دراسة كيميائية حياتية لانزيم البايروفوسفاتيز اللاعضوي Inorganic Pyrophosphatase المعزول من جرثومة القولون *Escherichia coli*

محمد حسين ميكائيل

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

(تاريخ الاستلام: ١٨ / ٢ /٢٠٠٨ ، تاريخ القبول: ٢٦ / ٥ / ٢٠٠٨)

الملخص

تضمن البحث دراسة فعالية وبعض الصفات الحركية لانزيم البايروفوسفاتيز اللاعضوي inorganic pyrophosphatase (EC 3.6.1.1) المستخلص من جرثومة القولون *Escherichia coli* ، اظهرت النتائج فعالية عالية لهذا الانزيم في هذا النوع من الجراثيم ، وكانت اعلى فعالية نوعية تم الحصول عليها هي (٤٦٦) نانومول / دقيقة/ ملغم بروتين في رائق supernatant خلايا جرثومة القولون. كانت الفعالية النوعية اقل في المستخلص الخام crude extract لخلايا جرثومة القولون ، اذ بلغت (٤٢٠) نانومول/دقيقة/ملغم بروتين، في حين اظهر الراسب precipitant المرسب بطريقة الموجات فوق الصوتية والطرد المركزي اقل فعالية نوعية للانزيم اذ بلغت (٩٨) نانومول /دقيقة/ملغم بروتين . وجرى تحديد الظروف المثلى لفعالية الانزيم عند (٧,٠= pH) وكانت اعلى فعالية نوعية للانزيم عند الظروف (٣٠٠) مايكروغرام من بروتين رائق الخلايا كمصدر للانزيم و (٢,٠) ملي مول من المادة الاساس بايروفوسفات الصوديوم Na_4ppi وفترة حضن لمدة (١٠) دقائق عند الدرجة الحرارية (٣٧)°م ، وبلغت قيمة ثابت ميكيلس – منتن (Km) Michaelis-Menten مقاربة الى (0.42) ملي مول .

الكلمات الدالة : ***Escherichia coli*, inorganic pyrophosphatase,**

المقدمة :

تمثل الانزيمات بشكل عام مركزا محوريا هاما في تنظيم سرعة العمليات الفسلجية في الكائن الحي وبنظام دقيق ، لذا فان دراسة العوامل المؤثرة على سرعة التفاعلات المحفزة انزيمياً تعد ذات اهمية كبيرة في تفسير ومعرفة كيفية حدوث العمليات الفسلجية داخل خلايا الكائن الحي [١] .

اكتشف انزيم البايروفوسفاتيز اللاعضوي norganic yrophosphatase (EC 3.6.1.1) (البايروفوسيفت فوسفوهايدروليز Pyrophosphate phosphohydrolase) اولا في الخميرة [٢] ويعد هذا الانزيم من الانزيمات المهمة في التفاعلات الحيوية البنائية المتعلقة بايض الفسفور، اذ يلعب دوراً مهما في تحويل البايروفوسفات الى الاروثوفوسفات وان مستقبل مجموعة الفوسفات هو مجموعة الكاربوكسيل لمذيل residue الحامض الاميني الثنائي الكاربوكسيل، اذ بارتباط الفوسفات مع الانزيم يتكون اسيل فوسفات [٣]. كما يتطلب هذا التفاعل ايونات موجبة ثنائية التكافؤ مثل المغنيسيوم او المنغنيز او الكوبلت او الخارصين[٤]. واظهرت الدراسات السابقة وجود اختلافات في فعالية الانزيم اعتمادا على نوع الايون الموجب ثنائي التكافؤ، وتركيزه، والاس الهيدروجيني، فضلا عن تركيز البايروفوسفات [٢]. وجد ان انزيم البايروفوسفاتيز اللاعضوي المعزول من *E.Coli* يتكون من ست وحدات ثانوية يبلغ الوزن الجزيئي لكل منها (٢٠٠٠٠) دالتون [٥] وان هذا الانزيم مستقر بشكل كبير تجاه الحرارة ، اذ يتحمل درجة حرارة (٨٠)°م لمدة عشرة دقائق [٦] فضلا عن ذلك فقد درس الانزيم في كائنات عديدة مثل خميرة الخبز [٧] وجرثومة *Streptococcus salivarius* [٨، ٩]، وادمغة الجرذ [١٠] كما حددت الفعالية النوعية للانزيم في تسع سلالات من جرثومة السالمونيلا *Salmonella* المعزولة من الاغذية الملوثة [١١].

ان الفعالية النوعية لاي انزيم لا يمكن الاعتماد عليها في الظروف التمهيدية ، بل يعتمد على الفعالية النوعية في الظروف المثلى بغية ايجاد قيم حقيقة تعبر عن نشاط الانزيم[١٢]، لذا تعد الدراسة الحالية دراسة اولية لبعض صفات الانزيم والظروف المثلى لفعاليته في جرثومة القولون *Escherichia coli* عند الاس الهيدروجيني (pH = ٧,٠) .

المواد وطرائق العمل :

تم عزل جرثومة القولون *Escherichia coli* من الاصابات الجلدية للانسان ولتحضير مستخلص الجرثومة تم زرعها بعد تنقيتها على وسط الاكار المغذي المائل nutrient agar slant ثم لقحت انابيب من وسط المرق المغذي بهذه الجرثومة وحضنت في درجة حرارة (٣٧)°م لمدة (١٦–١٨) ساعة. رسبت الخلايا بعدها بجهاز الطرد المركزي المبرد الفوقي ultracentrifuge بدرجة (٤)°م وبسرعة ١٠٠٠٠ xg ولمدة (١٥) دقيقة . ثم غسلت الخلايا مرتين وذلك بتعليقها في (٢) سم^3 من المحلول المنظم (Tris-HCl buffer, 10 mmol , pH 7.0) واعيد ترسيبها بجهاز الطرد المركزي المبرد الفوقي تحت نفس الظروف السابقة ، واعيد تعليقها في (٢) سم^3 من المحلول المنظم (Tris-HCl buffer , 10 mmol , pH 7.0) الحاوي على (5 mmol) مركابتو ايثانول –2 mercaptoethanol، ثم سحقت الخلايا باستخدام جهاز الترددات الفوق الصوتية ultrasonic ، ثم رسب المستخلص بجهاز الطرد المركزي المبرد الفوقي بدرجة حرارة (٤)°م وبسرعة ٢٠٠٠٠ xg لمدة (١٥) دقيقة .

قيست فعالية الانزيم في المستخلص الخام crude extract والرائق supernatant والراسب precipitant حسب طريقة Chen *et al.* [١٣] التي تعتمد على قياس كمية الفوسفيت اللاعضوي المتحرر باستخدام الكاشف المكون من حامض البيركلوريك perchloric acid ومولبيدات الامونيوم ammonium molbidate وحامض الاسكوربك ascorbic acid كعامل مختزل. حددت كمية الفوسفات اعتمادا على منحنى قياسي للفوسفات اللاعضوي وقيست شدة اللون عند الطول الموجي (٧٠٠) نانوميتر ، كما حددت كمية البروتين باستخدام طريقة Lowry *et al.* [١٤] واستخدم الرائق لاختبارات تحديد الظروف المثلى لقياس فعالية

الانزيم (اختيار فترة التحضين المثلى ، تحديد درجة الحرارة المثلى للتفاعل ، التركيز الامثل للمادة الاساس) ، وتم التعبير عن الفعالية النوعية للانزيم بالنانومول / دقيقة / ملغم بروتين .

النتائج والمناقشة :

اظهرت النتائج الاولية تحت الظروف التمهيدية وجود فعالية لانزيم البايروفوسفاتيز اللاعضوي inorganic pyrophosphatase في جرثومة القولون *Escherichia coli* ويبين الجدول رقم (١) الفعالية النوعية لانزيم البايروفوسفاتيز اللاعضوي في الاجزاء المختلفة من مستخلص خلايا الجرثومة .

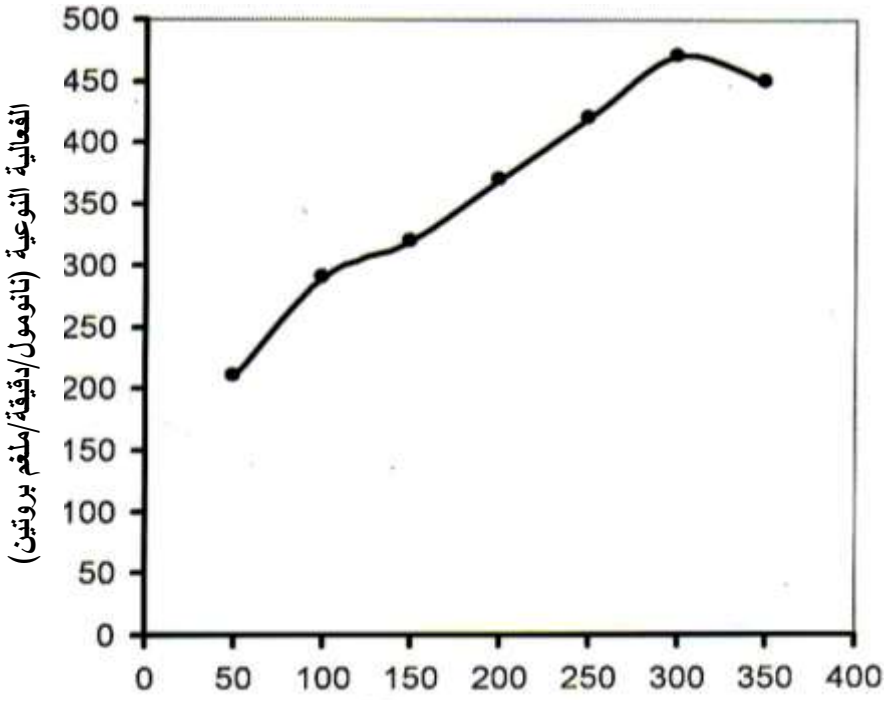
جدول (١) الفعالية النوعية لانزيم البايروفوسفاتيز اللاعضوي في الاجزاء المختلفة من مستخلص جرثومة القولون *E. coli*

الجزء	الفعالية النوعية*	النسبة المؤية للفعالية النوعية %
الرائق	٤٦٦	١٠٠
الراسب	٩٨	٢١
المستخلص	٤٢٠	٩٠

* الفعالية النوعية (نانومول/دقيقة/ملغم بروتين)

اذ يلاحظ من الجدول (١) بان الفعالية النوعية للانزيم في هذا النوع من الجراثيم قد بلغت في الرائق (٤٦٦) نانومول / دقيقة / ملغم بروتين وهي اكثر بمقدار (١٠%) تقريبا من قيمتها في المستخلص الكلي، اذ كانت (٤٢٠) نانومول/دقيقة/ملغم بروتين،كما انها تزيد باربع مرات تقريبا عن قيمتها في الراسب والتي بلغت(٩٨) نانومول/دقيقة/ملغم بروتين. ويبدو واضحا ان اعلى فعالية نوعية للانزيم كانت في الرائق ، لذا استخدم الرائق في اختبارات تحديد الظروف المثلى لفعالية الانزيم في التجارب اللاحقة .

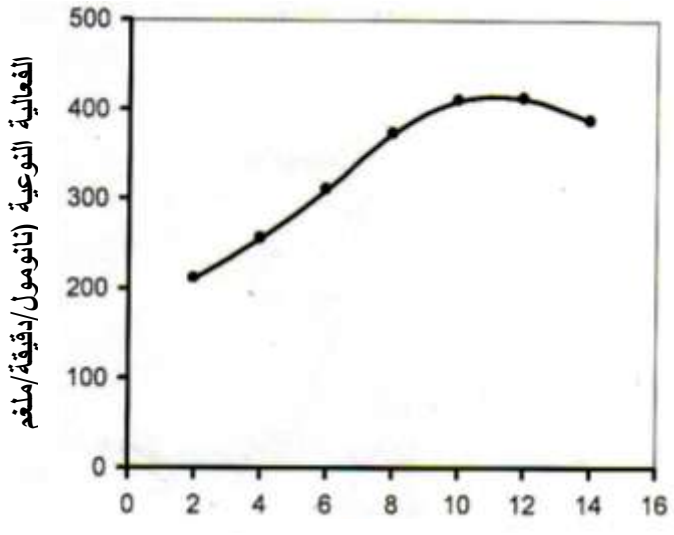
ولتحديد الظروف المثلى لفعالية الانزيم فقد جرت الاختبارات بوجود تراكيز مختلفة من البروتين في رائق خلايا الجرثومة تراوحت ما بين (٥٠-٣٥٠) مايكروغرام / سم^3 . بوجود تركيز ثابت للمادة الاساس Na_4ppi (١,٥) ملي مول. ويبين الشكل (١) العلاقة بين فعالية الانزيم وتركيز البروتين الكلي الموجود في رائق الخلايا.



شكل (١) تأثير تركيز البروتين الكلي في رائق خلايا جرثومة *E. coli* على فعالية انزيم البايروفوسفاتيز اللاعضوي

ويلاحظ من الشكل (١) ان السرعة الاولية للتفاعل تزداد بزيادة تركيز البروتين في رائق الخلايا (تركيز الانزيم). هذه النتائج تعطي دلالة على تحرر الفوسفيت اللاعضوي بفعل الانزيم في رائق الخلايا ، وان السرعة الاولية هذه تعتمد على عاملين هما تركيز المادة الاساس وتركيز الانزيم، ويلاحظ من الشكل (١) ايضا بان التركيز (٣٠٠) مايكرو غرام / سم^3 من الرائق اعطى اعلى سرعة تفاعل وهذه السرعة بدورها تعتمد على عاملين ايضا هما ثابت معدل السرعة وتركيز الانزيم [١٥].

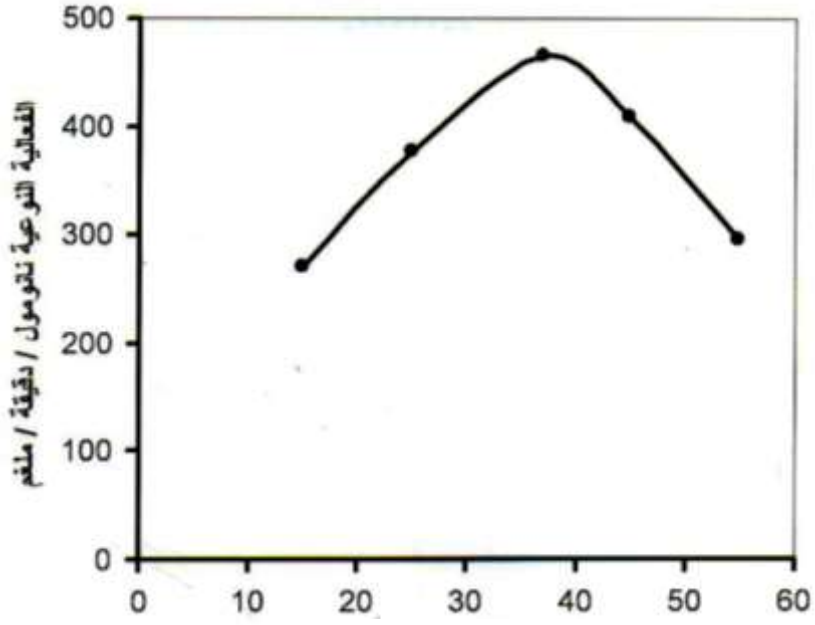
وكذلك جرى دراسة العلاقة بين فترة التحضين (زمن التفاعل) وفعالية انزيم البايروفوسفاتيز اللاعضوي عن طريق اختبار فترات مختلفة للتحضين ابتدا من (٢-١٤) دقيقة لاختيار فترة التحضين المثلى واللازمة لاتمام التفاعل الانزيمي ويوضح الشكل (٢) العلاقة بين فترات التحضين المختلفة وفعالية الانزيم من رائق الخلايا.



الشكل (٢) تأثير فترة التحضين على فعالية انزيم البايروفوسفاتيز اللاعضوي في جرثومة الـ *E.coli*

يظهر من الشكل (٢) ان فعالية الانزيم تزداد وبشكل خطي مع زيادة فترة التحضين الى حدود (٨-١٠) دقائق وهذا التناسب الخطي هو دليل اخر على ان تحرر الفوسفيت اللاعضوي هو تحرر انزيمي. ويلاحظ من الشكل (٢) ايضا استقرار نسبي في الفعالية الانزيمية بعد العشر دقائق الاولى من فترة التحضين، لذا تم اعتماد فترة التحضين (١٠) دقائق كفترة تحضين مثالية للتفاعل الانزيمي واعتمدت في التجارب اللاحقة .

كما جرت دراسة تأثير درجة الحرارة على فعالية الانزيم، اذ تم قياس فعاليته عند درجات حرارية مختلفة تراوحت ما بين (١٥-٥٥) درجة مئوية ويوضح الشكل (٣) العلاقة بين درجة حرارة التفاعل وسرعة التفاعل الانزيمي.

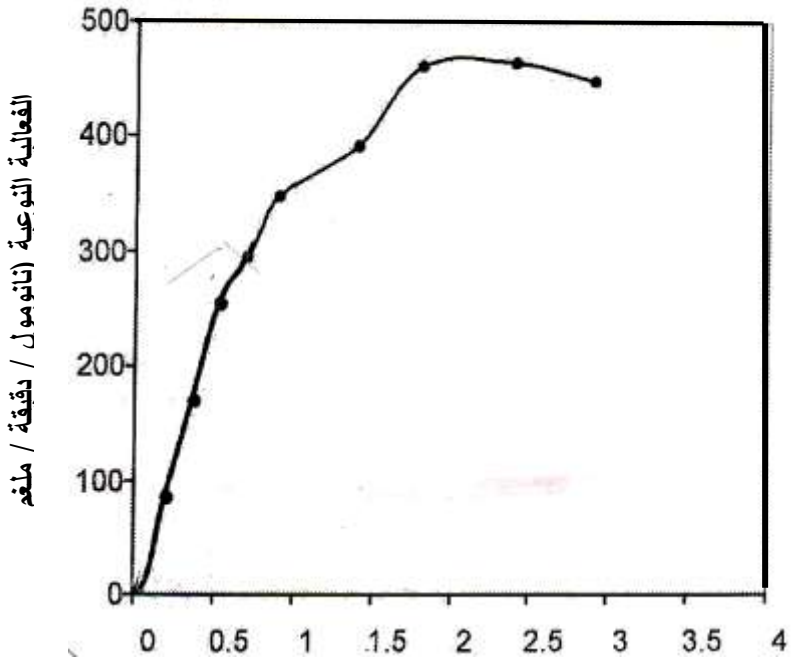


الشكل (٣) تأثير درجة الحرارة على فعالية انزيم البايروفوسفاتيز اللاعضوي في جرثومة الـ *E. coli*

يظهر واضحا من الشكل (٣) ان الارتفاع التدريجي للحرارة ادى الى زيادة في فعالية الانزيم وبشكل خطي تقريبا ، اذ وصلت الفعالية ذروتها عند الدرجة (٣٧) مئوية واعتمدت هذه الدرجة كدرجة حرارية مثلى لفعالية الانزيم . وبشكل عام فان ارتفاع درجة الحرارة (ضمن الحدود التي يكون فيها الانزيم مستقراً تجاه الحرارة) يعمل على زيادة عدد الجزئيات التي تستطيع التفاعل من خلال زيادة طاقتها الحركية وزيادة عدد التصادمات التي تقوم بها، ويلاحظ من الشكل (٣) ايضا ان فعالية الانزيم تبدأ بالانخفاض بعد (٣٧) درجة مئوية لتصل الى اقل من ذروتها بمقدار الثلث عند الـ (٥٥) درجة مئوية ويعزى ذلك الى ان الدرجات الحرارية العالية تؤدي الى زيادة الطاقة الحركية داخل الانزيم مقتربة من تخطي حاجز الطاقة اللازم والكافي لتحطيم الاواصر الهيدروجينية والاواصر الكارهة للماء الضعيفة hydrophobic bonds المسؤولة عن ثبات التركيب الثانوي والثالثي للانزيم مما يؤدي الى مسخ الانزيم enzyme

denaturation الامر الذي يؤدي الى انخفاض في الفعالية التحفيزية ولربما الى فقدانها كليا [١٦ ، ١٧] .

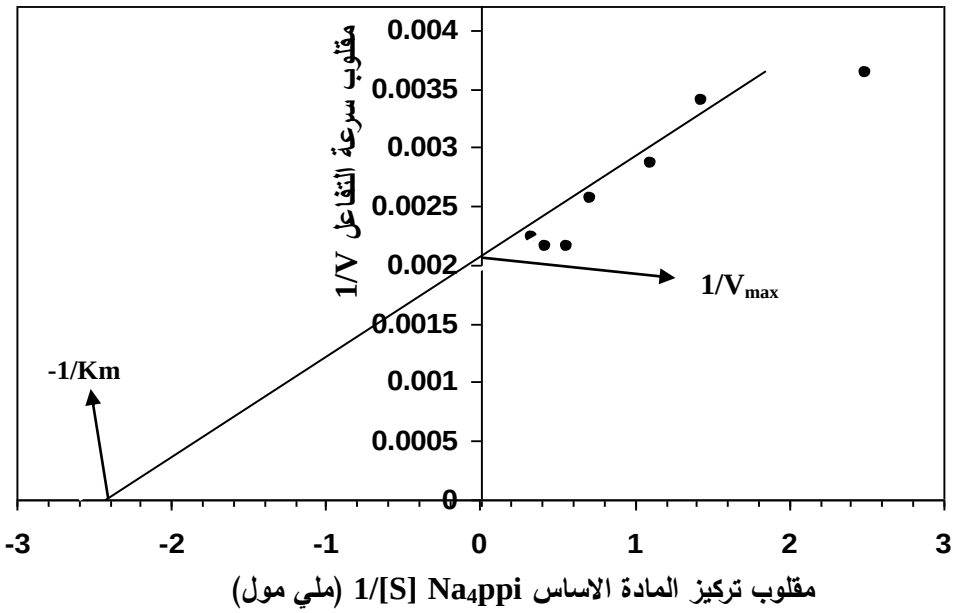
كما جرى قياس فعالية انزيم البايروفوسفاتيز اللاعضوي باستخدام تراكيز مختلفة من المادة الاساس بايروفوسفات الصوديوم Na_4ppi تراوحت ما بين (٠,٢ –٢,٩) ملي مول. ويوضح الشكل (٤) تاثير التراكيز المتغيرة من المادة الاساس Na_4ppi على سرعة التفاعل المحفز بانزيم البايروفوسفاتيز اللاعضوي عند بقاء تركيز الانزيم ثابتا (٣٠٠ مايكرو غرام / سم^3 من بروتين رائق خلايا جرثومة القولون) .



الشكل (٤) تأثير تركيز المادة الاساس Na_4ppi على فعالية انزيم البايروفوسفاتيز اللاعضوي في جرثومة الـ *E.coli*

اذ يلاحظ من الشكل (٤) ان التراكيز الواطئة من المادة الاساس تؤدي الى زيادة سرعة التفاعل (السرعة الاولية) زيادة طردية ، مما يدل على زيادة في عدد معقدات الانزيم–المادة الاساس وبالتالي زيادة في سرعة التفاعل . يلاحظ كذلك ان التركيز (٢,٠) ملي مول من المادة الاساس اعطت اعلى فعالية والتي يطلق عليها بالسرعة القصوى maximum velocity (Vmax) والتي بلغت تقريبا (٤٦٠) نانو مول / دقيقة/ ملغم بروتين، ثم يلاحظ حصول استقرار نسبي في سرعة التفاعل ويكون الانزيم عندها مشبعا saturated ولا يستطيع ان يعمل بسرعة اكبر ، اذ تكون جميع المواقع الفعالة للانزيم في حالة تشبع saturation بجزئيات المادة الاساس [١٨] .

ان فعالية الانزيمات عموما تحدد بدقة من خلال تحديد قيمة ثابت ميكيلس – منتن (Km) Michaelis-Menten والذي يعرّف على انه تركيز المادة الاساس الذي يعطي نصف السرعة القصوى، حددت قيمة (Km) باستخدام طريقة لينويفر – بيرك Lineweaver-Burke الذي يمثل العلاقة بين مقلوب معدل سرعة التفاعل ١/V ومقلوب تركيز المادة الاساس ١/[S] [١٩] ، اذ وجد ان قيمة (Km) للمادة الاساس Na_4ppi مقاربة الى (0.42) ملي مول في حالة استخدام رائق الخلايا كمصدر للانزيم وكما هو موضح في الشكل (٥) .



الشكل (٥) رسم لينويفر – بيرك يوضح قيمة (Km) لانزيم البايروفوسفاتيز اللاعضوي في جرثومة الـ *E.coli*

وعموما لغرض الحصول على السرعة القصوى للتفاعل الانزيمي يجب ان يحتوي نظام التفاعل التركيز الامثل لكل من الانزيم والمادة الاساس ويحضن في الدرجة الحرارية المثلى ولفترة تحضين كافية لاتمام التفاعل بشكل كامل .

ومما تقدم يتضح بان افضل فعالية لانزيم البايروفوسفاتيز اللاعضوي inorganic pyrophosphatase من رائق خلايا جرثومة القولون *Escherichia coli* جرى الحصول عليها هي تحت الظروف التالية .

(٣٠٠) مايكروغرام من بروتين رائق الخلايا و (٢,٠) ملي مول من المادة الاساس بايروفوسفات الصوديوم Na_4ppi وفترة حضن لمدة عشر دقائق عند درجة حرارة (٣٧)°م وبثبات الاس الهيدروجيني(pH = 7.0)، وجاءت هذه النتائج متفقة مع نتائج دراسات سابقة على هذا الانزيم في العديد من الكائنات مثل *Streptococcus salivarius* [٨] وكذلك دراسة فعالية هذا الانزيم في تسع سلالات من جرثومة السالمونيلا *Salmonella* [١١] .

المصادر

[1] M.K. Campbell and S.O. Farrell. "Biochemistry". (2003) 4th Ed. Thomson Learning Academic Resource Center. U.S.A. p 135.

[2] M. Kunit. *J. Gen. Physiol.* (1952). 35: 423.

[3] S.M. Avaeva, N.P. Bakuleva, L.A. Bavatova, T.I. Nazarva and et al. *Biochem. Biophys. Acta.* (1977). 482: 173

[4] A.C. Steven, S. Richard, S.K. Pamela and L.H. Robert. *J. Biol. Chem.* (1978). 253: 889.

[5] M. Dixon, E. C. Webb, C.J.R. Thorne and K.F. Tipton. "Enzyme" (1979). 3rd Ed. Longman Group Limited. London. p 555.

[6] J. Josse. *J. Biol. Chem.* (1966). 241: 1938.

[7] N.N. Vorobeva, J.I. Nazavova, and N.P. Bakuleva. *J. Mol. Biol. and Bioorg. Chem.* (1982). 47 : 740.

[8] M.A. Gonzalez and B. Cooperman. *J. Biochem.* (1986). 25: 7179.

[9] L.K. Ramji and R.H. Ian. *Can. J. Biochem.* (1981) 60 : 452

[10] E.A. Robbins, M.P. Stulberg and P.D. Bayer. *Arch. Biochem. Biophys.* (1955). 549 : 215.

[11] S.D. Sulyman *Edu. and Sci.* (1994). 15: 102.

[12] E. Beulter, K.G. Biume J.C. Kapalan, G.W. Loka, and et al. *J. Haematol.* (1977) 35: 331.

[13] S.P. Chen, Y.T. Torebasa, and H. Warmer. *Anal. Chem.* (1956). 28 : 1856.

[14] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. *J. Biol. Chem.* (1951). 193: 265.

[15] D.L. Nelson and M.M. Cox. "Principle of Biochemistry". (2005) 4th Ed. W.H. Freeman and Company. New York. pp 202-212.

[16] B.D. Hames and N.M. Hooper. "Biochemistry". (2000) 2nd Ed. Bios Scientific publishers Ltd. U.K. p 84.

[17] R.H. Garrett and C.M. Grisham. "Biochemistry". (2005). 3rd Ed. Thomson Learning Inc. Singapore. pp 420-421.

[18] D. Voet and J.Q. Voet. "Biochemistry". (2004). 3rd Ed. John Wiley and Sons. Inc. U.S.A. pp 477–482.

[19] H. Lineweaver, D. Burke. *J. Amer. Chem. Soc.* (1934). 56: 658.

Biochemical Study of Inorganic Pyrophosphatase Isolated from *Escherichia coli*

(Received 18 / 2 / 2008 , Accepted 26 / 5 / 2008)

Abstract

The study concerned with describing the activity and some properties of the enzyme inorganic pyrophosphatase (EC 3.6.1.1) from *Escherichia coli*. A high activity of the enzyme was detected in *Escherichia coli*. The highest specific activity of the enzyme was detected in the supernatant (466) nmol/min/mg protein and the lowest was in the precipitant, by a sonication and centrifugation, (98) nmol/min/mg protein, while crude extract exhibited a value between the two limits (420) nmol/min/mg protein. The optimum conditions of the enzyme activity were (300) mg protein as a source of enzyme, (2.0) mmol of sodium pyrophosphate as a substrate, at pH (7.0) , with (10) minutes as incubation time at 37°C and the Michaelis-Menten constant (Km) was about (0.42) mmol.