بیوشیمی آنزیم

گرد آورندگان

دکتر هاجر شکری‌افرا

دکتر هیمن مرادی سردره

فهرست مطالب

فصل ۱ ..... خصوصیات آنزیم‌ها ۱

فصل ۲ ..... انواع کوفاکنورهای آلی یا کوآنزیم‌ها ۹

فصل ۳ ..... آنزیم‌های چند سوبسترایی ۱۷

فصل ۴ ..... طبقه‌بندی آنزیم‌ها ۱۹

فصل ۵ ..... مکانیسم عمل آنزیم‌ها ۲۷

فصل ۶ ..... کینتیک واکنش‌های آنزیمی ۴۵

فصل ۷ ..... مهار فعالیت آنزیم ۶۷

فصل ۸ ..... تنظیم عمل آنزیم‌ها ۷۹

فصل ۹ ..... کاربرد آنزیم ها ۸۷

فصل ۱

خصوصیات آنزیم‌ها

آنزیم‌ها[1] مهم‌ترین گروه از پروتئین‌ها هستند که در نقش **کاتالیزورهای بیولوژیکی**[2]، انجام واکنش‌های بیوشیمیایی و سرعت بخشیدن به آن‌ها را بر عهده دارند و به همین دلیل به کاتالیزورهای زیستی یا کاتالیزورهای یاخته‌ای معروف‌اند. ریشه لغوی کاتالیزور از دو صفت کاتا و لیزور تشکیل‌شده است. در زبان یونانی «کاتا» به معنای پائین، افتادن، یا پائین افتادن است و «لیزور» به معنی قطعه‌قطعه کردن می‌باشد. در برخی زبان‌ها کاتالیزور را به معنی گرد هم آوردن اجسام دور از هم نیز معرفی کرده‌اند. تاریخچه اولین گزارش استفاده از کاتالیزور، مربوط به کریشف می‌باشد که با استفاده از یک اسید به‌عنوان کاتالیزور توانست نشاسته را به قند، هیدرولیز کند. اولین کار در توضیح اینکه چرا یک واکنش کاتالیزوری انجام می‌گیرد و کاتالیزور چه نقشی دارد، توسط «فارادی» انجام شد. بیشترین بهره‌برداری از کاتالیزور در جنگ جهانی بود. انقلاب تکنولوژی اصلی درزمینه کاتالیزور مربوط به نیمه دوم قرن ۲۰ یعنی بین سال‌های ۱۹۸۰ـ۱۹۵۰ می‌باشد.

در حقیقت آنزیم‌ها همانند کاتالیزورها اجازه‌ی انجام واکنشی را که در شرایط عادی به‌سادگی اتفاق نمی‌افتد را، آن‌هم با سرعت‌بالا، ممکن می‌سازند، درحالی‌که آنزیم‌ها توسط سلول‌ها ساخته‌شده و محل فعالیتشان داخل یا خارج سلول سازنده‌شان است. آنزیم‌ها در تمام اندام‌ها و اندامک‌های موجودات زنده، هرجائی که واکنش‌های ضروری برای حیات روی می‌دهد، وجود دارند. درواقع یک سلول هنگامی کاری را انجام می‌دهد که تقریباً همیشه این کار با استفاده از یک آنزیم انجام می‌شود؛ بنابراین آنزیم یکی از شروط **حفظ حیات** است. هیچ آنزیمی به‌تنهایی قادر به کاتالیز واکنش‌های بسیار پیچیده و چندمرحله‌ای نیست و همواره مجموعه‌ای از آنزیم‌ها این اعمال گروهی را باهم انجام می‌دهند. اغلب آنزیم‌ها ساختار پروتئینی دارند، اما انواع محدودی از آن‌ها هستند، مانند ریبوزوم‌ها، که از جنس ریبونوکلئیک‌اسید هستند.

آنزیم‌ها با کاتالیزورهای شیمیایی در جهاتی شباهت دارند:

۱- هر دو طی واکنش مصرف یا تولید نمی‌شوند.

۲- هر دو تأثیری روی وقوع واکنش ندارند. یعنی اگر واکنشی انجام نشدنی باشد وجود آن‌ها تأثیری بر انجام واکنش ندارد، بلکه تنها سرعت انجام واکنش را، که خیلی کم است، افزایش می‌دهند. اما آنزیم‌ها **شاخصه‌های ویژه‌ای** مانند قدرت بالای کاتالیز و اختصاصیت عمل، دارند که وجه مقایسه آن‌ها در مقابل کاتالیزورهای غیر زیستی است

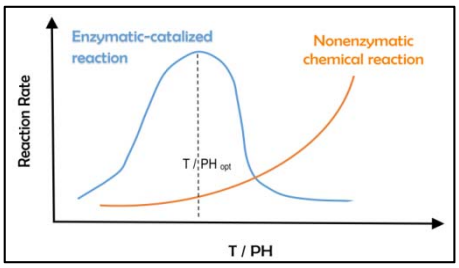
---

[1] Enzymes
[2] Biologic Catalyst

قدرت بسیار بالای کاتالیز. آنزیم‌ها ترکیباتی هستند که می‌توانند سرعت واکنش را $۱۰^{۱۶}$–$۱۰^{۳}$ برابر افزایش دهند. هیدراته شدن CO_2 پس از انتقال از بافت‌ها به ریه و دفع آن از بدن توسط آنزیم کربنیک انیدراز کاتالیز می‌شود. این آنزیم واکنش هیدراتاسیون را $۱۰^{۷}$ برابر واکنش غیر آنزیمی آن سرعت می‌بخشد. مولار (molar) یا فعالیت مولکولی، به تعداد مولکول سوبسترایی که در یک دقیقه توسط یک مولکول آنزیم (یا جایگاه فعال آنزیم) به محصول تبدیل می‌شود، گویند که پیشتر با عدد نوسازی یا T.O.N[1] شناخته می‌شد.

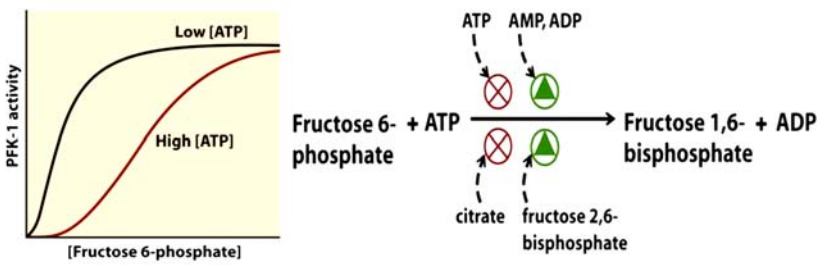
اختصاصیت عمل. اغلب آنزیم‌ها هم ازلحاظ **نوع سوبسترا** و هم **نوع واکنش** بسیار اختصاصی هستند. درعین‌حال درجات مختلفی از تخصص وجود دارد. علت اختصاصی بودن آنزیم‌ها را باید در ساختار فضایی آن جستجو کرد. ویژگی عمل آنزیم به سوبسترا به این معنی است که هر نوع آنزیم تنها با نوع خاصی از ماده (سوبسترا) که آنزیم برای آن ساخته‌شده واکنش می‌دهد. این ویژگی تا حدی است که موجب تفکیک انواع ایزومرهای فضایی (انواع L و D) توسط آنزیم‌ها می‌شود. آنزیم‌ها تنها کاتالیزور یک واکنش ویژه می‌باشند؛ اختصاصیت عمل آنزیم به یک واکنش شیمیایی خاص بسیار مهم است زیرا باعث می‌شود آنزیم‌ها اشتباه نکنند و بر دیگر ترکیبات سیستم اثر نداشته باشند، باعث ایجاد واکنش درجایی غیر از محل هدف نشود و محصولات جانبی حین واکنش تولید نشود. بدین ترتیب بازدهی عمل واکنش‌های آنزیمی در قیاس با واکنش‌های شیمیایی ۱۰۰٪ است. اختصاصیت آنزیم‌ها به گروه‌های فعال آنزیم، گروه‌های فعال سوبسترا و چگونگی در کنار هم بودن این گروه‌های فعال بستگی دارد.

ویژگی فعالیت آنزیم. محیط کاری آنزیم در عملکردشان بسیار مهم است. عملکرد آنزیم به‌وسیله انواع اسیدهای‌آمینه شرکت‌کننده در ساختمان آن، توالی اسیدهای‌آمینه و شکل رشته پروتئینی آن تعیین می‌شود، بنابراین شرایط ملایمی از حرارت و PH بهینه (optimum) و محیط رقیق (با غلظت کم) برای عملکردشان نیاز است. درحالی‌که اغلب کاتالیزورهای غیرآلی در این محیط فاقد فعالیت هستند. آنزیم‌ها تحت حرارت بالا و اسیدها و قلیاها، پایدار نمی‌مانند و تغییر می‌کنند ولیکن کاتالیزورهای غیر زیستی بدون تغییر می‌مانند (شکل ۱).



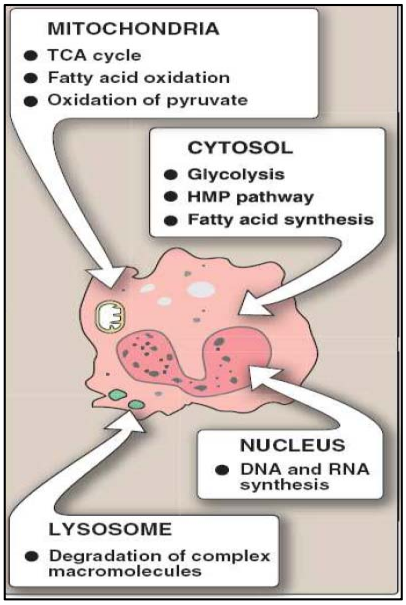
شکل ۱. تأثیر شرایط دمایی و pH بر فعالیت آنزیم

قابلیت تنظیم شدن. فعالیت آنزیم‌ها بسته به نیازمندی‌های سلول می‌تواند تنظیم (فعال یا مهار) گردد. اکثر آنزیم‌ها پس از پرشدن جایگاه‌های فعالشان از سوبسترا به اشباع‌شدگی می‌رسند و از ادامه فعالیت متوقف می‌شوند. در مواردی تمایل آن‌ها به سوبسترا تحت اثر برخی مواد موجود در محیط واکنش یا سیگنال‌های ارسالی از مناطق مختلف تغییر می‌کند و متناسب با آن فعالیت کاتالیزوری آن‌ها نیز تغییر خواهد کرد. اثر تحریکی فروکتوز ۶–فسفات (سوبسترای واکنش) و AMP (سیگنال کمبود انرژی) و اثر مهاری ATP (سیگنال کفایت انرژی) بر فعالیت آنزیم فسفوفروکتوکیناز را می‌توان مثال زد. نتیجه عمل آنزیم‌های تنظیمی حصول هماهنگی لازم بین فعالیت‌های متابولیسمی مختلف در بدن است (شکل ۲).



شکل ۲. قابلیت تنظیم شدن PFK-1 توسط عوامل تحریکی( ) و مهاری ( ).

[1] Turn Over Number



محصور شدن آنزیم‌ها. بعضی از آنزیم‌ها مخصوص بافت یا ارگانل‌های خاصی هستند. این کار باعث تفکیک سوبسترا یا محصول‌های واکنش از نقاط دیگر و ایجاد یک محیط مناسب کاری برای انجام واکنش و جهت دادن واکنش‌ها در مسیرهای متناسب می‌گردد (شکل ۳).

شکل ۳. جایگاه داخل سلولی برخی از آنزیم‌ها و مسیرهای مهم سلولی.

اصول کلی واکنش‌های آنزیمی

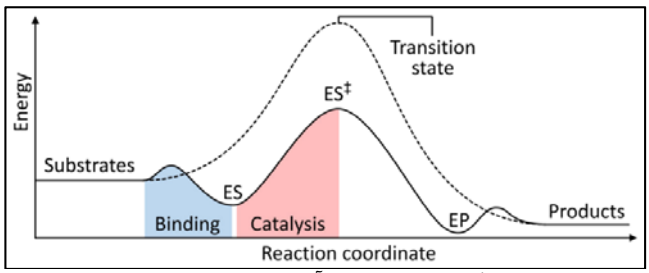
آنزیم‌ها (E) دارای یک یا چند محل نفوذ سطحی (جایگاه‌های فعال) هستند که سوبسترا (S)، ماده‌ای که آنزیم بر آن اثر می‌کند، به این نواحی متصل می‌شود. آن‌ها طی ۴ مرحله فعالیت خود را انجام می‌دهند (شکل ۴):

۱- اثر بر مواد واکنش‌دهنده به نام سوبسترا (S) یا سوبستراها.

۲- آنزیم از جایگاه فعال به سوبسترا متصل می‌گردد و کمپلکس حد واسط آنزیم/سوبسترا (ES) تشکیل می‌شود.

۳- انجام واکنش کاتالیز و ایجاد تغییر در سوبسترا (شکستن یا ایجاد یک پیوند جدید) که با تولید کمپلکس آنزیم/محصول (EP) در انتهای کاتالیز همراه است.

۴- آنزیم محصول را رها می‌کند و E و P از هم جدا می‌شوند. سپس آنزیم به حالت پایه خود (شکل اولیه) برمی‌گردد و آماده اثر بر مولکول سوبسترای دیگری می‌شود.



شکل ۴. مراحل فعالیت آنزیمی و تولید محصول

پیرامون خصوصیات واکنش‌های آنزیمی، می‌توان موارد زیر اشاره کرد:

۱- آنزیم‌ها حین واکنش تغییر می‌کند (ترکیب با سوبسترا (ES) و محصول (EP)) ولی در انتهای واکنش به حالت اول برمی‌گردد و تغییرنیافته باقی خواهند ماند.

۲- آنزیم‌ها در طی واکنش مصرف نمی‌شوند، به همین جهت مقدار کمی از آنزیم بر مقادیر زیادی از سوبسترا تأثیر می‌گذارد.

۳- واکنش‌های آنزیمی دوطرفه‌اند اما بنابر ضرورت در برخی از واکنش‌های خاص در بدن، عملا یک‌طرفه عمل می‌کنند.

– **اتصال سست:** کوفاکتورهای معدنی که بااتصال سست به آنزیم متصل می‌شوند، معمولاً یون‌های فعال‌کننده نامیده می‌شوند.
– اتصال محکم: کوفاکتورهای معدنی که بااتصال محکم به آنزیم متصل می‌شوند، معمولا در گروه یون‌های فلزی متالوآنزیم‌ها قرار می‌گیرند.

ب. مواد آلی: کوفاکتورهای گروه مواد آلی را **کوآنزیم‌ها** می‌نامند که آن‌ها نیز به دو شیوه به آنزیم متصل می‌شوند:
– **اتصال سست:** کوفاکتور آلی که با اتصال سست به آنزیم متصل شده باشد، کوسوبسترا نامیده می‌شود.
– **اتصال محکم:** کوفاکتور آلی که با اتصال محکم به آنزیم متصل شده باشد، گروه‌های پروستتیک نامیده می‌شود.

کوفاکتورهای معدنی

یون‌های فلزی مانند منیزیم، منگنز، روی، کلسیم، مس، آهن، سدیم، پتاسیم، کبالت و مولیبدن کوفاکتورهای معدنی برخی آنزیم‌ها را تشکیل می‌دهند (جدول ۱). اگر اتصال این کوفاکتورها به آنزیم سست باشد، یون فلزی را یون فعال‌کننده و آنزیم را **آنزیم فعال شونده توسط فلز** می‌گویند. درحالی‌که اگر اتصال کوفاکتور و آنزیم محکم باشد، کمپلکس آنزیم و یون را **متالوآنزیم** می‌گویند.
یون‌های فلزی ممکن است نقش‌های زیر را در آنزیم به عهده بگیرند:

۱- نقش ساختمانی

الف) نقش واسطه برای تشکیل پیوند بین مولکول‌های آنزیم و سوبسترا و کمک به اتصال سوبسترا به آنزیم؛ Fe^{2+} ، Zn^{2+} و Mg^{2+} چنین نقشی دارند، مانند نقشی که Mg^{2+} در اتصال ATP به کینازها بازی می‌کند.
ب) نقش تثبیت‌کنندگی شکل فعال آنزیم را با اتصال به آنزیم بر عهده دارند؛ K^+، Na^+ و Mn^{2+} چنین نقشی دارند، مثلا با اتصال K^+ به پیروات کیناز کونفورماسیون فعال آنزیم ایجاد می‌شود و یا F (فلوئور) آنزیم آدنیلات سیکلاز را فعال می‌کند.

۲- شرکت در عمل کاتالیز به‌عنوان دهنده یا گیرنده الکترون؛ مانند آنچه یون‌های Fe^{2+} و Cu^{2+} در واکنش‌های اکسیداسیون–احیا انجام می‌دهند. Fe^{2+} در آنزیم کاتالاز نقش اصلی را در تجزیه H_2O_2 دارد و همچنین در سیتوکروم‌ها مستقیما در کاتالیز شرکت دارد.

۳- به‌عنوان اسید لوویس[۱۳]: یون‌های مثبت می‌توانند به الکترون‌های جفت نشده اتصال یابند مانند پروتون‌ها، حتی قوی‌تر از آن‌ها، بار منفی آن‌ها را خنثی و پایدار کنند، مانند Fe^{2+}، Zn^{2+}، Cu^{2+} و Mg^{2+}. این گروه از فلزات به مدل‌های زیر با آنزیم کمپلکس تشکیل می‌دهند:

الف. آنزیم–سوبسترا–فلز (E-S-M): در این حالت فلز مستقیماً با آنزیم واکنش نمی‌دهد. بسیاری از آنزیم‌های کینازی (به‌جز PEPCK[۱۴] و PK[۱۵]) در این گروه‌اند. در واکنش‌های کینازی، کمپلکس Mg-ATP به عنوان سوبسترا عمل می‌کند نه ATP به‌تنهایی. آنزیم کربوکسی پپتیداز وابسته به Zn^{2+} نیز در این گروه است.

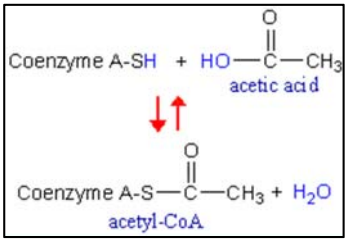
ب. آنزیم– فلز–سوبسترا (E-M-S): در این وضعیت سوبسترا با واسطه فلز، با آنزیم واکنش می‌دهد. درحالی‌که در غیاب فلز، سوبسترا به آنزیم متصل نمی‌شود. متالوآنزیم‌ها در این گروه قرار دارند. PK و کربنیک انیدراز نیز در این گروه‌اند.

جدول ۱. یون‌های فلزی به عنوان کوفاکتور آنزیم‌ها.

یون فلزی	آنزیم‌ها
Zn^{2+}	آلکالن فسفاتاز، تیمیدین کیناز ، DNA پلیمراز I، کربنیک انیدراز ، الکل دهیدروژناز، لاکتات دهیدروژناز–۵ یا M4 (LDH-5)، RNA پلیمراز، کربوکسی پپتیداز A و B، سیتیدین دآمیناز
Mg^{2+}	هگزوکیناز، پیروات کیناز، گلوکز ۶–فسفاتاز
Fe^{2+} و Fe^{3+}	کاتالاز، پراکسیداز، سیتوکروم اکسیداز و گوانیلیل سیکلاز

[۱۳] به موادی که در واکنش بتوانند جفت الکترون بگیرند اسید لوییس و موادی که الکترون بدهند باز لوییس گویند.
[۱۴] Phosphoenolpyruvate carboxykinase
[15] Pyruvate kinase

پلی‌پپتیدی است. چون بخش فعال هر دو کوآنزیم، گروه سولفیدریل (SH–) از تیواتانول آمین است، آن را به‌صورت HS-CoA یا HS-ACP نمایش می‌دهند. هر دو در انتقال ریشه‌های آسیل شرکت می‌کنند، بدین‌صورت که SH– با گروه کربوکسیل اسیدهای آلی پیوند تیواستری پرانرژی ایجاد کرده و به‌این‌ترتیب سبب فعال‌سازی گروه‌های آسیل برای شرکت در واکنش‌های مختلف می‌شوند. به‌عنوان‌مثال ریشه دو کربنه استات حاصل از دکربوکسیله شدن پیرویک اسید ، با پیوند تیواستری به CoA متصل شده و ریشه‌ی استات فعال می‌شود(شکل ۱۱):



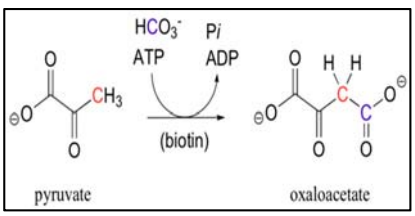
شکل ۱۱. فعال شدن ریشه استات به‌صورت کوآنزیم آ

ث) پیریدوکسال فسفات (PLP) مشتق از Vit B_6 یا پیریدوکسال است. این کوآنزیم در متابولیسم مواد سه‌گانه شرکت می‌کند:

- واکنش **ترانس‌آمیناسیون** و انتقال عامل آمین از یک aa به یک α–کتواسید را انجام می‌دهد.
- کوآنزیم آنزیم‌های **دکربوکسیلاز** اسیدهای‌آمینه است و آمین‌های فعال تولید می‌کند.
- در واکنش **δ–آمینو لوولینات سنتاز** در سنتز هم مشارکت دارد.
- در متابولیسم گلیکوژن در واکنش **گلیکوژن فسفریلاز** شرکت می‌کند.
- واکنش‌های تولید و تجزیه **سیستاتیونین** در مسیر تبدیل متیونین به سیستئین را پیش می‌برد.
- کوآنزیم واکنش **۳–کتواسفنگانین سنتاز** در سنتز اسفنگولیپیدها می‌باشد.

ج) بیوتین یا Vit H کوآنزیم آنزیم‌های کربوکسیلاز است و انتقال یک ریشه‌ی کربنه از منشاء بیکربنات را به عهده دارد. این عمل به کمک ATP و در حضور Mg^{2+} (یون منیزیم) صورت می‌گیرد. این کوآنزیم نقش مهمی در سنتز بازهای پورین و چربی بر عهده دارد. بیوتین کوآنزیم چهار کربوکسیلاز مهم در بدن است:

۱. **پیروات کربوکسیلاز:** در گلوکونئوژنز و آغاز چرخه کربس. (شکل ۱۲)
۲. **استیل–کوآ کربوکسیلاز:** در سنتز اسیدهای چرب.
۳. **پرو‌پیونیل–کوآ کربوکسیلاز:** در تبدیل پروپیونیل–کوآ به سوکسینیل–کوآ.
۴. **β–متیل کروتونیل–کوآ کربوکسیلاز:** در کاتابولیسم لوسین.



شکل ۱۲. نقش بیوتین در واکنش کربوکسیلاسیون پیروات

چ) تتراهیدروفولات (THF) از احیای Vit B_9 یا اسیدفولیک (فولات) مشتق می‌شود. THF به عنوان کوآنزیم در انتقال بنیان‌های یک کربنه شامل متیل ($–CH_3$)، متیلن ($–CH_2–$)، متنیل (–CH=)، هیدروکسی متیل ($–CH_2–OH$) (در آنزیم هیدروکسی متیلاز)، فرمیل (O=C–H) (در آنزیم ترانس فرمیلاز) و فرمیمینو ($H_2N=CH–$) نقش دارد. این کوآنزیم نقش مهمی در بیوسنتز بازهای پورین، پیریمیدین و اسیدهای نوکلئیک دارد.

ح) متیل‌کوبالامین (Methyl-B_{12}) و **آدنوزیل‌کوبالامین (Adenosyl-B_{12}):** از Vit B_{12} یا کوبالامین مشتق می‌شوند. (کوبالامین دارای ۹ شکل ترکیبی است که مهم‌ترین آن در پلاسما متیل‌کوبالامین است).

- متیل‌کوبالامین در انتقال بنیان‌های یک کربنه (ریشه‌های متیل و فرمیل) نقش دارد که با اسیدفولیک تواماً عمل می‌کند، مانند تبدیل هموسیستئین به متیونین.
- آدنوزیل‌کوبالامین عمل جابجا کردن عامل کربوکسیل داخل یک مولکول (نوعی واکنش ایزومری) را انجام می‌دهد، مانند تبدیل L–متیل مالونیل–کوآ به سوکسینیل–کوآ.

$$A + B \longrightarrow P \quad \Rightarrow \quad V = \frac{\Delta[A]}{\Delta t} = \frac{\Delta[B]}{\Delta t} = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} = k\,[A]^1 + [B]^1$$

۳- واکنش مربع. واکنشی که در آن دو مولکول از یک نوع سوبسترا با یکدیگر ترکیب شوند، همانند واکنش‌های دیمریزاسیون، سرعت آن با مربع غلظت سوبسترای یکسان متناسب است:

$$2A \longrightarrow P \quad \Rightarrow \quad V = \frac{\Delta[A][A]}{\Delta t} = k\,[A]^2$$

واکنش درجه صفر. اگر غلظت سوبسترا در یک واکنش به حدی زیاد باشد که در طی واکنش میزان آن اساساً ثابت بماند، واکنش نسبت به آن سوبسترا درجه صفر است. مهم است که در این حالت واکنشگر دیگری غیر از آنزیم در سرعت واکنش نقش نداشته باشد:

$$A \longrightarrow P \quad \Rightarrow \quad V = \frac{\Delta[A]}{\Delta t} = k\,[A]^0 \quad \Rightarrow \quad V = k$$

واکنش درجه اول کاذب. اگر در یک واکنش درجه دوم غلظت یکی از سوبستراها (مثلا B) خیلی زیاد باشد ولی غلظت سوبسترای دیگر (A) کم باشد، می‌توان سوبسترای B را از معادله سرعت حذف کرد، چون سرعت نسبت آن درجه صفر است. بنابراین می‌توان این واکنش را از نوع واکنش درجه‌یک دانست، چراکه سرعت آن تنها وابسته به غلظت یکی از سوبستراها است. واکنش‌های هیدرولیز و هیدراتاسیون به علت بالا بودن غلظت آب (یکی از واکنشگرهای واکنش) از واکنش‌های درجه ۲ هستند که به آن‌ها درجه ۱ کاذب گویند:

$$V = k\,[A]^1 + [B]^0 \quad \Rightarrow \quad V = k\,[A]^1$$

K_{eq}[۳۵] نسبتی از ثابت‌های سرعت است

همه‌ی واکنش‌های شیمیایی تا حدی برگشت‌پذیر هستند، اما اکثر واکنش‌های آنزیمی برگشت‌پذیر هستند. واکنش برگشت و سرعت واکنش برگشت (V_{-1}) به‌صورت زیر است:

واکنش رفت:

$$m\,A + n\,B \longrightarrow A_m\,B_n \qquad V_1 \propto [A]^m\,[B]^n$$

واکنش برگشت:

$$A_m\,B_n \longrightarrow m\,A + n\,B \qquad V_{-1} \propto [A_m\,B_n]$$

همان‌طور که می‌بینید سرعت واکنش برگشت نیز متناسب با غلظت واکنشگرهایش ($A_m\ B_n$) است. در واکنش‌های در حال تعادل، مولکول‌های سوبسترایی که در واحد زمان تبدیل به محصول می‌شوند، در همان واحد زمان محصول می‌تواند به سوبسترا تبدیل شود. اگر دو واکنش رفت‌وبرگشت را همانند معادله زیر در حالت تعادل در نظر بگیریم، m مولکول A و n مولکول B با مولکول $A_m\ B_n$ در حال تعادل خواهند بود. یعنی سرعت تبدیل سوبستراها به محصول‌ها با سرعت تبدیل محصول‌ها به سوبستراها **برابر** است. بنابراین در حالت تعادل، غلظت کلی واکنشگرها و محصولات ثابت باقی می‌ماند.

$$mA + nB \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} A_m\,B_n$$

در واکنش تعادلی سرعتی که سوبسترا تبدیل به محصول می‌شود برابر است با سرعتی که محصول به سوبسترا تبدیل می‌شود. ازاین‌رو سرعت واکنش رفت و سرعت واکنش برگشت برابر می‌باشند:

$$V_1 = V_{-1} \quad \Rightarrow \quad k_1\,[A]^m\,[B]^n = k_{-1}\,[A_m\,B_n]$$

$$K_{eq} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[A_m B_n]}{[A]^m\,[B]^n}$$

[۳۵] Equilibrium constant

ج. وقتی $k_p >>> k_{-1}$ باشد، آنگاه از k_{-1} می‌توان چشم‌پوشی کرد.

$$K_m = \frac{kp}{k_1}$$

۲- ثابت کاتالیتیک (k_{cat}) یا عدد نوسازی (turnover number)

ثابت کاتالیتیک فعالیت مولی آنزیم را نشان می‌دهد. این ثابت سبب محدودیت واکنش آنزیمی در جهت تولید محصول می‌گردد. از این ثابت برای مقایسه کیفیت کاتالیزوری آنزیم‌ها استفاده می‌شود. ثابت کاتالیتیک وابسته به ثابت مرحله یا مجموع ثابت‌های مراحلی است که سرعت واکنش را محدود می‌کند.

تعریف k_{cat}: k_{cat} برابر تعداد مولکول‌های سوبسترایی است که توسط یک مولکول آنزیم در زمان اشباع بودن آن از سوبسترا، در واحد زمان (معمولا ثانیه) به محصول تبدیل می‌گردد. k_{cat} یک ثابت سرعت درجه اول می‌باشد و دارای واحد معکوس زمان (s^{-1}) است.

$$[E] + [S] \underset{K_1}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} [ES] \xrightarrow{Kp} [E] + [P]$$

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_{cat}[ES]$$

$$V_{max} = k_{cat}[E_{total}]$$

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_{total}]}$$

مثال

عدد نوسازی آنزیم کربنیک انیدراز برابر s^{-1} ۴۰۰،۰۰۰ است. یعنی هر مولکول کربنیک انیدراز در شرایط مطلوب، ۴۰۰،۰۰۰ مولکول CO_2 را در هر ثانیه هیدراته می‌کند.

۳- ثابت ویژگی

ثابت ویژگی نشان‌دهنده کارایی و قدرت کاتالیزوری آنزیم نسبت به یک سوبسترا است. بهترین پارامتر برای مقایسه کارایی کاتالیتیک آنزیم‌های مختلف است. k_{cat}/K_m یک ثابت سرعت درجه دوم معرف ثابت ویژگی با واحد $M^{-1}s^{-1}$ است. با توجه به نسبت ثابت ویژگی اگر $k_m >> [S]$ باشد، سرعت کاتالیز برابر k_{cat} می‌باشد. وقتی k_m >> [S] باشد، سرعت واکنش آنزیمی به‌مراتب کمتر از k_{cat} است، چون بیشتر جایگاه‌های فعال آنزیم اشغال نمی‌باشد. در این حالت سرعت واکنش به مقدار k_{cat}/K_m و غلظت S و E بستگی دارد. با استفاده از ثابت ویژگی می‌توان میزان تمایل آنزیم به سوبستراهای مختلف را مقایسه کرد.

۴- فعالیت آنزیمی

فعالیت به تعداد مولکول‌های آنزیم موجود در محلول واکنش اشاره دارد. برای تعیین این فعالیت، میزان واکنش کاتالیز شده در شرایط مطلوب را به‌صورت میزان تغییر غلظت سوبسترا یا محصول در واحد زمان بیان می‌کنند. دو واحد متداول فعالیت آنزیم عبارت‌اند از:

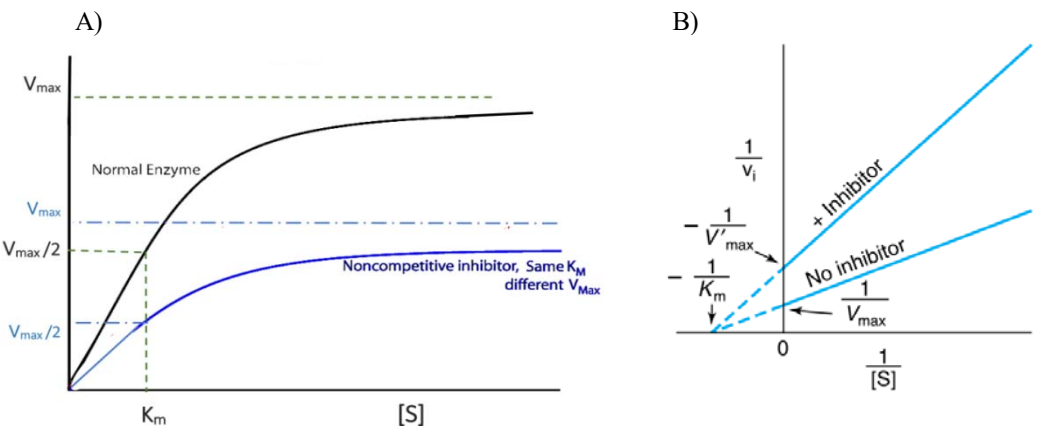
الف. واحد بین‌المللی (IU) مقدار آنزیمی است که یک میکرومول سوبسترا را در هر دقیقه به محصول تبدیل می‌کند و واحد آن µmol/min می‌باشد.

ب. واحد کاتال (Katal) مقدار آنزیمی است که یک مول سوبسترا را در مدت یک ثانیه به محصول تبدیل می‌کند (mol/s).

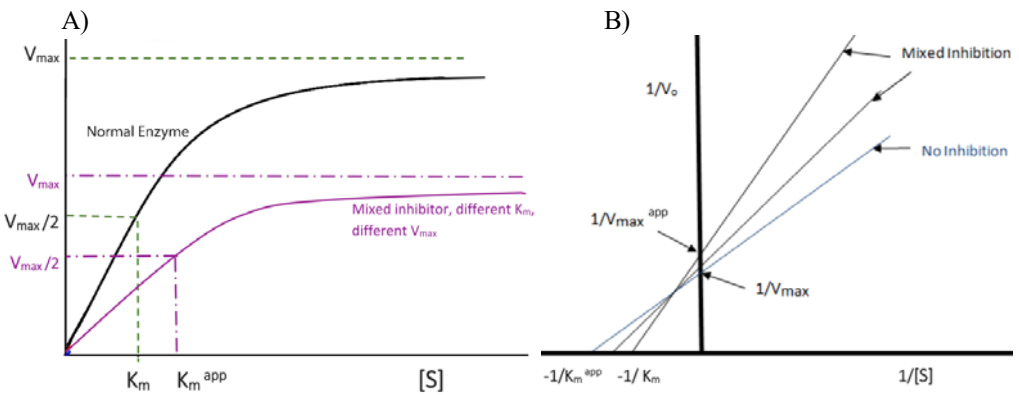
۲- مهارکننده مخلوط (Mixed inhibitor). این نوع از مهارکننده‌های غیررقابتی با تمایل متفاوتی به E آزاد و کمپلکس ES متصل می‌شوند. اتصال آنها به E، تمایل اتصال سوبسترا به آنزیم را تحت تاثیر می‌گذارد و بالعکس. بنابراین در این مهار K_m تغییر می‌کند. $Ki \neq Ki'$

در کل این نوع مهار ناشی از اثرشبه آلوستریکی است که از اتصال مهارکننده در جایی غیر از جایگاه فعال، ایجاد می‌شود. اتصال مهارکننده‌ها به آنزیم، موجب تغییر شکل سه بعدی (کونفورماسیون) آنزیم شده، به طوری که وابستگی سوبسترا برای جایگاه فعال کاهش می‌یابد. مهار نارقابتی و مخلوط فقط برای آنزیم‌های دو یا چند سوبستراپی دیده می‌شود:

در آنالیزهای تجربی این آنزیم‌ها، S1 و S2 از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. زمانیکه [S1] متغیر باشد، اگر یک مهارکننده، به جایگاهی متصل شود که به‌طورمعمول توسط S1 اشغال می‌شود، ممکن است یک به‌عنوان مهارکننده رقابتی عمل کند. در همین شرایط اگر یک مهارکننده، به جایگاهی متصل شود که به‌طورمعمول توسط S2 اشغال می‌شود، ممکن است به‌عنوان یک مهارکننده مخلوط یا نارقابتی برای S1 عمل کند. الگوهای واقعی مهارهای فوق، بستگی به این دارد که آیا وقایع اتصال S1 و S2 به‌صورت تصادفی بوده یا به‌صورت منظم و ترتیبی. بنابراین ترتیب اینکه کدام سوبستراها به‌جایگاه فعال متصل شده‌اند و کدام محصولات خارج‌شده‌اند، را می‌توان تعیین کرد.



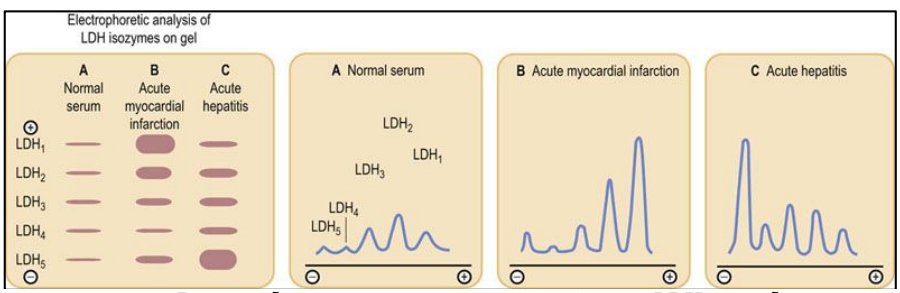
شکل ۵۷. تاثیر یك مهارکننده غیررقابتي (خالص) در سرعت واکنش نسبت به سوبسترا A) نمودار مکائیلیس-منتن. B) نمودار لنیوور-برک



شکل ۵۸. تأثیر یك مهارکننده مخلوط در سرعت واکنش نسبت به سوبسترا A) نمودار مکائیلیس-منتن. B) نمودار لنیوور-برک

جدول ۱۰. انواع ایزوآنزیم‌های LDH

ایزوفرم‌ها	زنجیره‌های پلی‌پپتیدی	توزیع بافتی	اهمیت بالینی	حرکت الکتروفورزی
LDH_1	H_4	اساسا در قلب و RBC	افـزایش شـدید در سـکته قلبـی و کم‌خـونی همولیتیک	↑
LDH_2	H_3M	مشخصاً در سیستم رتیکولوآندوتلیال و قلب	افزایش در سکته قلبی و کم‌خونی همولیتیک	
LDH_3	H_2M_2	بیشتر در ریه‌ها، پانکراس و سایر بافت‌ها	افزایش در آمبولی ریه و پانکراتیت حاد	
LDH_4	HM_3	اغلـب در کبـد و عضـلات و کمتـر در جفـت و پانکراس و کلیه	افزایش در اختلالات کبدی و عضلانی	
LDH_5	M_4	در کبد و عضلات مخطط	افزایش شدید در اختلالات کبدی و عضلانی	



شکل ۷۲. فراوانی ایزوآنزیم‌های LDH در سرم A: در حالت طبیعی و تغییرات سطوح ایزوآنزیم‌ها در B: انفارکتوس حاد میوکارد و C: هپاتیت حاد نسبت به سرم نرمال.

نکات پیرامون LDH:

– در حالت عادی و در افراد طبیعی، سطح LDH_2 بیشترین درصد از LDH توتال را به خود اختصاص مـی‌دهـد. بنـابراین نسبت LDH_1 به LDH_2 کمتر از یک است.

– در نوزادان و شیرخواران مقادیر LDH به‌طور طبیعی بالاست ولی در بـالغین مقـدار آن بـا سـن تغییـر نمی‌کنـد و هـیچ اختلافی در دو جنس وجود ندارد.

– خلاف آنزیم‌هایی مثل AST،ALT و CK که تغییرات فراوانی بین بافت‌ها نشان می‌دهند، محدوده مقادیر LDH بـین بافت‌هایی با بالاترین مقدار (مانند کبد) و بافت‌هایی با کمترین مقدار (مثل کلیه) تنها حدود ۱/۵ برابـر مـی‌باشـد. فعالیـت LDH در اکثر بافت‌ها ۱۰۰۰–۵۰۰ برابر بیشتر از LDH یافت شده در سرم طبیعی است، بنابراین افزایش چشمگیر مقادیر پلاسمایی با میزان کمی آسیب یا تخریب بافتی رخ می‌دهد.

– همولیز خفیف و جزئی، بررسی ایزوآنزیم‌های LDH را بی‌ارزش می‌کند. به دلیل وفـور LDH در RBCهـا، تمـاس بـا لخته، LDH را افزایش می‌دهد و LDH توتال و هم نسبت LD1 به LD2 را متأثر می‌سازد. پس از انتقال خـون، LDH توتال می‌تواند به‌طور موقتی افزایش یابد، اما در عرض ۲۴ ساعت به مقدار اولیه خود برمی‌گردد.

– LDH سرم به‌طور متوسط ۳۰ واحد بیشتر از پلاسما می‌باشد که به‌واسطه آزاد شدن از پلاکت‌ها می‌باشد.

– LDH در ۴ درجه سانتی‌گراد به علت حساسیت به سرما، پایدار نمی‌باشد. نمونه‌ها را می‌توان برای ۲۴ ساعت در دمـای اتاق با تغییر کمی نگهداری کرد. LDH مایع نخاع در یخچال پایدارتر است و به مدت ۲ هفته قابل نگهـداری مـی‌باشـد، درحالی‌که در دمای اتاق فقط چند ساعت می‌توان آن را نگهداری کرد.

– بستن گارو می‌تواند مقدار آنزیم را شدیداً افزایش دهد.

– بعد از ورزش مقدار LDH ممکن است تا ۵۰٪ افزایش یابد.