المحاضرة الأولى

(تحلل المواد العضوية في التربة)

من اهم وظائف الكائنات الحية هو تحليل المواد العضوية وتحرير العناصر الغذائية المضافة لتكون جاهزة للاستعمال من قبل النبات وسوف يصاحب هذه العملية ايضا تحرر غاز ثاني اوكسيد الكاربون الذي سوف يستعمل من قبل النبات في عملية التركيب الضوئي وتقاس كمية غاز ثاني اوكسيد الكاربون التي تستعمل كموشر لقياس فعالية ونشاط الاحياء الدقيقة في التربة.

أن اضافة المركبات العضوية في التربة سوف يؤدي الى الزيادة في كمية غاز ثاني اوكسيد الكاربون المتحرر ومقدار التحلل يعتمد على اعداد وانواع الكائنات الدقيقة في التربة وعلى نوع المادة او المركب العضوي المضاف بالاضافة الى درجة الحرارة والتهوية ودرجة تركيز ايون الهيدروجين (pH).

أثناء عملية التحلل قسم من الكاربون سوف يستعمل في بناء اجسام الخلايا التي تقوم بعملية التحلل بالاضافة الى ان القسم الاخر سوف يستعمل كمصدر للطاقة وفي نفس الوقت هناك قسم اخر سوف يبقى في التربة على شكل مركبات عضوية غير متحللة.

<u>المواد المطلوبة</u>

1. عينات من التربة
2. المواد العضوية المطلوب دراستها
3. أوعية زجاجية
4. تحضير:

1ع هيدروكسيد الصوديوم
1ع حامض الهيدروكلوريك
1ع كلوريد الباريوم
دليل الفينولفثالين

<u>طريقة العمل</u>

1. يوزن 100 غرام تربة (حسب عدد المعاملات مع وجود مكررين)
2. يعامل كل 100 غرام تربة بما ياتي مع الخلط الجيد

- لايضاف اي شي (مقارنة)
- كلكوز 0.5غرام
- سليلوز 0.5 غرام
- نشا 0.5 غرام
- ببتون 0.5 غرام
- كلكوز 0.5غرام مع 0.025غرام نترات الامونيوم
- سليلوز 0.5غرام مع 0.025 غرام نترات الامونيوم
- نشا 0.5 غرام مع 0.025 غرام نترات الامونيوم
- ببتون 0.5 مع 0.025 غرام نترات الامونيوم
- وعاء يحتوي على هيدروكسيد الصوديوم 1ع

3. يجب أن تكون نسبة الرطوبة في التربة بين 55 – 60% من التشبع
4. يضاف 15 مل من هيدروكسيد الصوديوم 1ع في الوعاء الخاص بذلك ويوضع في داخل الوعاء الذي يحتوي على التربة مع التأني بعدم سكبه داخل التربة.
5. يغطى الوعاء الذي يحتوي على التربة وهيدروكسيد الصوديوم بالغطاء الخاص.
6. بعد أسبوع يؤخذ محلول هيدروكسيد الصوديوم ويسحح مع حامض الهيدروكلوريك 1ع وكالاتي يؤخذ الـ 15 مل من هيدروكسيد الصوديوم التي امتصت ثاني اوكسيد الكاربون المتحرر نتيجة تحلل المادة العضوية في دورق حجمه 250 مل وأضف 2 مل من كلوريد الباريوم 1ع مع عدة قطرات من الفينولفثالين ومن ثم التسحيح مع حامض الهيدروكلوريك 1ع
7. يمكن تكرار الخطوات 4و 5 للأسبوع الثاني والثالث والرابع الخ.
8. يحسب عدد الملغرامات من الكاربون التي تحررت على شكل ثاني اوكسيد الكاربون من كل تربة وكل معاملة عن طريق حساب حجم حامض الهيدروكلوريك المعلن العيارية المستخدم لمعادلة هيدروكسيد الصوديوم الزائدة.

<u>الحسابـــــات</u>

- بالنسبة لعينة المقارنة (عينة هيدروكسيد الصوديوم فقط).

حجم الحامض × عيارية الحامض = مليمكافئ هيدروكسيد الصوديوم الزائدة

= مليمكافئ هيدروكسيد الصوديوم التي بدانا بها التفاعل
= (س)

- بالنسبة للمعاملات

حجم الحامض × عيارية الحامض = مليمكافئ الحامض = مليمكافئ هيدروكسيد الصوديوم الزائدة (بعد التفاعل)

= (ص)

مليمكافئ هيدروكسيد الصوديوم الكلي ـ مليمكافئ هيدروكسيد الصوديوم الزائدة = مليمكافئ هيدروكسيد الصوديوم المستخدمة بالتفاعل (ع)

س ـ ص = ع

ع ×22 = ملغم CO_2

ملغم C = ملغم CO_2 × 12

———————

44

المحاضرة الثانية

الاختبارات الكيموحيوية المستخدمة في تعريف البكتيريا (الإنزيمات البكتيرية)

Biochemical activity tests for bacterial identification (Enzymes)

تقوم الكائنات الدقيقة (كالبكتيريا) بإفراز انواع عديدة من الانزيمات لتحليل الكثير من المواد المعقدة الكربوهيدراتية والبروتينية والدهنية لتحوله الى جزيئات صغيرة الحجم يمكن امتصاصها

1. التحلل المائي للنشا Starch hydrolysis

اسم التجربة: اختبار قدرة البكتيريا على تحليل النشا

الهدف من التجربة: التمييز بين الكائنات الدقيقة عن طريق قدرتها على تحليل النشا

من المعروف إن النشا مادة كربوهيدراتية عبارة عن نوعين من الوحدات:

- اميلوز Amylose (سلاسل مستقيمة من الجلوكوز)
- اميلوبكتين Amylopectin (سلاسل متفرعة من الجلوكوز)

لكي يتمكن الكائن من تحليل النشا لابد من إفراز الإنزيمات:

a. ά-B amylase يكسر سلاسل الاميلوز المستقيمة إلى وحدات الجلوكوز
b. amilo glycosidase 1-6 يكسر سلاسل الاميلوبكتين المتفرعة الى وحدات الجلوكوز(

طريقة العمل :تحت ظروف التعقيم

1. كل مجموعة لديها 2طبق بتري يحتوي على بيئة اجار النشا
2. يلقح منتصف الطبق بمزرعة بكتيرية حديثة العمر بواسطة ابرة تلقيح ويترك الطبق الاخر كونترول للمقارنة
3. يحضن الطبق مقلوب عند 37م لمدة 24-48ساعة
4. يكشف عن قدرة البكتيريا على تحلل النشا باستخدام اليود، حيث يغمر سطح البيئة بكمية مناسبة من اليود. وجود هالة شفافة حول النمو البكتيري يدل على ان البكتيريا قادرة على تحلل النشا (نشا + يود لون أزرق) أي انها تفرز انزيم الأميليز للوسط الخارجي الذي يكسر النشا الى سكريات بسيطة (الجلوكوز) وبالتالي تظهر المنطقة الشفافة الخالية من النشا
5. إذا لم يوجد منطقة عديمة اللون حول النمو يعني ان عدم قدرة البكتيريا على تحليل النشا

2. اسالة الجيلاتين Gelatin Liquefaction

اسم التجربة: دراسة قدرة البكتيريا على تحلل الجيلاتين

الهدف من التجربة: التعرف على البكتيريا القادرة على اسالة الجيلاتين

الجيلاتين مادة بروتينية محضر من التحلل المائي للكولاجين بعض أنواع البكتيريا قادرة على انتاج انزيم خارجي Gelatinase الذي يحلل الجيلاتين

طريقة العمل: تحت ظروف التعقيم

1. كل مجموعة لديها 2 انبوبة تحتوي على كمية مناسبة من بيئة الجيلاتين المغذيnutrient gelatin
2. تلقح الانبوبة بمزرعة بكتيرية حديثة العمر بطريقة الوخز (الانبوبة الثانية كونترول)
3. تحضن الانبوبة عند 30-37م لمدة من 48-72ساعة
4. يكشف عن قدرة البكتيريا على تحلل الجيلاتين بوضع الانابيب في وعاء يحتوي على ثلج ويترك لمدة 15 دقيقة، ثم تمسك الانبوبة ويتم امالتها، إذا وجدت ان البيئة مازالت متماسكة يعني ان الجيلاتين لم يتحلل بواسطة البكتيريا أما إذا لاحظت اسالة الجيلاتين فهذا يدل على ان البكتيريا افرزت انزيم Gelatinase الذي يحلل الجيلاتين

3. تحلل الدهون Lipid hydrolysis

اسم التجربة: اختبار قدرة البكتيريا على تحلل الدهون

الهدف من التجربة: التعرف على قدرة الانواع البكتيرية على تحليل الدهن

قدرة البكتيريا على تحليل الدهون راجع الى افراز انزيم Lipase الذي يقسم جزيء الدهن الى جزيء جليسيرول و3 جزيئات من 3 احماض دهنية

طريقة العمل: تحت ظروف التعقيم

1. لديك 2 طبق يحتوي بيئة اجار الدهن، يلقح وسط الطبق بمزرعة حديثة العمر بإبرة التلقيح والطبق الثاني كونترول
2. يحضن الطبق عند 37م لمدة 96 ساعة
3. يكشف عن قدرة البكتيريا على تحلل الدهن بإضافة كمية من محلول كبريتات النحاس 10-20% لمدة 10 دقائق, ثم تخلصي من المحلول.
4. ظهور لون أزرق مخضر على النمو دليل على قدرة البكتريا على تحليل الزيت بإفرازها للإنزيم المحلل

المحاضرة الثالثة

1. تحلل الاحماض الامينية Amino Acids Hydrolysis

الاحماض الامينية هي ناتج تحلل البروتينات يمكن لبعض البكتيريا ان تحلل بعض هذه الاحماض الامينية محولة اياها الى مواد ابسط تركيبا

اسم التجربة: اختبار قدرة البكتيريا على انتاج كبريتوز الايدروجين H_2S Production

الهدف من التجربة: توضيح نشاط بعض البكتيريا في تحليل cyctine وانتاج H_2S

بعض البكتيريا تنتج غاز كبريتوز الايدروجين عند تحللها للحمض الاميني Cysteine (حمض اميني يحتوي على الكبريت) بواسطة افرازها لإنزيم Cysteine desulforase تستعمل بيئة كليجلر للكشف عن انتاج H_2S حيث تحتوي على كبريتات الحديدوز الذي يتفاعل مع H_2S مكونا راسب اسود من كبريتيد الحديدوز

طريقة العمل :تحت ظروف التعقيم

1. كل مجموعة لديها 2 انبوبة تحتوي على بيئة كليجلر Kligler
2. تلقح الانبوبة بطريقة الوخز بمزرعة بكتيرية حديثة (Proteus vulgaris) ويحتفظ بالأنبوبة الثانية بدون تلقيح
3. تحضن الانبوبة عند 30-37م لمدة من 2-7 أيام
4. كما يلاحظ تغير لون البيئة الاحمر الى الاصفر نتيجة انخفاض قيمة pH بسبب تكون الاحماض.

5. تقدير إنزيمات السليوليز Celluloses

تستطيع بعض الكائنات الحية الدقيقة تحليل السليلوز وهو عبارة عن مادة كاربوهيدراتية تتكون من وحدات من السكر الكلوكوز مرتبطة مع بعضها طوليا بروابط من نوع بيتا بين ذرة الكاربون الأولى وذرة الكاربون الرابعة لوحدة كلوكوز أخرى من جزئ السكر لتكون سلاسل طويلة. وجزيء السليلوز يتكون من 2000 إلى 10000 وحدة كلوكوز وقد تصل أحياناً إلى 15000 وحدة كلوكوز، ويختلف عند وحدات الكلوكوز في السلسلة وكذلك الوزن الجزيئي للسليلوز باختلاف نوع النبات.

ويتكون النظام الإنزيمية المحلل للسيليولوز من ثلاثة إنزيمات هي:

1. انزيم C1 (Endo-β-1,4 glucanase) وهو يحلل المركب الأساسي (السليلوز) ويحدث له تحلل جزئي.
2. إنزيم Cx (Exo-β -1,4 glucanase) ويعمل على النواتج من تكسير الانزيم الأول وينتج سكر ثنائي هو السلوبيوز علاوة على سلاسل قصيرة من وحدات الكلوكوز.
3. انزيم Glycosidase (β-1,4 glycosidase) يحلل السكر الثنائي السلوبيوز والسلاسل القصيرة إلى وحدات من الكلوكوز.

Cellulose $\xrightarrow{C1}$ **Chains of cello-oligo-saccharides**

Cello-oligo-saccharides $\xrightarrow{Cx}$ **Oligo-saccharides + cellobiose**

Cellobiose $\xrightarrow{Cellobiase}$ **Cellobiase glucose**

اولاً: تحلل السليلوز هوائيا

المواد اللازمة للتجربة

1. عينة تربة معاملة بالمواد العضوية
2. بيئة Dubo's medium معقمة وموضوعة في انابيب اختبار (أربعة انابيب)

خطوات العمل

1. يؤخذ 0.5 غرام من عينة التربة ثم توضع في كل انبوبة بيئة الـ Dubo's
2. تترك أنبوبتين بدون تلقيح للمقارنة.
3. تحضين انبوبتين على درجة حرار 31° م و انبوبتين على حرار 11° م.
4. تفحص الانابيب اسبوعيا لمدة شهر.

يلاحظ تآكل او ظهور بقع صفراء دلالة ذلك على نشاط الميكروبات في تحلل السليلوز

ثانياً : تحلل السليلوز لا هوائيا

المواد اللازمة للتجربة

1. عينة تربة معاملة بالمواد العضوية
2. بيئة Omeliansky's medium معقمة وموضوعة في انابيب اختبار

خطوات العمل

1. يؤخذ 0.5 غرام من عينة التربة ثم توضع في كل انبوبة بيئة الـ Omeliansky's medium
2. ضع 2 مليلتر من الفلدسبار المعقم على سطح البيئة لجعل الظروف لا هوائية
3. تترك أنبوبتين بدون تلقيح للمقارنة.
4. تحضين انبوبتين على درجة حرار 30° م و انبوبتين على حرار 50° م.
5. تفحص الانابيب اسبوعيا لمدة شهر.

يلاحظ تآكل او ظهور بقع صفراء دلالة ذلك على نشاط الميكروبات في تحلل السليلوز تحت الظروف اللاهوائية

التقدير الكمي للنمو الفطري

Quantative measurment of fungal growth

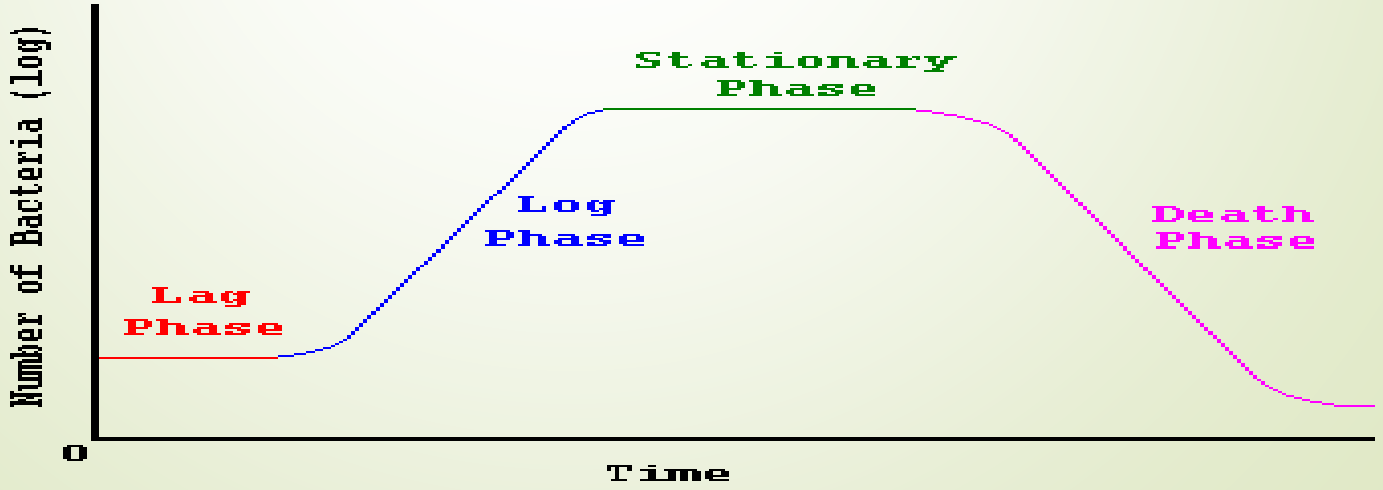
تعريف النمو الفطري:

يعتبر النمو الزيادة في عدد الأنوية وفي عدد الخلايا وحجمها أو في كمية المادة البنائية الحية.

أطوار النمو في الفطر:

يمر الفطر أثناء نموه بعدة أطوار هي:

- **الطور التمهيدي:** وفيه تبدأ الخلايا في الاستعداد للانقسام.
- **الطور اللوغارتمي:** وفيه يكون معدل الانقسام أعلى ما يمكن.
- **طور الثبات:** وفيه يحدث توازن بين عدد الخلايا المنقسمة والخلايا التالفة.
- **طور التحلل أو الموت:** وفيه تبدأ الخلايا في التحلل التدريجي حتى الموت.



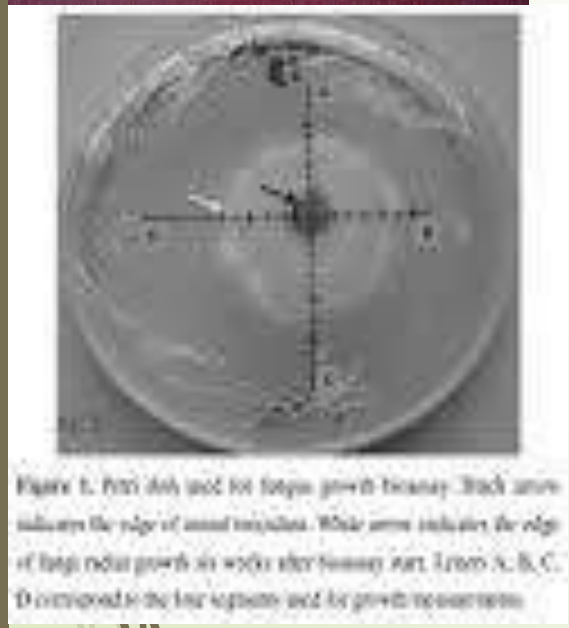
طرق قياس النمو الفطري:

- التغير في عدد الخلايا وحجمها.
- القياس الخطي لقطر المستعمرة.
- قياس كمية بعض المكونات الخلوية مثل كمية المواد الفينولية.
- طريقة الوزن الجاف لكتلة الخلية وتعتبر أفضل الطرق لان طريقة قطر المستعمرة تهمل سمك الميسليوم النامي وطريقة العد لا تصلح لكل الفطريات ولكنها خاصة بالفطريات وحيدة الخلية مثل الخمائر.

ملاحظة :

لقياس معدل النمو الفطري على البيئات الصلبة نستخدم قياس قطر المستعمرة. أما على البيئات السائلة نستخدم طريقة الوزن الجاف .

الطرق المعملية لقياس معدل النمو في الفطريات



طريقة قياس قطر المستعمرة:

وهي من أكثر الطرق شيوعاً وتتم عن طريق تلقيح وسط الأطباق المحتوية على بيئة تشابك دوكس بواسطة أقراص منتظمة من مزرعة فطرية حديثة العمر يتراوح عمرها (7–14يوم) ثم تحضن في درجة حرارة 25°c أو في جو المختبر لمدة أسبوع.

مع مراعاة أخذ قياس قطر المستعمرة على فترات منتظمة وذلك بعمل خطين متعامدين على قاعدة الطبق وقياس كلاً منها وأخذ المتوسط ثم تمثل النتيجة بيانياً.

فترة التحضين (يوم)	طبق (1)	طبق (2)	المتوسط
2			
4			
6			

سلبيات هذه الطريقة:

أنها تهمل سمك الميسليوم النامي في الطبق فبعض الفطريات قد لا تتوسع في النمو بشكل أفقي بقدر توسعها فيه بشكل رأسي.

طريقة الوزن الجاف Dry weight method

تعتبر هذه الطريقة أكثر دقة وبها يترك الفطر لينمو لفترة محدودة حيث يقاس خلالها الوزن الجاف للفطر على فترات منتظمة.

طريقة العمـــــل:

1. تحضر عدد **3** فلاسكات لكل مجموعة تحتوي على بيئة تشابك دوكس سائلة.
2. تلقح الفلاسكات بواسطة قرصين من مزرعة فطرية نقية حديثة العمر مع مراعاة أن يتم التلقيح تحت ظروف التعقيم مع إمالة الفلاسكة وذلك لكي لا يسقط القرص في قاع الفلاسكة مع مراعاة عدم رج الفلاسكة.
3. تحضن الفلاسكات عند درجة حرارة 25°c .
4. بعد أسبوع يتم ترشيح الفلاسكة رقم **(1)** بالكامل من خلال قمع ويؤخذ النمو الفطري بالكامل على ورقة ترشيح معلوم الوزن.
5. يوضع النمو الفطري في فرن درجة حرارته من (50–60 م) لمدة 48 ساعة.

6. بعد جفاف الفطر يتم حساب الوزن الجاف للفطر كالآتي:

الوزن الجاف للفطر= (وزن ورقة الترشيح + وزن الفطر) – وزن ورقة الترشيح.

7. تكرر الخطوات بالنسبة للفلاسكة رقم (2) بعد أسبوعين و الفلاسكة رقم (3) بعد ثلاثة أسابيع من بدء التجربة. بعدها تسجل النتائج وتمثل بيانيا على منحنى النمو .

ملاحظة:

كلما زادت فترة التحضين زاد النمو الفطري إلى حد معين بعده يبدأ النمو في التدهور والانحلال.

النتائج

فترة التحضين	الوزن الجاف
أسبوع	
أسبوعين	
ثلاثة أسابيع	

المحاضرة الخامسة

تقدير انزيم الفوسفاتيز القاعدي في التربة

تلعب الإنزيمات دوراً رئيساً في التفاعلات الكيميائية والحيوية التي تحدث في التربة فضلاً عن الفعاليات الحيوية لأحياء التربة المجهرية والجذور النباتية، تعد الإنزيمات مواد بروتينية يتم إنتاجها داخل الخلية الحية البكتيرية منها والفطرية لكي تحفز جميع التفاعلات الحيوية والكيموحيوية على سرعة التفاعل التي تحدث داخل الخلية أو خارجها من دون تغير في خصائص الإنزيم بعد نهاية التفاعل.

تتميز الإنزيمات بدقتها في القيام بعمليات معينة، فهي تحلل مركب واحد يسمى المادة الخاضعة (Substrate) أو مجموعة من المركبات المتشابهة. وإن قياسات فعالية الإنزيمات تعد من الأمور المهمة لمعرفة حالة الظروف البيئية لتربة ما وذلك كون الإنزيمات ضرورية في دورة العناصر وجاهزيتها في التربة، وإن النشاط الإنزيمي يعد مؤشراً على خصوبة التربة. أن الإضافات العالية من الأسمدة المعدنية إلى المحاصيل المزروعة ممكن أن تزيد من الكتلة الحية بصورة مباشرة ومن ثَمّ يمكن أن تزيد من فعالية الإنزيم بصورة غير مباشرة.

طريقة العمل:

يتم تقدير فعالية الإنزيم خلال مدد التحضين (10 , 20 , 30 , 40) يوما وعلى وفق الطريقة التي وضحها Tabtabai و Bremner, (1970).

1. نأخذ 1gm من التربة على أساس الوزن الجاف ومعاملتها بـ 0.2ml من التلوين و 4ml من المحلول المنظم "MUB" Modified Universal Buffer.
2. أضف 1ml من المادة الخاضعة للإنزيم (*ρ*– nitrophenyl phosphate).
3. حضين على درجة حرارة 37°م ولمدة ساعة واحدة بعد الرج لعدة ثواني.
4. ثبط نشاط الإنزيم بإضافة 1ml من محلول $CaCl_2$ 0,5 عياري و4ml من محلول NaOH 0,5 عياري.
5. نرشح لتقدير كمية *ρ*–nitrophenol بواسطة جهاز الطيف اللوني Spectrophotometer على طول موجي 420 نانوميتر.

تحلل البروتين بواسطة انزيم اليوريز

لا يستطيع النبات امتصاص النيتروجين الا على شكل امونيا حيث ان الامونيا مهمه لبناء الاحماض الامينية المختلفة

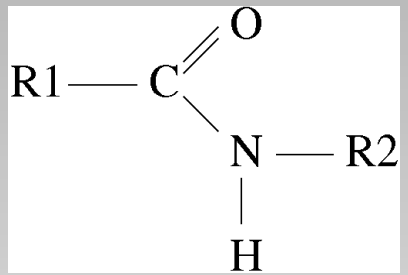
ماهي الاميدات ؟

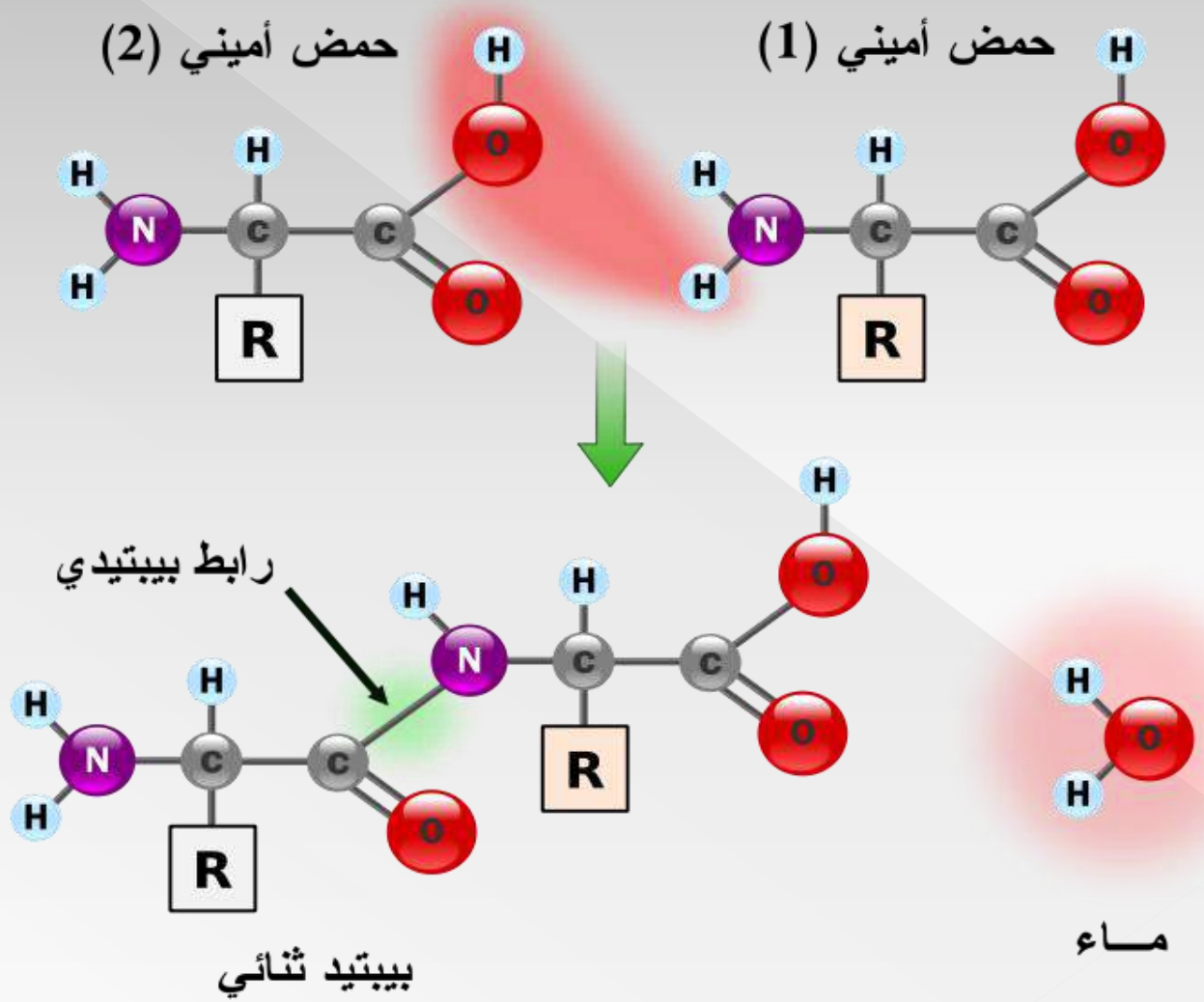
هي مركبات عضوية تحتوي على مجموعة وظيفية تسمى الاميد وهي عبارة عن مجموعة كربونيل متصلة بمجموعة امين

معلومة اضافية

- **الرابط البيبتيدي : وهي الاصرة التي تتشكل بين جزيئتين عندما تتفاعل مجموعة الكربوكسيل للجزيئة الأولى مع مجموعة الامينو للجزيئة الثانية محررة جزيئة الماء (H2O) ويدعى هذا التفاعل بالتآلف الجاف وكذلك يسمى (تفاعل التكثيف) ويحدث بين الاحماض الامينية. أن الآصرة الناتجة من هذا التفاعل وهي CO-NH تسمى الاصرة البيبتيدية وتدعى الجزيئة الناتجة بالأميد،**

جزيء الاميد


R1
C
O
N
R2
H


حمض أميني (2)
حمض أميني (1)
رابط ببيتيدي
ببيتيد ثنائي
مـــاء

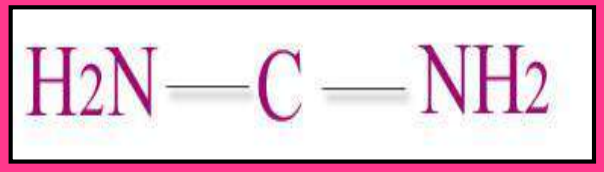
إنزيم اليورييز

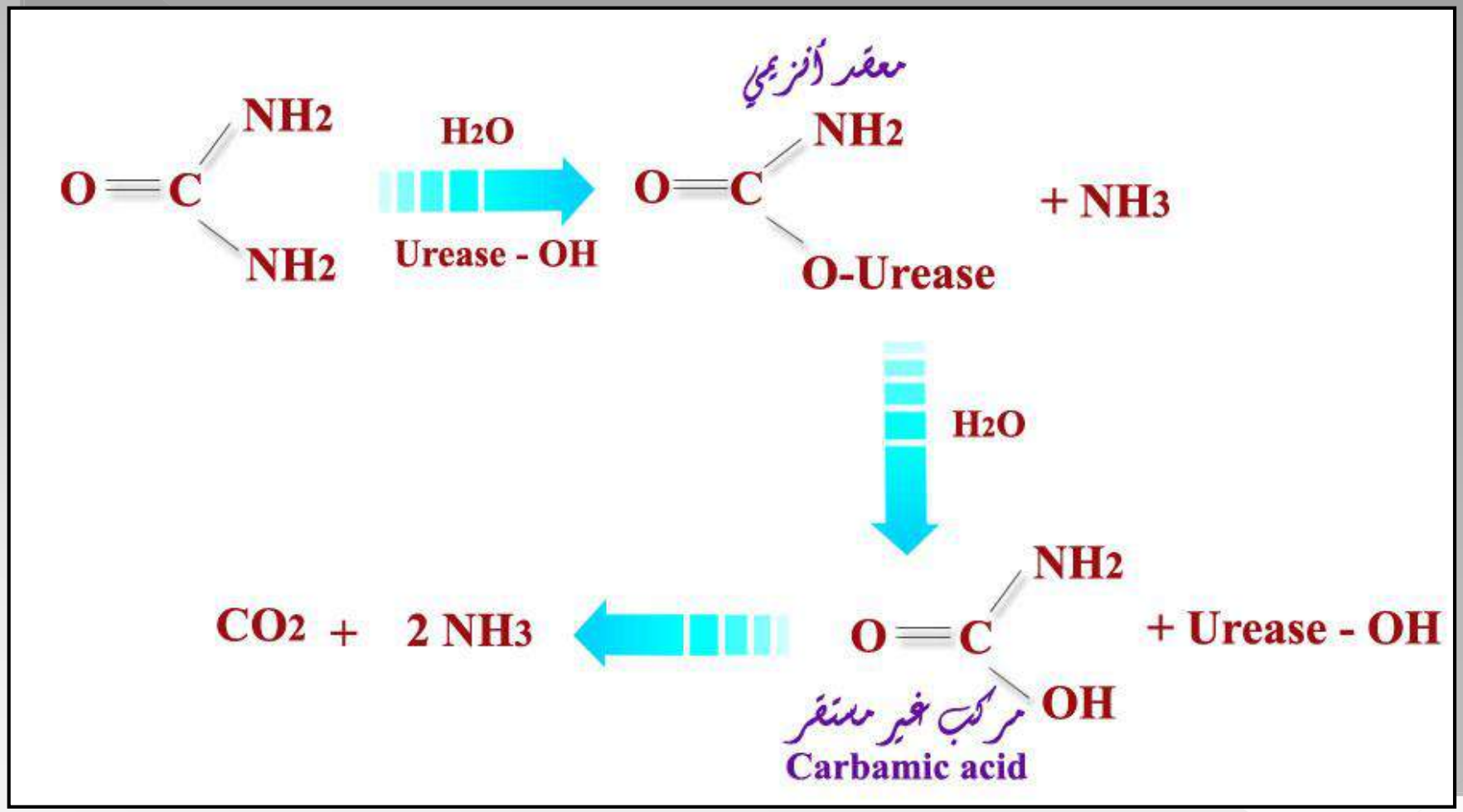
يعمل إنزيم اليورييز على الرابطة الأميدية (الكربونيتروجينية) حيث يحفز تحلل اليوريا إلى أمونيا وثاني اوكسيد الكربون.

الفرق بين الرابطة الببتيدية والرابطة الأميدية:

الرابطة الببتيدية

الرابطة الأميدية




معقد أنزيمي
NH2
O=C
NH2
H2O
Urease - OH
NH2
O=C
O-Urease
+ NH3
H2O
NH2
O=C
OH
+ Urease - OH
مركب غير مستقر
Carbamic acid
CO2 + 2 NH3

تجربة الكشف عن عمل إنزيم اليوريز

الأدوات :

- أنبوبتي اختبار
- إنزيم اليوريز
- بلورات اليوريا
- حمض الخليك
- كاشف أحمر الفينول (Phenol red)
- حمام مائي 35 – 40 ° م

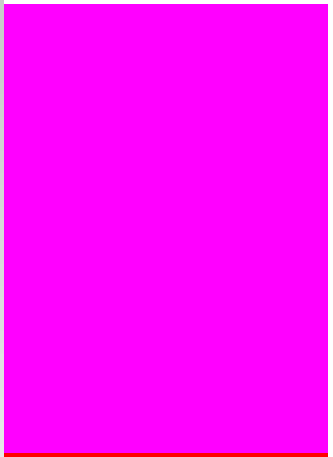
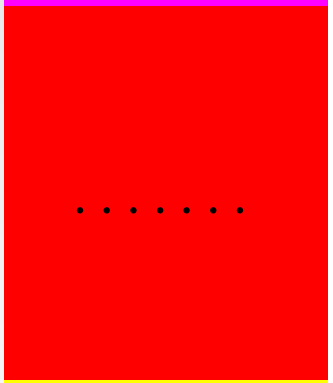
طريقة العمل

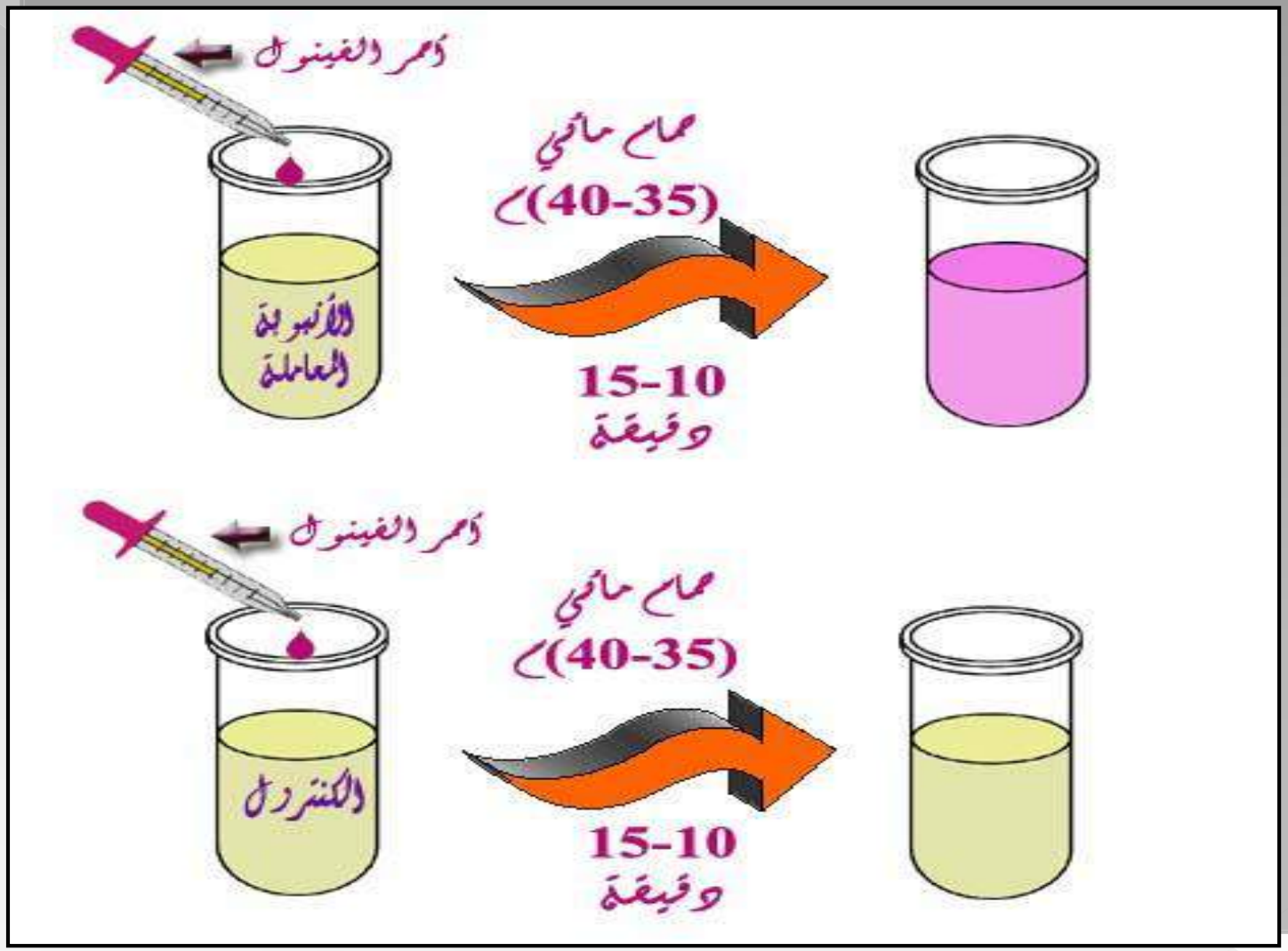
في الأنبوبة الأولى نضع 2 مل من الإنزيم + 1 مل حمض الخليك + 3 نقاط أحمر الفينول + بلورات مادة التفاعل (اليوريا) كمية بسيطة

نضع في الأنبوبة الثانية (الكنترول) 1مل حمض الخليك + 3 نقاط أحمر الفينول + بلورات مادة التفاعل

نضع الأنبوبتين في حمام مائي في درجة (35 – 40 ° م) من 10 إلى 15 دقيقة حتى يتغير اللون.

الألوان الخاصة بأحمر الفينول

Color	Symbol	Description	pH
	+++	لون زهري	قاعدي Alkaline
	++++	لون أحمر	متعادل Neutral
	++	لون أصفر	حمضي Acid


أحمر الفينول
حمام مائي
(40-35)
الأنبوبة
المعاملة
15-10
دقيقة
أحمر الفينول
حمام مائي
(40-35)
الكنترول
15-10
دقيقة

التقرير

- **النتيجة :**

في الأنبوبة الأولي (المعاملة) تحول اللون إلى اللون الوردي بينما لم يتغير اللون في الأنبوبة رقم 2 (الكنترول)

- **النتيجة الإيجابية:**

لون الكاشف (أحمر الفينول) في الوسط الحامضي أصفر باهت ويعمل إنزيم اليوريز على تحلل اليوريا إلى أمونيا و ثاني أكسيد الكربون ، فوجود الأمونيا (وسط قاعدي) أدى إلى تغير لون الكاشف من الأصفر الباهت إلى اللون الوردي بمعنى أن ظهور اللون الوردي دليل على أن الإنزيم قام بعمله وأن النتيجة موجبة للأنزيم

- **النتيجة سلبية:**

يبقى لون الوسط الغذائي باللون الأصلي الأصفر، وهذا يعني أن الكائن الحي غير قادر على إنتاج الإنزيم.

سؤال المشاركة

- اذكر احد تطبيقات إنزيم اليوريز (انزيم نباتي) الاقتصادية؟

يساعد الخلية النباتية على اعادة تدوير النيتروجين من البروتينات المعقدة.

يستخدم في تحويل الامونيا الى نيتروجين في التربة

يستخدم في تركيب المبيدات الحشرية

تستخدم في صناعة اجهزة الكشف عن تلوث المياة بالمعادن الثقيلة بمساعدة اقطاب الذهب.

الكاتاليز Catalase

هو إنزيم منتشر في الكائنات الحية. تتضمن وظائفه تحفيز تحلل بيروكسيد الهيدروجين إلى ماء وأكسجين .يتميز كاتالاز عن باقي الإنزيمات بحصوله على أعلى معدلات إنقلاب؛ حيث يستطيع جزيء واحد فقط تحويل 83,000 جزيء من بيروكسيد الهيدروجين إلى ماء وأكسجين في الثانية.

ينتشر كتالاز في الأنسجة النباتية ومعظم الكائنات الهوائية وبعض الكائنات اختيارية اللاهوائية.

الطبيعة الكيميائية

الكتالاز من الإنزيمات الحديدوبورفيرينية. يتكون الكتالاز من مجموعتين؛ وحدة البروتين والمجموعة النشطة ، وهى مجموعة تعويضية تشبه هيموجلوبين الدم وتسمى الهيماتين .يرتبط البروتين بالمجموعة النشطة عن طريق المجاميع الكربوكسيل الموجودة به.

عندما يختلف مصدر الكتالاز فإن خصائصه ستختلف أيضاً ، مثل الوزن الجزيئي ونشاطه الخ.. والاختلافات بين نوع الكتالاز وغيره تكون في أساساً في تركيب البروتين وفي عدد المجاميع التعويضية (الهيماتين). وعن طريق تقدير كثافة الطيف التي تعود للبروتوهيماتين ومحتوى الإنزيم من الحديد ، وجد أن الكتالاز الحيواني يحتوي على 4 مجاميع نشطة (تعويضية) بينما الكتالاز النباتي يحتوي على مجموعة واحدة فقط.

يعتبر كاتالاز من رباعيات الوحدة ويتكون من أربع سلاسل من متعدد الببتيد ، كل سلسلة تحتوي على أكثر من 500 حمض أميني.

آلية العمل

السبب في تضمين الكتالاز في خانة المواد ذات الفعل الحفزي هو قدرته على تحليل فوق أكسيد الهيدروجين إلى ماء وأكسجين جزيئي. ولكي يتم هذا التفاعل فإنه يحتاج إلى جزيئين من فوق أكسيد الهيدروجين ، حيث يعمل الأول كمستقبل للإلكترونات والثاني كمعطي لها.

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

تثبيط الكتالاز

تعمل المركبات الحاجزة لحديد المجموعة الهيماتينية مثل السيانيد والأزايد والسلفايد والهيدروكسيل أمين على تثبيط جميع الإنزيمات الهيدربروتينية (المحتوية على الحديد) ومن ضمنها الكتالاز ، ويتميز الكتالاز بإنه يثبط من قبل مواد أخرى غير متخصصة مثل النيتريت وأيونات الكلور والخلات والفوسفات والكبريتات ، والسبب في ذلك هو مشاركة أو منافسة هذه الأيونات على الأماكن في حديد الإنزيم. كما تؤثر الأحماض على نشاط الكتالاز وتوقفه تماماً حتى عند التركيزات المنخفضة ، والسبب هو إن الحمض يحجز الهيدروكسيل (الخاص

بفوق أكسيد الهيدروجين) عن المركز النشط للإنزيم. ومثال على ذلك حمض الفورميك في تركيز منخفض (0,02 مولر).

الوظيفة البيروكسيدية لإنزيم الكتالاز

تحت التركيزات المنخفضة جداً من فوق أكسيد الهيدروجين (هيدروكسيد الهيدروجين) (لا تزيد عن 10 $^{-9}$مولر) ، يعمل الكتالاز على أكسدة الإيثانول والميثانول والفورمالدهيد والنيترات. وبذلك فإنه يشبه فعل إنزيمات أخرى مثل الكحول ديهيدروجينيز وزانثين أكسيداز وأكسيدات الأحماض الأمينية. ولكن سرعة الأكسدة تكون في هذه الحالة بطيئة مقارنة بالإنزيمات المتخصصة ، وإذا زادت نسبة هيدروكسيد الهيدروجين فإنه سوف يعمل على أكسدته ويتوقف عن أكسدة الكحول.

الدور الحيوي وتوضع إنزيم الكتالاز

يوجد لدى هيدروكسيد الهيدروجين تأثير سام عندما يزيد تركيزه في الخلية ، ولذلك فكتالاز هام جداً حيث يقوم بتحليل هيدروكسيد الهيدروجين الزائد في الخلية. وبالإضافة إلى ذلك فإنه يقوم بإمداد الأنسجة بالأكسجين الجزيئي حيث يصعب وصول ذلك الأكسجين إلى هذه الأنسجة.

نظائر الكتالاز

يوجد في النبات ما قد يصل إلى 5 نظائر في بعض الأنسجة ، وثلاث نظائر في الإندوسبرم.أما في الإنسان فيوجد هيئتين فقط وهما المرتبط بالجسيمات البروكسيمية والآخر ذائب. وتستعمل النسبة بين هذين في التعرف على بعض الأمراض في الإنسان.

المختبر السادس

تقدير البكتين في التمور

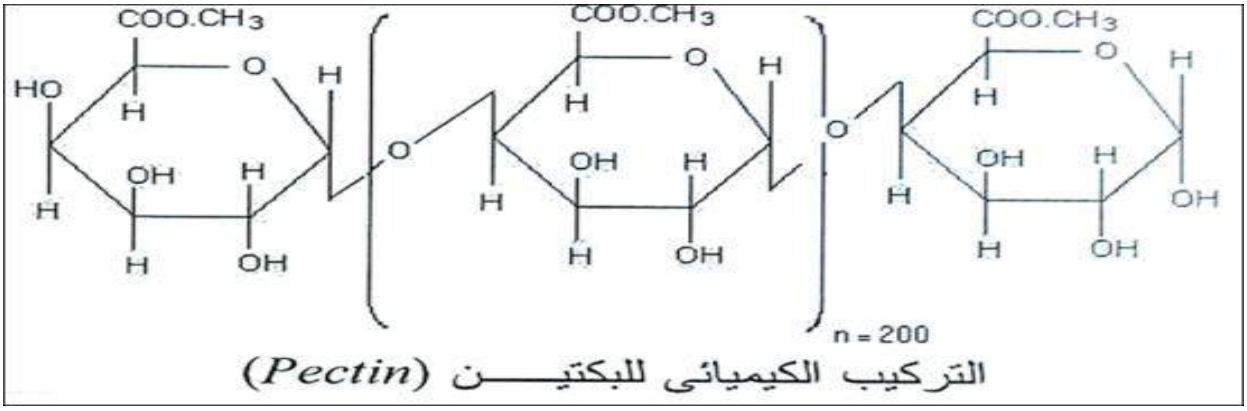
البكتين :

مركب كاربوهيدراتي ذو وزن جزيئي عالي معقد التركيب ويقسم الى

1- البروتوبكتين Protopectin هي المادة الاصلية غير الذائبة بالماء موجودة في حالة اتحاد مع السليلوز ويمكن تحللها من السليلوز وتحويلها الى مادة قابلة للذوبان وبكتين .

2- بكتين Pectin (حامض البكتينك Pectinic acid) مادة ذات وزن جزيئي عالي تكون تكون محلول غروي في الماء واهم مميزات البكتين قدرته على تكوين الجلي مع السكر والحامض تحت ظروف خاصة (لانه يحتوي على مجاميع استرات المثيل).

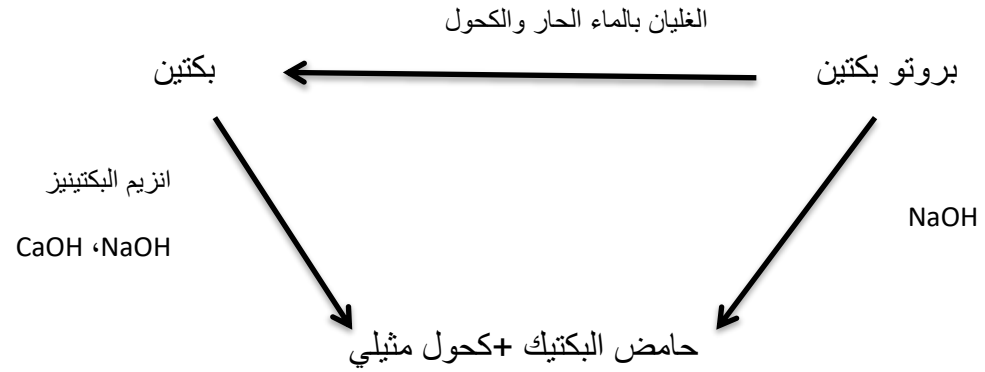
3- حامض البكتيك Pectic acid : يتكون من سلسلة من البولي كالاكترونيك اسد Polygalcturonic acid لايحتوي على مجاميع استرات المثيل . يكون الحامض مع السكر في الوسط الحامضي الجلي تحت ظروف مناسبة وبوجود العناصر المعدنية .



التركيب الكيميائى للبكتيـــــن (Pectin)

شكل اعلاه يلاحظ ان مجموعات الكاربوكسيل لجزيئات الحوامض المرتبطة بها يبقى قسماً منها طليقاً بينما يتحد القسم الاخر مع مجموعات المثيل استر فيتحلل في المحاليل الحامضية او القاعدية او بفعل الانزيمات الخاصة . مجموعات الكاربوكسيل طليقة لها القابيلة على الاتحاد مع الايونات الفلزية الموجبة الشحنه الموجودة في المحلول في المحلول فتتكون بكتات الكالسيوم (بوجود Ca) قليلة الذوبان في الماء لهذه الخاصية اهمية كبيرة في اذابة البكتين من عصير الفواكه

مخطط يوضح العلاقة بين المواد البكتينية وتأثير الانزيمات او الحوامض المخففة



طريقة العمل :

1. يؤخذ 50 غم تمر زهدي مقطع ومهروس منزوع النى والاقماع ويوضع في دورق زجاجي 800 مل ويضاف له 400 مل ماء مقطر .
2. تحدد علامة على مستوى الماء ويوضع على النار ويغلي لمدة ساعه وتوض الماء المتبخر في حالة نقصانة .
3. يترك المحلول ليبردوتنقل محتوياته الى دورق حجمي سعته 500 مل ويكمل الماء المقطر الى حد العلامة .
4. يرج جيدا ويرشح ويجمع الراشح في دورق مخروطي سعته 500 مل .
5. يسحب من الراشح 100 مل بوساطة ماصة وتوضع في دورق زجاجي سعته 800 مل ويضاف 300 مل ماء مقطر وبعد ذلك يضاف 10 مل (NaOH) N1 ويحرك جيدا ويترك لليوم التالي اضافة القاعدة لحدوث تحويل البكتين الى بكتات الصوديوم او البوتاسيوم في حالة ضافة KOH .
6. يضاف 50 مل حامض الخليك 1N مع التحريك الجيد الى المحلول المتروك لليوم التالي من اليوم الاسبق ويترك لمدة 5 دقائق ثم يضاف 25 مل(CaCL)N1 مع التحريك المستمر ويترك لمدة ساعه واحدة لغرض تكوين حامض البكتيك يضاف الحامض لتكوين بكتات الكالسيوم المترسبة يضاف CaCL
7. يسخن المحلول لدرجة الغليان لمدة 1 دقيقة ويرشح المحلول وهو ساخن لسهولة فصل الراسب توزن ورقة الترشيح قبل الترشيح .
8. يغسب الراسب بالماء المقطر مع استمرار الغسل حتى يتم التخلص من ايونات الكلوريد يمكن التأكد من وجودة بوساطه نترات الفضة وفي حالة وجوده يظهر راسب ابيض .
9. تنقل ورقة الترشيح الى فرن حراري على درجة 100مْ لمدة 4 ساعات ثم يبرد في desicator ويؤخذ الوزن الثابت وتطبق المعادلة

$$\%\text{wet Pectin} = \frac{\text{wt of Pectin}}{\text{wt of sample}} \times 100$$

$$\%\text{dry Pectin} = \frac{\text{wt of Pectin}}{\text{wt of sample - wt of } H_2O} \times 100$$

المصادر:

المظفر ،عدنان وهاب (2019) .تكنولوجيا التمور والسكر ،رقم الايداع في دارالكتب والوثائق بغداد 5533 لسنة 1029، 450ص .

العكيدي، حسن خالد 2009 -2010 . نخلة التمر - سيدة الشجر ودرة الثمر. آمنة للنشر والتوزيع . المملكة الاردنية الهاشمية

مجموعه من المصادر الالكترونية الحديثة ، الكتاب المنهجي للمرحلة الرابعه

جامعة الملك سعود
كلية العلوم
قسم الكيمياء الحيوية

كيمياء حيوية عامة (101 كيح)

الإنزيمات ENZYMES

تعريف وخصائص الإنزيمات

- هي عوامل مساعدة أو محفزات بيوكيميائية
- تعمل علي تخفيض طاقة التنشيط المطلوبة لبداية التفاعل
- لا تؤثر علي ثابت الإتزان في التفاعل
- لا تؤثر علي تغيرات الطاقة الحرة للتفاعل
- لا تستهلك أثناء التفاعل
- تزيد من معدل سرعة التفاعل إلي حوالي 10^{14}
- بروتينية التركيب

تسمية الإنزيمات وتصنيفها

تصنيف قديم ليس له دلالة (تريبسين trypsin – ببسين pepsin)

تصنيف حديث بإضافة مقطع ase إلى اسم مادة التفاعل

(ليباز lipase– أميلاز amylase – يورييز urease)

تصنيف الإتحاد الدولي للكيمياء الحيوية IUB:

تقسم فيه الإنزيمات إلى 6 أصناف حسب نوع التفاعل

يقسم كل قسم إلى أقسام فرعية مرقمة بأربع أرقام لكل إنزيم

الرقم الأول يدل على الصنف (1-6)

الرقم الثاني يدل على المجموعات التي تضاف أو تحذف

الرقم الثالث يدل على المرافق الإنزيمي أو المجموعة المتقبلة للمواد

الرقم الرابع يدل على نوع مادة التفاعل

1- إنزيمات الأكسدة والإختزال Oxidoreductases:

- انتقال إلكترونات من مادة مختزلة إلى مادة مؤكسدة
- مثال1: إنزيمات التنفس والأكسدة الحيوية
- مثال 2: إنزيمات نزع الهيدروجين من الكحولات
- يتم نقل 2 ذرة هيدروجين و 2 إلكترونين المادة من المختزلة (الكحول) إلى المادة المؤكسدة (المرافق الإنزيمي)

$$CH_3CH_2OH + NAD \rightleftharpoons CH_3CHO + NADH_2$$

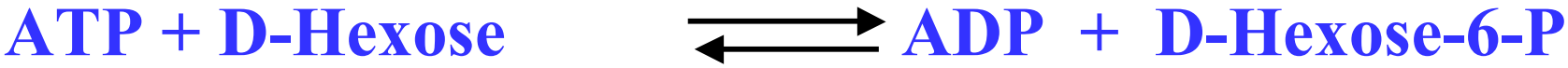
E.C. 1.1.1.1 Alcohol:NAD Oxidoreductase

- مثال 3: إنزيمات نزع الهيدروجين من الأمين
- يتم نزع ذرة هيدروجين من الجلوتامات إلى المادة المؤكسدة (المرافق الإنزيمي)

E.C. 1.4.1.3 Glutamate: NAD(P) Oxidoreductase

2- الإنزيمات الناقلة Trasferases:

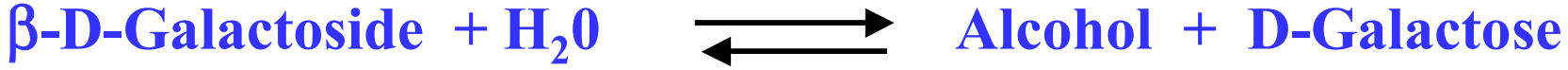
- انتقال مجموعة كيميائية من مركب لآخر
- مثل نقل ذرة كربون أو مجوعات كيتونية أو ألدهيدية أو مجموعات محتوية على فوسفور أو كبريت.
- مثال 1:



E.C. 2.7.1.1 ATP:D-Hexose-6-Phosphotransferase (Hexokinase)

مثال 2: إنزيمات مجموعة الأمين Transaminases

- **3- إنزيمات التحلل المائي Hydrolases:**
- تحلل الروابط بإضافة OH ‘ H على طرفي الرابطة
- مثال1: إنزيمات تحلل الرابطة الجلايكوزيدية



E.C. 3.2.1.23 β-D-Galactoside galactohydrolase

- مثال2: إنزيم ليباز الذي يحلل الجليسيريدات الثلاثية مائياً إلى جليسيرول وأحماض دهنية

E.C. 3.1.3.1 Glycerol ester hydrolase (Lipase)

E.C. 3.2.1.26 β-D-Fructofuranoside fructohydrolse (Sucorase)

- **4- إنزيمات التفكك Lyases:**
- تفكيك المركب ونشوء رابطة مزدوجة والتفاعلات العكسية لها
- مثال1: إنزيمات تحلل الرابطة الجلايكوزيدية

$$HOOC\text{-}CH_2\text{-}CHOH\text{-}COOH \rightleftharpoons HOOC\text{-}CH{=}CH\text{-}COOH + H_2O$$

E.C. 4.1.2.1 L- Malate Hydrolyase (Fumarase)

- مثال2: إنزيم ألدولاز الذي يحلل الكيتوز فوسفات إلى ثنائي هيدروكسي أسيتون فوسفات + الدهايد

Ketose 1-Phosphate ⇌ Dihydroxy Acetone Phosphate + Aldehyde

E.C. 4.1.2.7 Ketose 1-Phosphate Aldehydelyase (Aldolase)

• 5- إنزيمات التماكب Isomerases:

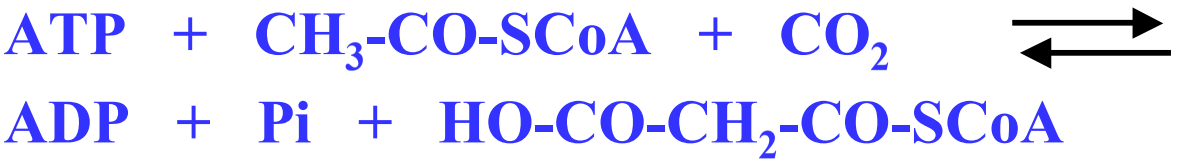
- وهي إنزيمات تحول المركبات إلى مماكبات سواء تماكب موضعياً أو هندسياً أو ضوئياً

E.C. 5.2.1.3 All Trans Retinene 11-Cis-Trans Isomerase (Retinene Isomerase)

- مثال2: إنزيمات تحويل السكر الألدهيدي إلى كيتوني مثل ألدو كيتو آيزوميراز

E.C. 5.3.1.1 D-Glyceraldehyde 3-Phosphate Ketol Isomerase

- **6- الإنزيمات الصانعة Ligases:**
- تربط بين مركبين ونشوء رابطة بين C-C, C-N, C-O, C-S



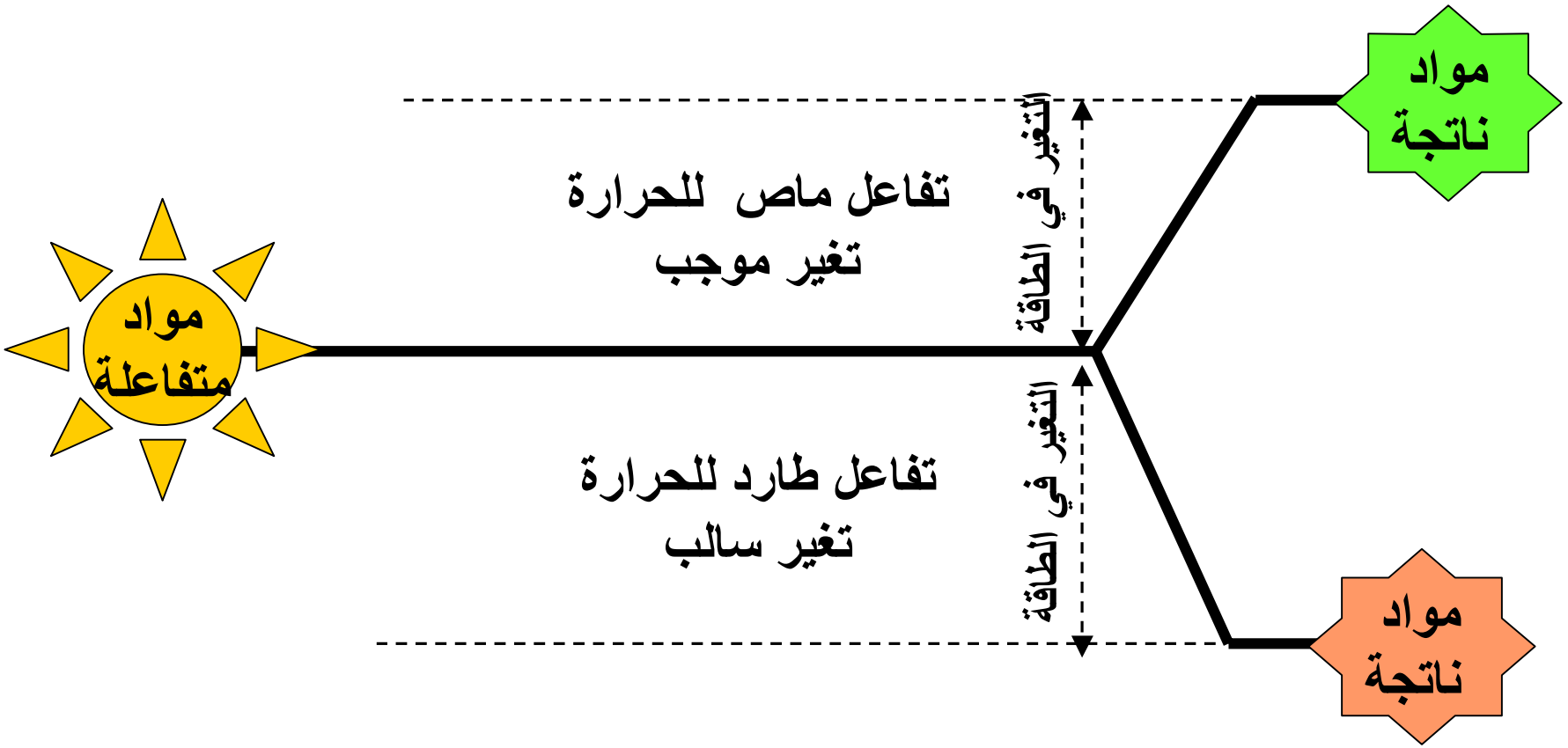
E.C. 6.4.1.2 Acetyl CoA: CoA CO_2 Ligase
(Acetyl Co carboxylase)

النظرية الحركية للتفاعلات

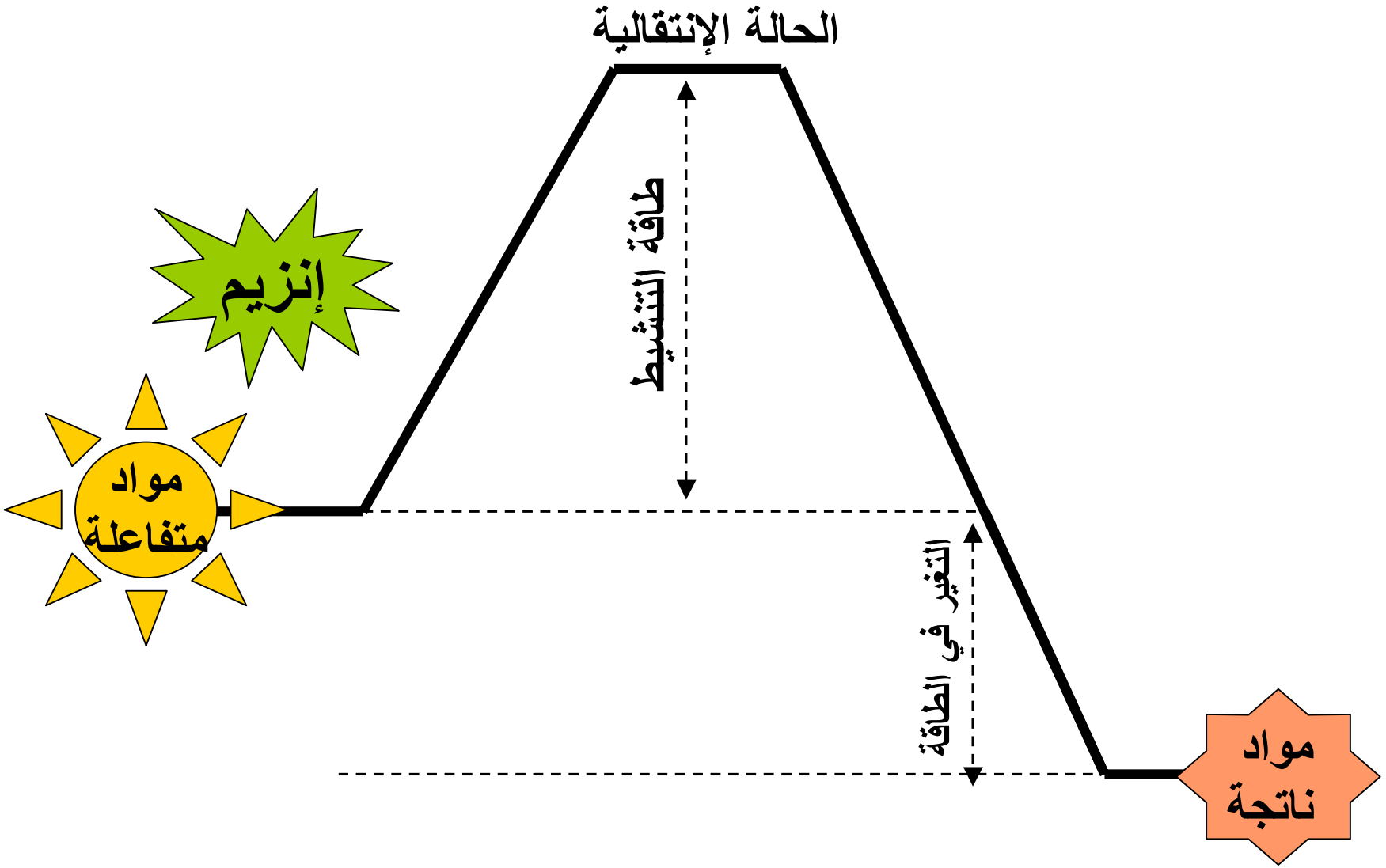
$$HCl + NaOH \longrightarrow H_2O + NaCl$$

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + \Delta G^0$$

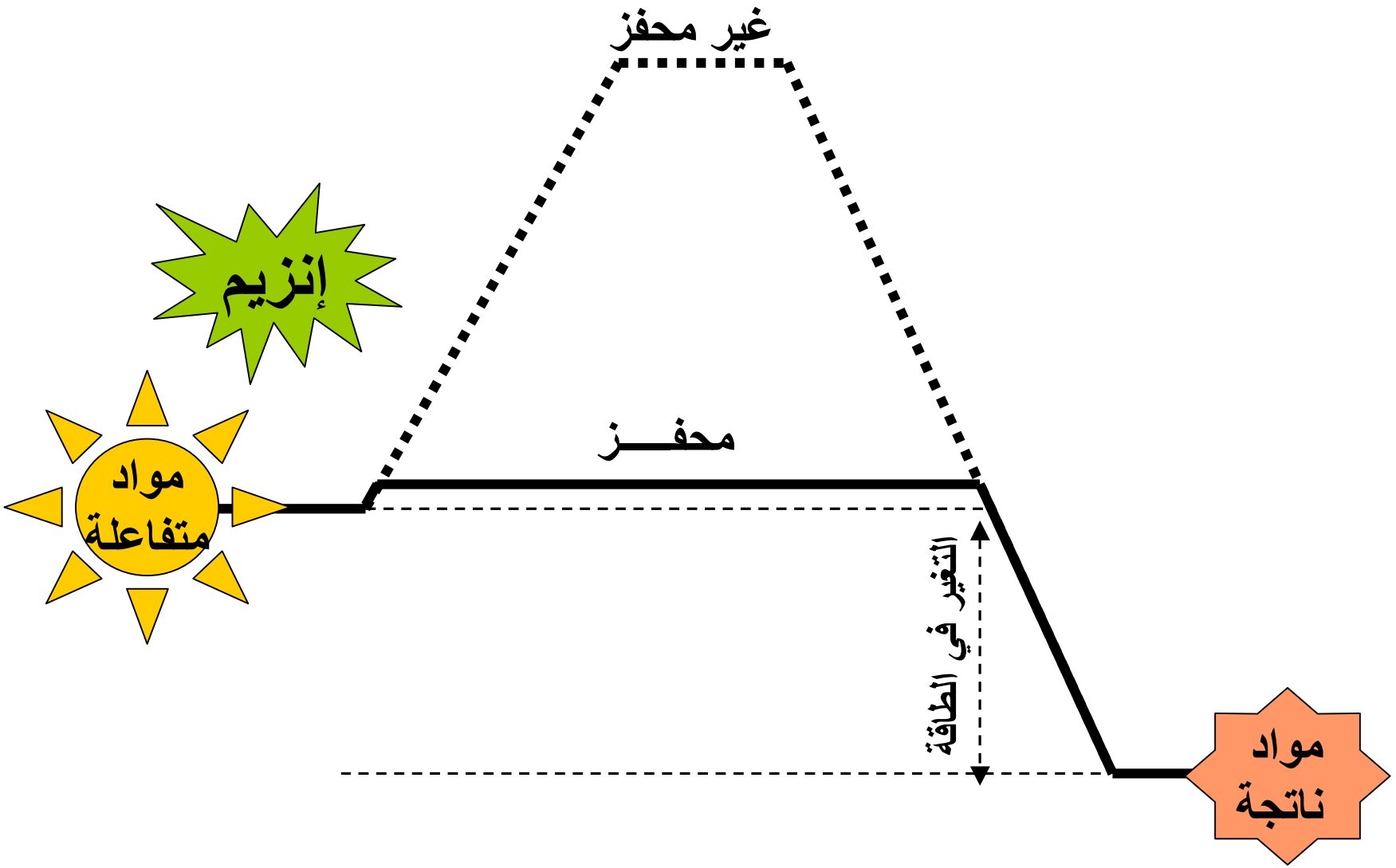
تغيرات الطاقة في التفاعلات الكيميائية



تغيرات الطاقة في التفاعلات الكيميائية



تغيرات الطاقة في التفاعلات الكيميائية



تعريفات

التغير القياسي للطاقة الحرة

هو الفرق بين طاقة المواد الداخلة في التفاعل وطاقة المواد الناتجة منه

طاقة التنشيط

هي الطاقة اللازمة لبدء التفاعل حيث تنقل المواد المتفاعلة إلي مستوي طاقة يكفي لتحويل المواد المتفاعلة إلي نواتج مروراً بحالة إنتقالية مؤقتة

هي الفرق بين مستوي الطاقة للمواد المتفاعلة ومستواها في المرحلة الإنتقالية

تعريفات

وحدة قياس النشاط الإنزيمي

كمية الإنزيم التي يمكنها تحويل 1 ميكرومول من مادة التفاعل إلي نواتج في الدقيقة الواحدة عند الظروف المثلي لعمل الإنزيم (درجة الحرارة وتركيز الأس الهيدروجيني وتركيز مادة التفاعل)

النشاط النوعي للإنزيم

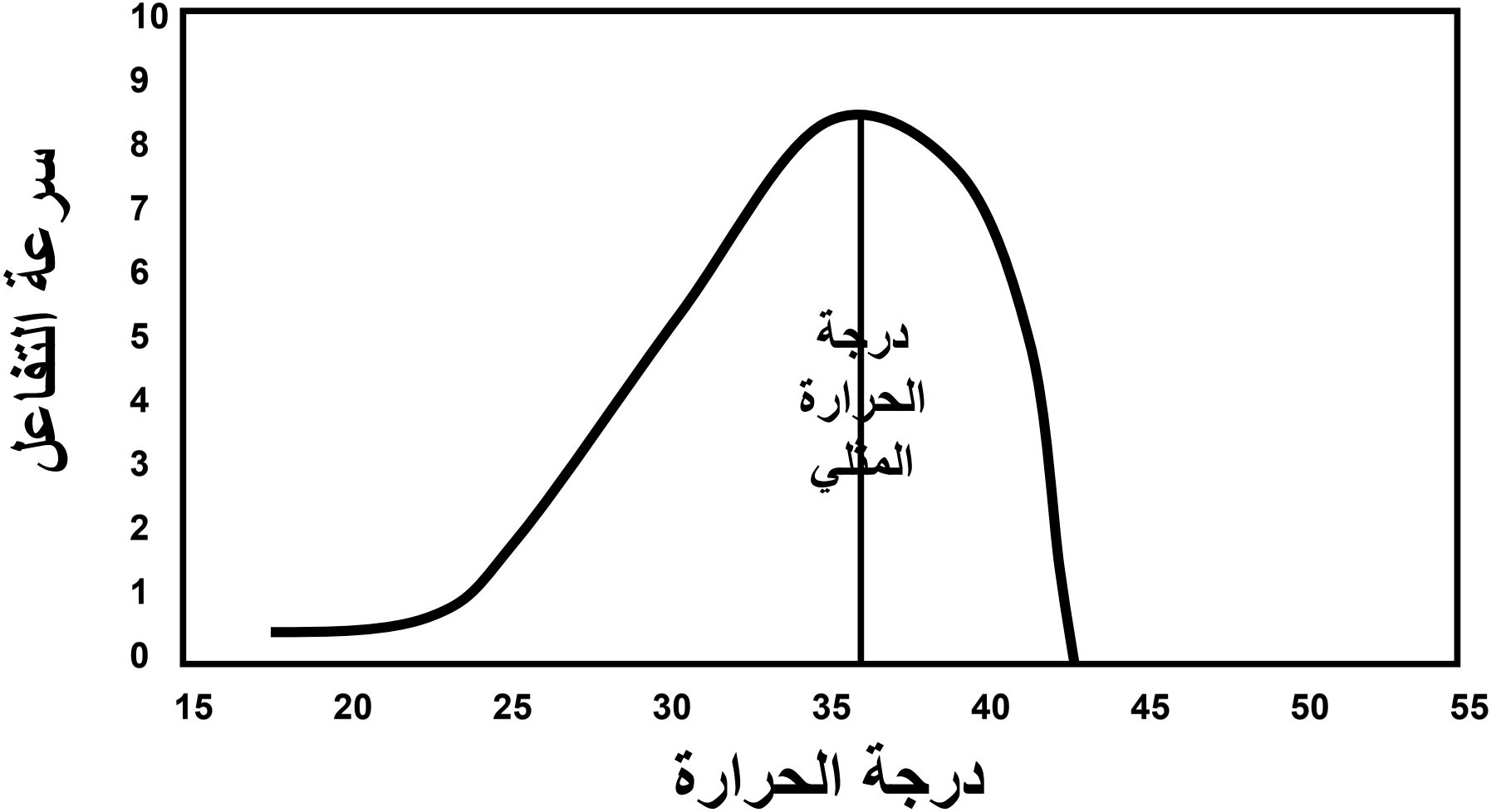
عدد وحدات الإنزيم الموجودة في الملليجرام بروتين

العوامل المؤثرة علي سرعة التفاعل الإنزيمي

1- درجة الحرارة
2- الأس الهيدروجيني
3- تركيز الإنزيم
4- تركيز المواد المتفاعلة

إنزيم + مواد متفاعلة <----- إنزيم + مواد ناتجة

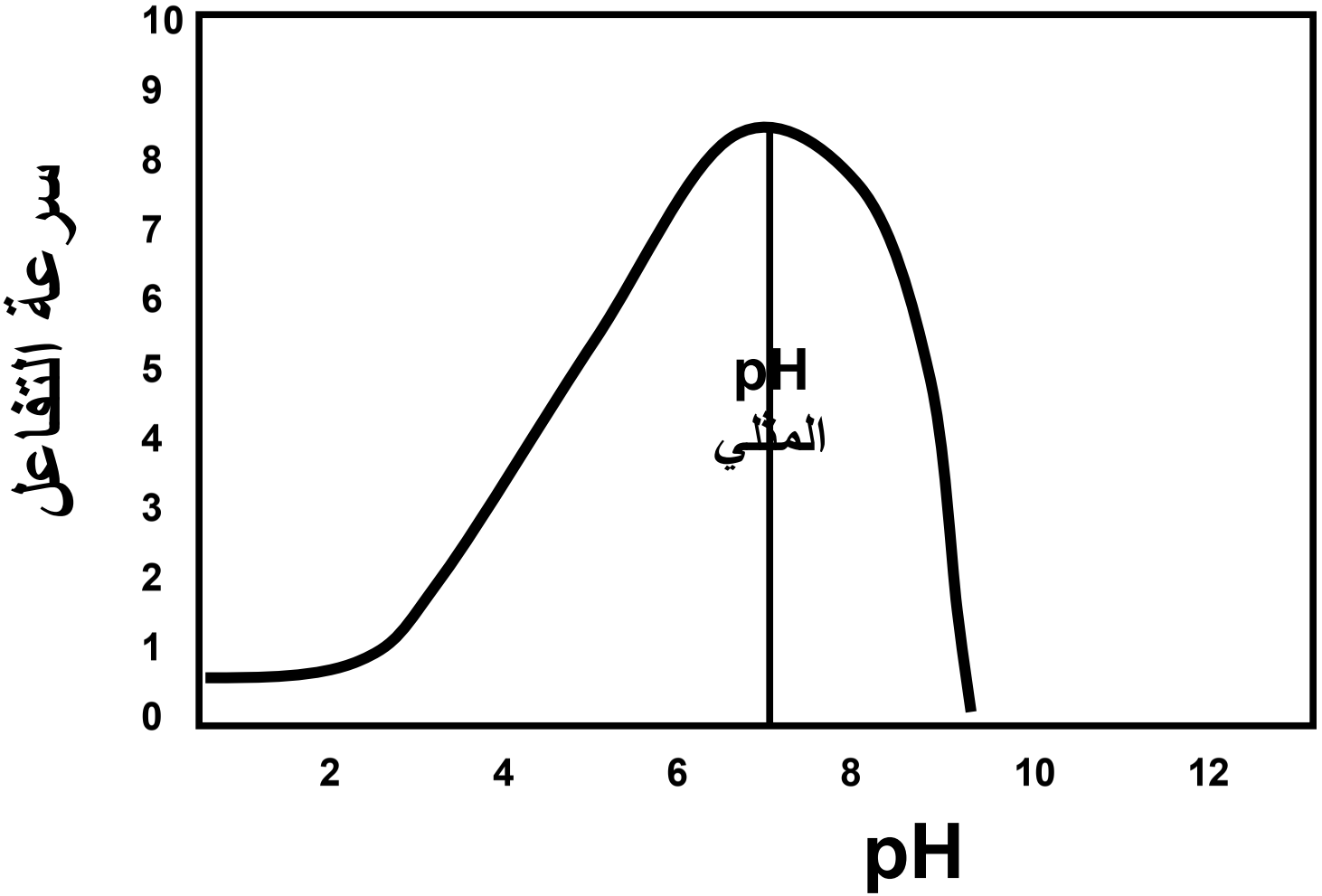
درجة الحرارة
Temperature



درجة الحرارة
Temperature

- لكل إنزيم درجة حرارة مثلي عندها يكون نشاط الإنزيم أعلي ما يمكن.
- يزداد نشاط الإنزيم بزيادة درجة الحرارة حتي حد معين بعدها يبدأ النشاط في الإنخفاض حتي ينعدم نظراً لتغير تركيب الإنزيم الطبيعي بسبب الحرارة العالية

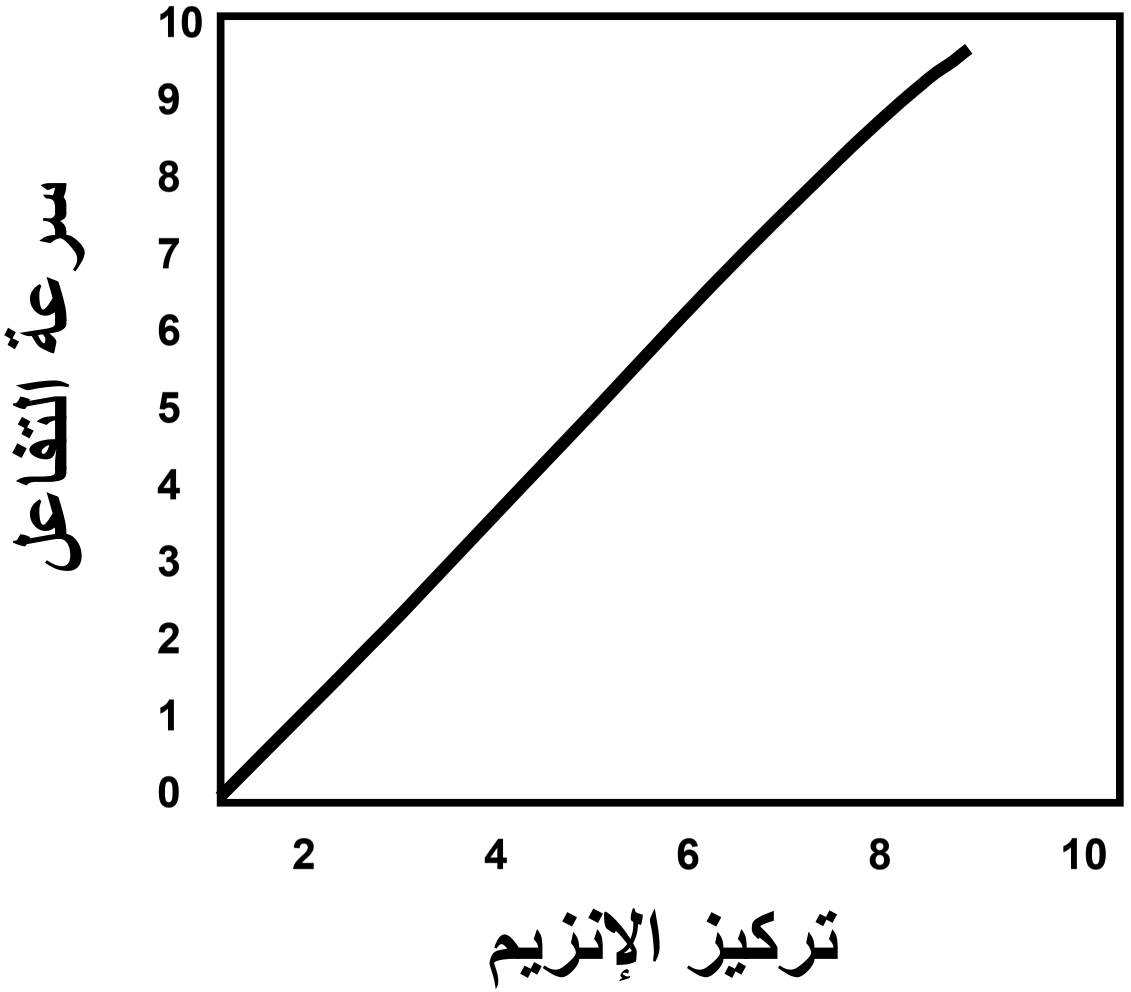
الأس الهيدروجيني



الأس الهيدروجيني pH

- لكل إنزيم درجة pH مثلي عندها يكون نشاط الإنزيم أعلي ما يمكن.
- يزداد نشاط الإنزيم بزيادة pH حتي حد معين بعدها يبدأ النشاط في الإنخفاض حتي ينعدم نظراً لتغير تركيب الإنزيم الطبيعي بسبب الـ pH البعيدة عن الظروف الفيسيولوجية للإنزيم

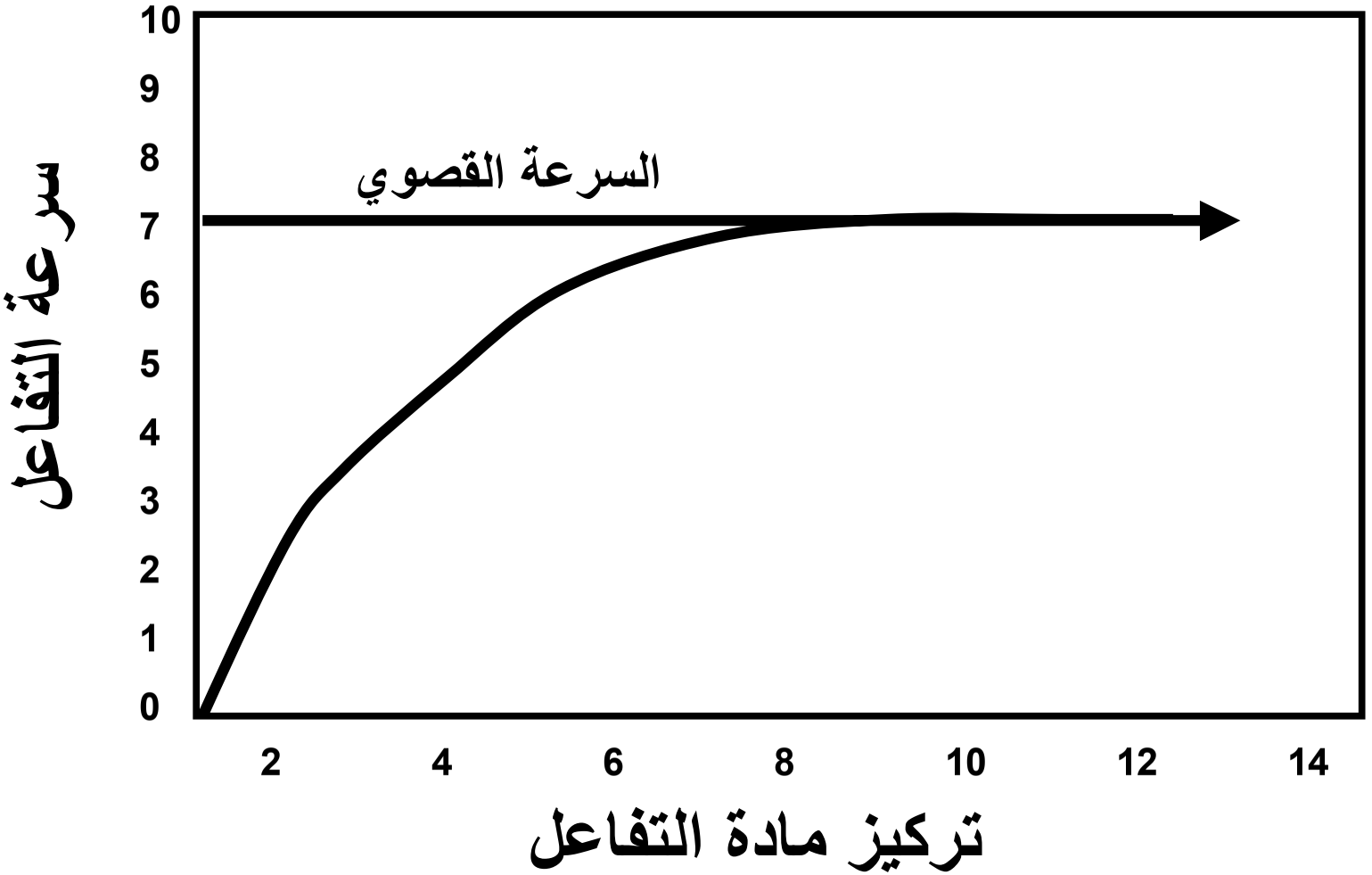
تركيز الإنزيم Enzyme concentration



علاقة طردية

تزداد سرعة التفاعل بزيادة تركيز الإنزيم زيادة طردية

تركيز مادة التفاعل
Substrate concentration

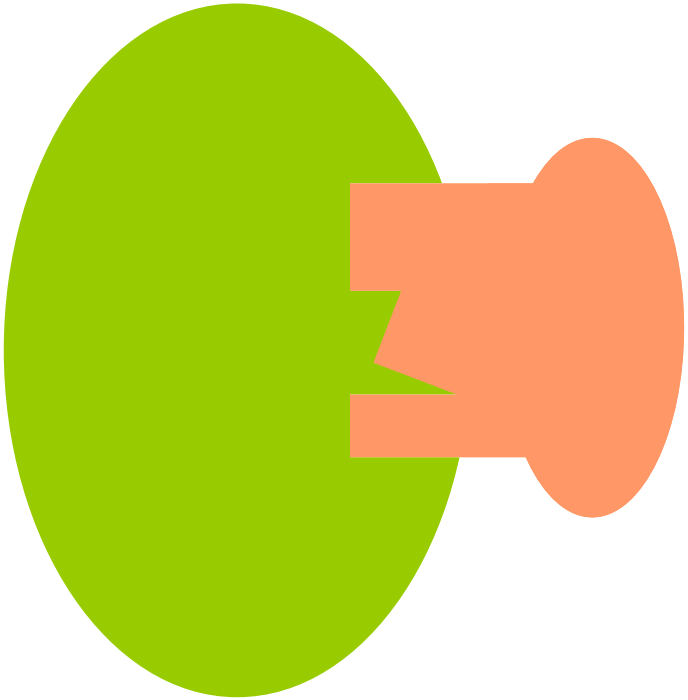


تركيز مادة التفاعل
Substrate concentration

- يزداد نشاط الإنزيم بزيادة تركيز مادة التفاعل.

- كلما زاد تركيز مادة التفاعل زادت سرعة التفاعل حتي حد معين وبعد ذلك تثبت سرعة التفاعل نظراً لعدم توفر إنزيمات حرة لإنجاز مزيد من التفاعلات.

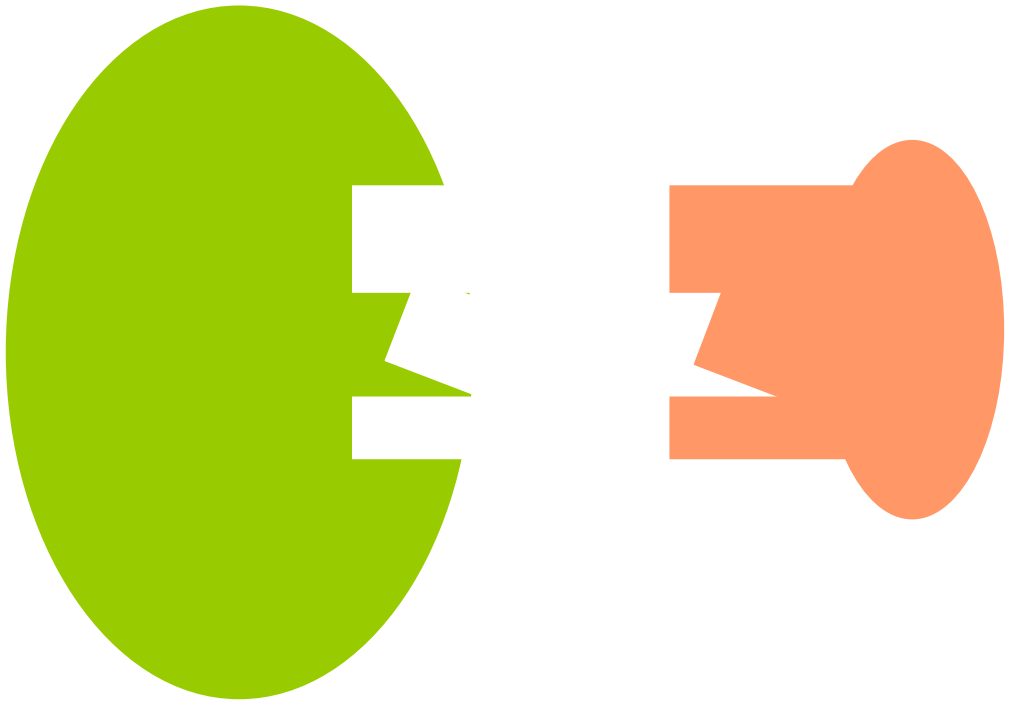
آلية عمل الإنزيم Enzyme mechanism



1- نظرية القفل والمفتاح

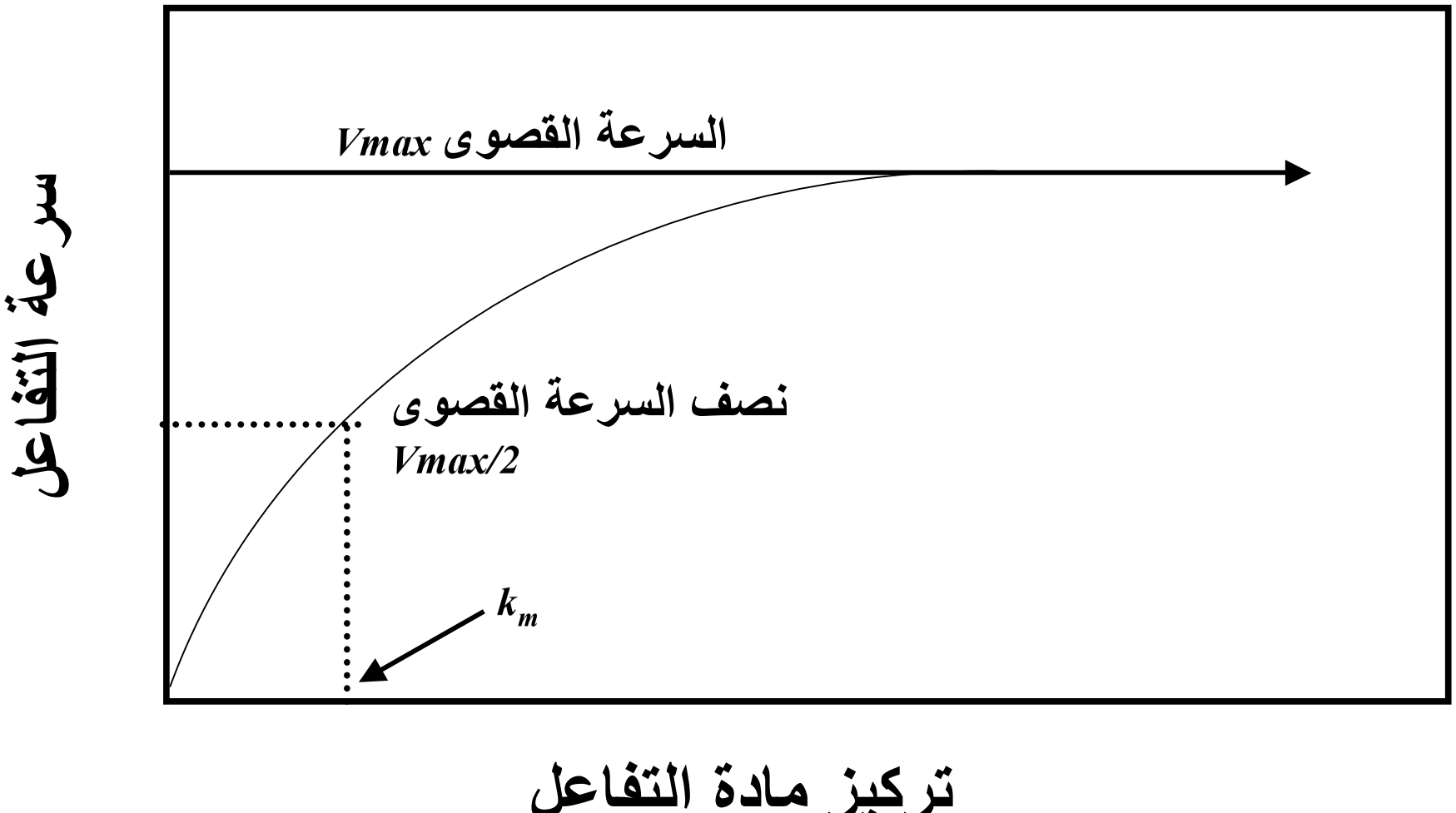
آلية عمل الإنزيم Enzyme mechanism

2- نظرية التوافق المستحث

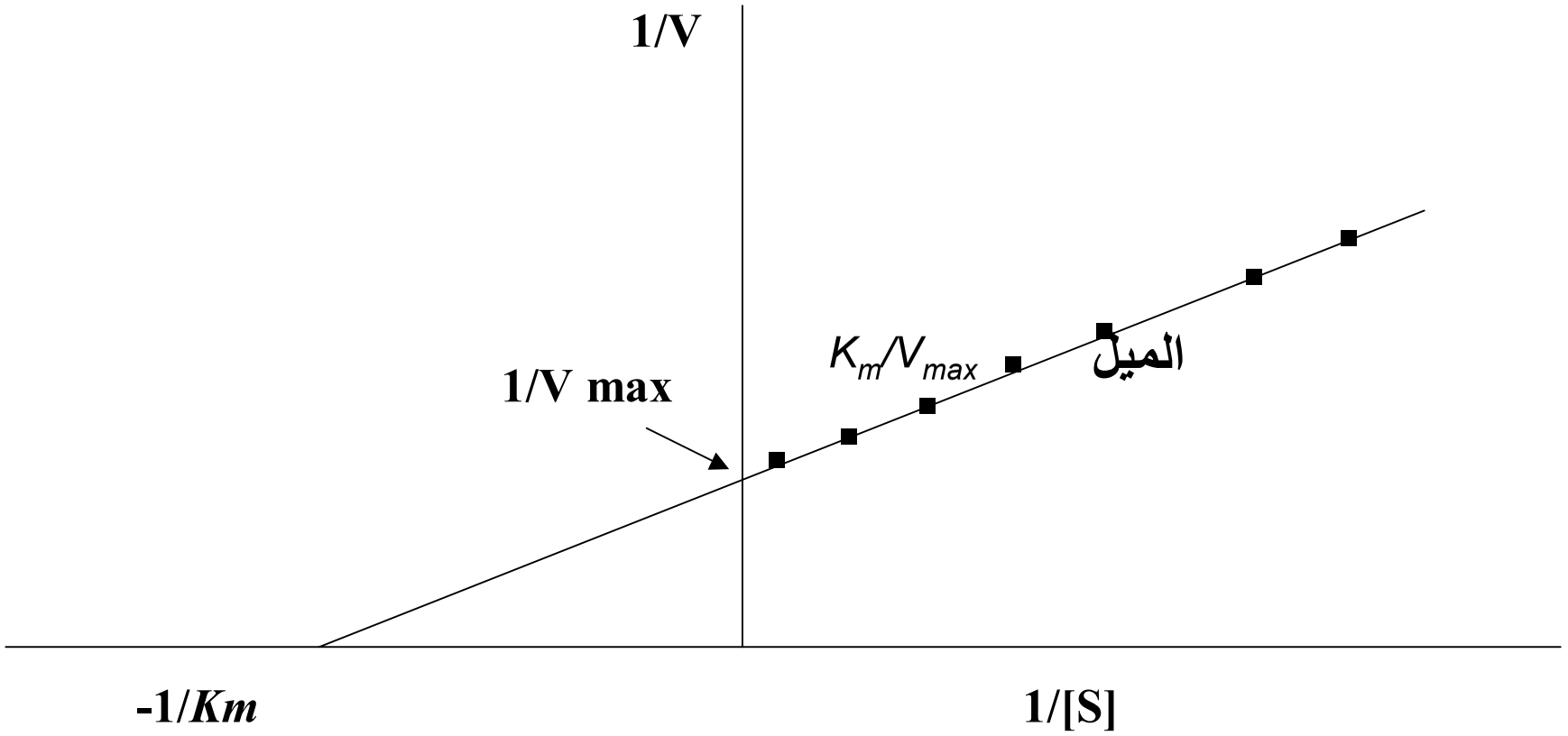


إنزيم

مادة التفاعل


السرعة القصوى Vmax
نصف السرعة القصوى
Vmax/2
k_m
سرعة التفاعل
تركيز مادة التفاعل

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$$



تركيب الإنزيمات Enzyme structure

بروتينية التركيب وبعضها يحتوي علي مجموعات غير بروتينية مثل الكربوهيدرات

1- إنزيمات بسيطة

2- إنزيمات مركبة

3- معقدات الإنزيمات

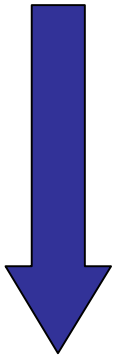
4- أيزوإنزيمات

تنشيط الإنزيمات Enzyme activation

1- بواسطة المرافق الإنزيمي
2- بواسطة فقد جزء من البروتين

التنشيط بواسطة المرافق الإنزيمي

الجزء البروتيني (غير نشط) + المرافق لإنزيمي (غير نشط)



الإنزيم النشط

التنشيط بفقد جزء من البروتين

الزيموجينات أو البروإنزيمات

هي مولدات الإنزيم وتكون فيه السلسلة الببتيدية المكونة للإنزيم تحتوي علي جزئ ببتيدي إضافي يتم حذفه عند تنشيط الإنزيم.

مثال: الببسينوجين ----> ببسين + ببتيد

التربسينوجين ----> تربسين + ببتيد

مثبطات الإنزيمات Enzyme inhibitors

1- تثبيط تنافسي Competitive inhibition

2- تثبيط لاتنافسي Non-competitive inhibition

3- تثبيط غير تنافسي Uncompetitive inhibition

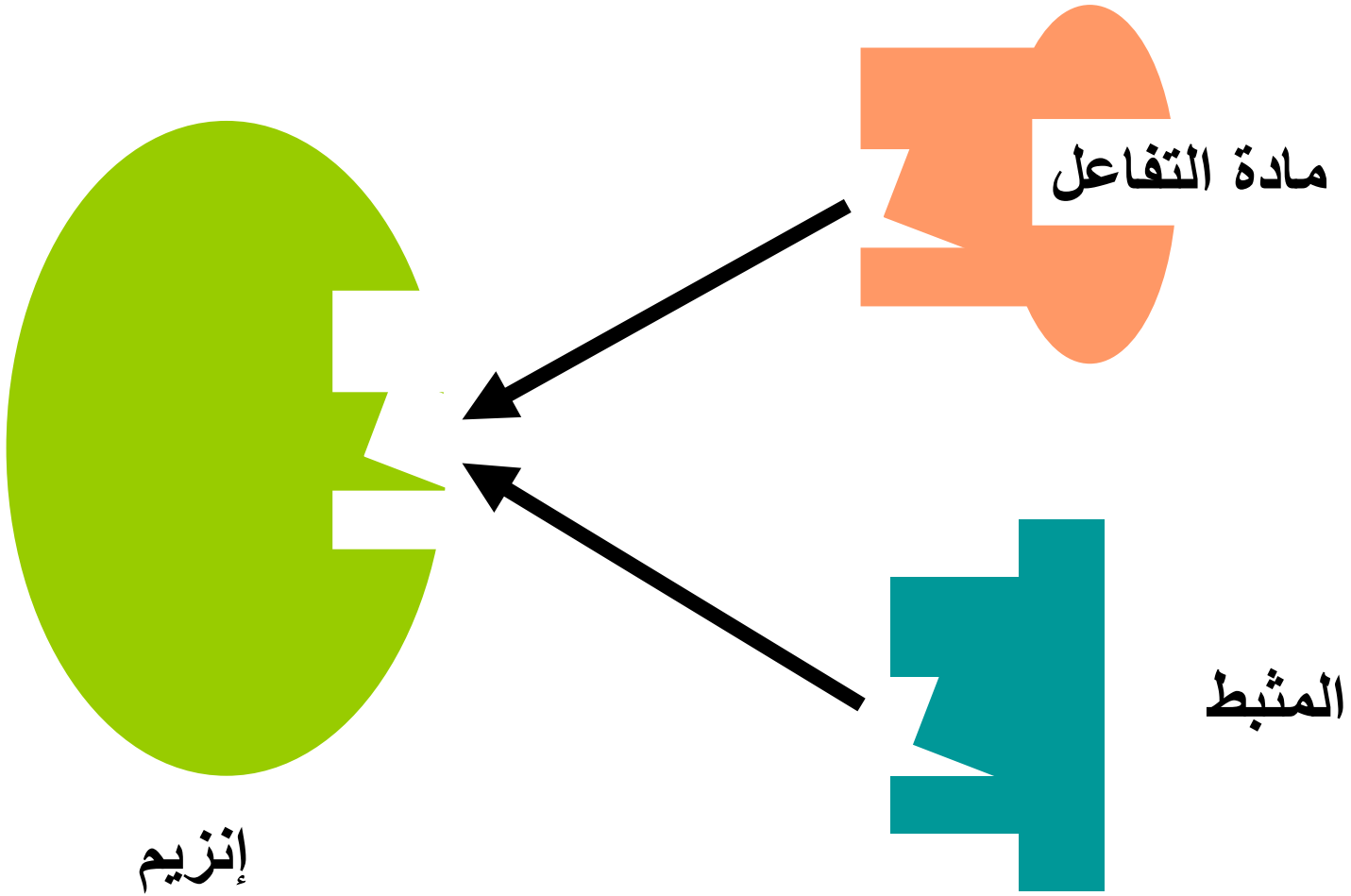
4- تثبيط التغذية المرتدة Feed-Back inhibition

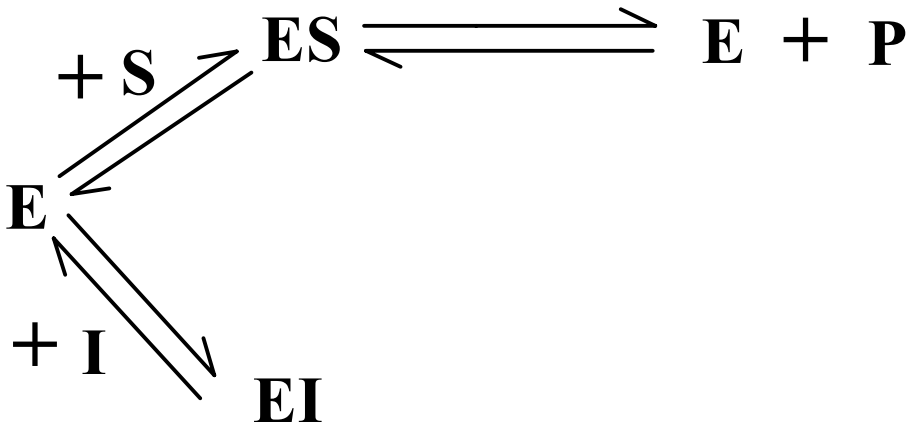
5- تثبيط غير عكسي Irriversible inhibition

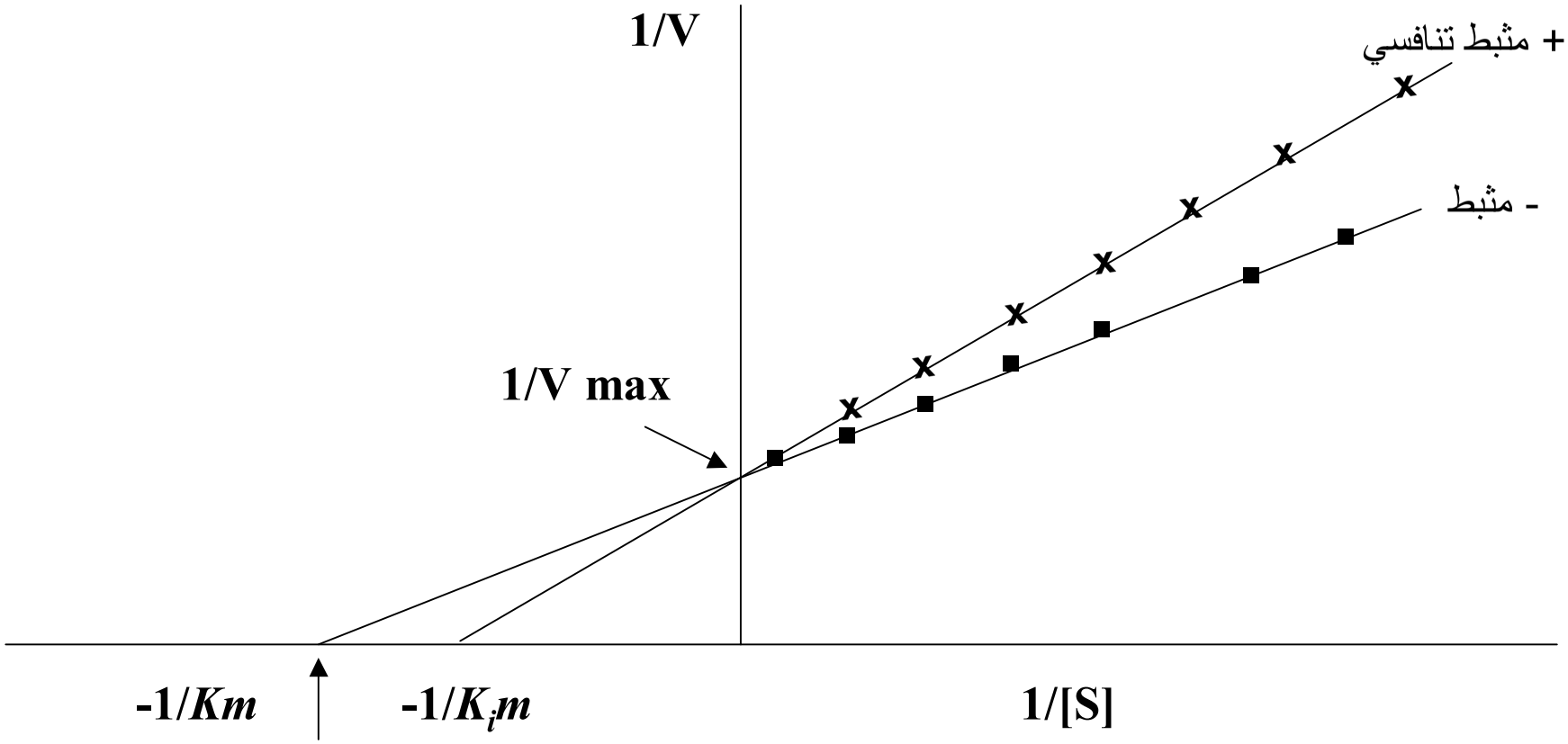
مثبطات الإنزيمات Enzyme inhibitors

1- تثبيط تنافسي

وفيه يتحد المثبط بنفس مكان إرتباط مادة التفاعل فينافسها في ذلك الموضع ويتم التغلب علي هذا التثبيط بزيادة تركيز مادة التفاعل


مادة التفاعل
المثبط
إنزيم


ES
E + P
+ S
E
+ I
EI

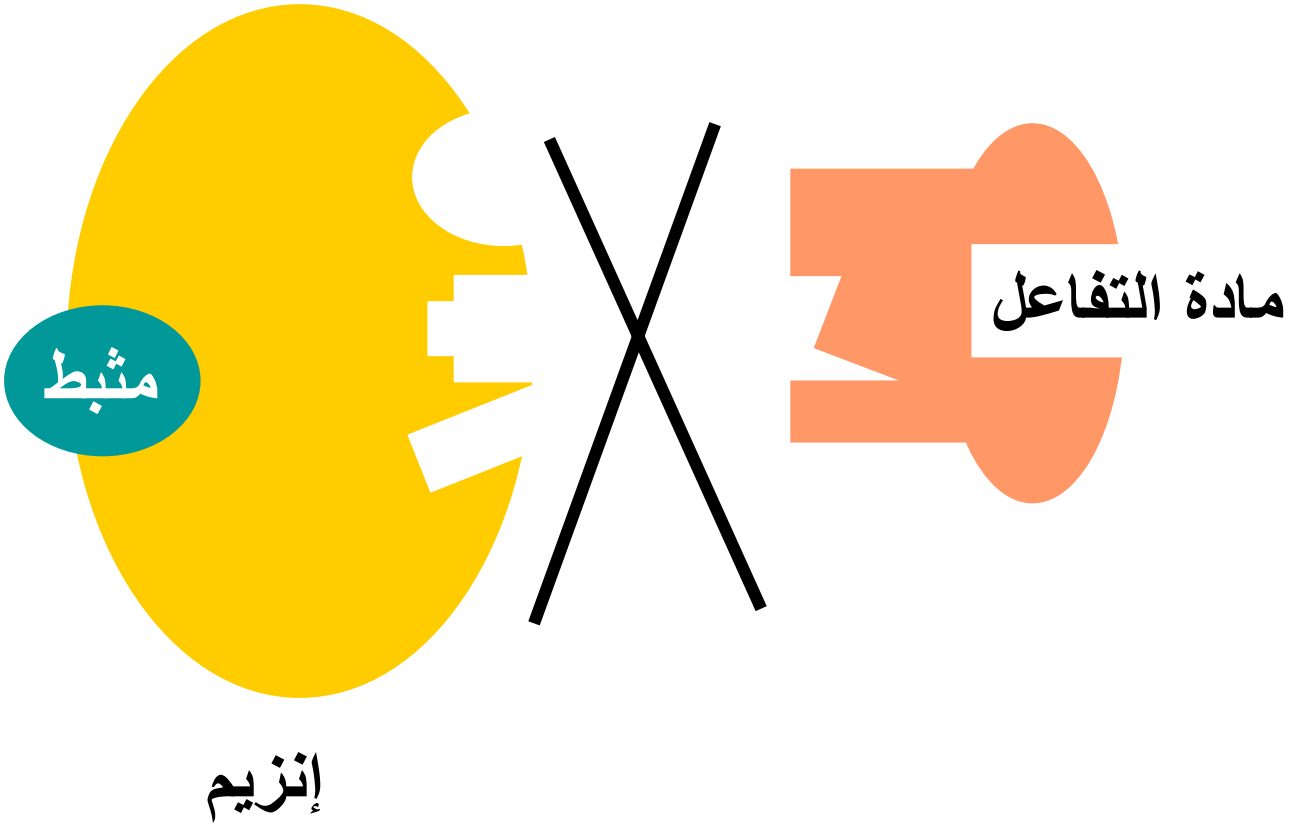

1/V
+ مثبط تنافسي
- مثبط
1/V max
-1/Km
-1/Kim
1/[S]

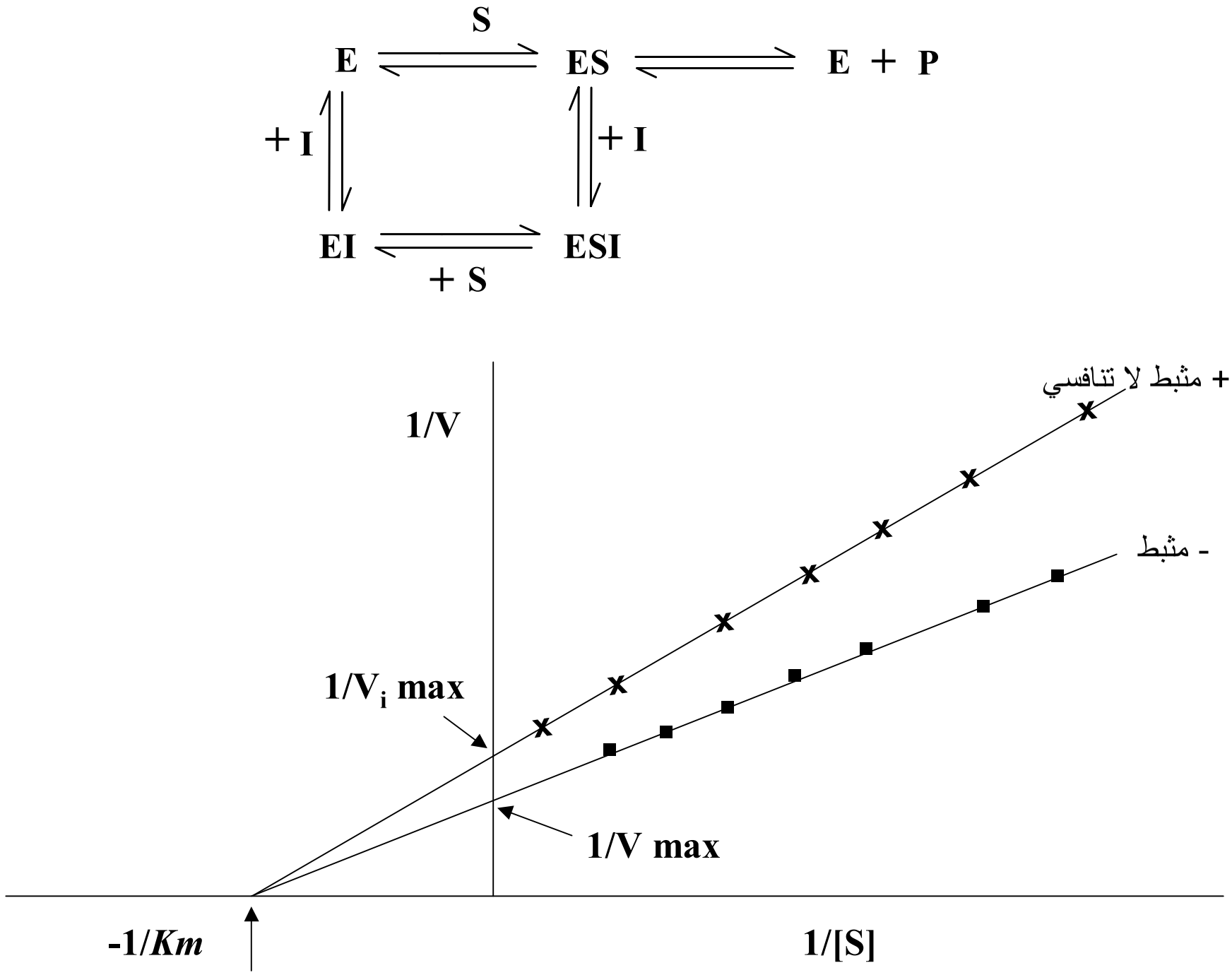
2- تثبيط لاتنافسي

Non-competitive inhibition

وفيه يتحد المثبط بالإنزيم في موقع مختلف عن مكان إرتباط مادة التفاعل. فهو بالتالي لا ينافسها. ويعتمد التثبيط علي أن المثبط يغير من شكل الإنزيم في الفراغ وبالتالي موقع إتصال مادة التفاعل

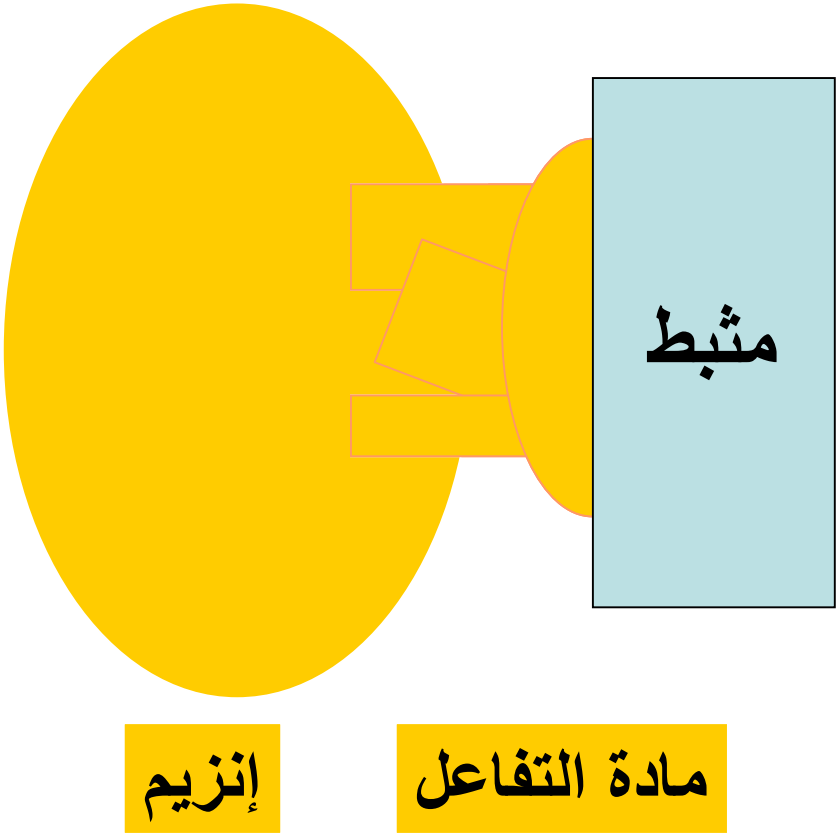
2- تثبيط لاتنافسي

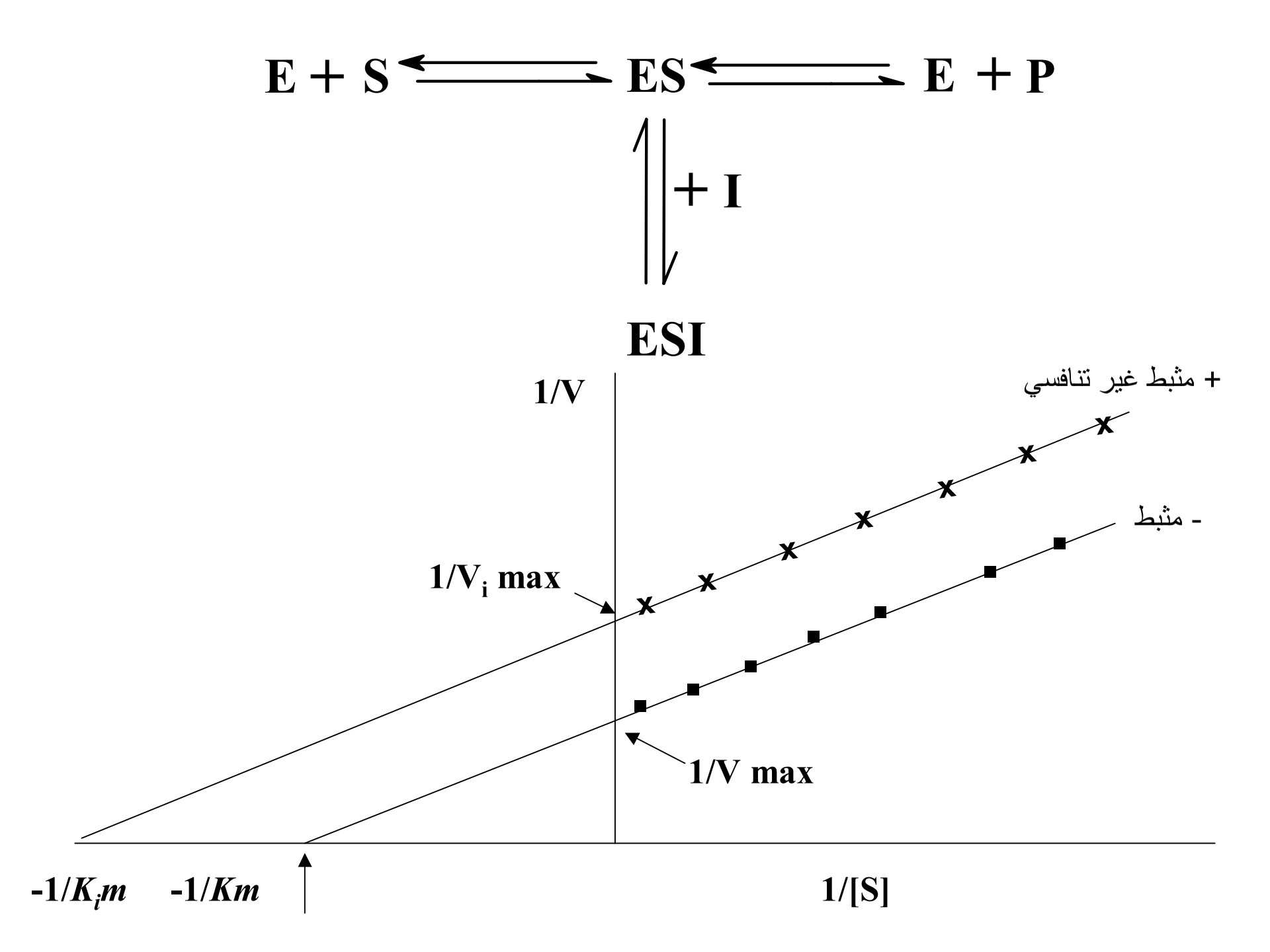



S
E
ES
E + P
+ I
+ I
EI
ESI
+ S
+ مثبط لا تنافسي
- مثبط
1/V
1/V_i max
1/V max
-1/Km
1/[S]

3- تثبيط غير تنافسي

وفيه يتحد المثبط بمادة التفاعل بعد إتحادها بالإنزيم
فيمنع الإنزيم من تحويل مادة التفاعل إلي نواتج

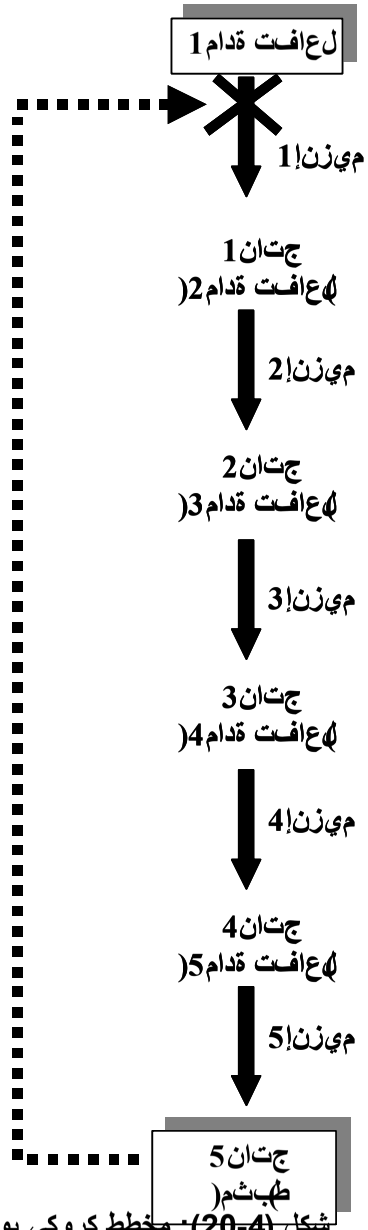



E + S
ES
E + P
+ I
ESI
1/V
+ مثبط غير تنافسي
- مثبط
1/V_i max
1/V max
-1/K_im
-1/Km
1/[S]

مثبطات الإنزيمات Enzyme inhibitors

4- تثبيط التغذية المرتدة Feed-Back inhibition

هو تثبيط لا تنافسى ولكن المثبط هو أحد نواتج التفاعل الإنزيمي الذي إن زاد عن حد ما يقوم بتقليل سرعة التفاعل عن طريق تثبيطه للإنزيم



شكل (4-20): مخطط كروكي يوضح تثبيط الإنزيم بالتغذية المرتدة.

مثبطات الإنزيمات Enzyme inhibitors

5- تثبيط غير عكسي

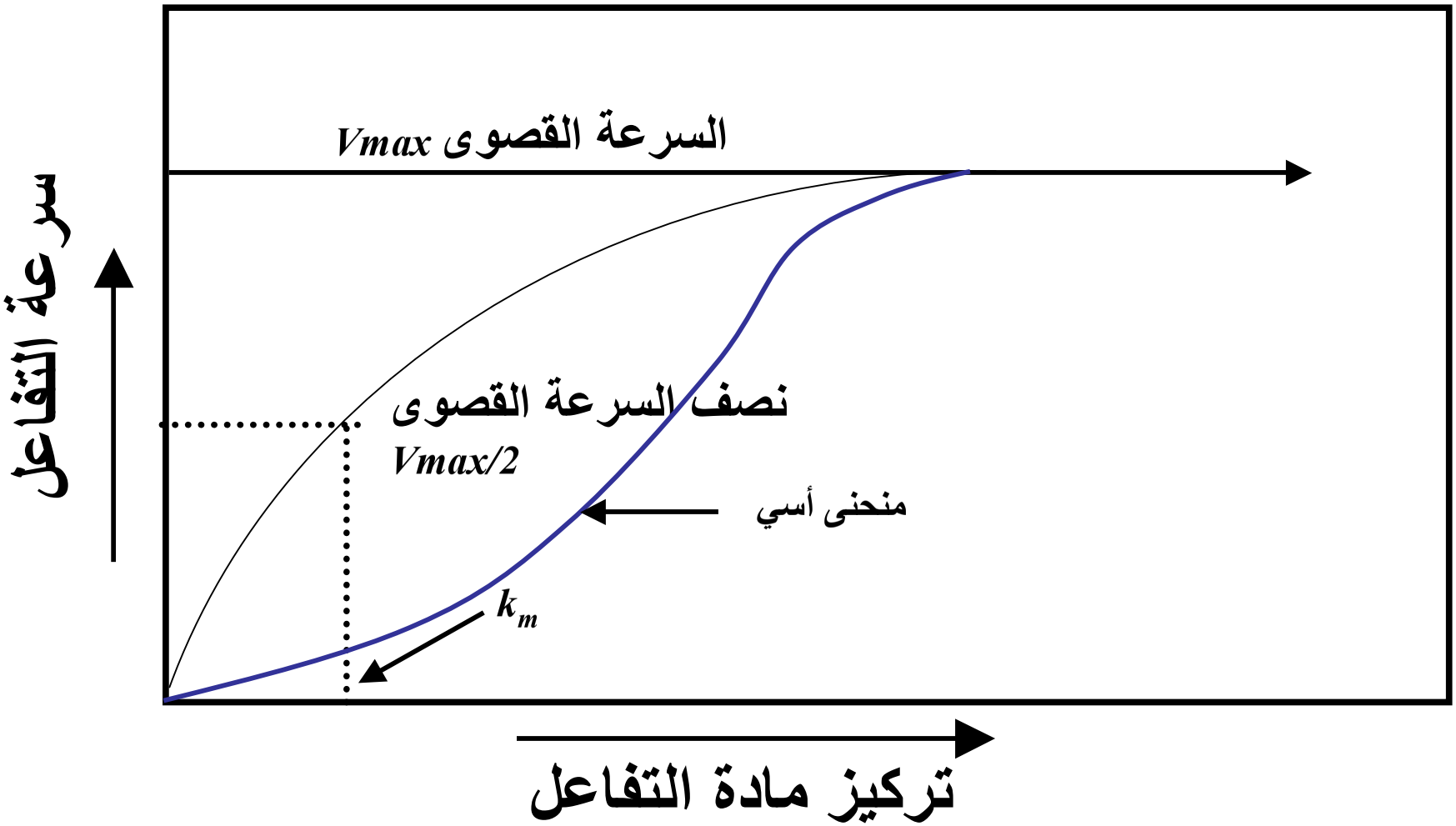
يتحد المثبط بالمراكز الفعالة للإنزيم إرتباطاً قوياً فلا ينفصل عنها وبالتالي يفقد الإنزيم نهائياً وظيفته ولا يتم التغلب علي هذا التثبيط بزيادة تركيز مادة الفاعل.

الإنزيمات الألوستيرية (غير الوضعية)
Allosteric enzymes

تعطي منحنى أسي Sigmoid للعلاقة بين سرعة التفاعل وتركيز المادة المتفاعلة.

تتكون من عدة وحدات فرعية subunits تحتوى على :

- أ- مركز فعال
- ب- مركز تنظيمي:
  - تنظيم إيجابي Positive effector
  - تنظيم سلبي Negative effector



المنحنى الأسي للإنزيمات الألوسيرية