تأثير منظف الـ Triton X 100 على أكسدة الفنيل آلانين ـ L بواسطة أغشية جرثـــــــوم الـ Proteus mirabilis

"Effet de Triton X 100 sur l'oxydation de L-phénylalanine par les membranes de Proteus mirabilis "

د. إبراهيم جبـــور
أستاذ مساعد في كلية العلـــوم
بجامعة تشريـــن

تؤكد جراثيم Proteus و Providencia الفنيل آلانين ـ L الــى الفنيل ببروفات بوجود أكسجين الهواء • الأنزيم L - Phénylalanine DCIP-réductase عبارة عن فلافوبروتين ينتمي للغشاء الداخلي الجرثومي وهو ينحــل بصورة تجمعات جزيئية بواسطة المنظفات •

تحضر الأغشية الداخلية والخارجية لجرثوم Proteus mirabilis باستعمال التثفيل السريع جدا (Ultracentrifugation) ضمن ممال خطي من الســـكاروز (٤٠ـ ٦٢ / : وزن /حجم) ، حيث تبين أن الفعاليتيـن L - phe oxydase و DCIP -réductase تكونان متحدتيـن معاً ضمن الغشاء الداخلي الجرثومي مـــع السيتوكروم b_1 • يثبط الـ Triton X 100 الفعالية فنيل آلانين أوكسيداز سواء فـــي الأغلفة الكاملة أو في الغشاء الداخلي وهذا التثبيط يكون كاملا تقريبا من أجل نسبـــة منظف / بروتين قدرها ٥ر٠ (وزن / وزن) ، وهذه النسبة تسمح باسترداد ٨٥ / مـــن الفعالية L-phénylalanine DCIP- réductase الغشائية المنحلة تحـــت شكل غير قابل للترسيب •

بينت الدراسة وجود ترابط قوي بيـن البروتين الأنزيمي والفوسفوليبيدات الغشائية كذلك بيّنا العلاقة بين الفعاليـة L-phe Oxydase والفوسفوليبيدات من خـــلا ل دراسة تأثير الفوسفوليباز A على هذه الفعالية حيث إن ٤٥ / من هذه الفعالية تضيـع بعد حضن الأغلفة الغشائية لمدة /٦٠/ دقيقة في درجة الحرارة ٣٠°م مع كمية كبيرة مـن الفوسفوليباز • تعمل الفوسفوليبيدات على زيادة الثبات الحراري للفعاليـــة L - phe déshydrogénase المعالجة بالأسيتون • أظهر فحص الطيف التفاضلي (Spectre différentiel) للأغلفة أو الأغشية الداخلية المرجَعة بواسطة $Na_2S_2O_4$ وجود عصابات مميزة لعدة سيتوكرومات وارجاع مركب فلافيني بواسطة الفنيل آلانيـــن ، تبين أن الـ Triton X 100 يثبط الفعالية L - phe oxydase بايقاف انتقـــال الالكترونات في مكان ما بين هذه الفعالية (الفلافوبروتين) وسلسلة السيتوكرومـــات (السلسلة التنفسية). يـــرمم الـ Ubiquinone (Co Q6) جزءاً من الفعاليـــة L-phe oxydase للأغشية المنحلة بواسطة الـ Triton X 100 وكميـة الـ Ubiquinone اللازمة لترميم هذه الفعالية تزداد مع النسبة منظف/ بروتينات. ان الـ Ubiquinone يمكنه إذاً أن يعمل كناقل للالكترونات بين الأنزيم نـــازع

مقدمة :

من المعروف أن بكتريا (جراثيم) Providencia و Proteus تؤكسد الفنيل آلانين ـ L الى الفنيل بيروفات بوجود الأكسجين(١)٠ يبدي جرثوم P. Vulgaris فعالية أوكسيدازية مرتفعة تجاه مجموعة من الحموض الأمينية (٢)، وهذه الخاصية قد أثبتت في الأغلفة المعزولة من جرثوم P.mirabilis (٣)٠ تبين أن السيتوكروم (مكون السلسلة التنفسية) يستخدم في نقل الالكترونات نحو الأكسجين ٠ يستعمل الفنيل آلانين ـ L بنشاط من قبل الأغلفة الجرثومية (Enveloppes bacteriennes) من أجل ارجاع الـ (DCIP) Dichloro - phénolindophénol والأنزيم الذي يحفز هذا التفاعل يسمى L-phénylalanine DCIP-réductase ٠ ويعتقد بأن نفس الأنزيم يكون قادرا على ارجاع الـ DCIP مع الفنيل آلانين وعدة حموض آمينية أخرى ذات سلسلة جانبية غير قطبية ، مثل الميتيونين ، اللوسين الابزولوسين التريبتوفان ومماثلات متنوعة ٠

الاختصارات :

Tris : tris,hydroxyméthyl-aminométhane

phe : Phénylalanine .

DCIP: Dichlorophénolindophénol

PMS : phénazine méthosulfate (=5-méthylphénazinium - méthylsulfate).

nm : Nanomètre

KDO : Acide 2 - Céto-3-Désoxyoctonique

COQ : Coenzyme Q

PPA : Phényl-pyruvate

HLB: Hydrophilic lipophilic balance .

CmC : Concentration micellaire critique

Cyt : Cytochrome .

بحسب معطيات هذا العمل ، فان أكسدة الفنيل آلانين وحموض آمينية أخرى بواسطة الهواء من قبل Proteus تشتمل على جزأين وظيفيين :

١- أنزيم نازع للهيدروجين الذي (Déshydrogénase) يحفز الزمرة الآمينية التأكسدية (Désamination oxydative) للسوبسترا (الركازة) ٠

٢- السلسلة التنفسية Chaîne - respiratoire ومن المحتمل أن يكون الـ phénylalanine DCIP-réductase أنزيما نازعا للهيدروجين ٠

والدلائل التمهيدية الواردة في هذه المقالة تشير الى أن الـ phénylalanine DCIP - réductase هو فلافوبروتين (Flavoprotéine) ينتمي للغشاء الداخلي الجرثومي ٠ انه ينحل بصورة تجمعات جزيئية (Micelles) بواسطة المنظفات (Détergents) لكنه مع ذلك يبقى

على مايبدو مرتبطا بشدة الفوسفوليبيدات . يكون هذا الأنزيم قادرا على استعمال الكينونات التنفسية كمستقبلات للالكترونات .

اللوازم والطرق (Materiel et Methodes)

١ - الأرومات وأوساط الزراعة :

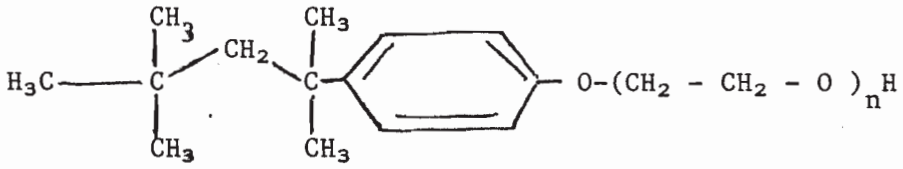
يزود جرثوم P.mirabilis من قبل معهد باستور (باريس) وينمو في الدرجة ٣٧°م كما هو موصوف سابقا (٣) في الوسط التالي (التركيب باللتر) NH_4Cl (١غ) ؛ Na_2SO_4 (٢ر٠ غ) ؛ K_2HPO_4 (٥ ر ٤ غ) ؛ KH_2PO_4 (٥ر٠ غ) ؛ غليكوز (١ غ) ؛ ناتج حلمهة الكازئين (Hydrolysat de Caséine) : ١٠ غ) ؛ $FeSO_4, 7H_2O$ (١ ملغ) ؛ $MgSO_4, 7H_2O$ (٤٠ ملغ) ؛ نيكوتين أميد (Nicotinamide : ١ملغ) ؛ Pantothenate de calcium (١ملغ) ؛ P.Aminolenzoate (١ملغ) والتيامين Thiamine : ١ملغ)

٢- فصل الأغشية والمعالجة بالمنظفات :

تحضر الأغشية الكاملة (الداخلية والخارجية) بواسطة المعالجة بأنزيم الليزوزيم (Lysozyme)، بالصدمة الحلولية (Choc osmotique) وبالتحطيم فوق الصوتي للخلايا حسب Hasin ومساعديه (٤).والمعلق الغشائي المستخدم في معظم التجارب هو المعلق غير الخاضع للتجزئة التالية. ومن أجل فصل المكونات الداخلية والخارجية للغشاء ، يوضع ٥٠ مل من المعلق الغشائي الموجود في المحلول الواقي التالي: Tris (١ر٠ مول) - Maléate (pH 7,5)، سكاروز (٢٥ر٠ مول) في أعلى ممال خطي من السكاروز (Gradient de saccharose) (٤٠ - ٦٢ ٪ : وزن / حجم) حجمه ٥٠٠ مل. يستمر التثفيل السريع لمدة ٤٨ ساعة بسرعة ٣٠ ٠٠٠ دورة بالدقيقة (أي ٧٠ ٠٠٠ g) ضمن دوار من نوع Zonal (B 14 MSE) سعته ٦٠٠ مل . وبعد هذا التثفيل المسمى التثفيل السريع عند التوازن (Ultracentrifugation à l'équilibre) تجمع عينات ذات حجم ٨ مل وتحدد كثافتها (غ/ مل) بواسطة وزن عينات ذات ٥ ملم وفعاليتها الأنزيمية وامتصاصها (Absorbance) عند الموجة ٢٨٠ نانومتر . بالنسبة للمعالجة بالمنظفات ، فان المعلق الغشائي الحاوي على ١٥ الى ٢٥ ملغ بروتينات / مل والموجود ضمن محلول واق Tris (٢٠ ميللي مول) - Maleate) درجة حموضة نهائية (pH 8,5) يعالج بالمحلول المائي للـ Triton X 100 ٢٠ ٪ (حجم / حجم)* وذلك باضافة كميات متزايدة من المنظف . وبعد حضن المزيج لمدة ١٥ دقيقة في الدرجة ٣٠°م مع التحريك اللطيف ، يثفل هذا المزيج لمدة ٦٠ دقيقة بسرعة ١٢٠ ٠٠٠ g في الدرجة ٤°م . يحفظ السائل الطافي (Surnageant) الناتج عن المعالجة بالـ Triton X 100 مابين صفر - ٤°م .

---

* - للتريتون (Triton X 100) أو Polyoxyéthylène - tertio - Octyl phénol الصيغة الكيميائية التالية :



n= ٥ر٩ (عدد المجموعات (Polyoxyethylene)
الوزن الجزيئي (PM المتوسط) : ٦٢٨
CMC : ٢٤ر٠ ميللي مول (محلول مائي) .
HLB : ٥ر١٣

٣ ـ قياس الفعالية الأنزيمية ومعايرة البروتينات والفوسفور وال KDO واستخلاص الفوسفوليبيدات :

تقاس أكسدة الفنيل آلانين بواسطة الهواء (فنيل آلانين أوكسيداز) في الدرجة ٣٠°م وذلك بتقدير كمية الفنيل بيروفات الناتج باستعمال كلور الحديد $FeCl_3$ كما هو موصوف سابقا (٣) . كذلك تقاس الفعالية phénylalanine DCIP - réductase بوجود ال phenazine méthosulfate(PMS) كما هو موصوف سابقا أيضا (٣) . ان وحدة من الفعالية الأنزيمية تحول ١/ ميكرومول من السوبسترا (الركازة) بالدقيقة الواحدة في الدرجة ٣٠°م ودرجة الحموضة pH 7,5 .

تعاير البروتينات بطريقة Bratlett LOWRY (٥) المعدلة من قبل ZACK و COHEN (٦) . يعاير الفوسفور العضوي بطريقة (٧) . أما ال KDO Acide 2-Céto - 3 - desoxyoctonique) فيعاير حسب طريقة KARKHANIS ومساعديه (٨) . تستخلص الفوسفوليبيدات حسب طريقة FOLCH ومساعديه (٩) .

٤ـ الدراسات الطيفية

(Etudes spéctrales)

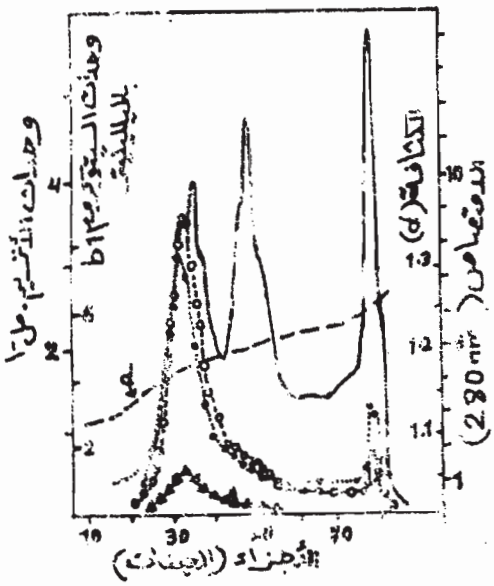
يسجل الطيف التفاضلي Spectre - différentiel (مرجّع ـ مؤكسَد : (Réduit - Oxydé) للأغشية في درجة الحرارة المحيطة باستعمال الجهاز Acta M6 . وفحص هذا الطيف سمح أيضا بتمييز السيتوكرومات (١٠) بحسب عصاباتها ∝ عند الموجة ٥٦٠ نانوميتر (سيتوكروم d) ، ٥٩٥ نانوميتر (سيتوكروم al) أو ٦٣٠ نانوميتر (سيتوكروم bl) . يقدر السيتوكروم bl (ذو المكونين) (انظر المرجع ١٠) باحداث فقاعات في حوض المرّجع بواسطة الأكسجين النقي وباضافة $Na_2S_2O_4$ الصلب الى حوض العينة . ان فرقا قدره ٠١ر٠ وحدة امتصاص بين الذروة عند الموجة ٥٦٠ نانوميتر وخط الأساس الذي يصل بين ٥٤٠ و ٨٥٠ نانوميتر يطابق الى وحدة سيتوكروم b_1 بالميلليليتر .

النتائـــج :

تفصل الأغشية الخارجية والداخلية (Membranes externes et internes) اعتبارا من الأغلفة (Enveloppes) الكاملة لجرثوم P.mirabilis باخضاعها لتشغيل سريع (Ultracentrifugation) ضمن ممال كثافة خطي من السكاروز ٤٠ - ٦٢ ٪ (وزن / حجم) (لاحظ فقرة الطرق). يبين الشكل التالي (-١-) الفصل الحاصل: عصابة أولى قريبة من قمة الممال عند كثافة ١٫١٨ غ/مل وعصابة ثانية عند كثافة ١٫٢١ غ /مل ونفس الشكل يبين أن الفعاليتين : الفنيل آلانين أوكسيداز والـ DCIP - réductase تكونان متحدتين معا ضمن الغشاء الداخلي مع الستوكروم b1 . وهذه النتيجة أكدها أيضا تحليل السيتوكرومات الذي بين أن العصابة الأولى تمثل الغشاء السيتوبلاسمي (الغشاء الداخلي) (وجود السيتوكروم b1 بشكل خاص)؛ وهذه العصابة (الغشاء الستوبلاسمي) هي كما ذكرنا أعلاه مقر الفعاليتين

L - phe oxydase

و L-phe DCIP -réductase . تبين معايرة الـ 2-céto-3-désoxyoctonate (KDO) (مكون هام للسكاريدات المتعددة الليبيدية) أن العصابة الثانية تطابق الغشاء الخارجي للجرثوم مع تركيز متوسط قدره ٣٠ ميكرو غرام من الـ KDO بالميلليليتر الواحد للغشاء الخارجي (بينما يكون تركيزه أقل من ١ ميكروغرام / مل بالنسبة للغشاء الداخلي) . تمثل القمة الثانية للفعاليات الأنزيمية الموجودة في المنطقة ذات الكثافة الأكبر للممال (١٫٢٥ غ / مل) الأجزاء الخلوية غير القابلة للفصل .



شكل/١/ : فصل الأغشية الداخلية والخارجية لجرثوم P.mirabilis بواسطة التشغيل السريع عند التوازن ضمن ممال كثافة خطي من السكاروز .

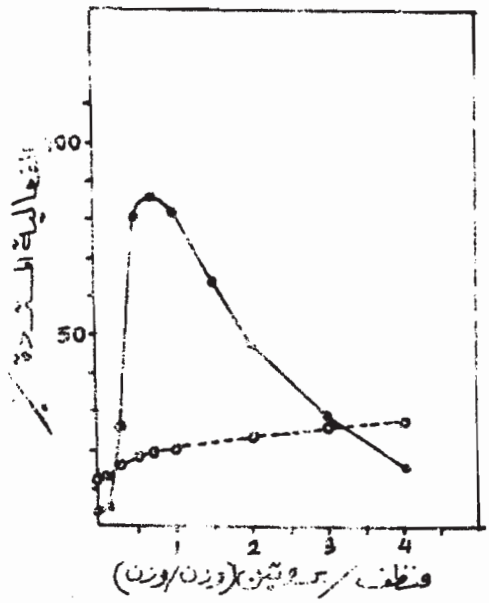
تكون الشروط التجريبية وواحدات الأنزيم والسيتوكروم محددة في فقرة الطرق .

الخط المتصل (ــــ) : الامتصاص عند الموجة ٢٨٠ نانوميتر. الدوائر البيضاء (○ - - - - ○) : الفعالية فنيل آلانين أوكسيداز .
المثلثات السوداء (▲ ــــ ▲) : الفعالية phénylalanine DCIP-réductase ,
الدوائر السوداء (● - - - ●) : الستوكروم b_1 .

تقود طرق تشغيل سريع أخرى فوق ممال كثافة (ممال غير مستمرمن السكاروز ، ممال الترسيب العكوسي ، ممال

KBr) الى نتائج مماثلة. وهذه النتائج تكون على اتفاق مع تلك المشاهدة من قبل HASIN ومساعديه (٤) .

تنخفض الفعالية فنيل الآنين أوكسيداز بشدة بواسطة المعالجة بالـ Triton X 100 سواء في الأغلفة الكاملة أو في الغشاء الداخلي ،وهذا التثبيط يكون كاملا تقريبا عندما تصبح النسبة منظف / بروتين مساوية ٥ر٠ (وزن / وزن). تسمح هذه النسبة باسترداد ٨٥ / من الفعالية phénylalanine DCIP-réductase الغشائية المنحلة تحت شكل غير قابل للترسيب بعد ٦٠ دقيقة من التثفيل السريع بسرعة ١٢٠ ٠٠٠ g (شكل ٢) لقد حضن المزيج (أغلفة TritonX100) مدة ١٥ دقيقة في الدرجة ٣٠° م قبل التثفيل . وفي هذه الشروط لم يعثر على أية فعالية L-phe oxydase لا في الأغلفة الكاملة المعالجة ولا في السائل الطافي الناتج عن التثفيل . ان المعالجة المنجزة عند الدرجة ٤° م تتطلب كمية أكبر من الـ Triton X 100 من أجل الحصول على نتيجة مماثلة. ومن الممكن أن يكون هذا معزواً الى ازدياد قيمة الـ CmC عند درجة الحرارة المنخفضة التي تخفض على مايبدو من فعالية المنظف (١١) . ان كمية أكبر من المنظف تحرر بروتينات أكثر لكن تسبب تثبيط الأنزيم. لاتزداد الفعالية L-phe DCIP-réductase المنحلة بواسطة سيانور البوتاسيوم (KCN)(٢ ميللي مول) خلافا لتلك المشاهدة في الأغشية السليمة (غير المعالجة) ، واختفاء تأثير السيانيد يتوافق مع التثبيط الكامل للفعالية فنيل آلانين أوكسيداز .



شكل -٢ - : تأثير الكميات المختلفة للـ Triton X 100 على انحلال البروتينات الغشائية لأغلفة جرثوم P.mirabilis .

البروتينات : ٣٦ ملغ / مل ، الفعالية L - phe DCIP - réductase: ٧ر٦ وحدة / مل) .

● - - - ● : الفعالية L - phe DCIP - réductase (يعبر عنها بالنسبة المئوية بالنسبة لفعالية الأغلفة غير المعالجة).

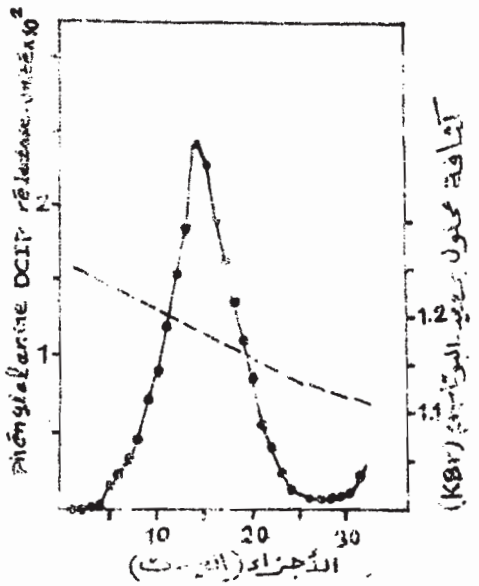
٥ - - - ٥ : كمية البروتينات المنحلة (يعبر عنها أيضا بالنسبة المئوية بالنسبة لكمية البروتينات الكلية (بروتينات الانطلاق) .

مدة التثفيل : ١ ساعة بسرعة ١٢٠ ٠٠٠ g

مدة الحضن : ١٥ دقيقة في الدرجة ٣٠° م قبل التثفيل .

يكون للأنزيم المنحل بواسطة

الـ Triton X 100 نسبة فوسفور/ بروتين قدرها ٠ر٠٤ ± ٠ر٠٥ ؛ ولقد وجد بأن هذه النسبة تبقى تقريبا مماثلة لتلك الموجودة في الغشاء الجرثومي كما هي الحال أيضا بالنسبة للتركيب بالفوسفوليبيدات (نتيجة غير منشورة). تبقى نسبة الليبيدات الى البروتينات في الأنزيم المنحل بعد المعالجة بالمنظف قريبة من ١ ، ووجود الليبوبروتينات في المنطقة ذات الكثافة المتوسطة ١ر١٨ غ / ملغ يكون متوقعا تماما. يبين الشكل -٣- نتيجة التثفيل السريع للأنزيم المنحل بالـ Triton X 100 في ممال كثافة من بروميد البوتاسيوم (KBr) لمدة ٤٢ ساعة بسرعة ٠٠٠ ١٦٠ g : لقد وجد أن الفعالية L-phe DCIP - réductase تتوضع في المنطقة ذات الكثافة المتوسطة ١ر١٨ غ / مل .



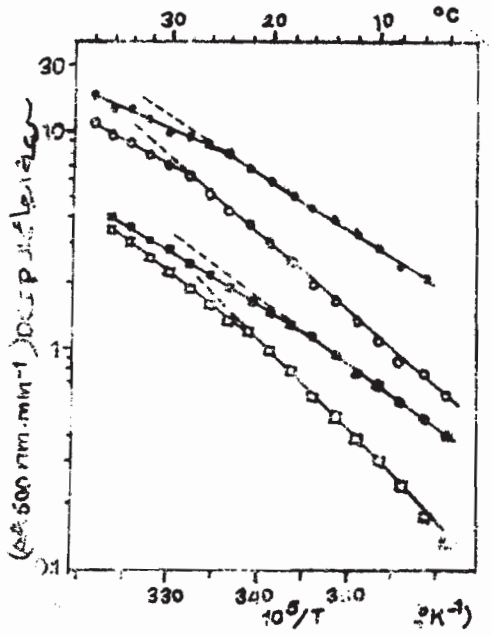
شكل - ٣ -

شكل - ٣ - : التثفيل السريع للأنزيم المنحل بالـ Triton X 100 ضمن ممال كثافة من بروميد البوتاسيوم (KBr) .
مدة التثفيل : ٤٢ ساعة بسرعة ٠٠٠ ١٦٠ g .
الحجم الكلي للممال الخطي : ٨ر٥ مل ويحضر بمزج محلولين من بروميد البوتاسيوم ٠ر٩٢ مول و ٣ر٧٠ مول .
البروتينات الغشائية الكلية الموضوعة في أعلى الممال : ٣ر٥ ملغ ضمن ٠ر٥ مل.
الدوائر السوداء (●) : الفعالية L-phe DCIP - réductase
الخط المتقطع (- - -) : الكثافة (غ/مل) .

ان الترابط بين الفعالية DCIP - réductase والفوسفوليبيدات في التجمعات الجزيئية الليبوبروتينية قد أشير اليه فيما بعد من خلال دراسة منحني أرينوس (Graphique d'Arrhénius) على الفعالية الأنزيمية . فالشكل - ٤ - يبين نتائج تجربتين منفصلتين على أغشية محضرة من جراثيم مزروعة في الدرجة ٣٧°م و ١٩°م . ان انكسار المنحني يلاحظ يوضوح في كل حالة مجربة على الأنزيم سواء في الغشاء أو في المستخلص المتأتي Triton X 100 عنه . وبحسب المعارف الحالية ، فان هذه الظاهرة تتعلق بالانتقال الحراري (Transition thermique) أو بنقطة الانصهار (Point de fusion) للطور الليبيدي للبروتينات الغشائية (١٢). لقد تبين أن تناقص درجة الانتقال الحراري تلاحظ مع انخفاض حرارة وسط الزراعة . ان نقطة الانصهار الأصغر (١٦°م بدلا من ٢٤°م) تلاحظ في الأغشية المحضرة من

الجراثيم المزروعة في الدرجة ١٩°م بسبب الكمية الأكبر لسلاسل الحموض الدسمة غير المشبعة في الفوسفو-ليبيدات (١٣).

من الواضح حسب الشكل - ٤- أن تأثير الفوسفوليبيدات على الفعالية Réductase لايتغير كثيرا بواسطة المنظف، باستثناء الازدياد الطفيف في نقطة الانصهار، الذي من الممكن أن يعزى اما الى تبدل في حالة الفوسفوليبيدات بعد تجزئة الغشاء الى تجمعات جزيئية أو الى وجود المنظف. ولقد وجد JONES و VENABLES (١٤) سلوكا مماثلا لـ D-Aminoacide déshydrogénase عند جرثوم E.coli.



شكل -٤- : منحني أرينوس (Graphique d'Arrhénius) للفعالية phénylalanine DCIP-réductase لأغلفة P.mirabilis

الدوائر السوداء (●—●) : أغلفة الجراثيم المزروعة في الدرجة ٣٧°م.
المربعات السوداء (■—■) : أغلفة الجراثيم المزروعة في الدرجة ١٩°م
المربعات البيضاء (□—□) : الأنزيم المنحل بالـ Triton X 100 والمستخلص من أغلفة الجراثيم المزروعة في الدرجة ١٩°م. نسبة المنظف / البروتين المستعمل من أجل استخلاص الأنزيم هي ٥ر٠
الدوائر البيضاء (هـ) : الانزيم المنحل Triton X 100 والمستخلص من أغلفة الجراثيم المزروعة في الدرجة ٣٧°م

كذلك بينا العلاقة بين الفعالية L-phe oxydase والفوسفوليبيدات من خلال دراسة تأثير أنزيمات الفوسفوليباز على هذه الفعالية. فوسفوليباز (phospholipase A) سم الثعبان تسبب ضياع ٤٥ ٪ من الفعالية الأنزيمية بعد حضن الأغلفة الغشائية لمدة ٦٠ دقيقة في درجة الحرارة ٣٠°م مع كمية كبيرة من الفوسفوليباز. وازالة الفعالية هذه الضعيفة نسبيا تنجم عن تأثير جزئي للفوسفوليباز التي تترك مع ذلك كميات صغيرة من الفوسفوليبيدات السليمة. وبالاضافة الى ذلك فان النواتج المتحررة عن الحلمهة الأنزيمية مثل الحموض الدسمة والليزو-فوسفوليبيدات يمكنها أن تسبب تأثيرات ثانوية من خلال فعاليتها المنظفة (Activité détergente).

ان أهمية الفوسفوليبيدات على الفعالية L-phe déshydrogénase قد وضحت مباشرة بواسطة اضافة معلق ليبيدي كامل الى الأغلفة المنزال ليبيداتها بالمعالجة بالأسيتون ٩٠ ٪؛ حضرت الليبيدات اعتبارا من الجراثيم الكاملة ونقيت بواسطة الكروماتوغرافيا فوق عمود من حمض السيليسيك

(Acide silicique) ٠ بعد ٢٠ دقيقة من الحضن في الدرجة ٣٠°م ومن أجل نسبة فوسفوليبيدات بروتينات = ٠ر١ بلغ ترميم الفعالية L-phe DCIP - réductase ٨٠ / من القيمة الأصلية المحددة في الأغشية غير المعالجة ٠

أيضا فقد بيّنا أن الفوسفوليبيدات تزيد بشدة الثبات الحراري (Stabilité thermique) للفعالية L-phe déshydrogénase المعالجة بالأسيتون ٠ فبعد ٥ دقائق من الحضن في الدرجة ٥٠°م ، يخسر الأنزيم المعالج هكذا بالأسيتون ٧٢٪ من فعاليته L - phe DCIP - réductase في حين أن الأنزيم المعاد تنشيطه بالفوسفو ليبيدات لايخسر الا ١١٪ من فعاليته هذه ٠ وفي نفس الشروط فان فعالية الأنزيم المنحل بواسطة الـ Triton X 100 لاتعاني الا تناقصاً ضئيلا وفعالية الأغلفة الكاملة تبقى دون تغيير٠

وهذه النتائج تقترب من تلك الحاصلة أثناء دراسة مختلف الأنزيمات نازعة الهيدروجين (Déshydrogénases) الغشائية عند مختلف الكائنات المجهرية لاسيما عند جرثوم

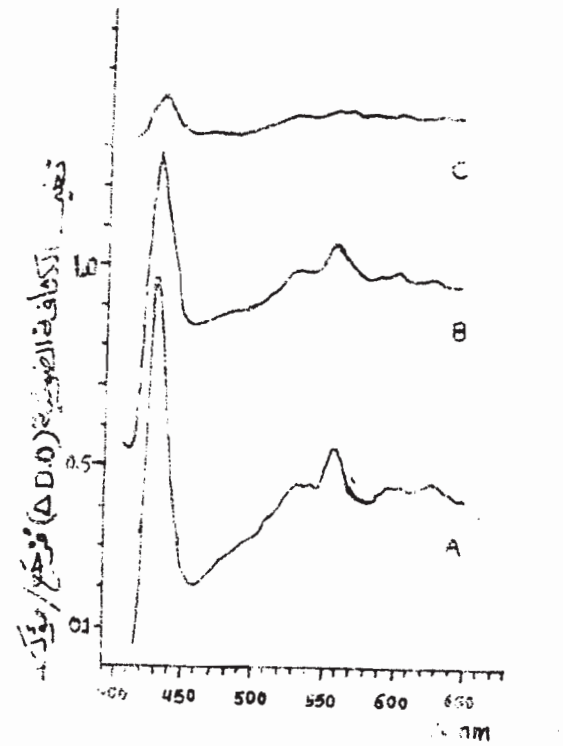
D-Lactate déshydrogénase:E.coli (١٥ ، ١٦)،
L-Lactate déshydrogénase (١٧)،
Pyruvate oxydase (١٨ ، ١٩)،
D-Aminoacide déshydrogénase (٢٠)،
NADH déshydrogénase (٢١)،

كذلك D-Glucose déshydrogénase جرثوم Pseudomonas fluorescens و (٢٢) NADH déshydrogénase جرثوم Acinetobacter calcoaceticus (٢٣) ٠ وعند جميع هذه الكائنات المجهرية تسبب ازالة الليبيدات (Délipidation) بواسطة الأسيتون أو بالحلمهة في المحضرات الغشائية كذلك الحال ازالة المنظف في المحضرات المنحلة ضياعا كبيرا للفعاليات المدروسة : هذا الضياع يمكنه أن يكون معوضا جزئيا بواسطة اضافة فسفو-ليبيدات جديدة ٠

يظهر فحص الطيف التفاضلي (Spectre différentiel) للأغلفة أو الأغشية الداخلية المرجّعة بواسطة $Na_2S_2O_4$ (Dithionite) وجود عصابات مميزة لعدة سيتوكرومات (شكل O_a -) التي أثبت وجودها سابقا في الأغشية الخلوية لجرثوم P.mirabilis (٣ ، ٢٤) أو جرثوم E.coli (٢٥ ، ٢٦ ، ٢٧ ، ٢٨ ، ٢٩) أو عند كائنات مجهرية أخرى (٣٠) ٠ ولقد ميزت العصابات ∝ للسيتوكرومات a_2 (٦٣٠ نانوميتر) ، a_1 (٥٩٥ نانوميتر) ، b1 (٥٥٨ نانوميتر) والعصابة β للسيتوكروم b_1 (٥٣٢ نانومتر) ؛ وهذا الأخير يسهم على الأرجح في تشكيل العصابة SORET بشكل كبير (٤٢٨ نانوميتر) ٠ تشير أيضا ملاحظة المنخفض الواضح جدا على طيف الشكل O_a بالقرب من الموجة ٤٦٠ نانومتر الى وجود جزء فلافيني في الجزيئات الغشائية (٣١) ٠

تظهر اضافة الفنيل آلانين - L أو الهيستيدين - L (L - Histidine) الى المعلق الغشائي طيفا تفاضليا مماثلا لذلك الحاصل مع الجزيئات الغشائية المرجعة بالـ $Na_2S_2O_4$ (شكل O_b) ٠ تبلغ شدة العصابة SORET ٦٠-٧٠ ٪ من الكثافة الملاحظة في الحالة السابقة ٠ كذلك فان المنخفض الملاحظ عند الموجة

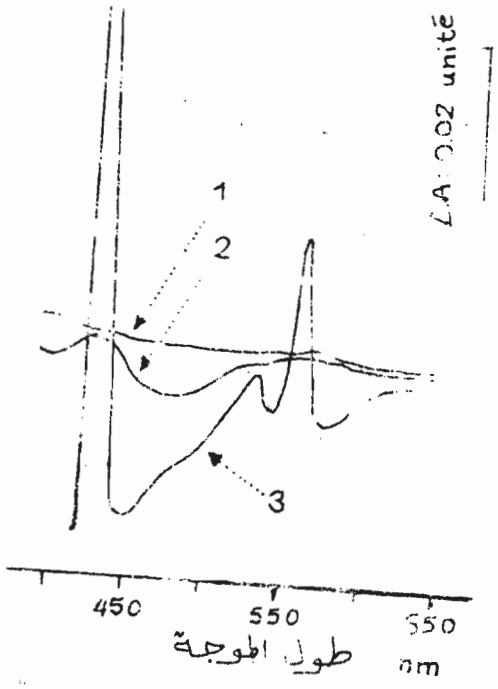
٤٦٠ نانومبتر والمنسب للفلافوبروتينات يكون أيضا أقل شدة بكثير بعد الارجاع بالـ $Na_2S_2O_4$.



شكل ـ ٥ ـ : الطيف التفاضلي المؤكسَد المرجَع لأغلفة جرثوم P.mirabilis .
سجل الطيف عند درجة الحرارة المحيطية باستعمال مقياس طيف ضوئي (Spectrophotomètre من نوع Cary 15.
A ـ معلق مرجَع بـ $Na_2S_2O_4$
B ـ معلق مرجع باضافة الفنيل آلانين ـ L
C ـ مثل B فورا بعد اضافة الـ Brij58 بتركيز نهائي قدره ١ ٪
تركيز البروتينات : ٨٠٠ ميكروغرام/مل تقريبا .
يؤكسَج الحوض المرْجِع بالبقبقة بالأكسجين النقي ، يحتوي حوض العينة على $Na_2S_2O_4$.

يظهر فحص الطيف التفاضلي المرجَع ـ المؤكسَد للأغشية بوجود الـTriton X 100 (الأنزيم المنحل) ارجاع مركب فلافيني فقط بواسطة الفنيل آلانين ـ L ، كما يشير الى ذلك التجويف (الامتصاص الأصغري) المشاهد في المنطقة المطابقة للموجة ٤٥٠ نانوميتر (شكل ـ٦ ـ ٢) . كذلك يكون السيتوكروم b_1 وآثار من سيتوكرومات أخرى موجودة ، كما يبين الطيف التفاضلي الحاصل بعد ارجاع الأنزيم المنحل بواسطة الـ Dithionite $Na_2S_2O_4$ (شكل ـ٦ ،منحني ٢). وفي الشروط نفسها ، ومن أجل نسبة Triton X 100 / بروتينات مساوية ٥ر٠ ، فانه لم تحفظ أية فعالية L - phe oxydase في حين أن الفعالية L-phe DCIP - réductase تحتفظ بـ ٨٥ ٪ من قيمتها الأصلية . وهكذا يصبح واضحا أن الـ Triton X 100 يثبط الفعالية L- phe oxydase وذلك بايقاف انتقال الالكترونات في مكان ما بين هذه الفعالية (الفلافوبروتين) وسلسلة السيتوكرومات (السلسلة التنفسية). مع ذلك يكون تأثير المنظف عكوسيا جزئيا بواسطة اضافة الـ Ubiquinones (CO 6 , CO 10) فالشكل ـ٧ـ (منحني ٢) يبين طيفا تفاضليا مماثلا لتلك الحاصل بغياب الـ Triton X 100 .

شكل ـ ٦ ـ : الطيف التفاضلي المرجَع ـ المؤكسَد (Spectre differentiel réduit Oxyde) لأغشية جرثوم P.mirabilis المعالجة بالـ Triton X 100 .
سجل الطيف عند درجة الحرارة المحيطية .



عولجت الأغشية بالمنظف ضمن نسبة Triton X 100/ بروتينات = ٥ ر ٠ ثم أخضعت للتثفيل السريع لمدة ٦٠ دقيقة بسرعة ٠٠٠ ١٢٠ g ٠ والسائل الطافي الحاصل (الأنزيم المنحل) استعمل من أجل انشاء الطيف ٠

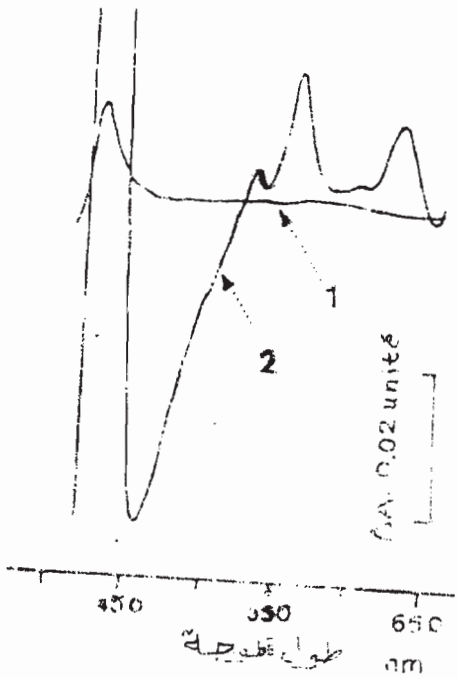
يؤكسَج الحوض المرْجِع (Référence) بالبقبقة بالأكسجين النقي ٠

ان حوض العينة (Echantillon) لايحتوي على السوبسترا (الركازة) (منحني 1 أو خط الأساس) أو يحتوي على الفنيل آلانين ـ L (السوبسترا) بتركيز قدره ٢٠ ميللي مول (منحني ٢) أو يحتوي على الفنيل آلانين ـ L (٢٠ ميللي مول والـ Dithionite (منحني ٣) ٠

يحتوي الحوضان على ٥٢٠ ميكرو غرام بروتينات ٠

شكل ـ٧ ـ الطيف التفاضلي المرجّع ـ المؤكسَد للأغشية الداخلية لجرثوم P.mirabilis

بوجود الـ Triton X 100



سجل الطيف عند درجة الحرارة المحيطية ٠

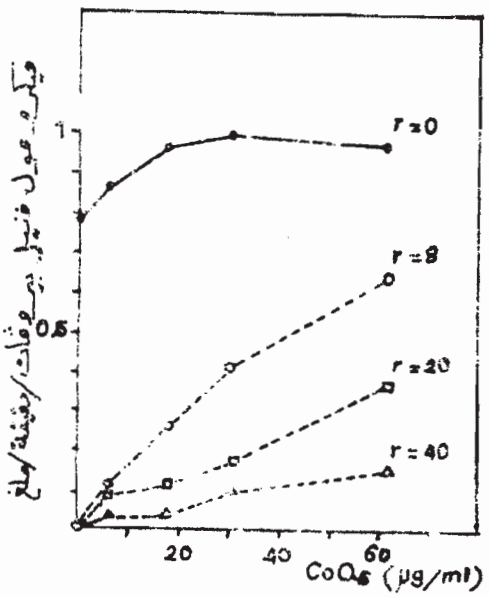
يحتوي كل حوض (المرْجِع والعينة على نفس الكمية من البروتينات (٢ ر ٤ ملغ / مل)والـ Triton X 100 (٢ ملغ/ مل) ٠

يؤكسج الحوض المرْجِع بالبقبقة بالأكسجين النقي ، يحتوي حوض العينة على ٢٠ ميللي مول L ـ فنيل آلانين (السوبسترا) (منحني ١) ودون أية اضافة أخرى ، المنحني ٢ : بعد اضافة ٦٠ ميكرو غرام/ مل من الـ (C₅Q6)Uhiquinone في كل حوض (أي في الحوضين معا) ٠

يكون الطيف التفاضلي الحاصل بغياب المنظف ومع الفنيل آلانين في حوض "العينة " مماثلا للمنحني ٢ ٠

يرمم الـ (CoQ6)Ubiquinone أيضا جزءا من الفعالية L-phe Oxydase للأغشية المنحلة بواسطة الـ Triton X 100 . يبين الشكل (٨) أن كمية الـ CoQ6 اللازمة لترميم هذه الفعالية تزداد مع النسبة منظف / بروتينات ، فمن أجل نسبة Triton X 100/بروتينات منخفضة (٨) ،فان ٨٥ ٪ من الفعالية L-phe Oxydase تكون مستردة من أجل تركيز بالـ Ubiquinone قدره ٦٠ ميكروغرام/مل . كذلك فان الفعالية L - phe Oxydase للغشاء السليم (غير المعالج بالـ (Triton X 100) تزداد أيضا بشكل ضعيف بواسطة الـ CoQ6 بغياب المنظف . ولقد وجد أيضا بأن الـ CoQ6 (٦٠ ميكروغرام / مل) يزيد سرعة التفاعل (ارجاع الـ DCIP بواسطة الجزيئات الغشائية) بغياب الـ PMS بعامل قدره ٢٠ على الأقل شريطة أن يكون الـ Triton X 100 موجودا أثناء الاختبار . اذا هذه الواقعة تشير الى أن الـ CoQ6 يمكنه أن يرجع بواسطة الغشاء التجمعات الجزيئية المتأتية عنه بوجود المنظف أثناء أكسدة الفنيل آلانين ويمكنه أن يعمل كناقل للالكترونات نحو السيتوكرومات أثناء تفاعل آلانين أوكسيداز .

تشير الملاحظات السابقة الى أن الـ Ubiquinone خارجي المنشأ (Exogène) يمكنه أن يعمل كناقل للالكترونات بين الأنزيم نازع الهيدروجين الفلافيني (Déshydrogénase flavinique) المبان من خلال فعاليته DCIP réductase ،وسلسلة السيتوكرومات حتى الأكسجين . عاديا فان الأنزيم النازع للهيدروجين يمكنه أن يرجع مباشرة الـ DCIP ،والـ PMS لايعمل سوى على تسريع العملية . اذا في غياب الـ PMS ووجود المنظف ،فان الـ CoQ6 (٦٠ ميكروغرام/ مل) يحفز بوضوح ارجاع الـ DCIP . فالـ ubiquinone يمكنه اذا أن يحل جزئيا محل الـ PMS وأن يعمل كمركب انتقالي بين الأنزيم نازع الهيدروجين والـ DCIP .



شكل – ٨ – : تأثير الـ (CoQ6) Ubiquinone على الفعالية .

L – فنيل آلانين أوكسيداز بوجود الـ Triton X 100.يعبر عن الفعالية الأنزيمية المقدرة من خلال تشكل الفنيل بيروفات (PPA) بميكرومولات الحمض السيتوني المتشكل بالدقيقة الواحدة ومن أجل ميلليغرام واحد من البروتينات .

كمية البروتينات المستعملة في كل تجربة هي ٥٠ ميكروغرام (الأغشية

الداخلية) .

r ـ يمثل نسبة الـ Triton X 100 / بروتينات (وزن / وزن) .

r = 0 ـ منحني شاهد دون اضافة المنظف .

يكون هذا التأثير ظاهرا بوضوح مع الأغشية المتأتية عن جراثيم مزروعة بغياب الأكسجين (Anaérobiose) . ليس لهذه الأغشية فعالية فنيل آلانين أوكسيداز لكنها تحتفظ بفعالية Phénylalanine réductase .

وبعد الانحلال بواسطة الـ Triton X 100 فان الـ Ubiquinone لايرمم الا بشكل ضعيف جدا ، الفعالية L ـ فنيل آلانين أوكسيداز ، مما يشير الى أن الجراثيم في حياة اللاهوائيات (Anaérobiose) قد بدلت سلسلة سيتوكروماتها (غياب السيتوكروم d) أو طبيعة الكينون (Quinone) وذلك باضاعة القدرة على تجميع الالكترونات فوق الأكسجين . بالمقابل فان الـ Ubiquinone يمكنه أن يحفز سرعة ارجاع الـ DCIP بعامل قدره ٦ .

بغرابة شديدة فان هذه التأثيرات للـ Ubiquinone ، وبشكل خاص على سرعة ارجاع الملون ، لاتكون واضحة الا بوجود المنظف . هكذا ، عندما يعالج الأنزيم المنحل بالـ Triton X 100 بالأسيتون من أجل ازالة المنظف ، فانه لايلاحظ الا ازدياد ضعيف في سرعة ارجاع الـ DCIP بواسطة الـ C_5Q6 بغياب الـ PMS والمنظف . بالمقابل تسبب اضافة الـ Triton X 100 الى المزيج تحفيزا كبيرا للظاهرة . وهذه الحاجة الجلية للمنظف ربما تعود لسبب فيزيائي . ان الـ Ubiquinone مادة كارهة للماء جدا (Hydrophole) حيث بقاؤها في حالة محلول مائي لايمكنه أن يحدث الا تحت شكل تجمعات جزيئية . لذلك فالمنظف يكون على ما يبدو ضروريا من أجل تأمين التماس الجزيئي بين الـ Ubiquinone وبقية الكواشف الموجودة في وسط التفاعل : السوبسترا ، الأنزيم والمستقبل للالكترونات .

بينت دراسة مشابهة أجريت بوجود الماء الأكسجيني (H_2O_2) أن لبيروكسيد الهيدروجين تأثيرا مماثلا : اختفاء الفعالية الأوكسيدازية للأغشية بوجود الـ H_2O_2 3×10^{-2} مول والاحتفاظ بمعدل مرتفع من الفعالية Réductase (حوالي ٥٠ / من الفعالية قبل المعالجة) .

باستعمال الطفرة المقاومة للماء الأكسجيني بينت SAURET ومساعديها (٣٢) أن مهاجمة الجراثيم بالماء الأوكسجيني ١٥٠ ميللي مول ، المضاف الى وسط الزراعة ، تسبب ضياعا كاملا للفعالية L ـ فنيل آلانين أوكسيداز ، في حين أن الفعالية Réductase تكون مماثلة لتلك الملاحظة في أغشية الجراثيم غير المعالجة . ولقد بينت التجارب أن الـ C_5Q6 يرمم جزئيا الفعالية L ـ فنيل آلانين أوكسيداز بغياب الـ Triton X 100 .

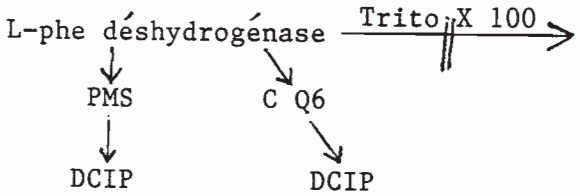
ان الطبيعة الكارهة للماء للوسط الفوسفوليبيدي للغشاء يجب أن تكون كافية من أجل تأمين التماس بين المواد الموجودة في الوسط . يلغى تأثير الـ C_5Q6 بواسطة السيانور مما يبين أن السيتوكرومات تبقى وظيفية بعد المهاجمة بالبيروكسيد .

وبالنتيجة يكون واضحا :

١ـ أن الـ Ubiquinone يمكنه

أن يستخدم كمستقبل للالكترونات من أجل الأنزيم L-Phe déshydrogénase المعاير بواسطة ارجاع الـ DCIP .

٢- أن الـ Triton X 100 أو الماء الأكسجيني (H_2O_2) يميلان لايقاف المرور العادي للالكترونات من الـ Dehydrogénases الى السيتوكرومات ، لكن هذا التأثير يمكنه أن يكون معوضا بشكل جزئي بواسطة اضافة زيادة من الـ Ubiquinone . فآلية انتقال الالكترونات اعتبارا من الـ Déshydrogénase يمكنها اذا على ما يبدو أن تكون التالية :



(السلسلة التنفسية)

بسبب الوجود الطبيعي للـ Ubiquinone أو الـ Ménaquinone في أغشية الـ P.mirabilis ، فان عمل المكونات (المركبات) الكينونية داخل الخلية (In vivo) كوسطاء في انتقال الالكترونات المتأتية عن أكسدة الفنيل آلانين - L نحو السيتوكرومات يكون محتملا جدا . لكن التجارب الموصوفة أعلاه لاتسمح لنا بتأكيد أن الكيتونات هي وسطاء اجبارية للسلسلة الـ Oxydo - réduction نحو الأكسجين . وبالاضافة الى ذلك كنا قد شاهدنا أن الغاء الفعالية الأوكسيدازية أثناء حياة اللاهوائيات لايمكنها أن تفسر فقط من خلال اختفاء الـ Ubiquinone الداخلي للأغشية ، لكن تعديلا آخرا ، متموضعا حسب الظاهر في مستوى السيتوكرومات ، يبدو أنه يتدخل أثناء النمو دون أوكسجين. ان ترميم الفعالية L-phe Oxydase حتى بوجود زيادة من الـ Ubiquinone خارجي المنشأ يبدو أنه يكون ضعيفا الى حد لايمكننا معه أن نقول أن الكينون هو المعني الوحيد في هذه الظاهرة .

المناقشة : (Discussion)

تكون كل المعطيات المذكورة أعلاه قابلة للتفسير بسهولة اذا ما افترضنا بأن الفعالية المسماة phénylalanine - DCIP - réductase للجزئيات الغشائية هي أنزيم نازع للهيدروجين (Déshydrogénase) للنظام فنيل آلانين أوكسيداز لجرثوم P.mirabilis . تشير الدلائل الطيفية الى أن هذا الأنزيم عبارة عن فلافو بروتين (Flavoprotéine) وهذا الاستنتاج يمكن اعتباره أكثر احتمالا من خلال المقارنة مع حموض آمينية أوكسيدازية أخرى موجودة في الطبيعة. من أجل هذا فان تنقية البروتين سوف تكون ضرورية بغية الحصول على معارف أكثر دقة حول هذه البروتينات . وحل الأنزيم بواسطة الـ triton X 100 كما هو موصوف أعلاه هي الخطوة الأولى من المحاولات العامة من أجل الحصول على هذا الأنزيم بشكل نقي . يبدو أن الترابط القوي بين البروتين والفوسفوليبيدات يبقى تقريبا على ما هو عليه بعد الاستخلاص بالمنظف ، غير أن الفعالية DCIP - réductase تكون سريعة التأثر (حساسة) بالحالة

الفيزيائية للطور الليبيدي بوجود المنظف. فالوسط الغشائي للـ Déshydrogénase يظهر أثناء التحليل الحراري ، انكسارا مميزا لمنحني أرينوس ، وقيمة درجة حرارة الانتقال تكون على علاقة متبادلة مع التركيب بالحموض الدسمة للفوسفوليبيدات ويمكنها على ما يبدو أن تطابق ، كما هو مقبول غالبا في المراجع ، الى تبدل في الحالة الفيزيائية للطور الليبيدي . ان البروتين المدروس هو بوضوح بروتين متكامل (٣٣) ضمن الغشاء الداخلي الجرثومي ، وحله تم بواسطة المنظف تحت شكل تجمعات جزيئية حاوية على الليبيدات والبروتين بنسبة محددة .

تبين نتائجنا بوضوح أن فعالية الـ Déshydrogénase تتعلق بالوسط الليبيدي للغشاء . فازالة ليبيدات (Délipidation) النظام بشكل جزئي بواسطة الأسيتون عند درجة حرارة منخفضة تسبب ازالة الفعالية بشكل كبير الى درجة أن اضافة معلق من الفوسفوليبيدات لايمكنها أن تعكس هذه الظاهرة الا جزئيا . وازالة الليبيدات بشكل كامل ظهر أنه غير ممكن لأنها تسبب تخريبا غير عكوسي للنظام . ومع أننا لم نتمكن من اثبات أن الفوسفوليبيدات تكون حتما ضرورية لفعالية الأنزيم ، الا أنه يبدو بوضوح أنها تمارس على الأقل تأثيرا واقيا حقيقيا والفوسفوليبيدات يمكنها أن تكون معوضة الى حد ما بالمنظف .

يمكن للفعالية L-phénylalanine déshydrogénase المرجعة للـ DCIP أن تستعمل الـ Ubiquinone (C_0Q6) كمستقبل للالكترونات خارجيا (In vitro). فاضافة الـ C_0Q6 الى جزء غشائي حيث الفعالية الأوكسيدازية قد ألغيت بواسطة الـ Triton X 100 ترمم جزئيا هذه الفعالية . كذلك فان ترميما مماثلا قد شوهد عند جزء غشائي أزيلت فعاليته بواسطة الماء الأوكسجيني . إذاً هذا التأثير يكون على ما يبدو تعويضا للـ Ubiquinone المخرب بواسطة الماء الأوكسجيني ويأتي كاثبات للدور المحتمل جدا الذي يلعبه هذا الكو أنزيم في التفاعل الأوكسيدازي . بالنتيجة فان هذه النتائج يبدو أنها تشير الى أن الكو أنزيم Q ، حيث وجوده قد أثبت عند Proteus ، يمكنه فعليا أن يستخدم كناقل للالكترونات من أجل النظام داخل الخلية (In Vivo). وبسبب الوجود الطبيعي للـ Ubiquinone والـ Naphtoquinone في غشاء P. mirabilis (٣٤) ، فان هذه النتائج تشير الى أن عمل المركبات الكينوتية كوسيط داخل الخلية (In Vivo) من أجل نقل الالكترونات بين الأنزيم والسيتوكرومات يكون محتملا جدا . مع ذلك فان هذه الفرضية لم تثبت بعد بشكل كامل ، لأن الكينونات يمكنها أن تتفادى المرور بين الـ Déshydrogénases والسيتوكرومات داخل الغشاء . واذا كان مثل هذا الارتباط يجب أن يوجد ، فانه من الواضح يكون مقطوعا بواسطة المنظف . من جهة أخرى ، وعلى الرغم من أن الارتباط بين المنظف والكينون لايمنع ارجاعه بواسطة الـ Déshydrogénases ، فانه يمكن أن يجعل صعبا اعادة أكسدته بواسطة السيتوكرومات ، واعادة الأكسدة هذه لاتكون من بعد ممكنة الا بعد اضافة زيادة كبيرة من الكو أنزيم Q . ان ترميم النظام L-phénylalanine Oxydase

لجرثوم P.mirabilis
بواسطة الـ CoQ6 يكون على اتفــــاق
مع النتـائج الحاصلة من قبل MOJTABA
ومساعدية (٣٥) ، التي بينت أن مزيجـــا
من الفوسفوليبيدات والـ CoQ_{10} يمكنه
أن يرمم الفعاليات NADH, D-Lactate
و Succinate oxydases لغشاء
جرثوم E.coli .

RESUME

Les bactéries du genre proteus et providencia oxydent L-phénylalaline en phénylpyruvate en présence de l'oxygène de l'air. L-phénylalanine DCIP - réductase est une flavoprotéine appartenant a la membrane interne bactérienne, et elle se solubilise sous forme de micelles par les détergents . Les membranes externes et internes de P.mirabilis sont preparées en ubilisant l'ultracentrifugation dans un gradient linéaire de sacharose (40 - 62 %)(P/V), dont les deux activités L-phe oxydase et DCIP - réductase sont associées ensemble dans la membrane interne bacterienne avec le cytochrome b1.Le Triton X 100 inhibe l'activité L-phe oxydase tant que dans les enveloppes entières ou dans la membrane interne , et cette inhibition est presque complète pour un rapport $\frac{\text{détergent}}{\text{protéines}}$ de l'ordre de 0,5(P/P),et ce rapport permet de récuperer environ 85% de l'activite L-phe DCIP réductase membranaire solubilisée sous forme micellaire . L'étude a montré la présence d'une association forte entre la protéine enzymatique et les phospholipides membranaires, Egalement , nous avons montré la relation entre l'activité phe oxydase et les phospholipides par l'etude de l'action de la phospholipase A sur cette activité dont 45 % de cette activité est perdue après l'incubation des enveloppes membranaires pendant 60 minutes a 30°C avec une grande quantité de phospholipase A . Les phospholipides augmentent la stabilité thermique de l'activité L-phe déshydrogénase traitée par l'acetone , L'exames du spectre différenteil des enveloppes ou des membranes internes réduites par $Na_2S_2O_4$ a montré la présence des bandes caractéristiques de plusieurs cytochromes et la réduction d'un composé flavinique par la phénylalanine . Le Triton X 100 inhibe l'activité L-phe oxydase en bloquant le transfert des électrons quelque part entre cette activité (flavoprotéine)et la chaine des cytochromes(chaîne respirature) . L'ubiquinone (CoQ_6) restaure une partie de l'activité L-phe oxydase des membranes solubilisées par le triton X - 100, et la quantité de l'ubiquinone necessaire pour la restauration de cette activité augment avec le rapport détergent/ Proteines . L'ubiquinone pourrait donc servire comme transporteur d'electrons entre l'enzyme déshydrogenasique flavinique et la chaîne des cytochromes jusqu'à l'oxygene .

(BIBLIOGRAPHIE)

1- Hamida, B.et Le Minor,L.(1956) Ann.Inst . Pasteur,(Paris), 90 - 671.

2- Stumpf,P.K et Green,D.E.(1943) J.Biol, Chem.,153,387 - 399.

3- JABBOUR, I (1992) J.Université de Tichrine (Lattaquié),

4- Hasin,M.,Rottem,S et Razin, S (1975) Biochim.Biophys,Acta , 375, 381 - 394

5 - LOWRY ,O.H.,ROSEBROUGH,N.J.,FARR, A.L.et RANDALL, R.J.(1951)J.biol. Chem., 193 , 273 .

6 - Zack,B. et cohen,J.(1961)Clin. Chim.Acta,6,665 - 670 .

7- Bartlett.G.R(1959)J.Biol,Chem ; 234,466 .

8- KARKHANIS , Y .D.,ZELTNER,J.Y. , JACKSON,J.J.et carlo,D.J.(1978) Anal.Biochem.85,595 - 601 .

9- FOLCH,J.LEES.M.et SLOANE-STANLEY, G.H.(1957)J.Biol. Chem.226,495 - 509 .

10- De Groot,G.N.et Stouthamer,A.H. (1970)Arch.Mikrobiol.,74,340-349.

11-HELENIUS,A.et SIMONS,(1975)Biochim Biophys.Acta 415,29- 79 .

12- Wilson,G.et Fox,C.F.(1985)J.Mol. Biol.,55, 49 - 60 .

13- Arlaud,G.,Jouve.H.et Pelmont , J.(1973)Biochimie,55,1287-1297

14- JONES,H.et VENABLES,W.A.(1983) Biochimie 65,177 - 183.

15- TANAKA,Y.ANRAKU, Y.et FUTAI,M. (1976)J.Biochem 80 , 821 - 830.

16- KOVATCHEV,S.,VAZ,W.L.C.et EIBLE, H(1981)J.Biol.chem.256,10369 - 10374 .

17- KIMURA,H.et FUTAI,M.(1978) J.Biol.chem.253,1095- 1100

18- CUNNINGHAM,C.C.et HAGER,L.P. (1975)J.Biol.Chem.250, 7139 - 7146.

19- BLAKE,R.,HAGER,L.P.et GENNIS,R.B. (1978)J.Biol.Chem, 253,1963-1971.

20- JONES,H.et VENABLES,W.A(1983)FEBS Lett - 151, 189 - 192.

21- THOMSON, Y.W.et SHAPIRO,B.M. (1981)J.Biol.Chem.256,3077-3084.

22- MATSUSHITA,K.,OHNO,Y.SHINAGAWA, E.,ADACHI,O.et AMEYAMA, M.(1982) Agric.Biol.Chem.46,1007 - 1011 .

23- BORNLEIT,P.et KLEBER,H.P.(1983) Biochim.Biophys.Acta 722,94-101.

24- VAN WIELINK,J.E.,REIJNDERS,W.N.M. OLTMANN,L.F.et STOUTHAMER,A.H. (1989)Arch.Microbiol.136,152-157.

25- BIRDSELL,D.C et COTA- ROBLES, E.H.(1970)Biochim.Biophys.Acta, 216 , 250 .

26- SMITH,L.(1961)in the Bacteria, (Gunsalus I,C et Stanier R.Y.ed) vol.II,Academic Press,N,Y.,P.365.

27- HENDLER,R.W.et NANNINGA,N.(1970) J.Cell.Biol.,46,114.

28- HADDOCK,B.A et JONES,C.W.(1977) Bacteriol.Rev.41,47 - 99 .

29- BRAGG,P.D.(1980)"Diversity of bacterial respiratory systems " vol. 1 , CRC Press,Inc.,Boca raton.Fla .

30 - KAMEN,M.D.et HORIO,T.(1987) Ann.Rev. Biochem.39,673 - 700

31- CHANCE,B.et WILLIAMS,G.R.(1955) J.Biol.Chem.,217,395,

32 - SAURET,G.,JOUVE,H.et PELMONT, (1979)can.J.Microbiol.25.312 - 320 .

33- Singer,S.J.(1974)Annual Rev. Biochem; 43,805 - 833.

34- Kröger, A.,Dadák,V.,Klingenberg, M,et Diemer,F.(1971)Eur.J.Biochem 21,322 - 333 .

35 - ESFAHANI,M.,RUDKIN,B.B.,CUTLER, C.J.et WALDRON,P.E(1977)J.Biol. Chem.,252, 3194 - 3198 .