني التالي يبين العلاقة بين تركيز المادة الأساس [S] وسرعة التفاعل الانزيمي V_0.



Effect of substrate concentration on reaction velocity

- V= سرعة التفاعل الانزيمي
- V_{max}= السرعة القصوى للتفاعل الانزيمي ويكون مقدارها ثابت لكل انزيم مع مادته الأساس.
- K_m= ثابت ميكائيلس
- [S]= تركيز المادة الأساس

وهذا البياني يتمثل بالمعادلة الاتية (معادلة ميكائليس- منتن)

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

اهمية ثابت ميكائليس

K_m يمثل تركيز المادة الأساس عندما تكون سرعة التفاعل الانزيمي تساوي نصف السرعة القصوى. وان قيمة K_m تدل على مقدار ألفة الانزيم مع المادة الأساس، فكلما كانت قيمةK_m قليلة كلما كانت ألفة الانزيم مع المادة الأساس عالية والارتباط قوي فيما بينهما وعندما يكون تركيز المادة الاساس مساويا الى K_m فان معدل سرعة التفاعل الانزيمي يساوي نصف مقدار السرعة القصوى. وان قيم K_m تتراوح بين 10^{-6}الى 10^{-1} مولر.

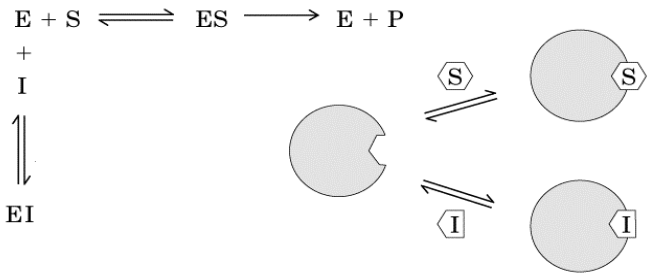
4 - تركيز الانزيم: عند ظروف معينة تشتمل على تركيز مناسب للمادة الاساس وبمقدار فائض عن حاجة الانزيم (K_mx100) ودرجة حرارة وpH مناسبين فان سرعة الفعالية للانزيم تتناسب مع كمية الانزيم الموجود.

5 – المثبطات: يتم تثبيط الانزيم بعدة عوامل منها رفع درجة الحرارة، تغيير ال pH ، اضافة أحدى مرسبات البروتين أو اضافة بعض المواد الكيميائية التي تدعى بالمثبطات. وتعتبر بعض العقاقير والمواد السامة والمبيدات مثبطات للانزيم، ومن انواع المثبطات.

أنواع التثبيط

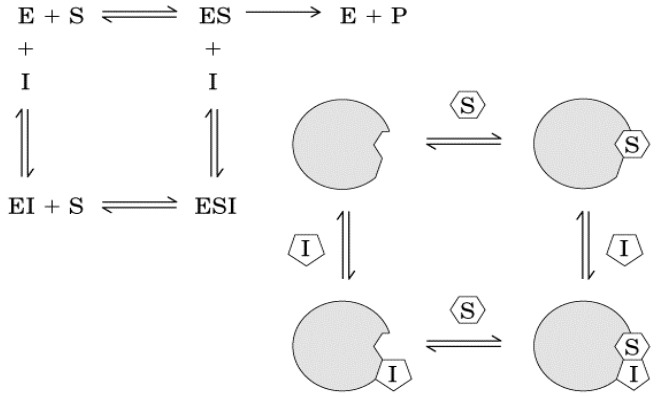
1- التثبيط العكسي: ترتبط المثبطات هنا مع الانزيم مباشرة، ويمكن ازالتها بالديلزة أو بالتخفيف فتسترجع الفعالية الانزيمية ثانية. ومن أنواعه:

a) التثبيط التنافسي العكسي: غالباً ما يكون التركيب الكيميائي للمثبط مشابه لتركيب المادة الأساس، ويتنافس كلاهما لاحتلال الموقع الفعال للانزيم. مثال أدوية السلفانيل أميد التي تشبه في تركيبها لمركب (بارا-أمينو بنزويك) وهو المادة الأساس للانزيمات المساهمة في نمو البكتريا، حيث تتنافس مع المادة الاساس وتحد من نمو البكتريا كما في المعادلة والشكل التالي:



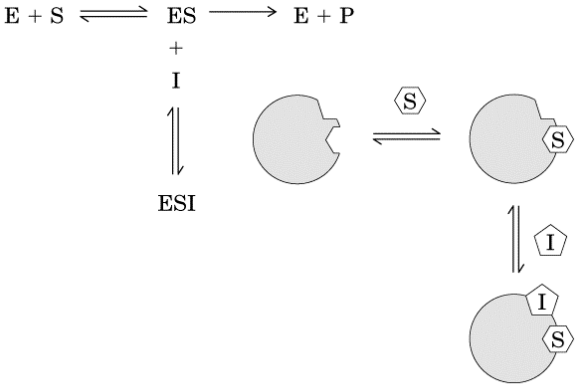
Competitive inhibition

b) التثبيط غير التنافسي العكسي: يكون التركيب الكيميائي للمثبط غير مشابه لتركيب المادة، وهنا يرتبط المثبط مع الانزيم في موقع آخر يختلف مع الموقع الفعال، سواء ان ارتبط الانزيم بالمادة الأساس أو لازال حراً.



Noncompetitive inhibition (Mixed)

c) التثبيط اللاتنافسي العكسي: يتحد المثبط اللاتنافسي هنا مع المعقد ES لتكوين المعقد ESI . وهو جزء من التثبيط غير التنافسي العكسي.



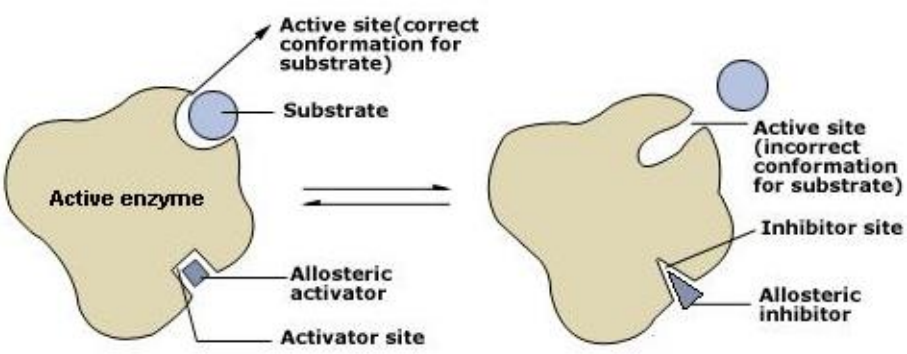
Uncompetitive inhibition

2- التثبيط غير العكسي (تسمم الانزيم)

هناك مثبطات أو سموم غير عكسية لاتشبه تركيب المادة الاساس، تتحد بقوة مع الانزيم ولا يمكن فصلها عنه كالسيانيد أو بعض المعادن كالزئبق أو مبيدات الحشرات أو بعض العقاقير الطبية مما يؤدي الى تحريف الانزيم وخفض فعاليته ثم توقفه.

الانزيمات الألوستيرية (Allosteric enzyme)

بعض الانزيمات تحوي على موقع آخر يختلف عن الموقع الفعال يسمى بالموقع المنظم. يرتبط هذا الموقع بآصرة تساهميةً مع مواد خاصة تسمى بالمواد المعدلة أوالمنظمة. يقع تأثير المواد المنظمة على الموقع الفعال للانزيم ويكون تأثيرها اما موجباً مما يزيد من اقتران الانزيم بالمادة الأساس أو سالباً مما يقلل من اقتران الانزيم بالمادة الأساس. وعادة ما تعمل مثل هذه الانزيمات في المسارات الأيضية وحسب حاجة الخلية.



تمارين تطبيقية عن حركيات الانزيم (معادلة ميكائيلس- منتن)

Michaelis-Menten equation

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

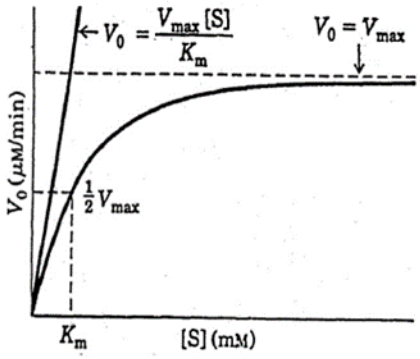
V_0= initial velocity (سرعة التفاعل الانزيمي)

V_{max}= maximum velocity (سرعة التفاعل الانزيمي القصوى وتكون ثابتة بثبات ظروف التفاعل)

[S]= substrate concentration (تركيز المادة الأساس)

K_m= Michaelis constant= [S] when the velocity of the reaction is ½ V_{max}

Km يمثل ثابت ميكائيلس ويساوي تركيز المادة الأساس التي تسبب حدوث نصف السرعة القصوى للتفاعل الانزيمي ويكون مقدار ثابت لكل انزيم مع مادته الأساس



شكل يمثل العلاقة بين سرعة التفاعل الانزيمي وتركيز المادة الأساس

أمثلة علي سرعة التفاعل الانزيمي

Q1 Urease enzyme hydrolyzed urea at [S] = 0.03 mmol/L with a K_m value of around 0.06 mmol/L. The initial velocity observed was $1.5x10^{-3}$ mmol/ min. Calculate the maximum velocity of the enzymatic reaction.

Answer

نكتب المعدلة ونعوض المعلومات المتوفرة ونحسب المطلوب من السؤال مع ضرورة الاهتمام بالوحدات والمطلوب هنا حساب السرعة القصوى

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

$1.5*10^{-3}$ mmol/ min = [V_{max}* 0.03 mmol/L]/ [0.06 mmol/L+0.03 mmol/L]
$1.5*10^{-3}$ mmol/ min= [V_{max}* 0.03 mmol/L]/0.09 mmol/L
V_{max}= [0.0015 mmol/ min* 0.09 mmol/L]/ 0.03 mmol/L
V_{max}= 0.0045 mmol/ min = $4.5*10^{-3}$mmo/min

Q2 An enzyme with a Km of 0.06 mmol/L hydrolyzed a substrate of a concentration 0.03 mmol/L, the initial velocity of the reaction was 0.0015 mmol/min. Calculate the substrate concentration which gives an initial velocity of 0.003 mmol/min

Answer

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

من المعلومات المتوفرة نحسب مقدار السرعة القصوى فيصبح لدينا مقدار K_m معلوم ومقدار السرعة القصوى معلوم، وبعدها يمكن حساب تركيز المادة الأساس عندما تكون سرعة التفاعل الانزيمي = 0.003 mmol/min

$1.5*10^{-3}$ mmol/ min = [V_{max}* 0.03 mmol/L]/ [0.06 mmol/L+0.03 mmol/L]

$1.5*10^{-3}$ mmol/ min= [V_{max}* 0.03 mmol/L]/0.09 mmol/L

V_{max}= [0.0015 mmol/ min* 0.09 mmol/L]/ 0.03 mmol/L

V_{max}= 0.0045 mmol/ min= $4.5*10^{-3}$mmo/min

بعد حسابنا لمقدار السرعة القصوى اكتملت لينا المعلومات وعندها يمكن حساب تركيز المادة الأساس المطلوب

V_O= (V_{max}*[S])/ (Km + [S])

0.003 mmol/ min = (0.0045 mmol/ min * [S])/ (0.06 mmol/L + [S])

[S]= $4.2* 10^{-3}$ mmol/L

Q3 An enzyme hydrolyzed a substrate concentration of 0.03 mmol/L, the initial velocity was $1.5x10^{-3}$ mmol/min and the maximum velocity was $4.5x10^{-3}$ mmol/min. Calculate the substrate concentration that gives a velocity of $3x10^{-3}$ mmol/min.

Answer

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

هنا علينا حساب Km أولا ثم حساب تركيز المادة الأساس

$1.5x10^{-3}$ mmol/min= ($4.5x10^{-3}$ mmol/min* 0.03 mmol/L)/ (Km + 0.03 mmol/L)

$1.5x10^{-3}$ K_m+ $4.5*10^{-5}$ mmol/L= $13.5*10^{-5}$ mmol/L

K_m= ($13.5*10^{-5}$ mmol/L- $4.5*10^{-5}$ mmol/L)/ $1.5x10^{-3}$

K_m= $9*10^{-5}$ mmol/L / $1.5x10^{-3}$

K_m=$6*10^{-2}$ mmol/L

الآن بعد اكتمال كل المعلومات عليك ان تحسب تركيز المادة الأساس المطلوب كما في المثال السابق

Q4 The following initial velocities have been reported depending on the substrate concentration:

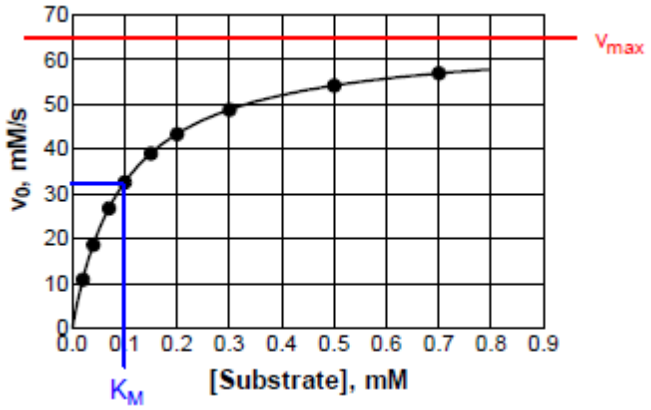
[Substrate], mM	v_0, mM s^{-1}
0.02	10.83
0.04	18.57
0.07	26.76
0.1	32.50
0.15	39.00
0.2	43.33
0.3	48.75
0.5	54.17
0.7	56.88

هنا يوجد جدول فيه بيانات قيم متغيرة لسرعة تفاعل انزيمي لانزيم معين وفقاً لتغير تركيز مادته الأساس والمطلوب رسم بياني يمثل العلاقة بين سرعة التفاعل الانزيمي (في المحور الصادي) وتركيز المادة الأساس (في المحور السيني) ومن البياني يمكن حساب K_m و V_{max}

(a) Draw a Michaelis-Menten plot for this enzyme.
(b) Draw a Lineweaver-Burke plot for this enzyme.
(c) Determine Km and Vmax for this enzyme

Answer

a) Draw a Michaelis-Menten plot for this enzyme.

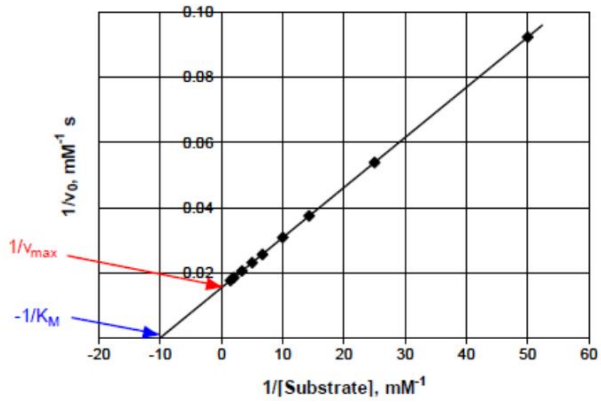


From the plot, we can determine V_{max} and K_m
V_{max} = 65 mmol/s
1/2V_{max} = 32.5 mmol/s
K_m = 0.1 mmol/L
ان قيم K_m و V_{max} التي تحسب من هذا البياني (ذو الشكل المنحني) تكون غير دقيقة وعليه تحسبان بطريقة أكثر دقة والمتمثلة بتطبيق الفرع b من السؤال

b) Draw a Lineweaver-Burke plot for this enzyme
According to the **Lineweaver-Burk equation,** we can plot $1/V_O$ with $1/[S]$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

في هذه الطريقة يتم الاعتماد على معادلة لاينويفر-بيرك بالصيغة أعلاه والتي تمثل مقلوب معادلة ميكائيلس-منتن ومنها نرسم العلاقة بين مقلوب سرعة التفاعل الانزيمي (على المحور الصادي) مقابل مقلوب تركيز المادة الأساس (على المحور الصادي). فنقطة التقاطع مع المحور الصادي تساوي 1/ V_{max} ومنها نحسب قيمة V_{max} بالضبط ، ونقطة التعادل مع المحور السيني تساوي (-1/K_m) ومنها نحسب قيمة K_m بالضبط .



c) K_m and V_{max} can be most precisely determined from the intercepts in the Lineweaver-Burke plot: $1/V_{max} = 0.015385\ mM^{-1}\ S$

$V_{max} = 65\ mM\ S^{-1}$

$-1/K_m = -10\ mM^{-1}$

$K_m = 0.1\ Mm$

Q5 According to the **Lineweaver-Burk equation, e**stimate the V_{max} and K_m of the enzyme-catalyzed reaction for which the following data were obtained.

هذا المثال يمثل ما تم توضيحه أعلاه

[S] (M)	V_0 (μM/min)
2.5×10^{-6}	28
4.0×10^{-6}	40
1×10^{-5}	70
2×10^{-5}	95
4×10^{-5}	112
1×10^{-4}	128
2×10^{-3}	139
1×10^{-2}	140

Answer

$1/[S]\ (M)^{-1}$	$1/V_o\ (\mu mol/min)^{-1}$
$400x10^3$	$36x10^{-3}$
$250x10^3$	$25x10^{-3}$
$100x10^3$	$14x10^{-3}$
$50x10^3$	$11x10^{-3}$
$25x10^3$	$8.9x10^{-3}$
$10x10^3$	$7.8x10^{-3}$
$5x10^3$	$7.2x10^{-3}$
$0.1x10^3$	$7.1x10^{-3}$

V_{max} = 140 µmol/min K_m = 1x $l0^{-5}$ M