

الباب الثانى
الانزيمات - المرافقات الانزيمية - الطاقة
الحركية للنمو البكتيرى

**Enzymes, Coenzymes and
bacterial growth kinetics**

الباب الثانى

الانزيمات - المرافقات الانزيمية - الطاقة

الحركية للنمو البكتيرى

Enzymes, Coenzymes and bacterial growth kinetics

يمكن للتفاعلات المنتجة لطاقة عالية (ΔF^0 عالية وسالبة القيمة) أن تتم فى اتجاه ثابت وتكون المحصلة مواد ناتجة products اكبر من المواد الداخلة reactants عند التعادل . اما التفاعلات ذات ΔF المنخفضة أو الغير سالبة فتحتاج إلى عامل لمسى Catalyst . ومن الوجهة الترموديناميكية فإن العامل للمسى هو الذى يخفض lowers طاقة التنشيط الحرة . أما من الناحية الفيزيائية فإن مادة التفاعل تتحد مؤقتا مع العامل للمسى وبالتالي فإن طاقة مادة التفاعل يعاد توزيعها لجعل روابط معينة أكثر مرونة للتحلل .

١٠٢ تعريف وخواص الانزيمات :

الانزيمات هى عوامل لمسية حقيقية لانها لا تؤثر على نقطة التعادل للتفاعل الذى تلامسه ولا تُستهلك أثناء التفاعل ولها القدرة على خفض طاقة التنشيط activation energy للتفاعل الذى تلامسه للوصول لحاله التعادل . وكل تفاعل انزيمى يظل فى حالة شغل حتى يصل لحالة التعادل ويعتبر هذا احد القواعد الاساسية فى علم الانزيمات . والامكانية الوحيدة للتفاعل لكى يستمر بعد حالة التعادل تظهر فى التفاعلات المتلازمة أو المتقابلة Coupled reactions حيث الناتج من التفاعل الأول يلامس مباشرة بواسطة انزيم ثان للحصول على ناتج آخر وهكذا .

ولهذا فلا يمكن لاي كائن أن ينغلق على نفسه فى مرحلة التوازن أو التعادل الكيماوى لأن أى نظام فى حالة التعادل لا يستطيع عمل أى شغل . وهذه الاستمرارية تجاه حالة التعادل تشبه حالة الثبات steady state حيث لا بد من تغذية مستمرة بمادة التفاعل ويخرج

من الناحية الاخرى نواتج التفاعل . وحيث ان الكائنات تمثل نظاما مفتوحا فإن حالة الثبات تؤدي لتكوين تركيزات ثابتة. **stationary conc.** والتي تختلف عن القواعد الترموديناميكية للتعاادل الكيماوى وهذا هو السبب الرئيسى ان التفاعلات الحيوية تظل فى حالة شغل فى اتجاه حالة التعاادل وعادة يحصل الكائن على طاقته من هذه التفاعلات .

وكل الانزيمات التى تُوصَل إلى تركيبها الكيماوى حتى الآن هى بروتينات والطرق المستعملة لفصل وتنقية الانزيمات هى نفسها المستعملة لفصل وتنقية البروتين .

جزئيات الانزيمات لها عمر محدد داخل الخلية كما أنها سريعة الدنتره **Denaturation** وتفقد خواصها اللمسية عند حرارة 50°C أو أعلى أو بواسطة أيونات المعادن الثقيلة وتتأثر كثيرا بدرجة الحموضة (**pH**) .

تختلف الانزيمات عن العوامل اللمسية الغير عضوية مثل البلاتيوم فى صفات منها انها أكثر تخصصا وأقل ثباتا .

تتكون اغلب الانزيمات من جزء بروتينى **Apoenzyme** ومرافق انزيمى **Prosthetic group or coenzyme** والجزء البروتينى يختص بتحديد مادة التفاعل التى يلامسها واتجاه التفاعل ولهذا يمكن للمرافق الانزيمى ان يلامس تفاعلات مختلفة حسب ما يسمح به **apoenzyme** .

وعندما يلامس انزيم تفاعل معين فإنه يتحد مؤقتا مع مادة التفاعل مكونا معقد انزيمى مع مادة التفاعل **enzyme substrate complex** ويكون الاتحاد عند المركز النشط **active site** وتتحول مادة التفاعل إلى نواتج معينة بينما يعود الانزيم إلى حالته الاولى ويتحد مع جزئ آخر ويكرر ذلك .

يمكن تثبيط معظم الانزيمات بواسطة المواد السامة المتخصصة وهى تشبه لحد ما فى بنائها مادة تفاعله . وهذه المثبطات هامة فى تحليل ومعرفة التفاعلات التى يلامسها الانزيم فى الخلية .

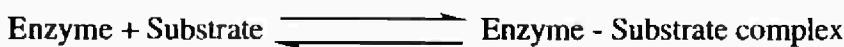
عندما تتفاعل مجموعة من الانزيمات فى سلسلة متعاقبة بحيث أن الناتج من تفاعل انزيمى معين يصبح مادة تفاعل لانزيم آخر وهكذا فإن هذا النظام يعرف **multi - enzyme system** وتعرف سلسلة التفاعلات بالدورة الايضية **metabolic pathway** .

درجة تخصص بعض الانزيمات عالية جدا فمثلا انزيم جليسرلدهيد ٣ فوسفات ديهيدروجينز تتفاعل فقط مع D-isomer من المركب ولا يتفاعل مع L-isomer .

يرجع الاختلاف بين الانزيمات وبعضها إلى عدة اسباب منها نوع ونسب الاحماض الامينية الداخلة فيها ، كيفية تتابع الاحماض الامينية داخل السلسلة الببتيدية ، نوعية الروابط الثانوية ، طبيعة المراكز النشطة الخاصة بكل انزيم .

٢٠٢ سرعة التفاعلات الانزيمية : Velocity of enzymatic reactions :

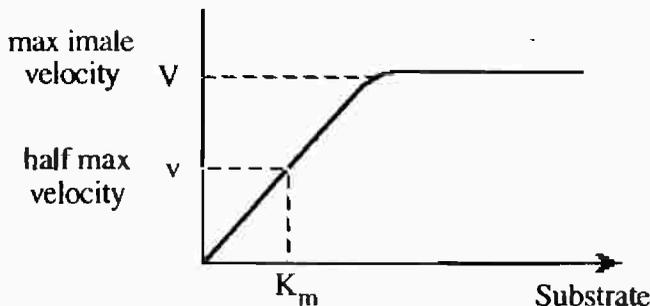
تعتبر مادة التفاعل من أهم العوامل التي تحدد سرعة التفاعل الانزيمي . فالانزيم يُكون اولا معقدا مع مادة تفاعله ثم ينكسر هذا المعقد معطيا الانزيم الحر ونواتج التفاعل كالتالي :



ويمكن حساب ثابت التشبع (التوازن) لمادة التفاعل كالتالي :

$$K_{eq} = \frac{[E] \times [S]}{[ES]}$$

ويمكن تمثيل العلاقة بين سرعة velocity أى تفاعل انزيمي مع مادة التفاعل بالرسم التالي :



شكل (١-٢) : العلاقة بين سرعة التفاعل الانزيمي ومادة التفاعل

وعند v يكون نصف الانزيم الداخل في التفاعل في صورة معقد (ES) واما النصف الآخر فيكون حراً أو بمعنى آخر فإن تركيز مادة التفاعل عند v يصل لما يعادل dissociation Constant لمعقد ES ويسمى هذا الثابت Michaelis - Menten Constant ويعرف بأن تركيز مادة التفاعل عند نصف السرعة القصوى للانزيم أو عند نصف تشبع الانزيم بمادة التفاعل .

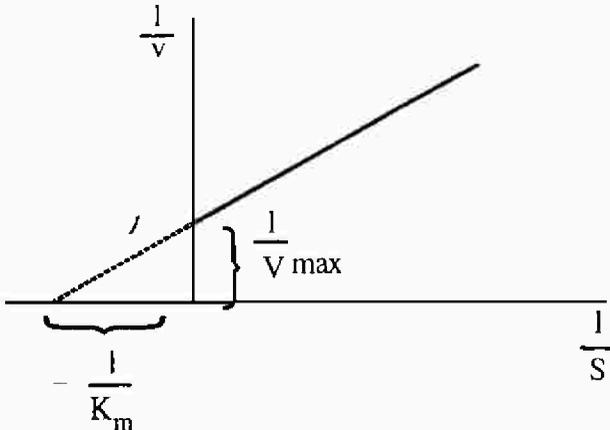
$$K_m = [S] \text{ at half maximal velocity}$$

وعندما تكون قيمة K_m عالية فإنه يعنى الاحتياج لتركيز عالى من مادة التفاعل أو أن الانزيم يملك حساسية قليلة لمادة التفاعل وهذا الثابت يتراوح عادة بين $10^{-2} - 10^{-5} \text{ mole/l.}$

ويمكن حساب K_m معملياً بسهولة . ففي الرسم السابق فإن السرعة القصوى V_{max} يصل إليها عندما يشبع الانزيم بمادة التفاعل أى كل الانزيم يتحول إلى معقد ES وعندئذ تصبح المعادلة الرياضية .

$$v = V \left(\frac{S}{K_m + S} \right)$$

وإذا رسمت العلاقة بين المتغيرين $\frac{1}{v}$ ، $\frac{1}{S}$ فإنه يمكن بسهولة تقدير K_m ، V_{max} كما بالرسم التالى :



شكل (٢-٢) : تقدير V_{max} ، K_m (السرعة القصوى ، ثابت ميخائيل) من

Lineweaver - Burk plot

اما معدل التفاعل الانزيمي reaction rate فيستخدم لتقدير وحدة الانزيم enzyme unit (U) والتي تعرف بالكمية التي تلامس تحويل $1 \mu \text{mole}$ من مادة التفاعل / دقيقة تحت ظروف ثابتة من حرارة (المثلى 30°C) ، pH ، تركيز كاف من مادة التفاعل لتتبع الانزيم (zero order kinetic) كما أوصى بذلك الاتحاد الدولي للكيمياء الحيوية (IUB) International Union of Biochemists .

ويقدر Molecular activity بالوحدة لكل ميكرومول من الانزيم عند تركيز مادة التفاعل الامثل أى عدد جزئيات مادة التفاعل المتحولة / دقيقة / جزئى الانزيم وعندما يحتوى الانزيم على مجموعة مرافقة prosthetic group فإن قوة التلامس catalytic power يمكن التعبير عنها بعدد الجزئيات المتحولة / دقيقة / عامل التلامس وتركيز الانزيم فى المحلول بقدر بالوحدات / مللى لتر (units / ml.) .

العوامل التي تؤثر على سرعة التفاعل الانزيمي :

- ١ - تركيز الانزيم عند ثبات تركيز مادة التفاعل فإن سرعة التفاعل تتناسب طرديا مع تركيز الانزيم .
- ٢ - تركيز مادة التفاعل كما ذكر سابقا تزداد سرعة التفاعل بزيادة تركيز المادة المتفاعلة حتى نقطة معينة بعدها لا تجدى أى زيادة فى التركيز على سرعة التفاعل حيث يتحول كل الانزيم من الصورة الحرة (E) إلى الصورة المرتبطة (ES) .
- ٣ - درجة الحرارة علاقة طردية حيث تزداد سرعة التفاعل بارتفاع درجة الحرارة حتى نقطة معينة (المثلى) بعدها تقل سرعة التفاعل ويفقد الانزيم نشاطه تدريجيا ويرجع السبب فى ذلك إلى تأثير الحرارة على طبيعة تركيب البروتين (كسر بعض الروابط الثانوية أو الضعيفة) .
- ٤ - الاسر الايدروجينى pH حيث لكل انزيم درجة pH مثلى يبلغ عندها سرعة التفاعل اقصى ما يمكن ولو زادت أو قلت عن ذلك تقل نشاط الانزيم والسبب فى ذلك يرجع لاحتواء مراكز النشاط بالانزيم على مجاميع متأينه وأى تغير فى pH يؤدي إلى تغيير طبيعة تأين هذه المجاميع .
- ٥ - المنشطات الايونية مثل Ca^{++} , Mg^{++} , Cl^- , K^+ , Fe^{3+} والتي تعمل كهمزة

وصل chelate بين الانزيم ومادة التفاعل أو كناقلة للالكترونات في تفاعلات الاكسدة والاختزال مثل Fe^{3+} فى السيتركروم وقد يكون تأثيرها ضار (مشبط) فى بعض الانزيمات الاخرى مثل Cl^- منشط لانزيمات التحلل المائى للبروتينات ومشط لانزيم zymase الخاص بتحويل الجلوكوز إلى ايثانول وخليك . كما أن التركيزات العالية من هذه المنشطات الايوتية لها فعل عكسى (مشبط) لعمل الانزيم .

٦ - المثبطات وهى مواد عضوية أو أيونية تقلل سرعة التفاعل الانزيمى أو توقفه مثل ايونات الفضة Ag^{++} ، الرصاص Pb^{2+} ، الزئبقوز Hg^{+1} ومركبات السلف حيث يعمل على تغير التركيب الطبيعى لبروتين الانزيم وترسيبه أو تلفة مراكز النشاط على الانزيم بالاتحاد معها .

٣٠٢ تقسيم الانزيمات : Enzyme Classification

بناء على القواعد الموضوعية من قبل IUB فإن الانزيمات المعروفة من زمن طويل تأخذ اسماءها الأولى مثل pepsin , trypsin اما الاسماء الاحداث فتأخذ المقطع "ase" وهذا المقطع يلحق باسماء التفاعلات الانزيمية - فمثلا Transferases , dehydrogenases . . . الخ - حيث تقسم الانزيمات إلى مجاميع على اساس نوع التفاعل الذى يلامسه وذلك مسبقا باسم مادة التفاعل .

وفى حالة استخدام مرافق انزيمى لتلامس انتقال الالكترتون من المعطى إلى المستقبل مثل البيوتين أو اليريدوكسين فإن اسم prosthetic group لا يدخل فى اسم الانزيم .

وكجزء من هذا التقسيم يعطى كل انزيم رقم حيث يحتوى رقم كل انزيم على ٤ عناصر مفصولة بنقط وبدل العنصر الاول على القسم الذى يتبعه الانزيم حيث يوجد ستة اقسام رئيسية للانزيمات هى :

- ١ - انزيمات الاكسدة والاختزال . oxidoreductases
- ٢ - انزيمات نقل المجاميع . tranferases
- ٣ - انزيمات التحلل المائى . Hydrolases
- ٤ - انزيمات النزاع أو الاضافة . lyases
- ٥ - انزيمات التشابة . Isomerases

6 - انزيمات التخليق Ligases (Synthetases)

6 - انزيمات التخليق

والعنصر الثانى يدل على subclass رقم وصفات المجموعة الداخلة فى التفاعل .
والعنصر الثالث يدل على subclass مع تفصيل أكثر تخصصا لنوع المعطى أو المجموعة الداخلة فى التفاعل .

والعنصر الرابع يدل على الرقم المسلسل للانزيم فى subclass الخاص به .

وبهذا النظام يمكن ادخال اى انزيم جديد عند نهاية subclass الخاص به بدون الاخلال بأى أرقام اخرى وفى حالة الضرورة لانشاء أى subclass , subclass يمكن اضافتها بدون تعديل المجاميع السابقة وهذا هو هدف IUB عند مراجعة الانزيمات الموجودة أو اضافة أى انزيم جديد فلا يحتاج الامر لاعادة ترقيمها . ويتم ذلك بواسطة هيئات معتمدة وليس بواسطة الافراد .

ولتفادى الصعوبات الناتجة عن طول الاسماء فإن IUB وضع نوعين من الأسماء :

1 - الاسم التخليقى للانزيم طبقا لما سبق ذكره من قواعد .

2 - الاسم التجارى Commercial name وهو قصير وكافى للاستعمال العام ولكن ليس محددًا أو منظما مثل السابق . والقواعد المنظمة لهذه التسمية التجارية موجودة فى كتاب Dixan and webb سنة ١٩٦٤ .

ولفهم نظام التسمية هذا نضرب المثال التالى بانزيم فركتوز ٦,١ داي فوسفور الدوليز فالتسمية التخليقية له

Fructose 1.6 - diphosphate D-glyceraldehyde -3- phosphalte lyase

ورقمه الكودى EC 4.1.2.13 وهذا يعنى

4 يتبع قسم انزيمات الازالة أو الاضافة lyase enzymes للمجاميع الاستبدالية من مادة تفاعلها (ليس بواسطة التحليل المائى) مكونا رابطة زوجية أو مضيفا لمجموعة للرابطة الزوجية .

4.1 الانزيم Carbon - Carbon lyase .

4.1.2 الانزيم aldehyde lyase مع رقم مسلسل 13 .

والتفاعل الخاص بهذا الانزيم هو :

Fructose 1.6 - diphosphate



dihydroxyacetone + D-glyceraldehyde
phosphate 3- phosphate

اما الاسم التجارى فهو فركتوز داى فوسفات الدوليز .

٤٠٢ المرافقات الانزيمية : Coenzymes

لكى تؤدى الانزيمات وظيفتها فإن كثير منها يحتاج لمواد عضوية أو غير عضوية معينة كمرافقات انزيمية والتي تتفاعل كمستقبل أو معطى لمجاميع من الايونات التى تنفصل من أو تنضم إلى مادة التفاعل وقديما كان يطلق مصطلح Prosthetic group, Coenzyme كمرادفين لبعضهما ولكن اخيرا تعارف على تسمية المجاميع ذات الرابطة القوية مع مادة التفاعل (والصعب فصلها بـ dialysis مثلا) بـ Prosthetic group أما التى يسهل فصلها فتعرف Coenzyme . والمجموعة الثالثة من المرافقات هى المنشطات activators وهى ذات طبيعة بسيطة مثل الايونات المعدنية .

وحيث انه لا يوجد للأُن تقسيم محدد للمرافقات الانزيمية فإنها تعامل بطريقة ايسر من المستعملة فى تقسيم الانزيمات طبقا للتفاعلات التى تلامسها ومعظم المرافقات أما نيوكليدات حقيقية أولها بعض الخواص البنائية المشابهة للنيوكليدات ومعظمها تحتوى قاعدة نيتروجينية فى أحد نهايتى الجزئ ومجموعة فوسفات فى النهاية الأخرى مع أو بدون تركيب كربوهيدراتى بينهما أو يرتبط تركيبين بنائين معا لتكوين نيوكليدات ثنائية وعلاقتها الوطيدة مع الفيتامينات هامة جدا حيث الفيتامينات ضرورية لبعض الوظائف الحيوية ولا يمكن biocatalytic functions وللمعرفة الجيدة بالمرافقات الانزيمية لا بد أن تتضمن الدراسة معلومات مفصلة عن التفاعل الذى يلامسه .

Coczymes^a

Coenzymes	Usual abbreviation	Group transferred	Corresponding vitamins
1. Hydrogen-transferring co-enzyme			
Nicotinamide-adenine dinucleotide	NAD ⁺	Hydrogen	Nicotinamide
Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate	NADP ⁺	Hydrogen	Nicotinamide
Nicotinamide mononucleotide	—	Hydrogen	Nicotinamide
Flavin mononucleotide (riboflavin phosphate)	FMN	Hydrogen	Riboflavin
Flavin-adenine dinucleotide	FAAD	Hydrogen	Riboflavin
Lipoic acid	Lip(S ₂)	Hydrogen and acyl	—
Glutathione	GSH	Hydrogen	—
Ascorbate	—	—	—
Coenzyme Q	Q	Hydrogen	—
Cytochromes	cyt.	Electrons	—
2. Group-transferring enzymes			
Adenosine triphosphate	ATP	Phosphate	—
Phosphoadenyl sulfate	PAPS	Sulfate	—
Uridine diphosphate	UDP	Sugar, uronic acid	—
Cytidine diphosphate	CDP	Phosphoryl choline	—
Pyridoxal phosphate	PALP	Amino	Pyridoxine (Methionine)
Adenosyl methionine	—	Methyl	—
Tetrahydrofolic acid	THF	Formyl	Pantothenic acid
Biotin	—	Carboxyl (CO ₂)	Biotin
Coenzyme A	CoA	Acetyl	Pantothenic acid
Thiamine pyrophosphate	TPP	C ₂ -Aldehyde	Thiamine
3. Coenzymes of isomerases and lyases			
Uridine diphosphate	UDP	Sugar isomerization	—
Pyridoxal phosphate	PALP	Decarboxylation	Pyridoxine
Thiamine pyrophosphate	TPP	Decarboxylation	Thiamine
B ₁₂ coenzyme	—	Carboxyl displacement	Cobalamin

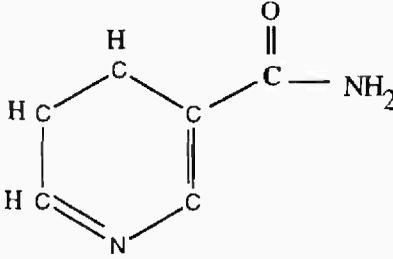
جدول (٢-١) : المرافقات الانزيمية والمجاميع التي تنقلها (عن Karlson, 1970)

Hydrogen transferring Coenzymes : المرافقات الانزيمية الناقلة للايدروجين : ١٠٤٠٢

(١) نيوكليوتيدات النيكوتين اميد : Nicotinamide nucleotide coenzymes

تستعمل الانزيمات الناقلة للايدروجين فى تفاعلات التخمر والتنفس وغيرها المرافق

الانزيمى داي نيوكليوتيدات نيكوتين اميد وهو احد مشتقات البيريدين Pyridine .



التركيب البنائى للبيريدين .

وتسمية هذا المرافق ذات جدل كبير حيث يوجد شائعا فى المراجع اسم

(DPN or TPN) di or triphospho pyridine nucleotide

, Coenzyme II (CoII), Coenzyme I (Co I) مثل (Co I) Coenzyme II (CoII),

Co dehydrogenase I & II , وايضا Cozymase

ولللخروج من هذا الخلاف المصطلحى لنيوكليوتيدات البيريدين فإن IUB وضع

التوصيات التالية :

١ - تسمى باسماءها الكيماوية :

(NAD) nicotinamide - adinine dinucleotide

(NADP) nicotinamide - adinine dinucleotide phosphate

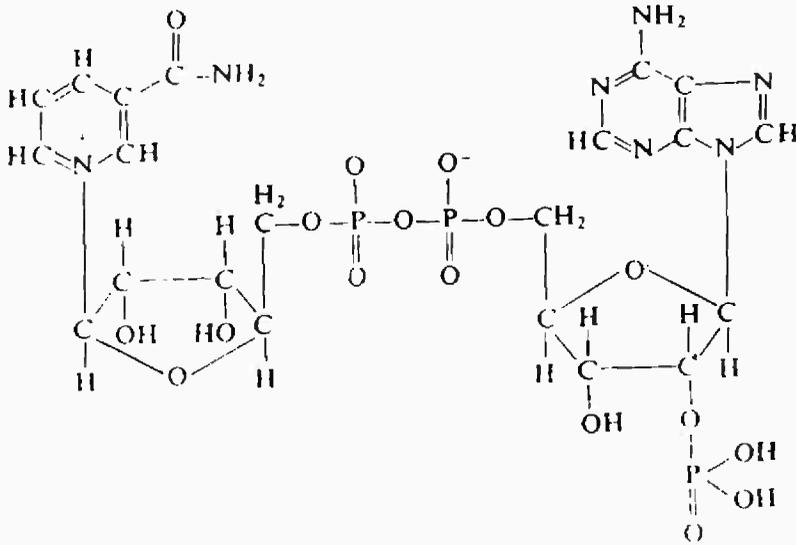
ولا تستعمل الاسماء الأخرى .

٢ - يسمح للصورة المختزلة من NAD (P) باستخدام احد البديلين reduced NAD (P)

أو NAD (P) H + H⁺ وعندئذ تسمى الصورة المؤكسدة NAD (P)⁺ ولا يسمح

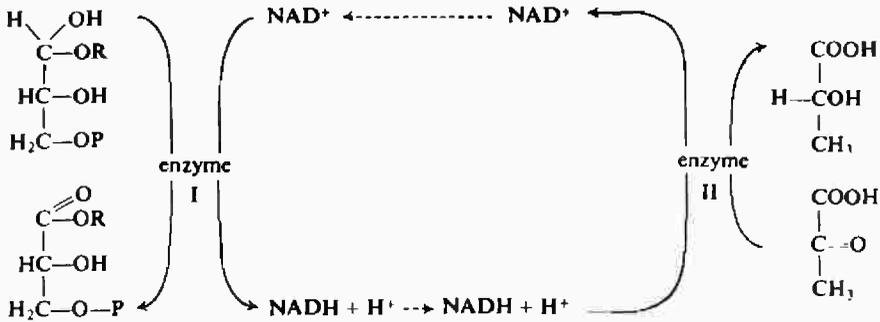
بكتابة التفاعل على الصورة NAD (p) → NAD(p)H₂ .

وحلقة البيريدين تتصل برابطة جليكوزيدية بالسكر الخماسي الريبوز بينما يربط حمض البيروفوسفوريك بين جزئي nicotinamide riboside , adenosine ويزيد فى المركب NADP مجموعة فوسفات فى الوضع "2" للسكر الخماسى « الريبوز » كما بالرسم .



شكل (٢-٣) التركيب البنائى لمركبى NAD^+ , $NADP^+$

والمرافق الانزيمى NAD^+ يمكنه ان يكون معقداً مع انزيم ما (E_I) وهذا المعقد يتفاعل مع مادة التفاعل ويؤكسدها بينما يختزل هو إلى $NADH$, H^+ وهذه الصورة المختزلة لا يمكنها تكوين معقد مع E_I وينفصل عنه وفى مرحلة تالية من دورة التفاعل يمكن $NADH$, H^+ تكوين معقد مع انزيم ثان (E_{II}) وبهذا المعقد يمكنه اختزال مادة اخرى بينما يتأكسد هو إلى NAD^+ وينفصل مرة اخرى وبهذا فإن NAD^+ يكون حلقة وصل بين الانزيمين كما فى الرسم التالى .



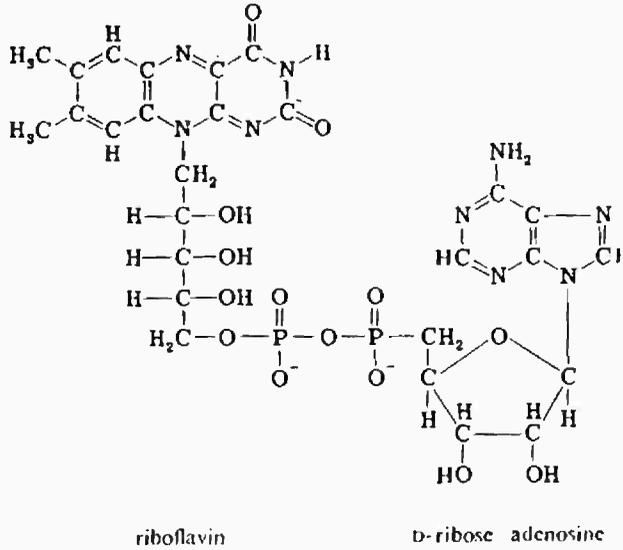
شكل (٢-٤) دور $NAD^+ / NADH. H^+$ في التلامس الانزيمي

وتكوين $NADH. H^+$ المختزل اثناء التفاعل يمكن قياسه بواسطة جهاز الاسبكتروفوتومتر بظهور منحنى بارز عند 340 nm أما NAD^+ (المؤكسد) فيمكن تحديده ضوئيا عن طريق اختفاء منحنى قياسه عند 340 nm .

ويعمل هذا المرافق الانزيمي فى عمليات نزع الايدروجين dehydrogenation لمجاميع الكحولات الاولية والثانوية ويشارك اساسا فى معظم انزيمات dehydrogenases . ويلاحظ $NAD (P)$ فى كل الخلايا والدورات مرتبطة دائما ب ATP حيث ATP حامل للروابط الفوسفاتية الغنية بالطاقة بينما NAD حامل للالكترونات فى الخلايا .

(ب) نيوكليوتيدات الفلافين : Flavine nucleotides :

الفلافوبروتينات نوع من انزيمات الاكسدة المحتوية على مستقبل الالكترون يسمى FAD (Flavine - adinine dinucleotide) الذى ينقل الالكترون بطريقة مماثلة للمركب NAD وهذا المركب يعتبر حجر البناء فى فيتامين الريبوفلافين (فيتامين B₂) .



شكل (٢-٥) : التركيب البنائي للمركب Flavine - adenine dinucleotide

FAD

NAD

الفرق بين

- احد مشتقات الـ isoalloxazine

- احد مشتقات الـ البريدين

- السلسلة الجانبية سكر خماسي بولي

- السلسلة الجانبية سكر

- مشتقات الـ Ribitol هيدروكسي من

- مشتقات الـ D-Ribose حلقي

والفلافينات لها القدرة على التفاعل مباشرة مع جزئ الاكسجين (عملية اعادة الاكسدة)

حيث يختزل الاكسجين إلى $H_2 O_2$. مثال ذلك lactate oxidase (EC 1.1.3.2) ،

و تشير الدلائل انه عند اختزال الريبوفلافينات تأخذ

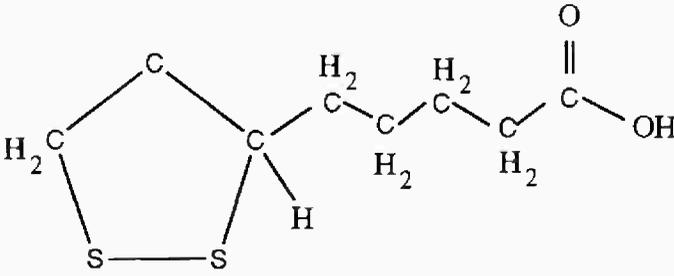
الالكترون واحد فقط وليس زوج من الالكترونات مثل NAD .

(ج) حمض الليبويك : Lipic acial :

أول من اطلق هذه التسمية هو Read وآخرون سنة ١٩٥٧ على حمض عضوي معزول

من سستخلص كبد البقر وهو نشط جدا في احوال الاستبات في بكتريا حمض اللاكتيك acetate

replacing factor وتركيبه الكيمياوي هو 1.2 - dithiolane 3- valeric acid



وتعتمد كفاءته البيولوجية على الرابطة ثنائية السلفيد disulfide الموجودة في حلقة dithiolane ويمكن قياس حمض الليبوتيك ضوئيا بواسطة جهاز الاسبكتروفوتومتر عند 330 nm . وهو شائع الانتشار في الكائنات الدقيقة والنباتات والحيوانات وهو يعمل ك Prosthetic group في المعقدات الانزيمية ذات الاغراض المتعددة (Ginsburg & statman, 1970) والتي تلامس عمليات الاكسدة المصحوبة بنزع ك أم من البيروفات ، الفاكتوجلوكونات إلى استيل كوانزيم A ، سكسينل كوازيم A على الترتيب .

(د) الجلوتاثيون : Glutathione :

وهو بيتيد محتوى على الكبريت شائع الاستعمال والانتشار والمجموعة الفعالة فيه هى thiol وهى تؤكسد بجزئى الاكسجين عند الظروف المناسبة (فى وجود آثار من المواد المعدنية) وايضا بواسطة سيتوكروم C . ولاءة اختزال صورت المؤكسدة إلى الثيول أما بعوامل مختزلة قوية او بواسطة انزيم glutathione reductase (EC 1.6. 4.0) فى وجود $NAD(P)^+$. وكا انزيم من انزيمات الاكسدة والاختزال فإنه يعمل كحامل بيولوجى للايدروجين وخاصة فى البكتريا الكيمواتوتروفية .

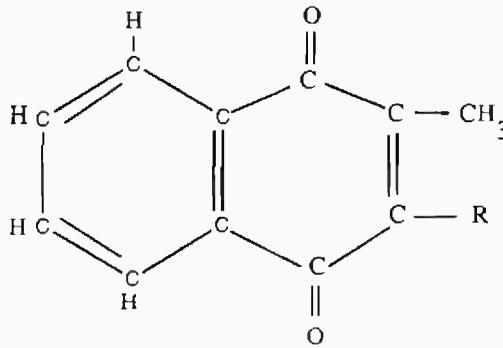
(هـ) حمض الاسكوربيك : Ascorbic acid :

فيتامين C او حمض الاسكوربيك هو عامل مختزل قوى مفيد فى زراعة البكتريا اللاهوائية . وبرغم انه يدخل فى تفاعلات الاكسدة والاختزال فلإن اسم الاسكوربيك يطلق على الصورة المختزلة فقط اما الصورة المؤكسدة فتسمى حمض ديهيدرواسكوربيك وترجع أهميته إلى انه يلعب دورا فى حفظ نشاط الانزيمات المحتوية على SH - مثل الجلوتاثيون .

ويوجد قسمان هامين في الكينونات :

الاول : مجموعة ubiquinones (كما بالرسم السابق) وهي الاسبق اكتشافا بواسطة Morton, 1953 وكانت تعرف بـ Co Q , Q₂₇₅ , SA , إلا أن IUB أوصت باستخدام ubiquinone . والصورة المختزلة منه (ubiquinol) تتأكسد من خلال نظام السيوكروم (سيوكروم C ، سيوكروم اوكسيديز) .

الثاني : مجموعة فيتامين K والمحتوية على Vit. K₁ , Vit. K₂ , menadione , وتدخل فى عمليات انتقال الالكترن فى الفسفرة الضوئية فى البكتريا ويمكن للفرودوكسين Ferredoxin ان يحل محله فى هذا الدور .



شكل (٦-٢) التركيب البنائى لفيتامين K

وهذا الفيتامين هو المشول عن تجلط الدم وقد عزل K₁ من البرسم ، K₂ من السمك .

٢٠٤٠٢ المرافقات الانزيمية الناقلة للالكترونات : Elactron transferring coenzymes

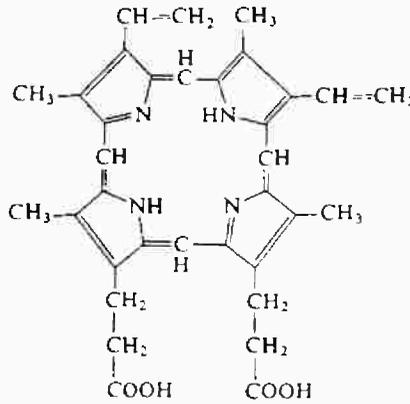
(I) السيوكرومات : Cytochromes

يطلق مصطلح السيوكرومات على كل البروتينات المحتوية على حديد Heme proteins داخل الخلايا (ما عدا الهيموجلوبين ، مايوجلوبين ، البيروكسيديز ، الكاتاليز) وهذه المجموعة تحتوى على مواد ذات وظائف مختلفة ولكن كلها تتفاعل من خلال اكسدة واختزال الحديد .

وترجع صعوبة تسمية السيتوكروومات لعزلها من مصادر مختلفة ولكن لها نفس الخواص ولقد قسمت إلى اربع مجاميع رئيسية من السيتوكروومات هي :

١ - سيتوكروم a : يحتوى على heme a ك prosthetic groups وهو ذو سلسلة جانبية ومرتبطة مع apoprotein لا تكافؤيا (non covalently) ولهذا يمكن فصله عنه بالاستخلاص بواسطة الاستيون الحمضى والصورة المختزلة منه يمكن قياسها ضوئيا عند nm ٥٨٠ - ٥٩٠ .

٢ - سيتوكروم b : يحتوى على protoheme ك prosthetic groups وهو ذو رابطة غير تكافؤية مع apoprotein ويمكن قياس صورته المختزلة عند nm ٥٥٨ - ٥٥٦ .



شكل (٧-٢) : التركيب البنائى لسيتوكروم b

٣ - سيتوكروم C : وهى السيتوكروومات ذات heme prosthetic groups المرتبطة تكافؤيا Covalently مثل الثيواستر thioester والصورة المختزلة يمكن قياسها عند nm ٥٤٩ - ٥٥١ .

٤ - سيتوكروم d : تشبه سيتوكروم a ولكن تقاس صورته المختزلة عند nm ٦٢٠ - ٦٠٠ . ولذ يسمى سيتوكروم a₂ وهى تتأكسد تلقائيا autoxidizable وترتبط مع CN , CO . وتوجد بعض الاختلافات البسيطة بين السيتوكروم العادى والسيتوكروم البكتيرى فى المجاميع الاستبدالية ومنحنيات القياس كالتالى :

* السيتوكروم البكتيري a : يمكن تقسيمه لتحت مجموعتين .

أ - سيتوكروم a : ويظهر α - bands عند 600 - 605 nm اما band γ - عند 440 - 445 nm ويطلق عليه سيتوكروم a_3 أو $a + a_3$ حسب تأثيره بوجود CO , CN .

ب - سيتوكروم a_1 : ومنحنى امتصاصه α - band بين 585 - 595 nm بينما band γ - عند 435 - 445 nm .

* السيتوكروم البكتيري b : ويتراوح منحنى امتصاصه α - band بين 562 - 565 nm (نوع b) ، بين 557 - 560 nm (نوع b_1) كما يوجد نوع (o) وله القدرة على الارتباط مع CO مثل سيتوكرومات d , a_3 , a ، وهو يظهر كعقد O - CO وله ثلاث Bands γ - , β - , α - عند 557 - 567 ، 532 - 537 ، 415 - 420 nm على الترتيب .

* السيتوكروم البكتيري C : برغم انه لم يحصل عليه بصورة نقية بعد الا أن الدراسات المقارنة تدل على وجود 6 أنواع منه وقد استخدم فى هذه الدراسات : منحنيات الامتصاص ، القدرة على تكوين معقدات مع بعض المواد مثل CO ، حجم الجزيئ ، isoelectric pH ، جهد الاكسدة والاختزال القياسى ، تسلسل الاحماض الأمية فى السلاسل البينية والانواع الستة كمايلى :

أ - سيتوكروم C_2 : المعزول من *Rhodospirillum rubrum* وهو ذائب فى الماء وذو وزن جزيئى 12,000 - 14,000 وجهد الاكسدة والاختزال اكبر من + 0.28V ، ويحتوى على هيم واحد ذو α - reduced band عند 550 - 552 nm .

ب - سيتوكروم C_3 : ولقد عزل اولا من البكتريا اللاهوائية الحتمية *Desulfouibrio desulfuricans* وهو ذو جهد اكسدة واختزال قوى جدا (- 0.25V) ولذا فهو ذاتى التأكسد autoxidizable ووزن الجزيئ حوالى 13,000 وهو يشارك فى عمليات اختزال السلفيت والسلفات وانطلاق غاز الايدروجين بواسطة hydroginase ويدخل فى phosphoclastic reactions .

وسيتوكروم C - 552 المعزول من *E. coli* يشبه سيتوكروم C_3 بسبب قوة جهد اكسدته (- 0.2V) .

ج - سيتوكروم C_5, C_4 : وقد عزلا من *Azotobacter vinelandii* وهما يظهر α - band مختزل عند ٥٥١ ، ٥٥٤ nm على الترتيب وزنهما الجزئى متشابه ١٢,٠٠٠ وجهد اكسدة واختزال لكليهما $+ 0.3V, 0.32V$ على الترتيب .

د - سيتوكروم C^-, CC^- ويحتوى مجموعة أو مجموعتين هيم (على الترتيب) مرتبطة تكافليا بالجزئى .

وجه المقارنة	mono heme cyt. C'	diheme cyt. CC'
الوزن الجزئى	٢٩,٠٠٠ - ١٣,٠٠٠	٣٠,٠٠٠ - ٢٧,٠٠٠
Eh	0 - 0.1	0 - 0.1
bands - ٨	420 - 435 nm	390 - 400 nm
مكان وجوده	<i>Rhodospirillum palustris</i> <i>Rhodosp. molischianum</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Ps. denitirificans</i>

(II) الفيرودوكسين Ferredoxin

- تم اكتشاف حامل الكترولونات جديد خلال العقدين الاخيرين يعمل على hydrogen side لكل من $NAD^+, NADP^+$ المؤكسد بعكس السيتوكروم الذى يعمل كمستقبل للالكترولونات له $NADH \cdot H^+, NADP H \cdot H^+$ المختزل . وعند نقل الفيرودوكسين للالكترولون إلى $NAD(P)^+$ فإن جهد الاكسدة والاختزال يصل إلى $0.40V$ - (عند pH 7) والذى يقع بين جزئى الايدروجين ونظام $NAD^+ / NADH \cdot H^+$.

- ومعطى الالكترولون اما غاز الايدروجين أو تفاعل قوى فوتوكيمياوى الذى يحرر الالكترولونات مع تكوين قوة اختزالية مساوية على الاقل لجزئى الايدروجين .

- ويوجد الفيرودوكسين أساسا فى البكتريا اللاهوائية والكلوروبلاست وأول عزله كان من *Clostridium pasterianum* والاسم الحقيقى اطلق عليها تقريبا سنة ١٩٦٢ وهى بروتينات غير محتوية على الحديد .

- تلعب دورا رئيسيا فى عملية التمثيل الضوئى والتخمير وتثبيت النتروجين هوائيا وهو يعمل اساسا كحامل للالكترولون ولكن تركيبة الكيمياوي يختلف حسب التفاعل .
- وللآن هناك ٤ انواع من الفيرووكسين هم :

١ - Ferredoxin a المعزول من الميكروب السابق ويلاحظ عموما فى كل البكتيريا اللاهوائية الخضراء المخمرة والتي لا تقوم بعملية التمثيل الضوئى ويشاهد منحى قياسه عند ٣٨٥ - ٣٩٠ nm وايضا فى منطقة UV عند ٢٨٠ nm ووزن الجزئى ٦٠٠٠ وهو يحتوى اكثر من مجموعة حديد وكبريت .

٢ - Ferredoxin a₁ وهو معزول من *chromatium sp.* ويلاحظ فى كل بكتريا الكبريت الارجوانية المثلثة للضوء ووزن الجزئى ١٠,٠٠٠ وهو اكثر سالييه للالكترولون (0.49V -) عند pH المتعادل ومنحنى قياسه مثل السابق ولكن يحتوى على ٧ إلى ٨ مجاميع حديد وسلفيد للجزئى .

٣ - Ferredoxin b وقد اكتشف باسبانيا ووزنه الجزئى ١٢,٠٠٠ وشائع الوجود فى النباتات والطحالب ومنحنى امتصاصه عند ٤٦٥ ، ٤٢٥ ، ٣٢٥ ، ٢٨٥ nm ويحتوى على مجموعتين حديد ومجموعتين سلفيد حرتين .

٤ - Ferredoxin c ويلاحظ فى بكتريا تثبيت النتروجين هوائيا وعزل من *Azotobacter vinelandii* ووزن الجزئى ٢٠,٠٠٠ ولذا فهو اكثرهم وزنا حتى الآن . ويقاس عند ٤٠٠ nm ويحتوى ٦ مجاميع حديد وسلفيد .

ويرى كثير من الباحثين ان الفيرووكسين يتوسط فى نقل الكترولون واحد فقط ولهذا يقوم الفيرووكسين البكتيرى بعمليتين نقل للجزئى بينما فى النبات يقوم بعملية نقل واحدة .

Rubredoxin

بعكس الفيرووكسين فإن روبردوكسين يحتوى فقط على ذره حديد واحدة للجزئى ولا يحتوى سلفيد غير عضوى ويعمل كحامل الكترولون (وحيد) فى تفاعل الاكسدة والاختزال وله جهد اكسدة واختزال اقوى كثيرا من الفيرووكسين البكتيرى (0.57V -) ويلاحظ منحى قياسه عند ٤٩٠ ، ٣٨٠ ، ٢٨٠ nm ووزنه الجزئى ٦٠٠٠ ويدخل فى كثير من التفاعلات البيولوجية التى يشارك فيها الفيرووكسين .

(III) الفلافودوكسين Flavodoxin

اذا نميت الميكروبات على بيئة محتوية على كمية غير كافية من الحديد لتشجيع تكوين ferredoxin فإن الفلافودوكسين يمكن ان يحل محله .

وهذا المرافق خالى من المعادن أو السلفيد وذو وزن جزئ مرتفع ١٥,٠٠٠ ويحتوى ما يوازى امول من FMN وفرق جهد الاكسدة والاختزال بين flavodoxin semiquinone , reduced flavodoxin , حوالي 0.37V - وهو يقارب فرق جهد الفيروودوكسين ولذا يمكنه ان يحل محله . وقد عزل من *Azotobacter vinelandii* , *Disulfobivrio gigas* , وأيضا *Clostridium pasterianum* .

Diaphorases

وهى فلافويربروتينات قادرة على ملامسه اكسدة نيوكليدات البريدين المختزلة بواسطة مواد عضوية مثل ازرق الميثيلين او الاندوفينول ومركبات غير عضوية مثل فيروسيانيد ولكن لا يستطيع التفاعل مباشرة مع جزئ الاكسجين ومعظم هذه الانزيمات يحتوى FAD , FMN , ك prosthetic group ووزنها الجزئى ٥٠,٠٠٠ - ٧٠,٠٠٠ .

٣٠٤٠٢ المرافقات الانزيمية الناقلة للمجاميع : Group-transferring coenzymes

(I) الناقلة للفوسفات phosphate carrier :

- اهم نوعين من تفاعلات النقل هما نقل الالكترون ونقل الفوسفات والنوع الأول يتعلق بانتاج الطاقة بينما النوع الثانى يتعلق بتقلها من عملية لآخرى وتخزينها .
- والحامل البيولوجى للفوسفات هو ادينوسين ثلاثى وثنائى الفوسفات ATP , ADP الذى يتفاعل كعامل مساعد فى عمليات نقل الفوسفات Transphosphorylation والانزيمات التى تلامس تفاعلات الانتقال من أو إلى حوامل الفوسفات هى مجموعة الكينيز (EC 2.7.1 - 4) Kinases .
- وليس واضحا تماما إلى أى مدى نستطيع نيوكليوسيدات الفوسفات الاخرى مثل inosine diphosphate (IDP), guanosine diphosphate (GDP),

cytidine diphosphate (CDP), uridine diphosphate (UDP) التفاعل كحوامل فوسفاتية .

- وقد ذكرت سابقا ميكانيكية تكوين ATP كمركب غنى بالطاقة حيث يحتوى رابطتين غنيتين بالطاقة وله مقدرة عالية على نقل المجموعة الفوسفاتية .
ويمكن لمركب ATP القيام بالآتى :

- نقل مجموعة الفوسفات الطرفية وانطلاق ADP .

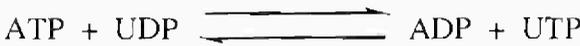
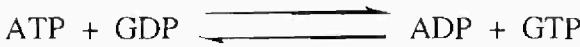
- نقل مجموعة البيروفوسفات وانطلاق AMP .

- نقل AMP وانطلاق البيروفوسفات .

- نقل الأدينوسيل وانطلاق الأرتو فوسفات والبيروفوسفات .

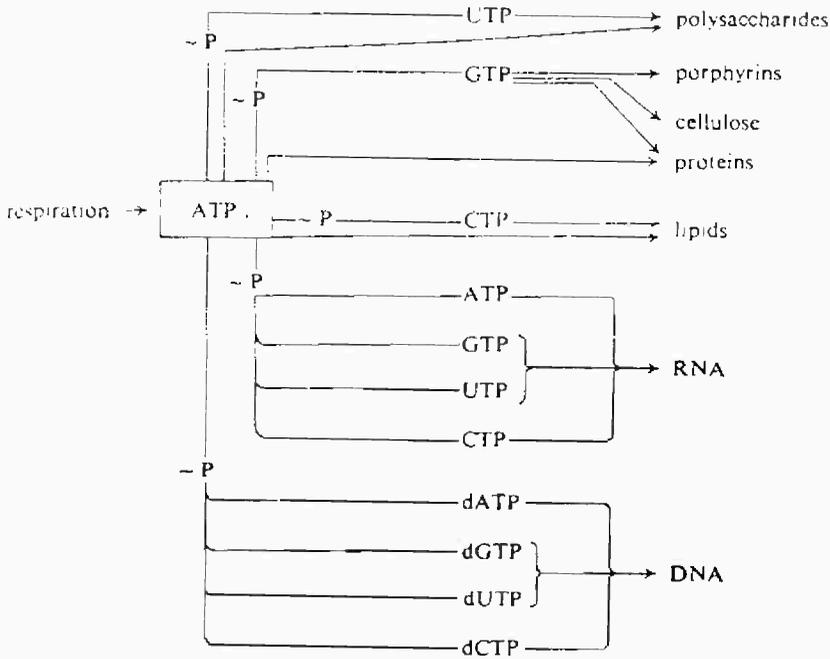
- وقد سبق وصف انتقال مجموعة الفوسفات الطرفية إلى ATP وفى حالة انتقال البيروفوسفات بالرغم من ان هذا النوع من الانتقال لم يلاحظ بعد - الا ان الخلية تستخدمه لترسيب الفوسفات فى ADP اثناء الفسفرة المؤكسدة أو التخمر حيث لا بد من تحليله مائيا اولا إلى الأرتوفوسفات فى وجود انزيم pyrophosphatase (EC 3.6 .1.1) مع انتاج طاقة حرة ضخمة .

- ويعتقد أن ATP هو الأساس فى انتقال الطاقة المرتبطة بينما كل النيوكليوسيدات تراه فوسفات تعمل كقنوات لنقل طاقة ATP إلى مختلف الدورات الحيوية .
ومثل هذه القنوات سهلة الحدوث لان مجموعة الفوسفات الطرفية لمركب ATP يمكن ان تنقل انزيميا إلى النيوكليوسيدات داي فوسفات الأخرى وذلك بواسطة انزيمات nucleoside diphosphate kinases (EC 2.7 4.6) كمايلي :



حيث d ADP هو دى أوكسى ادينين داي فوسفات .

وتتميز كل نواقل الفوسفات بأن لها نفس الطاقة الحرة للتحلل المائي لمجموعة الفوسفات الطرفية مثل ATP علما بأن ADP فقط هو الذى يستقبل مجموعة الفوسفات اثناء الفسفرة المؤكسدة . لهذا فإن نظام ADP / ATP ضرورى لفسفرة UDP , GDP . . . الخ . وللماء القنوات بمجاميع الفوسفات الغنية بالطاقة كما فى الرسم التالى :



شكل (٢ - ٨) : توزيع الطاقة من ATP للتخليق الحيوى لمكونات الخلية نقلا عن Lehninger, 1965

(II) الناقلة لمجموعة ذات ذرة كربون واحدة One carbon group carrier :

تماما مثلما تستطيع ATP حمل ونقل مجاميع الفوسفات فإنه يوجد مرافقات انزيمية

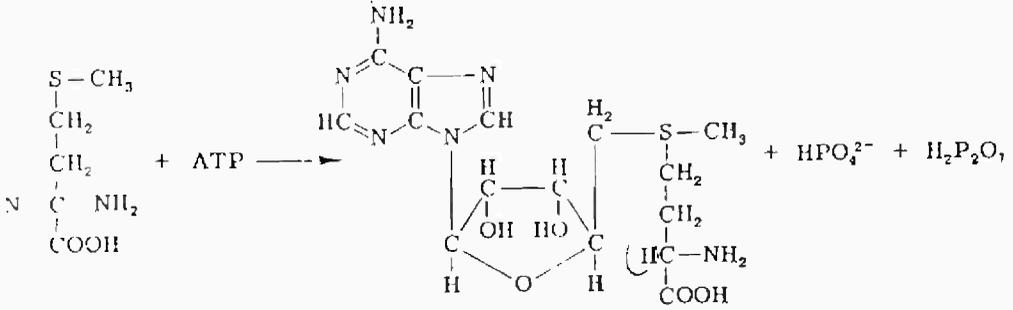
تستطيع نقل مجموعة كربونية ذات ذرة كربون واحدة مثل :

- مجموعة الميثايل (CH_3^-) من الميثانول CH_3OH .
- مجموعة هيدروكسى ميثيل (CH_2OH) من السيرين $\text{HOH}_2\text{C} - \text{NH}_2 - \text{COOH}$.
- مجموعة الفورميل (CHO) من حمض الفورميك ($\text{H} \cdot \text{COOH}$) .
- مجموعة الكربوكسيل (COOH) من حمض الكربونيك ($\text{HO} - \text{COOH}$) .

ومن أشهر هذه المرافقات الانزيمية الناقلة :

★ adenosyl methionine أو الميثونين المنشط :

ويقوم بنقل مجموعة الميثيل وحيث ان رابطة الثيواستر thioester المرتبطة بمجموعة الميثيل ليس لها جهد عالي فإن ATP ضرورى لعملية التنشيط لتكوين Sulfonium فى شكل ادينوسيل ميثونين كالتالى :



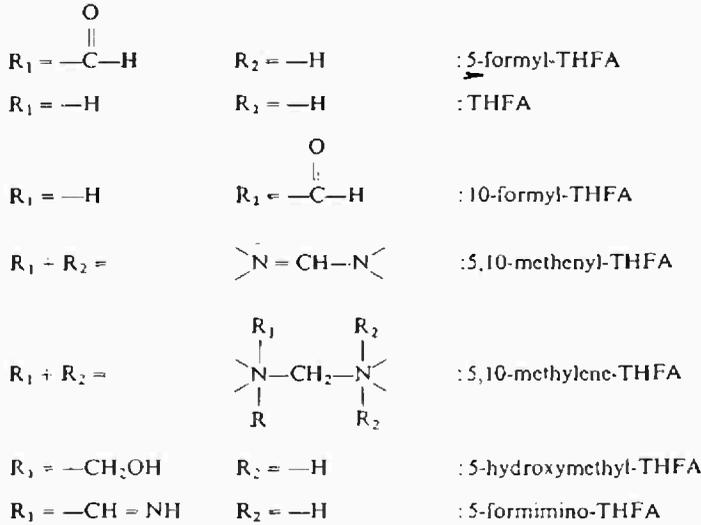
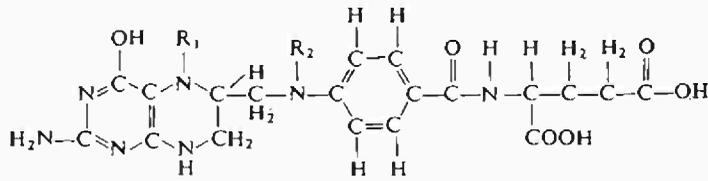
شكل (٢ - ٩) : ميكاتيكية عمل المرافق الانزيمى الميثونين

★ (THFA) Tetrahydrofolic acid :

فهو المرافق الانزيمى المستول عن نقل مجاميع هيدروكسى الميثيل ، فورميل ، formimino . والناقل النشط ليس حمض الفوليك كما اعتقد لبعض الوقت ولكن THFA . وفى تفاعلات البكتيريا فإن مشتق البولى جلوتامات polyglutamate لحمض الفوليك يشجع نمو بعض السلالات .

ومركب THFA سريع الاكسدة الذاتية autooxidizable وسريع التحول إلى dihydrofolate بواسطة الاكسجين كما يتأكسد انزيميا بواسطة NADP⁺ . ويختزل مركب folate إلى داي او تتراهيدروفولات بواسطة NADPH.H⁺ وبمساعدة انزيم DHFA dehydrogenase (EC 1.5.1.4) .

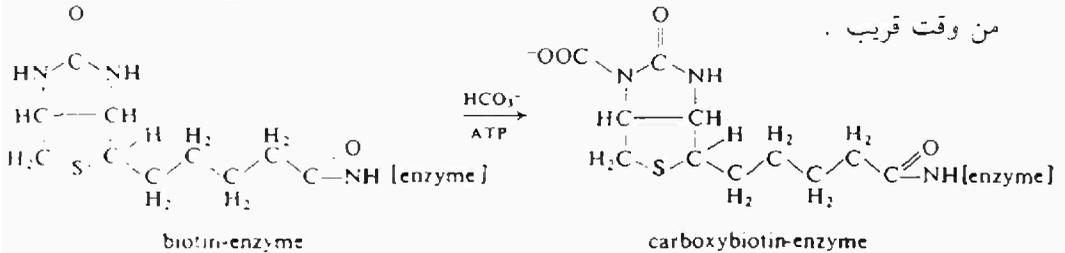
ويختلف THFA عن النواقل الاخرى بأن المجموعة المنقولة يمكن أن تتغير أو تتحول بينما مازالت مرتبطة بالناقل أى أن المجموعة المعطاة للمستقبل ليس شرط ان تكون مطابقة للتي تفصل عنه .



شكل (٢ - ١٠) : مركب حمض تتراهيدروفوليك ومشتقاته

★ البيوتين Biotin :

وهو فيتامين معروف وهو مشتق حلقي من اليوريا مع حلقة thiophan مرتبطة به كما بالرسم ووظيفته كعامل مساعد للتفاعلات الانزيمية المتضمنة ادخال أو نقل Co_2 وقد اكتشف من وقت قريب .



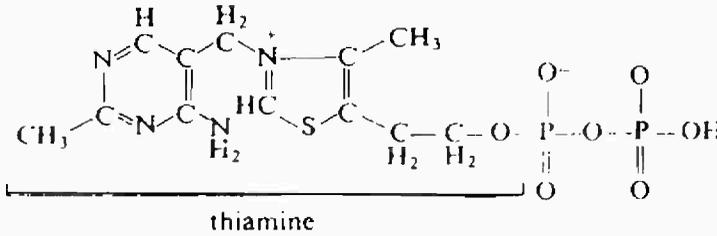
شكل (٢ - ١١) : دور البيوتين في تفاعلات تثبيت ك_٢

ويرتبط البيوتين مع بروتين الانزيم بواسطة رابطة ببتيديه مع مجموعة الامين في Lysyl . وعملية تحميل البيوتين بـ ك_٢ تحتاج لطاقة أي ATP ويرتبط ك_٢ مع ذرة التروجين للبيوتين ويعتبر عندئذ في صورته منشطة التي تشارك في العديد من تفاعلات Carboxylation مثل تكوين malonyl - CoA من acetyl - CoA .

(III) الناقله لمجموعة ذات ذرتين كربون Two carbon group carrier :

★ بيروفوسفات الثيمين (TPP) Thiamine Pyrophosphate :

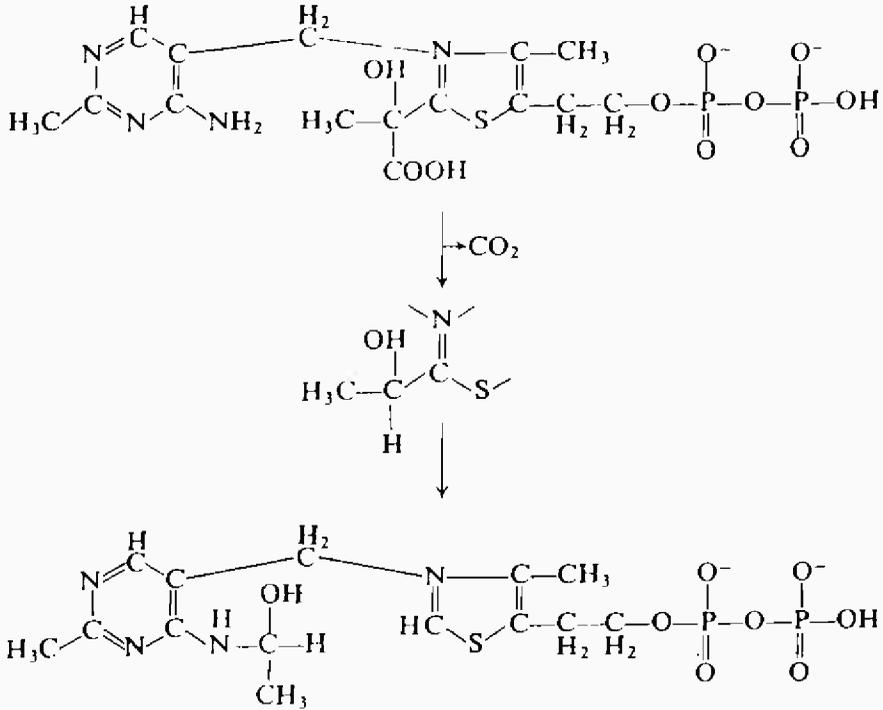
وهو المرافق الانزيمي الذى ينقل الـاسيتالدهيد والجليكولدهيد ويعرف ايضا محتواه من الكبريت حيث يحتوى التكوين البنائى له على حلقتين : واحدة بيريميدين والاخرى ثيازول thiazol ولذا يحمل شحنة موجبة دائما .



شكل (٢-١٢) : التركيب البنائى للبيروفوسفات ثيمين (TPP)

ويعمل كـ prosthetic group لانه يرتبط بروتين الانزيم فى كل التفاعلات المحتوية على احماض الفاكيتونية مثل البيروفات حيث ترتبط ذرة الكربون الثانية C₂ حلقة الثيازول مع مجموعة الفاكتيو فى صورته القطبية polarized وبالتالي يلامس نزع ك⁺ ويتكون الـاسيتالدهيد فى صورة منشطة على ذرة C₂ حلقة الثيازول والذى ينتقل إلى مجموعة الامينو المجاورة ويصبح الآن حر الانطلاق أو ينتقل إلى مستقبل آخر كما فى شكل ١٣٠٢ .

والمركب الوسطى يسمى α - هيدروكسى ايثيل ثيمين فوسفات ونواتجه النهائية تتوقف على أى انزيم سيشارك فى التفاعل التالى . ومن أهم التفاعلات التى يشارك فيها TPP هسى نزع ك⁺ بالاكسدة oxidative decarboxylation للأحماض الالفاكيتونية حيث ينقل الـاسيتالدهيد المتبقى إلى حمض الليبوثيك الذى يعمل كعامل مؤكسد وفى تفاعل transketolase يعمل TPP كمرافق انزيمي فى نقل الجليكولدهيد .

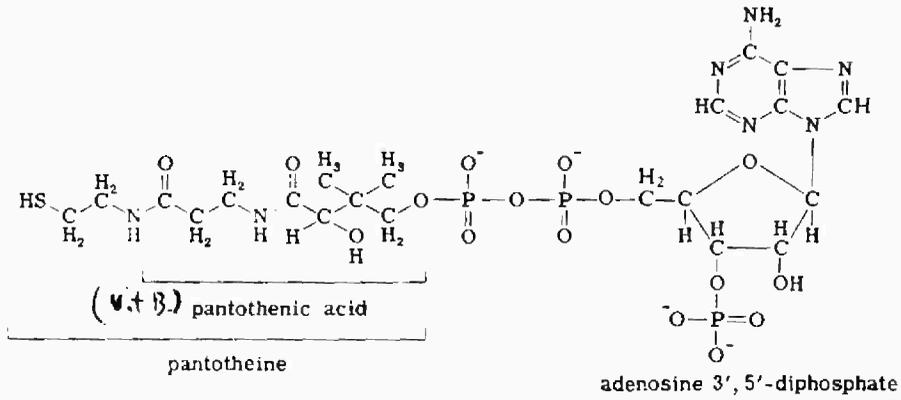


شكل (٢ - ١٣) : كيفية انطلاقه ك أ٢ وانتقال الاستيلدهيد بملاسة TPP

★★ (Co A) Coenzyme A :

تعطى الدراسات الحديثة فى التفاعلات الايضية للكربوهيدرات انتباها لعملية نقل مجموعة الاسيل acyl group خاصة بواسطة النواقل المحتوية على مجاميع الثيول thiol مكونة استرات الثيول thioesters لان هذه المركبات الغنية بالطاقة تشارك مع مركبات الفوسفات الغنية بالطاقة فى وظيفة نقل الطاقة الحيوية الهامة .

وقد اكتشف CoA بواسطة lipman , 1947 والحرف "A" مشتق من acylation ورابطة الاحماض مع المركب CoA لها قدرة عالية على نقل مجموعة الاستيل المنشط ويعرف باسم Acetyl - CoA . وقد اكتشف مؤخرًا ان acyl - CoA يمكن ان يتفاعل اكثر من ٦٠ انزيم على مركباته . والتحلل المائى لـ acyl - CoA يتج طاقة حوالى 8000 cal / mole .



شكل (٢ - ١٤) : التركيب البنائي للمركب Coenzyme A

وهو يعتبر أكثر تعقيدا من السيوكروم أو NAD . ومركب pantotheine هو عامل نمو للعديد من الكائنات الدقيقة ويتكون من pantoic acid ، β - alanine ، mercaptoethylamine . والمركب الناتج من اتحاد pantoic acid ، β - alanine يعرف pantothenic acid (المعروف بفيتامين B) .

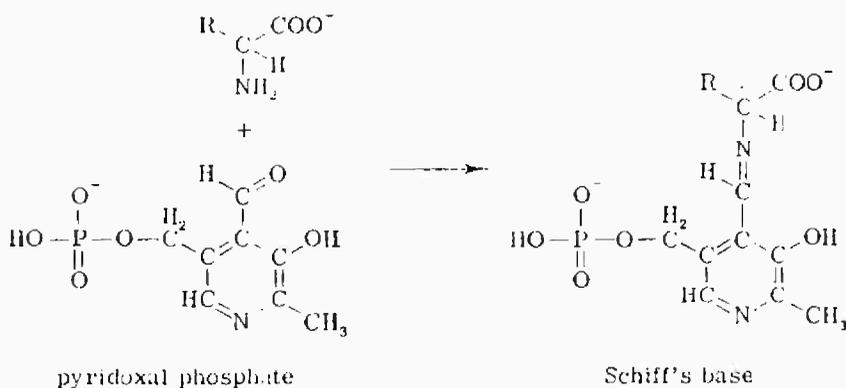
- وكما ذكرنا فإن acetyl - CoA أهم مركبات CoA حيث ترتبط مجموعة الاستيل -CO-CH₃ مع مجموعة SH - الحرة مكونة ثيواستر ولرابط الاستيات أو أى حمض كربوكسيلي آخر مع هذا المركب فإن يحتاج لطاقة وهي غالبا تشتق من تفاعلات منتجة للطاقة مثل oxidative decerboxylation أو من انشقاق ATP .

- مركب CoA مادة غير ملونة يمكن قراءتها عند 257 nm بواسطة الاسبكتروفوتومتر بسبب احتوائها على adenine . ويقع كل acid - thiol - ligases في تحت المجموعة الانزيمية (ES 6.2.1) حيث تلامس تكوين CoA thiolesters من الاحماض الحرة مستخدما الطاقة من ATP ، GTP بينما كل acyl transferases (EC 2.3.1) تنقل مجموعة الاستيل إلى أو من CoA . ويدخل أيضا استيل كوانزيم A في التفاعلات التي يلامسها انزيمات lyases . وتضاف مجموعة الاستيل إلى أى جزئ مستقبل ذو رابطة زوجية سواء بواسطة أو بدون التحلل المائي لرابطة الثيواستر وهو اساس البدء لدوره حمض الستريك (TCA) ، هدم الاحماض الدهنية بالاكسدة وللعديد من العمليات التخليقية الاخرى .

(IV) المرافقات الانزيمية الناقلة لمجاميع اخرى :

★ بيريدوكسال الفوسفات (PALP) :

وهو المرافق الانزيمى لتحولات الاحماض الامينية مثل نقل مجموعة الامينو-transamination . وهذا المرافق يعتبر مثال ممتاز للمرافقات الانزيمية المفردة القادرة على ملامسه التفاعلات المتتلفة بالكامل فهو يدخل ايضا فى انزيمات نزع ك أ⁺ decarboxylases ومختلف انزيمات الازالة والاضافة lyases والتخليق synthetases وميكانيكة عمله يعتقد انها تكوين azomethine باتحاد مجموعة الالدهيد مع مجموعة الامينو فى مادة التفاعل ويتوقف نواتج التفاعل على طبيعة البروتين الانزيمى Apoenzyme المرتبط به هذا المرافق (PALP) وعلى مجموعة R .



شكل (٢ - ١٥) : تكوين schiff's base من مادة التفاعل والمرافق

بيريدوكسال فوسفات

★★ فيتامين B₁₂ (Cobalamine) :

وهو مرافق انزيمى فى مجال isomerization ويعمل كناقل لمجاميع الميثيل

٢-٥ القوى المحركة للنمو البكتيري : Bacterial Growth kinetics

٢-٥-١ المزارع ذات الدفعة الواحدة : Batch Cultures

عند تلقيح الخلايا الميكروبية في مرق مغذى وتحضينها على درجة حرارة مناسبة فإنه تحدث سلسلة من التغيرات التي يمكن متابعتها بطرق مختلفة بعد فترة التأقلم lag period حيث تزداد الكائنات في الكتلة وتنقسم مسببا زيادة في كمية المادة الحية وهو ما تطلق عليه النمو . وعند توافر الظروف المناسبة للنمو والتضاعف فإن كمية المادة الحية تزداد - ليس في تناسب مباشر مع الزمن - ولكن طبقا لمتواليه هندسة كالتالي :

$$2^0 \longrightarrow 2^1 \longrightarrow 2^2 \longrightarrow 2^3 \longrightarrow 2^4 \dots\dots\dots 2^n$$

فيذا كان عدد الخلايا في اللقاح هو N_0 فإن عدد الخلايا N بعد عدد من الانقسامات هو :

$$N = N_0 \times 2^n \dots\dots\dots (1)$$

$$\therefore \log N = \log N_0 + n \log 2 \dots\dots\dots (2)$$

وبالتالي يمكن حساب عدد الاجيال أو انقسامات الخلية بين N, N_0

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} \quad (\text{عدد الاجيال}) \quad (3)$$

$$\therefore \log 2 = 0.301$$

$$\therefore n = 3.32 (\log N - \log N_0) \quad (4)$$

وإذا دخل تحت هذه الظروف المثالية - عامل الزمن - فإنه يمكن الوصول إلى معدل التضاعف (r) للمزرعة .

$$r = \frac{n}{t_1 - t_0} = \frac{3.32 (\log N - \log N_0)}{t_1 - t_0} \quad (5)$$

ويتم هذا النمو في مرحلة الطور اللوغاريتمي اما لو اخذنا في الاعتبار التغيرات الحادثة في بيئة النمو حيث يستهلك عناصر غذائية وتفرز نواتج جديدة مما يسبب تغير pH ويقلل

تركيز الاكسجين في حالة الميكروبات الهوائية مثلا ولهذا فعملية النمو تؤدي إلى وسط نهائي قد لا يناسب مزيد من النمو وعندئذ تدخل المزرعة في مرحلة الثبات stationary state أى أن تعاقب التغيرات بسبب دورة النمو الميكروبي وما يحدث فيها من تداخلات وتفاعلات مع البيئة يؤدي لعدم وجود ظروف مثالية في معظم الاحوال .

وحيث ان الظروف المثالية ليست موجودة عادة في "batch culture" فإنه يستعمل اصطلاح g أى « زمن الجيل أو زمن التضاعف » بدلا من عدد الأجيال (n) .

$$g = \frac{t}{n} \quad (6)$$

ومن معادلة (5) .

$$g = \frac{1}{r} \quad (7)$$

$$n = \frac{t}{g} = t \times r \quad (8)$$

وليس سهلا قياس زمن التضاعف في المزرعة الميكروبية نظرا لصعوبة تقدير عدد الخلايا عند N_0, N ولذا تستخدم تعبير كتلة البكتريا النامية (x) بدلا من عدد الخلايا .

وبالرجوع إلى معادلة (1)

$$N = N_0 \times 2^n$$

وبالتعويض عن n من معادلة (8)

$$\therefore N = N_0 \times 2^{\frac{t}{g}}$$

وبالتعويض عن عدد الخلايا بكتلة الميكروبات (X) فإن

$$X = X_0 \cdot 2^{\frac{t}{g}}$$

وبتحويلها إلى الصورة اللوغاريتمية

$$\ln x = \ln x_0 + \frac{t}{g} \ln 2 \quad (9)$$

وبالنظر إلى عنصر الزمن وعلى اعتبار أن $X_0 = 1$ فإن المعادلة تتحول إلى

$$\frac{d(\ln x)}{dt} = 0 + \frac{\ln 2}{g} \quad (10)$$

وبالرجوع إلى معادلة (9) فإن

$$\ln x - \ln x_0 = \frac{t}{g} \ln 2$$

$$x = x_0 e^{\frac{\ln 2 t}{g}}$$

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\ln 2}{g} \cdot x$$

$$\therefore \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \frac{\ln 2}{g} \quad (11)$$

ومن معادلة (10) ، (11) .

$$\frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \frac{\ln 2}{g} = \frac{d(\ln x)}{dt} = \mu \quad (12)$$

حيث تمثل μ معدل النمو المتخصص specific growth rate .

ولشرح الفرق بين growth rate ، specific growth rate .

يمكن تحديد الآتي :

١ - المعدل الحقيقي لزيادة تركيز الكائن $\frac{dx}{dt}$ يعرف growth rate .

٢ - معدل الزيادة بالنسبة لوحدة تركيز الكائن $\frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$ يعرف specific growth rate .

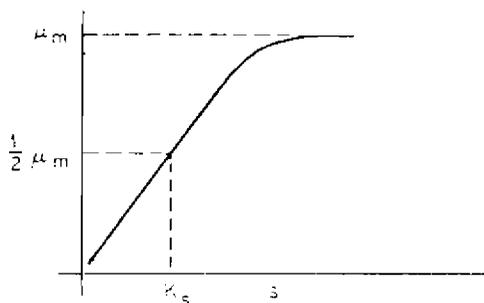
وباحلال $\frac{\ln 2}{g}$ في معادلة (9) بقيمة μ تصبح

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad (13)$$

ويرسم t على المحور الافقى ، $\ln x$ على المحور الرأسى فإننا نحصل على خط مستقيم

ذو انحدار يعتمد على معدل النمو وتدرج هذا الخط هو μ الذي يقاس بالعلاقة

$$\mu = \tan \alpha = \frac{BB'}{AB} = \frac{CC'}{AC'}$$



شكل (٢ - ١٦) : تقدير specific growth rate (μ) من المنحنى القياسى

أو يمكن حساب μ مباشرة بالمعادلة (13) حيث

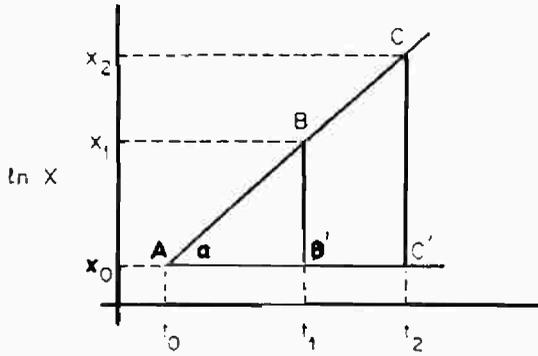
$$\mu = \frac{\ln x - \ln x_0}{t} \quad (14)$$

وبالرجوع إلى معادلة (12) حيث $g = \frac{\ln 2}{\mu}$

وبالتعويض من معادلة (14) السابقة يمكن حساب زمن الجيل

$$\begin{aligned} \therefore g &= \frac{t \ln 2}{\ln x - \ln x_0} \\ &= \frac{0.69 t}{\ln x - \ln x_0} \end{aligned} \quad (15)$$

وواضح من كل العلاقات الرياضية السابقة امكانية استنتاج ان batch cultures تتأثر بوضوح بالبيئة وخاصة تركيز المغذيات الاساسية (مادة التفاعل) . فإذا وضع μ على المحور الرأسى وتركيز مادة التفاعل (S) على المحور الافقى فإنه تنتج علامة تشبه قياس سرعة الانزيم أى يزداد معدل النمو المتخصص بزيادة تركيز مادة التفاعل حتى نقطة معينة (μ_{max}) لا يجدى بعدها أى زيادة فى تركيز (S) ويثبت معدل النمو المتخصص كما بالرسم التالى .



شكل (٢ - ١٧) : العلاقة بين معدل النمو المتخصص للبكتيريا (μ) وتركيز مادة التفاعل (S) ومنه يمكن تحديد ثابت تشبع مادة التفاعل (K_s)

وقد وضع Monod, 1942 هذه العلاقة في صورة رياضية

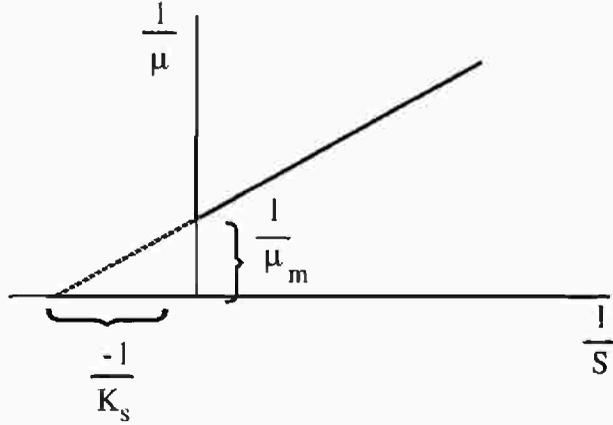
$$\mu = \mu_m \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \quad (16)$$

حيث μ_m = القيمة العظمى لمعدل النمو المتخصص (μ) (عندما لا تكون مادة التفاعل هي العامل المحدد)

$$K_s = \text{ثابت التشبع لمادة التفاعل عند } \frac{1}{2} \mu_m$$

وحيث انه في batch cultures كل المواد الغذائية موجودة ابتداءً وفي تراكيز كافية حتى لا تكون عاملاً محدداً لمعدل النمو المتخصص (μ) لذا فإن μ يكون مساوياً μ_m اثناء مرحلة النمو اللوغاريتمي اما ثابت مادة التفاعل K_s فإنه عادة أكبر من zero ولذا فإن قيمة المعادلة عامة اصغر من ١ .

وتتشابه المعادلة (16) مع معادلة Michaelis - Menten مما يصف ضرورة اخذ القوى المحركة للنظام الانزيمي في الاعتبار . وهذا التشابه يظهر ان كلا المعادلتين يتحكم فيهما قيمة التشبع لاحد مكونات النظام ولذا يمكن استخدام طريقة Lineweaver and Burk لتقدير قيمة μ_m , K_s .



شكل (١٨-٢) : تقدير μ_m , K_s باستعمال Lineweaver - Burk plots

ويمكن استعمال المعادلة التالية لتقديرها

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s + S}{\mu_m S} = \frac{1}{S} \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{1}{\mu_m} \quad (17)$$

ويرسم $\frac{1}{\mu}$ على المحور الرأسى ، $\frac{1}{S}$ على المحور الافقى فتحصل على خط مستقيم

يحدد $\frac{1}{K_s}$ ، $\frac{1}{\mu_m}$. كما فى الرسم السابق .

ولقد وجد Monod, 1942 علاقة رياضية بين نمو المزرعة واستهلاك مادة التفاعل

$$\frac{dx}{dt} = -y \frac{ds}{dt}$$

حيث y هى yield factor ويحسب كالتالى

$$y = \frac{\text{وزن البكتريا المتكونة}}{\text{وزن مادة التفاعل المستهلكة}}$$

وهناك العديد من المراجع الممتازة لمزيد من التفاصيل مثل , stouthamer, 1969

. Rose, 1965

٢٠٥٠٢ المزارع المستمرة : Continuous Culture :

تبدأ كل المزارع المستمرة مثل المزارع ذات الدفعة الواحدة حيث تحضن البيئة الموجودة في روارق التنمية مع الكائن المطلوب تنميته فإذا اضيف مزيد من البيئة اثناء طور النمو اللوغاريتمي للمزرعة بمعدل كافى ليحفظ بكثافة ميكروبات المزرعة ثابتة ، فإن النمو الميكروبي لا يهبط كما فى المزرعة المتقطعة ولكن يستمر كما هو .

ويزداد معدل اضافة البيئة وحجم المزرعة اسيا بزيادة الكتلة الحيوية ولذا يزود النظام بوسيلة للتخلص من الزائد من المزرعة بمعدل يساوى معدل الاضافة أى ثبات حجم النظام حيث المواد الداخلة (input) (inflow) بنفس معدل الخارج (output) (overflow) منه .
والتغير فى الطاقة يكون ثابتا ($\Delta F = \text{constant}$) .

ومن الأجهزة المستخدمة فى المزارع المستمرة ما يعرف بـ "chemostat" حيث ينمو الكائن عند معدل نمو متخصص يشبه μ_m . ولهذا الغرض فإن المزرعة تكون ذات حجم ثابت (V) ويضاف إليها البيئة عند معدل ثابت (F) وهذه البيئة تحتوى على كل المواد التى يحتاجها الكائن للنمو ماعد (واحد) يوجد فى المزرعة بتركيز يتعدى احتياجات النمو . وهذا الواحد يسمى المحدد للنمو . وعند فصل هذه المادة المحددة للنمو من بقية مكونات البيئة واضافتها منفصلة لدورق النمو فإننا نحصل على نمو أفضل وهذا النوع من النظام المفتوح ذو الخطوة الواحدة single step open system يتحدد معاملة بواسطة البيئة الجديدة الداخلة in-flow لدورق المزرعة والخارج overflow منه عند نفس المعدل ولكنه بما يحتويه من نواتج نشاط الكائن الايضى .

وتعرف نسبة الكمية المضافة من البيئة فى الساعة إلى حجم المزرعة بمعدل التخفيف (D) .

$$D = \frac{F}{V}$$

وفى هذا النظام التجريبي فإن معدل نمو الكائن لن يعتمد على معدل اضافة البيئة inflow ولكن على معدل التخفيف . فإذا احتفظ بمعدل التخفيف ثابتا فإن تركيز ما يسمى المحددة للنمو growth limiting substrate يعطى قيمة مساوية لمعدل النمو المتخصص μ ولهذا

$$\mu = D$$

ونصل لمرحلة الثبات steady state للمزرعة والتي يمكن الاحتفاظ بها لمدة طويلة بدون تغيير معدل الاضافة او تركيز مادة التفاعل .

وتركيز مادة التفاعل المؤثر يمكن التعبير عنه .

$$S_x = S_0 - S_1$$

حيث S_0 = تركيز المادة الاساسى فى البيئة الداخلة

S_1 = تركيز المادة الاساسى فى دورق التفاعل

وعندما تكون $S_x = 0$ فإن مادة التفاعل لا تستخدم ولا يحدث نمو للكائن اما إذا زادت الكتلة الحيوية biomass فلا بد ان تكون S_x موجب أى $S_1 < S_0$. وفى حالة زيادة تركيز S_x فإن معدل النمو μ سيتغير قيمته القصوى μ_m أى أن μ ستكون function لتركيز مادة التفاعل .

ولتحديد القوى المحركة للنمو البكتيرى فى المزارع المستمرة فى chemostat فلا بد من فهم العلاقة بين معدل التخفيف ، معدل النمو ، تركيز مادة التفاعل ولو أمكن التحكم جيدا فى ظروف التجربة مثل تجانس المزرعة وثبات خواص المزرعة عند التركيز العالى لمادة التفاعل المحددة للنمو ووجود بقية المغذيات الاخرى بوفرة فإن معدل μ يمكن أن يفترض انه اقتراب من حدة الاقصى μ_m .

ومن معادلة (14) فإن

$$x = x_0 e^{\mu t} \quad (18)$$

وبأخذ الزمن فى الاعتبار

$$\left(\text{التغير فى الكتلة مع الزمن} \right) \quad \frac{dx}{dt} = \mu x \quad (19)$$

وإذا عوض عن x بـ μ بواسطة انسياب الكتلة الحيوية مع البيئة $D x$ فإن التغير الحقيقي في تركيز الكتلة الحيوية مع الوقت يمكن تقديره بالعلاقة

$$\text{increase} = \text{growth} - \text{outflow}$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - D x$$

$$\frac{dx}{dt} = x (\mu - D) \quad (20)$$

أى عندما يكون $D > \mu$ فإن $\frac{dx}{dt}$ يكون موجبا وتركيز الكائن في المزرعة سيزداد مع

الوقت اما إذا كان العكس $D < \mu$ فإن $\frac{dx}{dt}$ ستكون سالبة القيمة وسيقل تركيز الخلايا مع الوقت ولن تستهلك مادة التفاعل .

اما إذا كان $D = \mu$ فإن $\frac{dx}{dt} = 0$ صفر وسيظل تركيز الخلايا في المزرعة ثابتا مع الوقت

وهذه مرحلة المزرعة المنتظمة الثبات steady state culture ومن معادلتى (12) , (16) فإن

$$D = \mu = \mu_m \left(\frac{S}{K_s + S} \right) = \frac{\ln 2}{g} \quad (21)$$

وليس صعبا الوصول إلى هذه المرحلة لان معدل النمو للكائن فى المزرعة - المحدد بواسطة معدل اضافة مادة التفاعل المحددة للنمو - يجب ان يناسب معدل التخفيف . فإذا كان معدل التخفيف سيظل ثابتا فإن النظام سيتوازن ذاتيا .

وحيث ان معدل النمو المتخصص μ لا يمكن ان يتجاوز μ_m ولهذا لا يمكن ان نصل لحالة ثبات المزرعة عند معدل تخفيف أعلى من الحد الحرج Critical value (D_c) والتي تساوى تقريبا μ_m . اما إذا زاد معدل التخفيف عن D_c فإن المزرعة ستغسل (تنتهى) من المخمر .

ولقد ذكر سابقا أن النمو البكتيرى يعتمد أيضا على تركيز مادة التفاعل ولهذا فإنه ضروريا أن نضع فى الاعتبار ليس فقط تأثير معدل التخفيف D على معدل النمو μ ولكن

تأثير معدل التخفيف على تركيز مادة التفاعل المحددة للنمو (S) والكتلة الحيوية (x) في المزرعة .

فالمادة الداخلة في دورق النمو عند تركيز S_0 تستهلك بالكائن وتخرج مع outflow عند تركيز S ولهذا فإن التغير الصافي في تركيز مادة التفاعل .

Change of substrate = input - outflow - consumption.

$$\frac{dS}{dt} = DS_0 - DS - (\mu x / y)$$

بإحلال μ من معادلة (16)

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu_m x}{y} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \quad (22)$$

وبإحلال μ في معادلة (20)

$$\frac{dx}{dt} = x \mu_m \left(\frac{S}{K_s + S} \right) - Dx \quad (23)$$

والمعادلات الثلاثة الأخيرة 21 , 22 , 23 .

١ (تحدد كيميا سلوك المزرعة في Chemostat .

٢ (تظهر ان المزرعة المستمرة (بصرف النظر عن مرحلة بدء نموها) لا بد أن تكون منتظمة الثبات دائما .

٣ (تعبر عن قدرة التنظيم الذاتية للنظام المستمر .

ونظرا لان المعادلتين 22 , 23 تكون قيمتها صفرا عند مرحلة الثبات $\left(\frac{dx}{dt} = 0 \right)$

فإن قيم S , X يمكن حسابهما في ظروف هذه المرحلة .

* حساب الكتلة الحيوية (x) من معادلة 22

$$D (S_0 - S) = \frac{x}{y} \mu_m \left(\frac{S}{K_s + S} \right)$$

وفى حالة steady state فإن $D = \mu$ لذا يمكن اختصار المعادلة السابقة إلى

$$\therefore x = y (S_0 - S) \quad (24)$$

** حساب تركيز مادة التفاعل S من معادلة 23 .

$$D = \mu_m \left(\frac{S}{K_s + S} \right)$$

$$\therefore S = K_s \left(\frac{D}{\mu_m + D} \right) \quad (25)$$

وبإحلال S من معادلة (25) فى معادلة (24) .

$$x = y \left[S_0 - K_s \left(\frac{D}{\mu_m + D} \right) \right] \quad (26)$$

وحيث ان القيم K_s , μ_m , y تم قياسها معمليا فى batch culture وهكذا اصبحت ثابتة فى المزارع المستمرة فإنه يمكن تصميم السعة التنظيمية الذاتية self - regulating capacity للمزرعة المستمرة . وبتغيير S_0 , D معمليا فإن عدد كبير من حالات الثبات يمكن الوصول إليها مرتبطة فقط بتركيز S الموجود عند مستوى معين هو العامل المحدد لنحو المزرعة البكتيرية .

اسئلة لمراجعة الباب الثاني

- ١ - ما هو الانزيم وما هي وظيفته ؟
- ٢ - ما هو Michaelis - Menten Constant (K_m) وكيف يمكن حسابه ؟
- ٣ - ماهي أهمية lineweaver - Burk plot ؟
- ٤ - ما هو الفرق بين prosthetic group & Coenzyme ؟
- ٥ - اشرح الفرق بين NAD^+ , FAD^+ ، الكينونات .
- ٦ - ماهي مجاميع السيتوكروم الاربع وكيف يمكن التفريق بينهم ؟
- ٧ - ما هو الفرق بين السيتوكروم والفيروودوكسين والفلافودوكسين ؟
- ٨ - ناقش الدور الذي يلعبه كل من $THFA$, TPP .
- ٩ - يعتبر $acetyl - CoA$, ATP من أهم المركبات الغنية بالطاقة . ناقش ذلك .
- ١٠ - اذكر المعادلة الرياضية لتقدير معدل النمو المتخصص ، زمن الجيل ، معدل التضاعف ، عدد الاجيال في المزارع ذات الدفعة الواحدة .
- ١١ - ناقش العلاقة بين kinetics للنظام الانزيمي والنمو البكتيري .
- ١٢ - ما المقصود بالسعة التنظيمية الذاتية في المزارع المستمرة ؟

المراجع

1. Dixon, M. and Webb, F.C. (1964). Enzymes. 2nd Ed. Longmans, Green, New York.
2. Ginsburg, A. and Stadtman, E.R. (1970) Multienzyme systems. Annu. Rev. Biochem. 39; 429.
3. Karlson, P. (1970). Kurzes Lehrbuch der Biochemie. 7th Ed. Thieme-stuttgart.
4. Lehninger, A.L. (1965). Bioenergetics. Benjamin, New York.
5. International Union of Biochemistry Commission (1972). "Enzyme Nomenclature : Recommendations of the IUB on Nomenclature and Classification of Enzymes, together with their units and the symbols of enzyme kinetics" Elsevier, Amsterdam.
6. Málck, I. and Fenel, Z. (1966). Theoretical and methodological basis of continuous culture of microorganisms. Academic Press, New York.
7. Reed. L., de Busk, B., Gunsalus, I. and Hornberger, C. (1957). Crystalline α -lipoic acid. A catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. Science, 114: 93.
8. Rose. A.H. (1969). Chemical Microbiology 3rd Ed., Butterworth, London.
9. Sokatch, J.R. (1969). Bacterial physiology and metabolism. Academic press. New York.
10. Stouthamer, A.H. (1969). Determination and significance of molar growth yields. In : Methods of Microbiology (J.R. Norris and D.W. Ribbons, eds) Vol. 1, p: 629. Academic Press, New York.