الباب الثانى
الانزيمات - المرافقات الانزيمية - الطاقة الحركية للنمو البكتيرى

Enzymes, Coenzymes and bacterial growth kinetics

obeikandl.com

obeikandl.com

الباب الثانى
الانزيمات - المرافقات الانزيمية - الطاقة الحركية للنمو البكتيرى
Enzymes, Coenzymes and bacterial growth kinetics

يمكن للتفاعلات المنتجة لطاقة عالية (ΔF^{o} 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 الثرموديناميكية فإن العامل اللمسى هو الذى يخفض lowers طاقة التنشيط الحرة .

أما من الناحية الفيزيقية فإن مادة التفاعل تتحد مؤقتا مع العامل اللمسى وبالتالى 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 لاى كائن أن ينغلق على نفسه فى مرحلة التوازن أو التعادل الكيمياوى لأن أى نظام فى حالة التعادل لايستطيع عمل أى شغل . وهذه الاستمرارية تجاه حالة التعادل تشبه حالة الثبات steady state حيث لابد من تغذية مستمرة بمادة التفاعل ويخرج

obeikandl.com

من الناحية الاخرى نواتج التفاعل . وحيث ان الكائنات تمثل نظاما مفتوحا فإن حالة الثبات تؤدى لتكوين تركيزات ثابتة .stationary conc والتى تختلف عن القواعد الثرموديناميكية للتعادل الكيمياوى وهذا هو السبب الرئيسى ان التفاعلات الحيوية تظل فى حالة شغل فى اتجاه حالة التعادل وعادة يحصل الكائن على طاقته من هذه التفاعلات .

وكل الانزيمات التى تُوّصل إلى تركيبها الكيمياوى 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 ٥٠° م أو أعلى أو بواسطة أيونات المعادن الثقيلة وتتأثر كثيرا بدرجة الحموضة (pH) .

تختلف الانزيمات عن العوامل اللمسية الغير عضوية مثل البلاتنيوم 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 متعاقبه 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 ديهيدروجنيز 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 البيتيدية ، نوعية الروابط الثانوية ، طبيعة المراكز النشطة الخاصة بكل انزيم .

٢٠٢ سرعة التفاعلات الانزيمية : Velocity of enzymatic reactions

تعتبر مادة التفاعل من أهم العوامل التى تحدد سرعة التفاعل الانزيمى . فالانزيم يُكوّن اولا معقدا مع مادة تفاعله ثم ينكسر هذا المعقد معطيا الانزيم الحر وناتج التفاعل كالتالى :

$$\text{Enzyme} + \text{Substrate} \rightleftharpoons \text{Enzyme - Substrate complex}$$

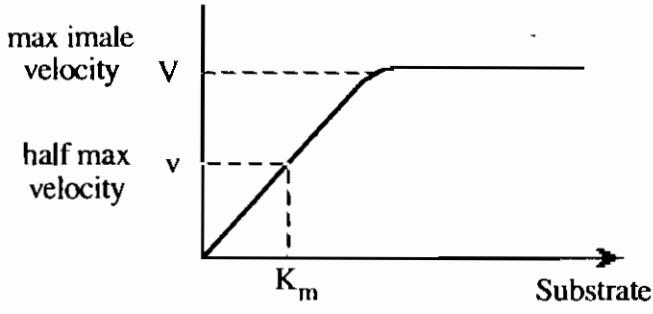
$$E + S \rightleftharpoons ES$$

$$ES \rightleftharpoons \underbrace{A + B}_{\text{products}} + E$$

ويمكن حساب ثابت التشبع (التوازن) لمادة التفاعل كالتالى :

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

ويمكن تمثيل العلاقة بين سرعة velocity أى تفاعل انزيمى مع مادة التفاعل بالرسم التالى :



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

وعند v يكون نصف الانزيم الداخل فى التفاعل فى صورة معقد (ES) واما النصف الآخر فيكون حرًا أو بمعنى آخر فإن تركيز مادة التفاعل عند v يصل لما يعادل dissociation Canstant 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 .

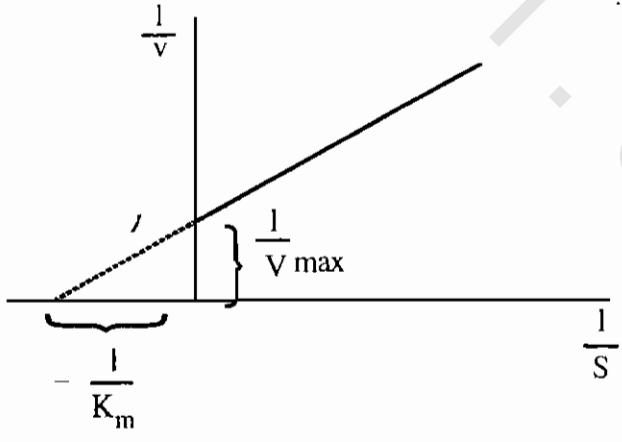
$$K_m = [S] \text{ at half maximal velocity}$$

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} mole/l.

ويمكن حساب K_m معمليا بسهولة . ففى الرسم السابق فإن السرعة القصوى Vmax يصل اليها 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 ، Vmax كما بالرسم التالى :



شكل (٢-٢) : تقدير Vmax ، Km (السرعة القصوى ، ثابت ميخائيل) من Lineweaver - Burk plot

اما معدل التفاعل الانزيمى reaction rate فيستخدم لتقدير وحدة الانزيم enzyme unit (U) والتى تعرف بالكمية التى تلامس تحويل 1 µ mole من مادة التفاعل / دقيقة تحت ظروف ثابتة من حرارة (المثلى ٣٠ م) ، pH ، تركيز كاف من مادة التفاعل لتشبع الانزيم (zero erder kenetic) كما أوصى بذلك الاتحاد الدولى 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 / جزئ الانزيم وعندما يحتوى الانزيم على مجموعة مرافقة prosthetic group فإن قوة التلامس catalytic power يمكن التعبير عنها بعدد الجزئيات المتحولة / دقيقة / عامل اللمس وتركيز الانزيم فى المحلول يقدر بالوحدات / مللى لتر (units / ml.) .

العوامل التى تؤثر على سرعة التفاعل الانزيمى :

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 - الاس الايدروچينى pH حيث لكل انزيم درجة pH مثلى يبلغ عندها سرعة التفاعل اقصى ما يمكن ولو زادت أو قلت عن ذلك تقل نشاط الازيم والسبب فى ذلك يرجع لاحتواء مراكز النشاط بالانزيم على مجاميع متأينه وأى تغير فى pH يؤدى إلى تغيير طبيعة تأين هذه المجاميع .

٥ - المنشطات الايونية مثل Fe^{3+} , K^{+} , Cl^{-} , Mg^{++} , Ca^{++} والتى تعمل كهمزة

obeikandl.com

وصل chelate بين الانزيم ومادة التفاعل أو كناقلة للالكترونات فى تفاعلات الاكسدة والاختزال مثل Fe^{3+} فى السيتوكروم وقد يكون تأثيرها ضار (مثبط) فى بعض الانزيمات الاخرى مثل Cl^- منشط لانزيمات التحلل المائى للبروتينات ومثبط لانزيم zymase الخاص بتحويل الجلوكوز إلى ايثانول وخليك . كما أن التركيزات العالية من هذه المنشطات الايونية لها فعل عكسى (مثبط) 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 تتلف مراكز النشاط على الانزيم بالاتحاد معها .

٣٠٢ تقسيم الانزيمات : Enzyme Classification

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

وفى حالة استخدام مرافق انزيمى لتلامس انتقال الالكترون من المعطى إلى المستقبل مثل البيوتين أو البيريدوكسين 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 ويدل العنصر الاول على القسم الذى يتبعه الانزيم حيث يوجد ستة اقسام رئيسية للانزيمات هى :

١ - انزيمات الاكسده والاختزال . oxidoreductases

٢ - انزيمات نقل المجاميع . traneferases

٣ - انزيمات التحلل المائى . Hydrolases

٤ - انزيمات النزع أو الاضافة . lyases

٥ - انزيمات التشابة . Isomerases

٦ - انزيمات التخليق Ligases (Synthetases) .

والعنصر الثانى يدل على subclass رقم وصفات المجموعة الداخلة فى التفاعل .

والعنصر الثالث يدل على subsubclass مع تفصيل أكثر تخصصا لنوع المعطى أو المجموعة الداخلة فى التفاعل .

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

وبهذا النظام يمكن ادخال اى انزيم جديد عند نهاية subsubclass الخاص به بدون الاخلال بأى أرقام اخرى وفى حالة الضرورة لانشاء أى Subsubclass , 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 :

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

٢ - الاسم التجارى Commercial name وهو قصير وكافى للاستعمال العام ولكن ليس محددا 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 داى فوسفور الدوليز فالتسمية التخليقية له

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

ورقمه الكودى EC 4.1.2.13 وهذا يعنى

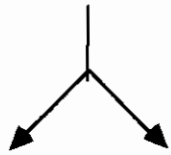
4 يتبع قسم انزيمات الازالة أو الاضافة lyase enzymes للمجاميع الاستبدالية من مادة تفاعلها (ليس بواسطة التحليل المائى) مكونا رابطة زوجية أو مضيفا لمجموعة للرابطة الزوجية .

4.1 الانزيم Carbon - Carbon lyae .

4.1.2 الانزيم aldehyde lyase مع رقم مسلسل 13 .

والتفاعل الخاص بهذا الانزيم هو :

Fructese 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 والتى 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 activitors وهى ذات طبيعة بسيطة مثل الايونات المعدنية .

وحيث انه لايوجد للأن تقسيم محدد للمرافقات الانزيمية فإنها تعامل بطريقة ابسط 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 بنائيين معا لتكوين نيوكليدات ثنائية وعلاقتها الوطيدة مع الفيتامينات هامة جدا حيث الفيتامينات ضرورية لبعض الوظائف الحيوية ولا يمكن استبدالها بمواد اخرى كما أن عدد كبير من الفيتامينات ذو وظيفة لمسية حيوية biocatlytic functions وللمعرفة الجيدة بالمرافقات الانزيمية لابد أن تتضمن الدراسة معلومات مفصلة عن التفاعل الذى يلامسه .

Coenzymes[a]

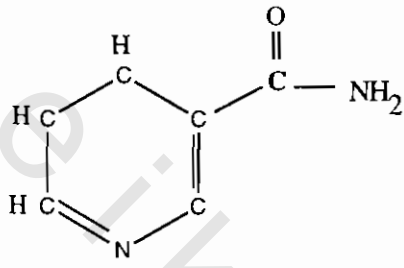
Coenzymes	Usual abbreviation	Group transferred	Corresponding vitamins
1. Hydrogen-transferring coenzyms			
Nicotinamide–adenine dinucleotide	NAD^+	Hydrogen	Nicotinamide
Nicotinamide–adenine dinucleotide phosphate	$NADP^+$	Hydrogen	Nicotinamide
Nicotinamide mononucleotide	—	Hydrogen	Nicotinamide
Flavin mononucleotide (riboflavin phosphate)	FMN	Hydrogen	Riboflavin
Flavin–adenine dinucleotide	FAD	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
Adenosyl methionine	—	Methyl	(Methionine)
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 التى تنقلها (عن karlson. 1970)

١٠٤٠٢ المرافقات الانزيمية الناقلة للايدروجين : Hydrogen transferring Coenzymes

(أ) نيوكليوتيدات النيكوتين اميد : Nicotinamide nucleotide coenzymes

تستعمل الانزيمات الناقلة للايدروجين فى تفاعلات التخمر والتنفس وغيرها المرافق الانزيمى داى 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

والمراجع الاقدم بها اسماء أخرى مثل Coenzyme I (Co I) ,Coenzyme II (CoII) , Cozymase , وايضا Co dehydrogenase I & II

وللخروج من هذا الخلاف المصطلحى لنيوكليوتيدات البيريدين فإن IUB وضع التوصيات التالية :

١ - تسمى باسماءها الكيمياوية :

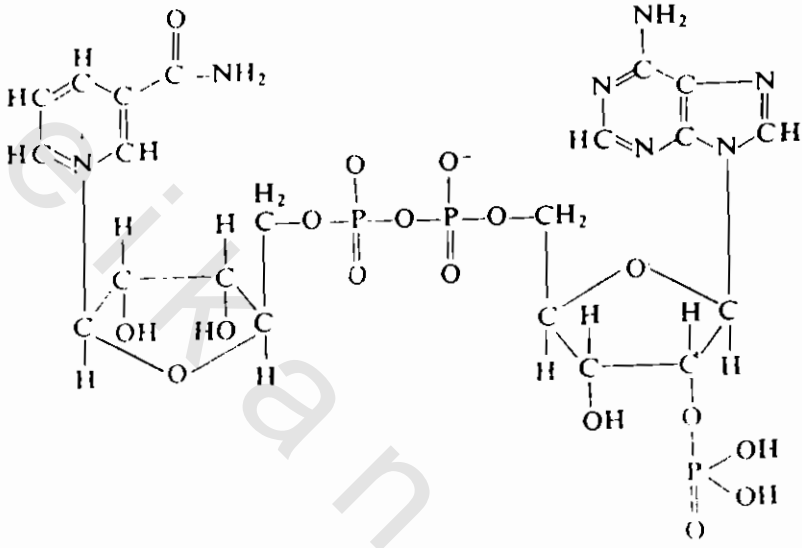
(NAD) nicotinamide - adinine dinucleotide

(NADP) nicotinamide - adinine dinucleotide phosphate

ولا تستعمل الاسماء الأخرى .

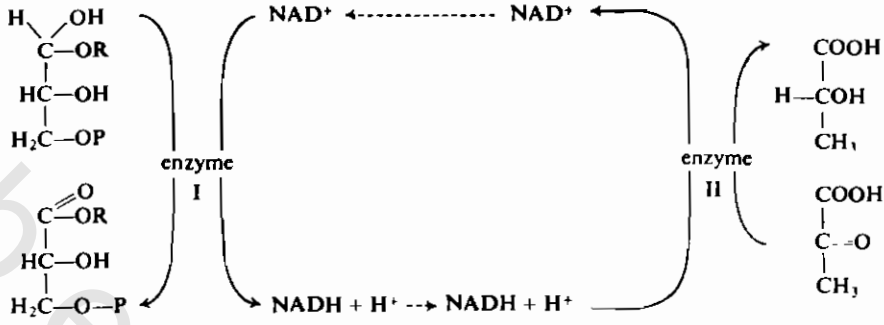
٢ - يسمح للصورة المختزلة من NAD (P) باستخدام احد البديلين reduced NAD (P) أو $NAD\ (P)\ H + H^+$ وعندئذ تسمى الصورة المؤكسدة $NAD\ (P)^+$ ولا يسمح بكتابة التفاعل على الصورة $NAD\ (p) \rightarrow NAD(p)H_2$.

وحلقة البيريدين تتصل برابطة جليكوزيدية بالسكر الخماسى الريبوز بينما يربط حمض البيروفوسفوريك بين جزئى 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 يكّون معقدًا 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 تكوين معقد مع انزيم ثان (E_{II}) $NADH. H^+$ وبهذا المعقد يمكنه اختزال مادة اخرى بينما يتأكسد هو إلى NAD^+ وينفصل مرة أخرى وبهذا فإن NAD^+ يكون حلقة وصل بين الانزيمين كما فى الرسم التالى .



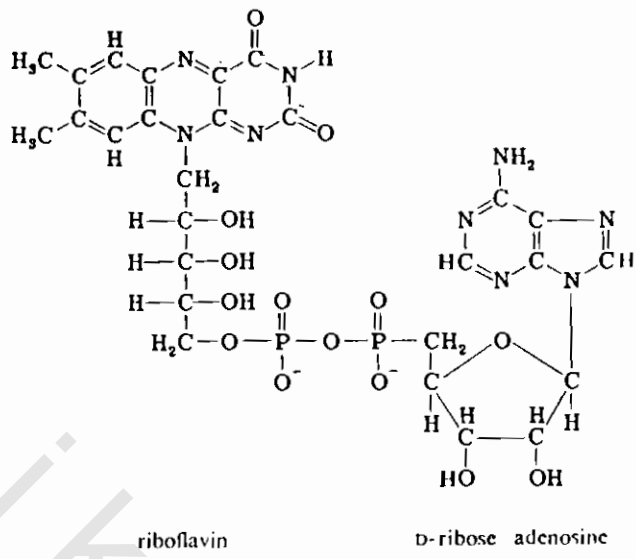
شكل (٢-٤) دور NAD^+ / NADH. H^+ فى التلامس الانزيمى

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 الانزيمى فى عمليات نزع الايدروجين dehydrogenation لمجاميع الكحولات الاولية والثانوية ويشارك اساسا فى معظم انزيمات dehydrogenases . ويلاحظ NAD (P) فى كل الخلايا والدورات مرتبطة دائما بـ 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 مماثله للمركب NAD وهذا المركب يعتبر حجر البناء فى فيتامين الريبوفلافين (فيتامين B_2) .



شكل (٢-٥) : التركيب البنائى للمركب Flavine - adenine dinuclotide

الفرق بين NAD و FAD

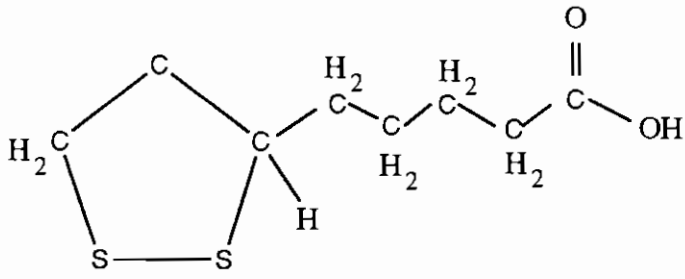
- احد مشتقات البريدين
- السلسلة الجانبية سكر خماسى حلقى D-Ribose .

- احد مشتقات isoalloxazine
- السلسلة الجانبية سكر خماسى بولى هيدروكسى من مشتقات Ribitol .

والفلافينات لها القدرة على التفاعل مباشرة مع جزئ الاكسجين (عملية اعادة الاكسدة) حيث يختزل الاكسجين إلى H_2O_2 . مثال ذلك lactate oxidase (EC 1.1.3.2) ، pyruvate oxidase (EC1.2.3.3) وتشير الدلائل انه عند اختزال الريبوفلافينات تأخذ الكترون واحد فقط وليس زوج من الالكترونات مثل NAD .

(جـ) حمض الليبوئيك : Lipoic acial :

أول من اطلق هذه التسمية هو Read وآخرون سنة ١٩٥٧ على حمض عضوى معزول من مستخلص كبد البقر وهو نشط جدا فى احلال الاستيات فى بكتريا حمض اللاكتيك acetate replacing factor وتركيبه الكيمياوى هو 1.2 - dithiolane 3- valeric acid



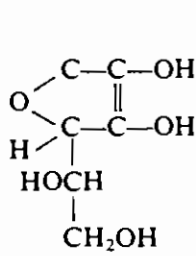
وتعتمد كفاءته البيولوچية على الرابطة ثنائية السلفيد disulfide الموجودة فى حلقة dithiolane ويمكن قياس حمض الليبوتيك ضوئيا بواسطة جهاز الاسبكتروفوتومتر عند 330 nm . وهو شائع الانتشار فى الكائنات الدقيقة والنباتات والحيوانات وهو يعمل كـ Prosthetic group فى المعقدات الانزيمية ذات الاغراض المتعددة (Ginsburg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

(د) الجلوتاثيون : Glutathione :

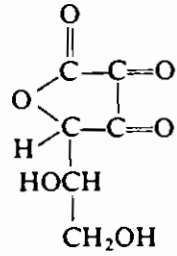
وهو ببتيد محتوى على الكبريت شائع الاستعمال والانتشار والمجموعة الفعالة فيه هى thiol وهى تؤكسد بجزئ الاكسچين عند الظروف المناسبة (فى وجود آثار من المواد المعدنية) وايضا بواسطة سيتوكروم C . ولاعادة اختزال صورت المؤكسدة إلى الشيول أما بعوامل مختزلة قوية او بواسطة انزيم glutathione reductase (EC 1.6. 4.0) فى وجود $NAD\ (P)^+$. وكا انزيم من انزيمات الاكسدة والاختزال فإنه يعمل كحامل بيولوچى للايدروچين وخاصة فى البكتريا الكيمواتوتروفيه .

(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 فإن 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 .



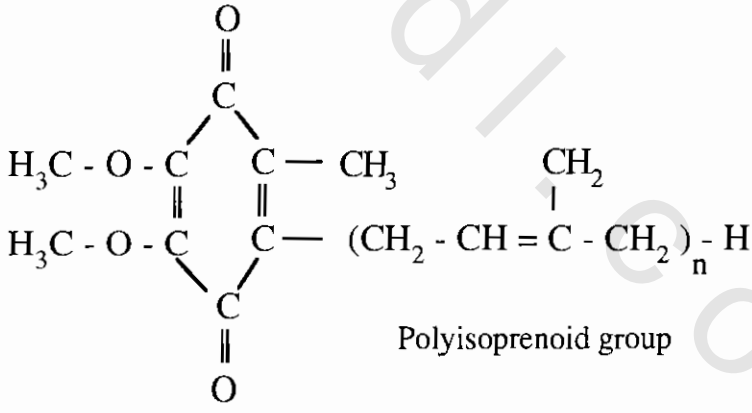
ascorbic acid



dehydroascorbic acid

(و) الكينونات : Quinones :

وهى شائعة الوجود فى الخلايا الحية وبعضها خاصة - methylaled quinones المرتبطة بسلسة جانبية من البولى ايزوبرينويد polyisopernoid - تلعب دورا هاما كحوامل وسطية للايدروجين فى السلسلة التنفسية .



Polyisoprenoid group

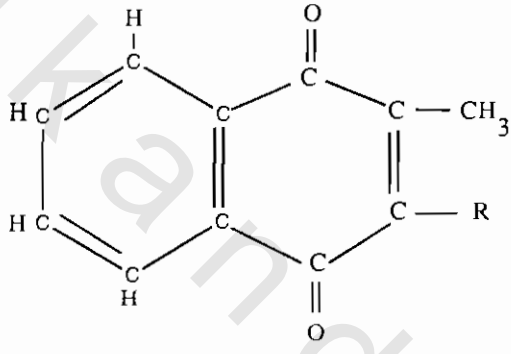
methylated quinone

التركيب البنائى لـ ubiquinones

ويوجد قسمان هامان فى الكينونات :

الأول : مجموعة ubiquinones (كما بالرسم السابق) وهى الاسبق اكتشافا بواسطة Morton, 1953 وكانت تعرف بـ Co Q , Q_{275} , SA إلا أن IUB أوصت باستخدام ubiquinone . والصورة المختزلة منه (ubiquinol) تتأكسد من خلال نظام السيتوكروم (سيتوكروم C ، سيتوكروم اوكسيديز) .

الثانى : مجموعة فيتامين K والمحتوية على K_1 Vit. , K_2 Vit. , menadione وتدخل فى عمليات انتقال الالكترون فى الفسفرة الضوئية فى البكتريا ويمكن للفرودوكسين Ferredoxin ان يحل محله فى هذا الدور .



شكل (٢-٦) التركيب البنائى لفيتامين K

وهذا الفيتامين هو المسئول عن تجلط الدم وقد عزل K_1 من البرسم ، K_2 من السمك .

٢٠٤٠٢ المرافقات الانزيمية الناقلة للالكترونات : Elactron transferring coenzymes

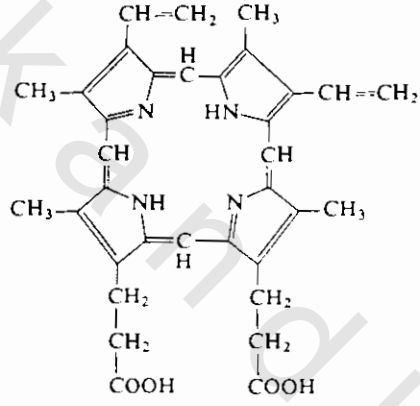
(I) السيتوكرومات : Cytochromes

يطلق مصطلح السيتوكرومات على كل البروتينات المحتوية على حديد Hemeproteins 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 السيتوكرومات لعزلها من مصادر مختلفة ولكن لها نفس الخواص ولقد قسمت إلى اربع مجاميع رئيسية من السيتوكرومات هى :

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

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



شكل (٢-٧) : التركيب البنائى لسيتوكروم b

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

٤ - سيتوكروم d : تشبه سيتوكروم a ولكن تقاس صورته المختزله عند ٦٠٠ - ٦٢٠ nm ولذ يسمى سيتوكروم a_2 وهى تتأكسد تلقائيا autoxidizable وترتبط مع CN , CO .

وتوجد بعض الاختلافات البسيطة بين السيتوكروم العادى والسيتوكروم البكتيرى فى المجاميع الاستبداليه ومنحنيات القياس كالتالى :

* السيتوكروم البكتيرى a : يمكن تقسيمه لتحت مجموعتين .

أ - سيتوكروم a : ويظهر α - bands عند ٦٠٠ - ٦٠٥ nm اما γ - band عند ٤٤٠ - ٤٤٥ nm ويطلق عليه سيتوكروم $a + a_3$ أو aa_3 حسب تأثيره بوجود CO , CN .

ب - سيتوكروم a_1 : ومنحنى امتصاصه α - band بين ٥٨٥ - ٥٩٥ nm بينما γ - band عند ٤٣٥ - ٤٤٥ nm .

* السيتوكروم البكتيرى b : ويتراوح منحنى امتصاصه α - band بين ٥٦٢ - ٥٦٥ nm (نوع b) ، بين ٥٥٧ - ٥٦٠ nm (نوع b_1) كما يوجد نوع (o) وله القدرة على الارتباط مع CO مثل سيتوكرومات a , a_3 , d وهو يظهر كمعقد O - CO وله ثلاث α, β, γ - Bands عند ٥٥٧ - ٥٦٧ ، ٥٣٢ - ٥٣٧ ، ٤١٥ - ٤٢٠ nm على الترتيب .

* السيتوكروم البكتيرى C : برغم انه لم يحصل عليه بصورة نقية بعد الا أن الدراسات المقارنة تدل على وجود ٦ أنواع منه وقد استخدم فى هذه الدراسات : منحنيات الامتصاص ، القدرة على تكوين معقدات مع بعض المواد مثل CO ، حجم الجزئ ، isoelectric pH ، جهد الاكسده والاختزال القياسى ، تسلسل الاحماض الأمنية فى السلاسل البينيه والانواع الستة كمايلى :

أ - سيتوكروم C_2 : المعزول من *Rhodospirillum rubrum* وهو ذائب فى الماء وذو وزن جزئى ١٢,٠٠٠ - ١٤,٠٠٠ وجهد الاكسدة والاختزال اكبر من 0.28V + ، ويحتوى على هيم واحد ذو α - reduced band عند ٥٥٠ - ٥٥٢ 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 الجزئ حوالى ١٣,٠٠٠ وهو يشارك فى عمليات اختزال السلفيت والسلفات وانطلاق غاز الايدروچين بواسطة hydroginase ويدخل فى phosphoroclastic reactions .

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

obeikandi.com

جـ - سيتوكـــروم C_5 , C_4 : وقد عـــزلا مــن *Azotobacter vinelandii* وهما يظهر α - band مختـزل عـنـد ٥٥١ ، ٥٥٤ nm على الـترتيب وزنهـما الجزئ متـشابه ١٢,٠٠٠ وجـهد اكسـدة واختزال لكليـهما 0.3V + , 0.32V عـلـى الترتيب .

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

وجه المقارنة	mono heme cyt. C´	diheme cyt. CC´
الوزن الجزئ	١٣,٠٠٠ - ٢٩,٠٠٠	٢٧,٠٠٠ - ٣٠,٠٠٠
Eh	0 - 0.1	0 - 0.1
ɣ - bands	420 - 435 nm	390 - 400 nm
مكان وجودة	*Rhodospirillum palustris* *Rhodosp. molischianum*	*Rhodospirillum rubrum* *Ps. denitirificans*

(II) الفيرودوكسين Ferredoxin

- تـــم اكتشاف حامـــل الكترونـات جديد خـــلال العقديـــــن الاخيـريـــن يعـمل علـــــى hydrogen side لكل من NAD^+ , $NADP^+$ المؤكـد بعـكس السيتوكروم الـذى يعـمل كمستقبل للالكترونـــات لـ $NADH . H^+$, $NADP H.H^+$ المختزل . وعند نقل الفيرودكســين للالكترون إلــى $NAD (P)^+$ فإن جهد الاكـسدة والاختزال يصـل إلـــى 0.40V - (عـنـد 7 pH) والــذى يقــع بـين جزئ الايدروجين ونظام $NAD^+ / NADH.H^+$.

- ومعـطى الالكـترون اما غاز الايـدروجين أو تفـاعل قوى فـوتوكيمـياوى الذى يـحرر الالكترونات مع تكوين قوة اختزالية مساوية على الاقل لجزئ الايدروجين .

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

obeikandi.com

- تلعب دورا رئيسيا فى عملية التمثيل الضوئى والتخمر وتثبيت النتروجين هوائيا وهو يعمل اساسا كحامل للالكترون ولكن تركيبة الكيمياوي يختلف حسب التفاعل .
- وللآن هناك ٤ أنواع من الفيرودكسين هم :

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

٢ - Ferredoxin a_I وهو معزول من *chromatium sp.* ويلاحظ فى كل بكتريا الكبريت الارجوانية الممثلة للضوء ووزن الجزئ ١٠,٠٠٠ وهو اكثر سالبيه للالكترون (0.49V -) عند pH المتعادل ومنحنى قياسه مثل السابق ولكن يحتوى على ٧ إلى ٨ مجاميع حديد وسلفيد للجزئ .

٣ - Ferredoxin b وقد اكتشف باسبانيا ووزنه الجزئ 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 الجزئ ٢٠,٠٠٠ ولذا فهو اكثرهم وزنا حتى الآن . ويقاس عند ٤٠٠ n m ويحتوى ٦ مجاميع حديد وسلفيد.

ويرى كثير من الباحثين ان الفيرودكسين يتوسط فى نقل الكترون واحد فقط ولهذا يقوم الفيرودوكسين البكتيرى بعمليتين نقل للجزئ بينما فى النبات يقوم بعملية نقل واحدة .

Rubredoxin

بعكس الفيرودوكسين فإن روبردوكسين يحتوى فقط على ذره حديد واحدة للجزئ ولا يحتوى سلفيد غير عضوى ويعمل كحامل الكترون (وحيد) فى تفاعل الاكسدة والاختزال وله جهد اكسدة واختزال اقوى كثيرا من الفيرودوكسين البكتيرى (0.57V -) ويلاحظ منحنى قياسه عند ٤٩٠ ، ٣٨٠ ، ٢٨٠ n m ووزنه الجزئ ٦٠٠٠ ويدخل فى كثير من التفاعلات البيولوجية التى يشارك فيها الفيرودوكسين .

(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 حوالى 0.37V - وهو يقارب فرق جهد الفيرودوكسين ولذا يمكنه ان يحل محله . وقد عزل من , *Azotobacter vinelandii* , *Disulfovibrio gigas* وأيضا *Clostridium pasterianum* .

Diaphorases

وهى فلافويربروتينات قادرة على ملامسه اكسدة نيوكليدات البريدين المختزلة بواسطة مواد عضوية مثل ازرق الميثلين او الاندوفينول ومركبات غير عضوية مثل فيروسيانيد ولكن لا يستطيع التفاعل مباشرة مع جزئ الاكسجين ومعظم هذه الانزيمات يحتوى FMN , FAD , كـ prosthetic group ووزنها الجزئ 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 بنقلها من عملية لاخرى وتخزينها .
- والحامل البيولوچى للفوسفات هو ادينوسين ثلاثى وثنائى الفوسفات ADP , ATP 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),

التفاعل كحوامل cytidine diphosphate (CDP), uridine diphosphate (UDP) 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 الادنيوسيل وانطلاق الارثو 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 لابد من تحليله مائيا اولا إلى الارثوفوسفات فى وجود انزيم pyrophosphatase (EC 3.6 .1.1) مع انتاج طاقة حرة ضخمة .
- ويعتقد أن ATP هو الاساس فى انتقال الطاقة المرتبطة بينما كل النيوكليوسيدات تراى 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 داى فوسفات الاخرى وذلك بواسطة انزيمات nucleoside diphosphate kinases (EC 2.7 4.6) كمايلى :

$$ATP + GDP \rightleftharpoons ADP + GTP$$

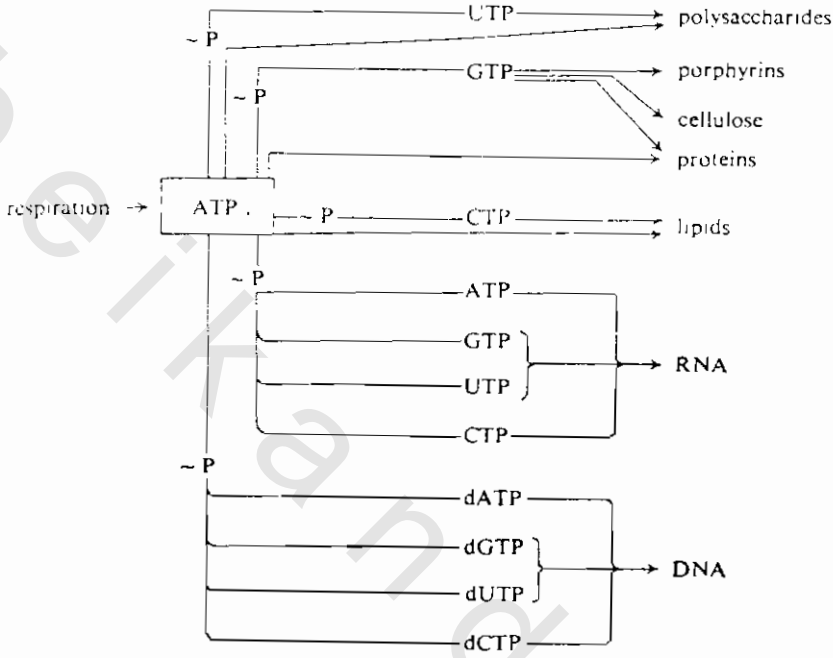
$$ATP + UDP \rightleftharpoons ADP + UTP$$

$$ATP + CDP \rightleftharpoons ADP + CTP$$

$$ATP + dADP \rightleftharpoons ADP + d\,ATP$$

حيث d ADP هو دى آوكسى ادينين داى فوسفات .

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



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

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

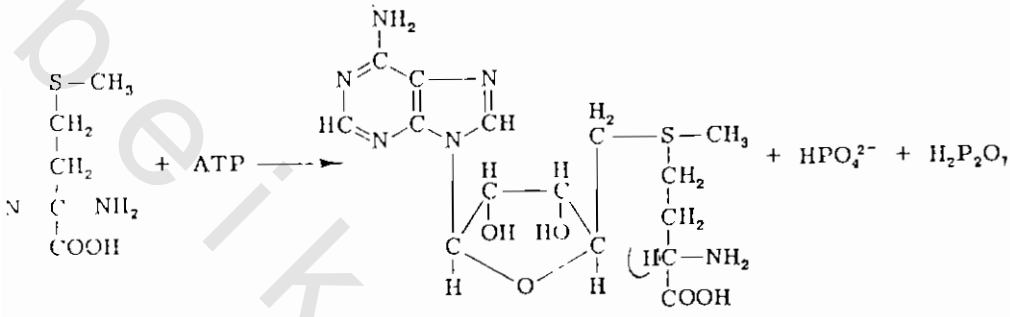
تماما مثلمـا تستطيع ATP حمل ونقـل مجاميع الفوسفـات فإنه يوجد مرافقـات انزيمية تستطيع نقل مجموعة كربونية ذات ذرة كربون واحدة مثل :

- مجموعة الميثايل ($-CH_3$) من الميثانول CH_3OH .
- مجموعة هيدروكسى ميثيل (CH_2OH) من السيرين $HOH_2C - NH_2 - COOH$.
- مجموعة الفورميل (CHO) من حمض الفورميك (H. COOH) .
- مجموعة الكربوكسيل (COOH) من حمض الكربونيك (HO - COOH) .

ومن أشهر هذه المرافقات الانزيمية الناقلة :

★ adenosyl methionine او الميثونين المنشط :

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



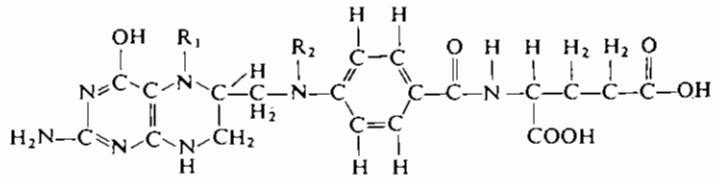
شكل (٢ - ٩) : ميكانيكية عمل المرافق الانزيمى الميثيونين

★ Tetrahydrofolic acid (THFA) :

فهو المرافق الانزيمى المسئول عن نقل مجاميع هيدروكسى الميثيل ، فورميل ، formimino . والناقل النشط ليس حمض الفوليك كما اعتُقد 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 داى 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 للتى تنفصل عنه .

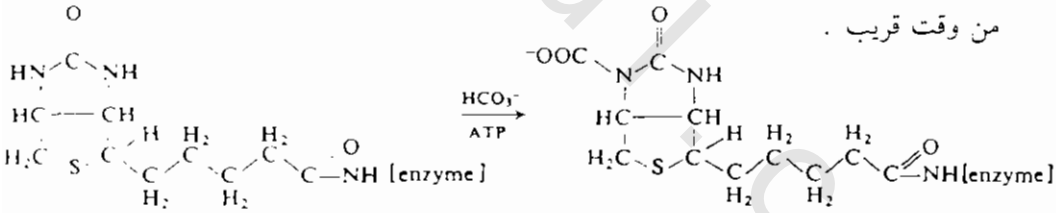


$R_1 = -\overset{O}{\overset{\|\|}{C}}-H$	$R_2 = -H$	:5-formyl-THFA
$R_1 = -H$	$R_2 = -H$	:THFA
$R_1 = -H$	$R_2 = -\overset{O}{\overset{\|\|}{C}}-H$	:10-formyl-THFA
$R_1 + R_2 =$	$>N = CH-N<$	:5,10-methenyl-THFA
$R_1 + R_2 =$	$>N-CH_2-N<$	:5,10-methylene-THFA
$R_1 = -CH_2OH$	$R_2 = -H$	:5-hydroxymethyl-THFA
$R_1 = -CH = NH$	$R_2 = -H$	:5-formimino-THFA

شكل (٢ - ١٠) : مركب حمض تتراهيدرفوليك ومشتقاته

★ البيوتين Biotin :

وهو فيتامين معروف وهو مشتق حلقى 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 فى تفاعلات تثبيت ك أ٢

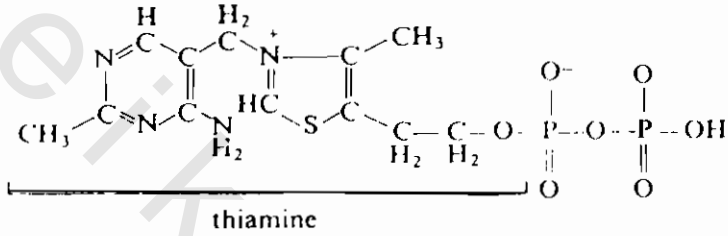
ويرتبط البيوتين مع بروتين الانزيم بواسطة رابطة ببتيديه مع مجموعة الامين فى Lysyl . وعملية تحميل البيوتين بـ ك أ٢ تحتاج لطاقة أى ATP ويرتبط ك أ٢ مع ذرة النتروجين للبيوتين ويعتبر عندئذ فى صوره منشطة التى تشارك فى العديد من تفاعلات Carboxylation مثل تكوين malonyl - CoA من acetyl - CoA .

obeikandl.com

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

★ بيروفوسفات الثيمين Thiamine Pyrophosphate (TPP) :

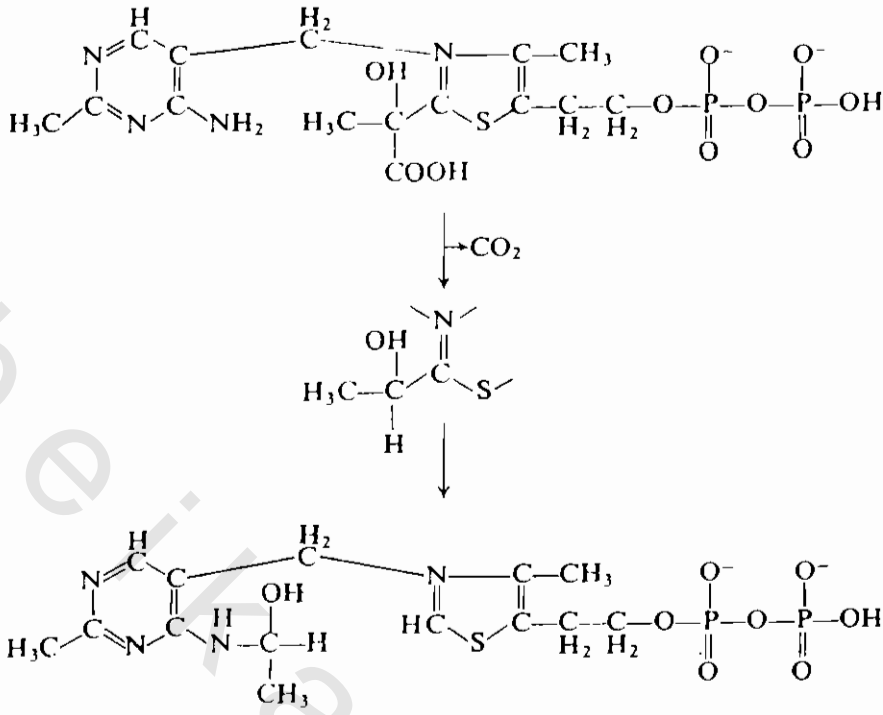
وهـــو المرافق الانـــزيمى الذى ينقل الاسـيتالدهيـد والجليكولدهـيد ويعـــرف ايضا (DPT) diphosphothiamine , Co - carboxylase , vitamin B_1 ويرجع الاسم إلى محتـواه من الكبريت حـيث يحتوى التـكوين البنـائى له على حلـقتين : واحدة بيريمـيدين والاخرى ثيازول thiazol ولذا يحمل شحنة موجبة دائما .



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

ويعمل كـ prosthetic group لانه يرتبط ببروتين الانزيم فـى كل التفاعلات المحتوية على احماض الفاكيتونية مثل البـيروفات حيث ترتبط ذرة الكربون الثانية C_2 لحلقة الثيازول مع مجموعـة الفاكيتو فى صورته الـقطبية polarized وبالتالـى يلامس نزاع ك أ٢ ويتكون الاستيالدهيد فى صورة منشطة على ذرة C_2 لحلقة 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 فوسـفات ونواتجه النهائية تتوقف علـى أى انزيم سـيشارك فى التفاعل التالـى . ومن أهم التفاعلات التى يـشارك فيها TPP هـــى نزع ك أ٢ بالاكسدة oxidative decarboxylation للأحماض الالفاكيـتونية حيث ينقل الاسـيتالدهيد المتـبقى إلى حمض الليـبوثيك الذى يعمـل كعامل مؤكسد وفـى تفاعل transketolase يعمل TPP كمرافق انزيمى فى نقل الجليكولدهيد .

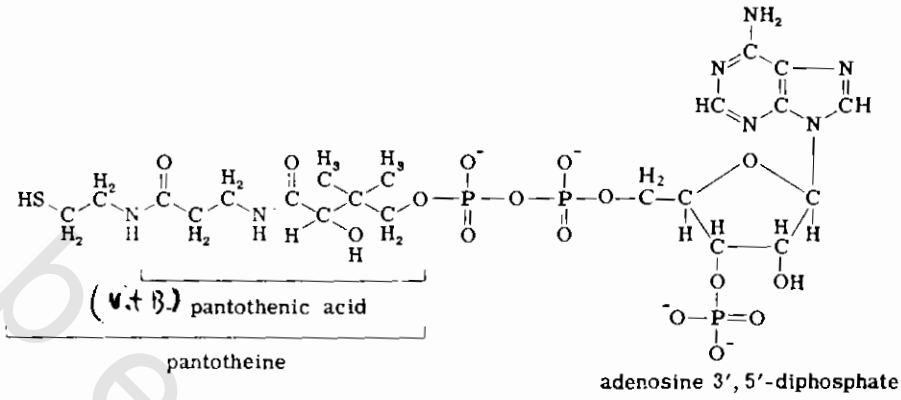


شكل (٢ - ١٣) : كيفية انطلاقه ك أ٢ وانتقال الاسيتالدهيد بملامسة TPP

:(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 لهـا قدرة عالية علـى نقل مجموعة الاسيتيل المنشط ويعرف باسم Acetyl - CoA . وقد اكتشف مؤخرا ان acyl - CoA يمكن ان يتفاعل اكثر من ٦٠ انزيم على مركباته . والتحلل المائى لـ acyl - CoA ينتج طاقة حوالى 8000 cal / mole .



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

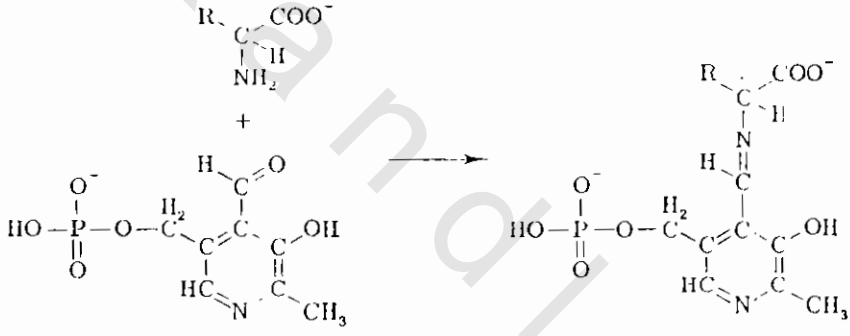
وهـو يعتبر أكثر تعقيدا من السيتوكروم أو NAD . ومركب pantotheine هو عامل نمو لـلعديـد من الكائـنات الدقيـقة ويتكـون من pantoic acid ، β - alanine ، mercaptoethylamine . والمركـب الناتـج مـن اتحاد β - alanine , pantoic acid يعرف pantothenic acid (المعروف بفتامين B) .

- وكمـا ذكرنـا فـإن acetyl - CoA أهم مركبات CoA حيث ترتبط مجموعة الاستيل CH_3 - CO- مع مجموعة SH - الحرة مكونة ثيواستر ولرابط الاستيات أو أى حمض كربـوكسيلى آخر مع هـذا المركب فإن يحتاج لـطاقة وهى غالبا تـشتق من تفاعلات منتجة للطاقة مثل oxidative decerboxylation أو من انشقاق ATP .
- مركـب CoA مادة غير ملونة يمـكن قراءتها عند 257 nm بواسطة الاسبكتروفوتومتر بسبب احتوائها على adenine . ويقع كل acid - thiol - ligases فى تحت المجموعة الانزيمية (ES 6.2.1) حيث تلامـس تكوين CoA thiolesters من الاحمـاض الحرة مستخدما الطاقة من ATP ، GTP بينما كل acyl transferases (EC 2.3.1) تنقل مجموعة الاسـيل إلى أو من CoA . ويدخل ايضا اسـتيل كوانزيم A فى التفاعلات التى يلامسها انزيمات lyases . وتضاف مجموعة الاسيتـيل إلى أى جزئ مستقبل ذو رابطة زوجية سواء بواسـطة أو بدون التحلل المائى لرابطة الثـيواستر وهو اساس البدء لدوره حمض الـستريك (TCA) ، هدم الاحـماض الدهنـية بالاكسـدة وللعديـد من العمليات التخليقية الاخرى .

(IV) المرافقات الانزيمية الناقلة لمجاميع اخرى :

★ بيريدوكسال الفوسفات pyridoxal phosphate (PALP) :

وهو المرافق الانزيمى لتحولات الاحماض الامينية مثل نقل مجموعة الامينو transami-nation . وهذا المرافق يعتبر مثال ممتاز للمرافقات الانزيمية المفردة القادره على ملامسه التفاعلات المختلفة 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 نوانج 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 B_{12} (Cobalamine):

وهو مرافق انزيمى فى مجال isomerization ويعمل كناقل لمجاميع الميثيل

٢-٥ القوى المحركة للنمو البكتيرى : Bacterial Growth kinetics

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

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

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

فإذا كان عدد الخلايا فى اللقاح هو N_o فإن عدد الخلايا N بعد عدد من الانقسامات هو :

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

$$\therefore \quad \log N = \log N_o + n \log 2 \quad \ldots\ldots \quad (2)$$

وبالتالى يمكن حساب عدد الاجيال أو انقسامات الخلية بين N , N_o

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

$$\because \quad \log 2 = 0.301$$

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

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

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

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

تركيز الاكسجين فى حالة الميكروبات الهوائية مثلا ولهذا فعملية النمو تؤدى إلى وسط نهائى قد لا يناسب مزيد من النمو وعندئـذ تدخل المزرعة فى مرحلة الثبات stationary state أى أن تعاقب التغيرات بسبب دورة النمو الميكروبى وما يحدث فيها من تداخلات وتفاعلات مع البيئة يؤدى لعدم وجود ظروف مثالية فى معظم الاحوال .

وحيث ان الـظروف المثاليـة ليست موجـودة عادة فى "batch culture" فإنه يستعمل اصطلاح g أى « زمن الجيل أو زمن التضاعف » بدلا من عدد الأجيال (n) .

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

ومن معادلة (5) .

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

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

وليس سهلا قياس زمن التضاعف فى المزرعة الميكروبية نظرا لصعوبة تقدير عدد الخلايا عند N_o , 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)

$$\therefore N = No \times 2^{t/g}$$

وبالتعويض عن عدد الخلايا بكتلة الميكروبات (X) فإن

$$X = X_o \cdot 2^{t/g}$$

وبتحويلها إلى الصورة اللوغاريتيمة

$$\ln x = \ln x_o + \frac{t}{g} \ln 2 \qquad (9)$$

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

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

obeikandl.com

وبالرجوع إلى معادلة (9) فإن

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

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

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

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

ومن معادلة (10) , (11) .

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

حيث تمثل μ معدل النمو المتخصص specific growth rate .

ولشرح الفرق بين specific growth rate , growth rate .

يمكن تحديد الآتى :

١ - المعدل الحقيقى 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 .

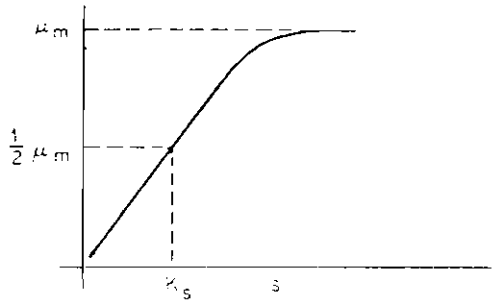
وباحلال $\frac{\ln 2}{g}$ فى معادلة (9) بقيمة μ تصبح

$$\ln x = \ln x_o + \mu t \qquad (13)$$

وبرسم t على المحور الافقى ، lnx على المحور الرأسى فإننا نحصل على خط مستقيم ذو انحدار يعتمد على معدل النمو وتدرج هذا الخط هو μ الذى يقاس بالعلاقة

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

obeikandl.com



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

أو يمكن حساب μ مباشرة بالمعادلة (13) حيث

$$\mu = \frac{\ln x - \ln x_o}{t} \qquad (14)$$

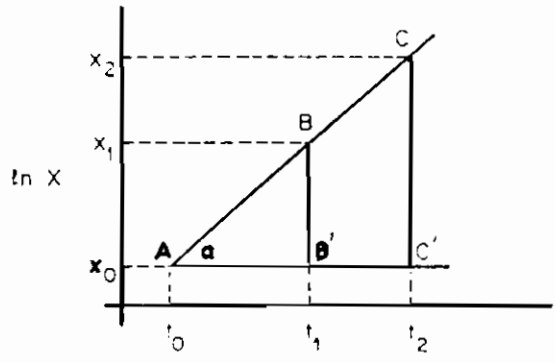
وبالرجوع إلى معادلة (12) حيث $g = \frac{\ln 2}{\mu}$

وبالتعويض من معادلة (14) السابقة يمكن حساب زمن الجيل

$$\therefore \quad g = \frac{t \ln 2}{\ln x - \ln x_o}$$

$$= \frac{0.69\ t}{\ln x - \ln x_o} \qquad (15)$$

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 للبكتريا (μ) وتركيز مادة التفاعل (S) ومنه يمكن تحديد ثابت تشبع مادة التفاعل (K_s)

وقد وضع Monod, 1942 هذه العلاقة فى صورة رياضية

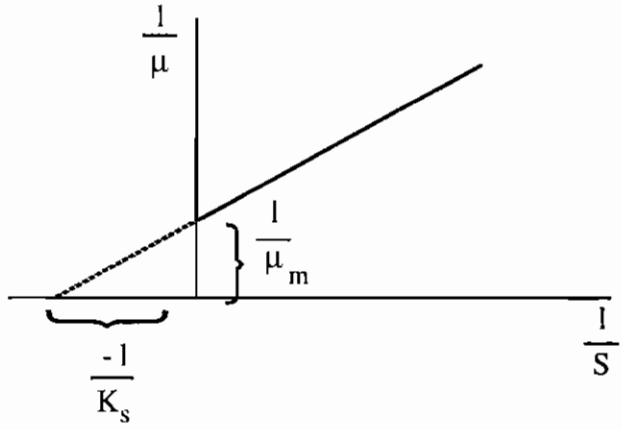
$$\mu = \mu_m \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \qquad (16)$$

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

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

وحيث انه فى batch cultuves كل المواد الغذائية موجودة ابتداءاً وفى تركيزات كافية حتى لا تكون عاملا محدداً لمعدل النمو المتخصص (μ) لذا فإن μ يكون مساويا μ_m اثناء مرحلة النمو اللوغاريتمى 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 الانزيمى فى الاعتبار . وهذا التشابه يظهر ان كلا المعادلتين يتحكم فيهما قيمة التشبع لاحد مكونات النظام ولذا يمكن استخدام طريقة Lineweaver and Burk لتقدير قيمة K_s ، μ_m .



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

ويمكن استعمال المعادلة التالية لتقديرها

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

ويرسم $\frac{1}{\mu}$ على المحور الرأسى ، $\frac{1}{S}$ على المحور الافقى فتحصل على خط مستقيم يحدد $\frac{1}{\mu_m}$ ، $\frac{1}{K_s}$. 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 factar 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 Cultune :

تبدأ كل المزارع المستمرة مثل المزارع ذات الدفعة الواحدة حيث تحضن البيئة الموجودة فى روارق التنمية مع الكائن المطلوب تنميته فإذا اضيف مزيد من البيئة اثناء طور النمو اللوغاريتمى للمزرعة بمعدل كافى ليحتفظ بكثافة ميكروبات المزرعة ثابتة ، فإن النمو الميكروبى 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 ($\Delta F = constant$) .

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 معاله 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 التجريبى 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 والتى 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 $S_x = o$ فإن مادة التفاعل لا تستخدم ولا يحدث نمو للكائن اما إذا زادت الكتلة الحيوية biomass فلابد ان تكون S_x موجبه 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 فلابد 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 اقترب من حدة الاقصى μ_m .

ومن معادلة (14) فإن

$$x = x_o \, e^{ut} \qquad (18)$$

وبأخذ الزمن فى الاعتبار

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \qquad (19)$$

(التغير فى الكتلة مع الزمن)

وإذا عوض عن μx بواسطة انسياب الكتلة الحيوية مع البيئة $D x$ فإن التغير الحقيقى فى تركيز الكتلة الحيوية مع الوقت يمكن تقديره بالعلاقة

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

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

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

أى عندما يكون $\mu > D$ فإن $\frac{dx}{dt}$ يكون موجبا وتركيز الكائن فى المزرعة سيزداد مع الوقت اما إذا كان العكس $\mu < D$ فإن $\frac{dx}{dt}$ ستكون سالبة القيمة وسيقل تركيز الخلايا مع الوقت ولن تستهلك مادة التفاعل .

اما إذا كان $\mu = D$ فإن $\frac{dx}{dt}$ = صفر وسيظل تركيز الخلايا فى المزرعة ثابتا مع الوقت وهذه مرحلة المزرعة المنتظمة الثبات steady state culture ومن معادلتى (12) , (16) فإن

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

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 (Dc) والتى 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

obeikandl.com

تأثير معـدل التخفيف على تـركيز مادة التفاعل المحـددة للنمو (S) والكتلـة الحيوية (x) فى المزرعة .

فالمادة الداخلة فى دورق النـمو عند تركيز S_o تستهلك بالـكائن وتخرج مع outflow عند تركيز S ولهذا فإن التغير الصافى فى تركيز مادة التفاعل .

Change of substrate = input - outflow - consumption.

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

بإحلال μ من معادلة (16)

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

وباحلال μ فى 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 كميا سلوك المزرعة فى Chemostat .

٢) تظهر ان المزرعة المستـمرة (بصرف النظر عن مرحلة بدء نموها) لابـد أن تكون منتظمه الثبات دائما .

٣) تعبر عن قدرة التنظيم الذاتية للنظام المستمر .

ونظرا لان المعادلتين 22 , 23 تكون قيمتها صفرا عند مرحلة الثبات $\left(\frac{dx}{dt} = o \right)$ فإن قيم X , S يمكن حسابهما فى ظروف هذه المرحلة .

obeikandl.com

* حساب الكتلة الحيوية (x) من معادلة 22

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

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

$$\therefore \quad x = y\,(S_o - S) \qquad (24)$$

** حساب تركيز مادة التفاعل S من معادلة 23 .

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

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

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

$$X = y \left[S_o - K_s \left(\frac{D}{\mu_m + D}\right) \right] \qquad (26)$$

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_o , 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 الثانى

١ - ما هو الانزيم وما هى وظيفته ؟

٢ - ما هو Michaelis - Menten Constant (K_m) وكيف يمكن حسابه ؟

٣ - ماهى أهمية lineweaver - Burk plot ؟

٤ - ما هو الفرق بين prosthetic group & Coenzyme ؟

٥ - اشرح الفرق بين NAD^+ , FAD^+ ، الكينونات .

٦ - ماهى مجاميع السيتوكروم الاربع وكيف يمكن التفريق بينهم ؟

٧ - ما هو الفرق بين السيتوكروم والفيرودوكسين والفلافودوكسين ؟

٨ - نافش الدور الذى يلعبه كل من TPP , THFA .

٩ - يعتبر ATP , acetyl - CoA من أهم المركبات الغنية بالطاقة . ناقش ذلك .

١٠- اذكر المعادلة الرياضية لتقدير معدل النمو المتخصص ، زمن الجيل ، معدل التضاعف ، عدد الاجيال فى المزارع ذات الدفعة الواحدة .

١١- ناقش العلاقة بين kinetics للنظام الانزيمى والنمو البكتيرى .

١٢- ما المقصود بالسعة التنظيمية الذاتية فى المزارع المستمرة ؟

obeikandl.com

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. Málek, 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.

obeikandl.com