



Metody badań żywych organizmów

Skład chemiczny organizmów żywych (zwłaszcza aktywnych organów) cały czas się zmienia. Również martwe tkanki przez jakiś czas ulegają procesom metabolicznym lub rozkładowi.

Analiza biochemiczna powinna być wykonana w najkrótszym czasie po zabiciu żywej materii, oraz powinno się wstrzymać procesy metaboliczne. W tym celu stosuje się działanie niskiej temperatury (zamrażanie ciekłym azotem lub schłodzonym etanolem, acetonem itp.) albo wysokiej temperatury (wrząca woda lub etanol).

Niskie temperatury spowalniają działanie metabolizmu, a wysokie temperatury powodują denaturację enzymów i hamowanie aktywności biologicznej.

Metabolizm hamuje również pozbawienie tkanki wody swobodnej, np. suszenie w temp. do 70 °C.



Frakcjonowanie materiału biologicznego.

Materiał biologiczny do badań rozdrabnia się a następnie homogenizuje (dezintegruje tkanki i komórki).

Części komórki rozdziela się na zasadzie **różnicowego wirowania**.

Najmniejsza siła wirowania oddziela większe części (np. jądro komórkowe), wyższe siły wirowania oddzielają mitochondria, lizosomy, mikrociałka i rybosomy. W płynie pozostają rozpuszczalne enzymy i drobnocząsteczkowe substancje.

Spełniona jest zależność, że im mniejszy wymiar organelli, tym większa jest jej liczba w komórce.



Związki występujące w organizmach w małych ilościach (zwłaszcza metabolity) lub bardzo podobne pod względem chemicznym, rozdziela się chromatograficznie:

- chromatografia absorpcyjna
- chromatografia cienkowarstwowa
- chromatografia gazowo-cieczowa
- chromatografia jonowymienna
- filtracja żelowa
- chromatografia powinowactwa
- chromatografia cieczowa, wysoko ciśnieniowa



Obieg energii i materii w przyrodzie odbywa się w tzw. **biosferze**.

Warunkami niezbędnymi dla biosfery są: światło słoneczne jako źródło energii, obecność wody w postaci płynnej, sole mineralne oraz dwutlenek węgla jako źródło składników chemicznych.

Energia słoneczna jest przekształcana w materię organiczną dzięki fotosyntetycznemu wiązaniu dwutlenku węgla. W trakcie częściowej redukcji węgla, do atmosfery jest uwalniany tlen z wody.

Reakcja odwrotna polegająca na spalaniu materii organicznej, uwalnia zmagazynowaną energię na procesy życiowe, oraz zużywa tlen a oddaje do otoczenia dwutlenek węgla, zamykając cykl przemian.

Część materii jest rozkładana przez mikroorganizmy, czyli reducentów. W ten sposób są zwracane do środowiska składniki mineralne.



Produkcja biomasy

1/3 produkcji jest w oceanach, 2/3 w ekosystemach lądowych.

Stymulacja produkcji materii organicznej:

- a) sztuczne zwiększanie stężenia dwutlenku węgla
- b) uzupełnianie składników mineralnych w fosfor i azot (właściwe proporcje)
- c) temperatura otoczenia
- d) redukcja odpadów – wzrost ilości odpadów sprzyja rozrostowi reduktantów, intensyfikuje procesy gnilne, co zużywa zapasy tlenu w wodach, niszcząc ekosystemy.



Podłoże molekularne fotosyntezy.

Fotosynteza odbywa się w chloroplastach. Chloroplasty wywodzą się z protoplastydów, otoczonych podwójną błoną. Wewnętrzna błona wpukla się tworząc tylakoidy, które grupują się w lamelle, które z kolei czasem tworzą jajowate jednostki – grany.

Gdy chlorofil pozostaje dłuższy czas w ciemności, lamelle rozpadają się, tworząc pecherzyki.

Chloroplasty zawierają ok. 1/3 masy lipidów.

Chlorofil występuje w kompleksie z białkami i karotenoidami. Niektóre białka wbudowane w tylakoidy są białkami enzymatycznymi, biorącymi udział w reakcjach świetlnych fotosyntezy. Enzymy reakcji ciemnych znajdują się w stromie chloroplastów.



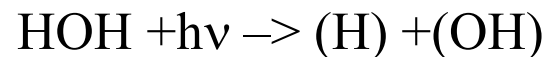
Przebieg fotosyntezy.

Faza jasna – fotolityczny rozkład wody i wytwarzanie związków energetycznych (ATP i NADPH₂)

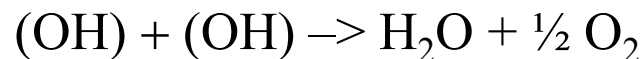
Faza ciemna – asymilacja CO₂ i redukcja powstałych związków do węglowodanów.

Reakcje jasne

1. Rozkład wody na rodniki



2. Redukcja koenzymu NADP do NADPH₂ i rekombinacja rodników OH z uwolnieniem tlenu:



Schemat Z fotosyntezy składa się z **fotosytemu I (PS I)** i **fotosystemu II (PS II)** następujących po sobie.



W fotosystemie II, kwant światła o długości 680 nm wybija z chlorofilu elektron do stanu zredukowanego. Elektron zostaje przechwycony przez nieznany akceptor Q (wygaszacz fluorescencji). Wzbudzony elektron traci energię poprzez nośniki: plastochinon – cytochrom b_3 – cytochrom f – plastocyjaninę i wpada do luki elektronowej fotosystemu I (chlorofil pozbawiony elektronu przez wybite fotonami 700 nm).

W fotosystemie II następuje rozkład wody i tworzenie się ATP (fosforylacja niecykliczna na przejściu cytochrom b_3 – cytochrom f).

Z kolei wybity elektron z chlorofilu fotonem 700 nm (PS I) jest wyłapywany przez akceptor Z. Elektron przechodzi przez ferredoksynę – cytochrom b_6 – cytochrom f – plastocyjaninę. Między cytochromem b_6 a cytochromem f jest możliwa fosforylacja cykliczna z wytworzeniem ATP i powrotem elektronu do PS I. Alternatywnie elektron może przeskoczyć do ferredoksyny i zredukować NADP do NADPH_2 .

Układy PS I i PS II współdziałają ze sobą kooperatywnie wzmacniając fotosyntezę. Jest to efekt Emmersona.

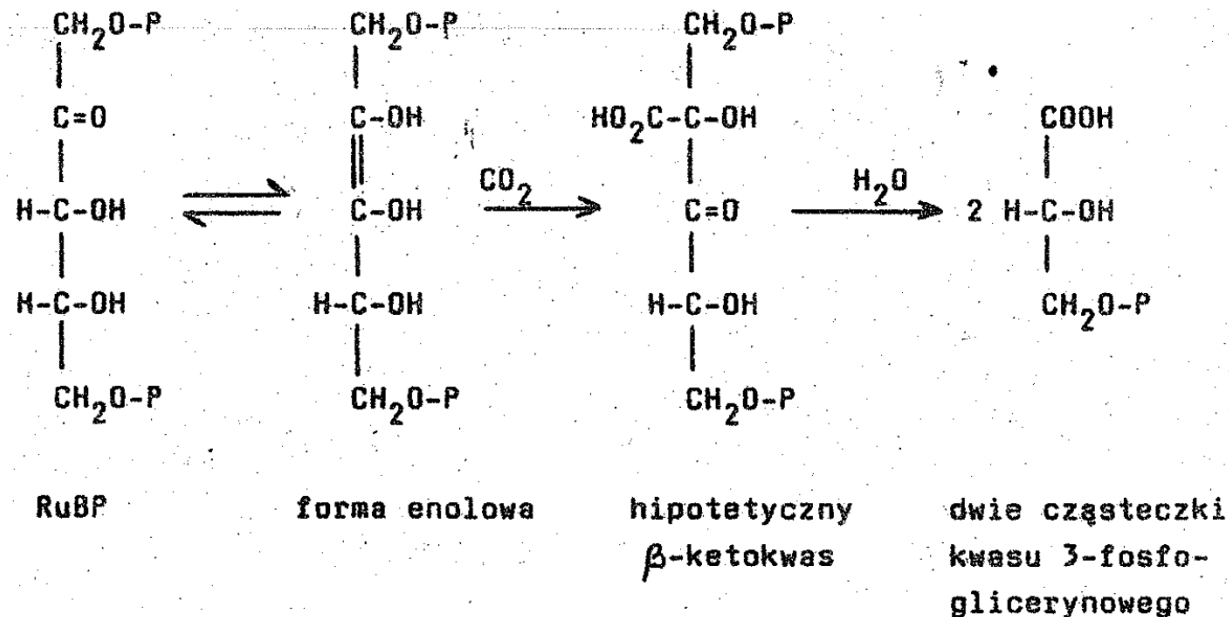
Niektóre organizmy nie mają fotosystemu II i przez to nie mają zdolności rozkładu wody do tlenu. Jako donor wodoru jest wtedy siarkowodór lub związki organiczne.

Reakcje ciemne:

Otrzymane w fazie jasnej ATP i NADPH_2 są potrzebne w procesie asymilacji CO_2 . Ten proces biochemiczny dzieli się na etapy:

- 1) karboksylacja rybulozo-1,5-bisfosforanu
- 2) redukcja kwasu 3-fosfoglicerynowego
- 3) regeneracja rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBP)

RuBP reaguje w formie enolowej. CO_2 przyłącza się do węgla 2, a po hydrolizie powstałego związku pośredniego, tworzą się dwie cząsteczki kwasu 3-fosfoglicerynowego.



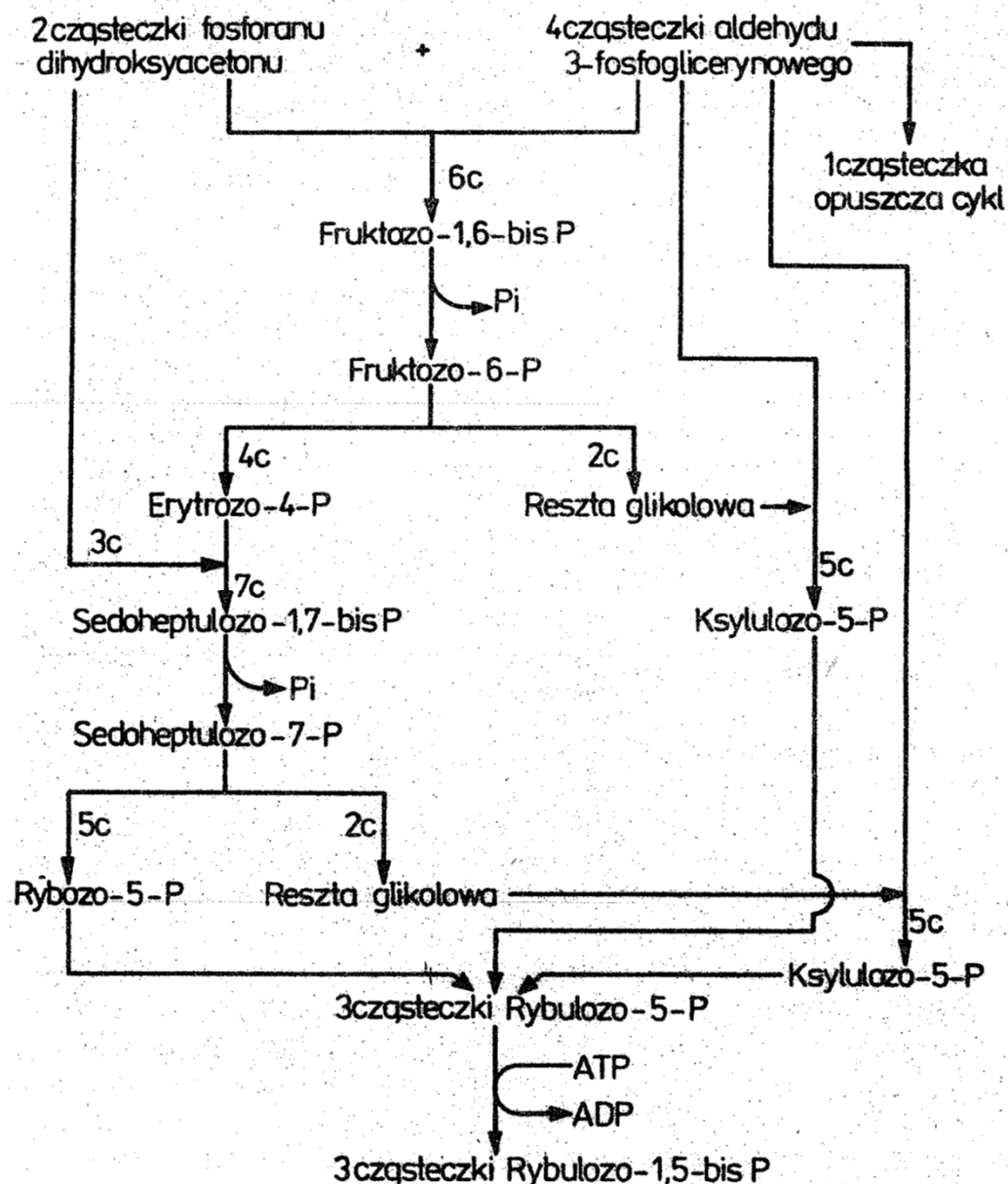


Ufosforylowanie kwasu 3-fosfoglicerynowego przy węglu 1 prowadzi do kwasu 1,3-bis-fosfoglicerynowego. Zużywa się tutaj ATP z reakcji jasnej.

Następnie redukcja tego związku za pomocą NADPH_2 prowadzi do powstania aldehydu 3-fosfoglicerynowego i uwolnienie fosforanu nieorganicznego.

Konieczność ciągłego odbudowywania akceptora CO_2 , czyli rybulozo-1,5-bisfosforanu jest powodem, że na każde 6 cząsteczek aldehydu 3-fosfoglicerynowego, 5 cząsteczek jest zużywane do regeneracji RuBP, a tylko jedna cząsteczka służy do syntezy heksozy.

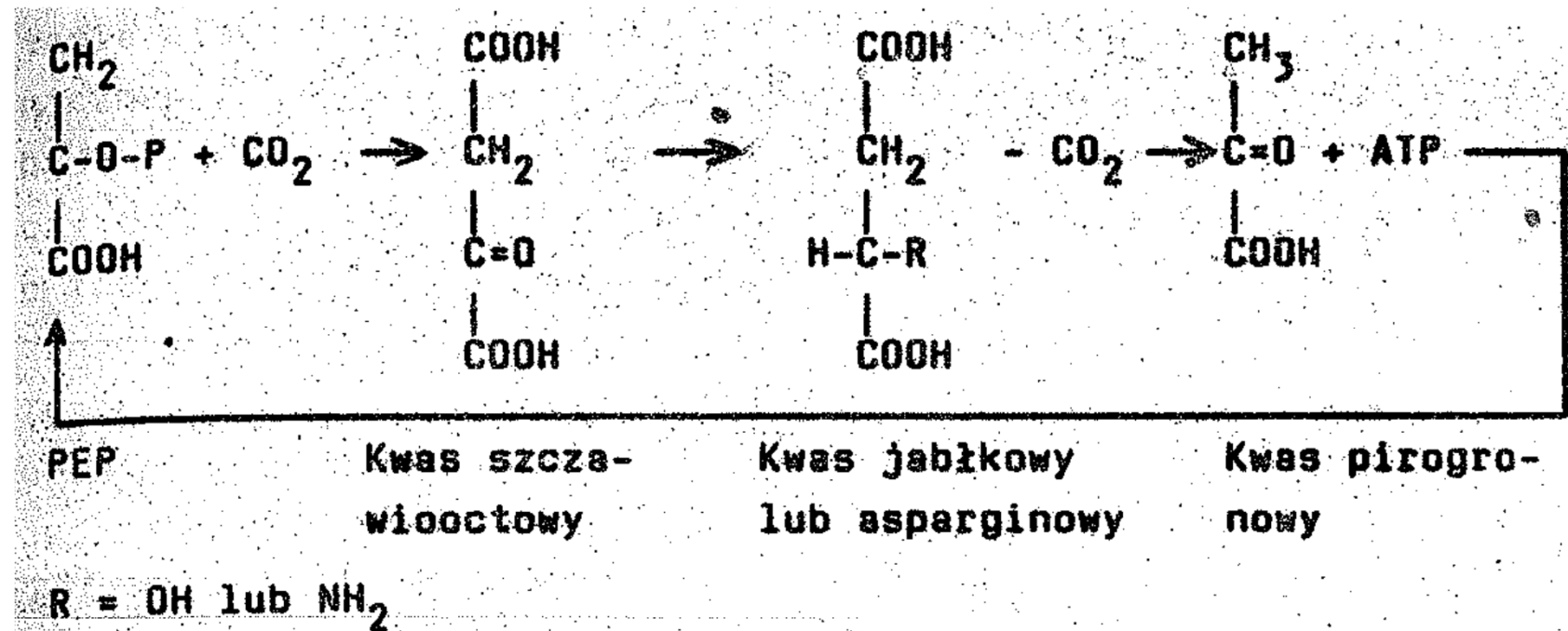
Regeneracja rybulozo-1,5-bisfosforanu (akceptora CO_2). Aldehyd 3-fosfoglicerynowy częściowo izomeryzuje do fosforanu dihydroksyacetonu, a następnie obie formy dimeryzują do fruktozo-1,6-bisfosforanu. Związek ten po defosforylacji przechodzi w fruktozo-6-fosforan, a następnie rozkłada się na resztę glikolową i erytrozo-4-fosforan, który kondensuje z fosforanem dihydroksyacetonu do sedoheptulozo-1,7-bisfosforanu, a następnie po defosforylacji i fragmentacji na rybozo-5-fosforan i resztę glikolową, ta ostatnia kondensuje z aldehydem-3-fosfoglicerynowym do ksylukozy-5-fosforanu. Podobną kondensację przechodzi reszta glikolowa z rozbitcia fruktozo-6-fosforanu. Te trzy pięciowęglowe związki izomeryzują do rybulozo-5-fosforanu i po fosforylacji tworzy się rybulozo-1,5-bisfosforan.



Fotosynteza roślin typu C₄

Niektóre rośliny z siedlisk jałowych (kukurydza, trzcina cukrowa, sorgo) mogą asymilować CO₂ na drodze wiązania go z fosfoenolopirogronianem (PEP).

Akceptorem CO₂ jest PEP, który przekształca się w czterowęglowy kwas szczawiooctowy. Następnie ulega on redukcji do kwasu jabłkowego (niekiedy asparginowego na drodze transaminacji). 4-węglowe produkty przemieszczają się do komórek pochwy okołowiązkowej gdzie następuje dekarboksylacja z otrzymaniem kwasu pirogronowego, który wraca do komórek miękiszu, podlega ufosforylowaniu przez ATP, odtwarzając PEP.





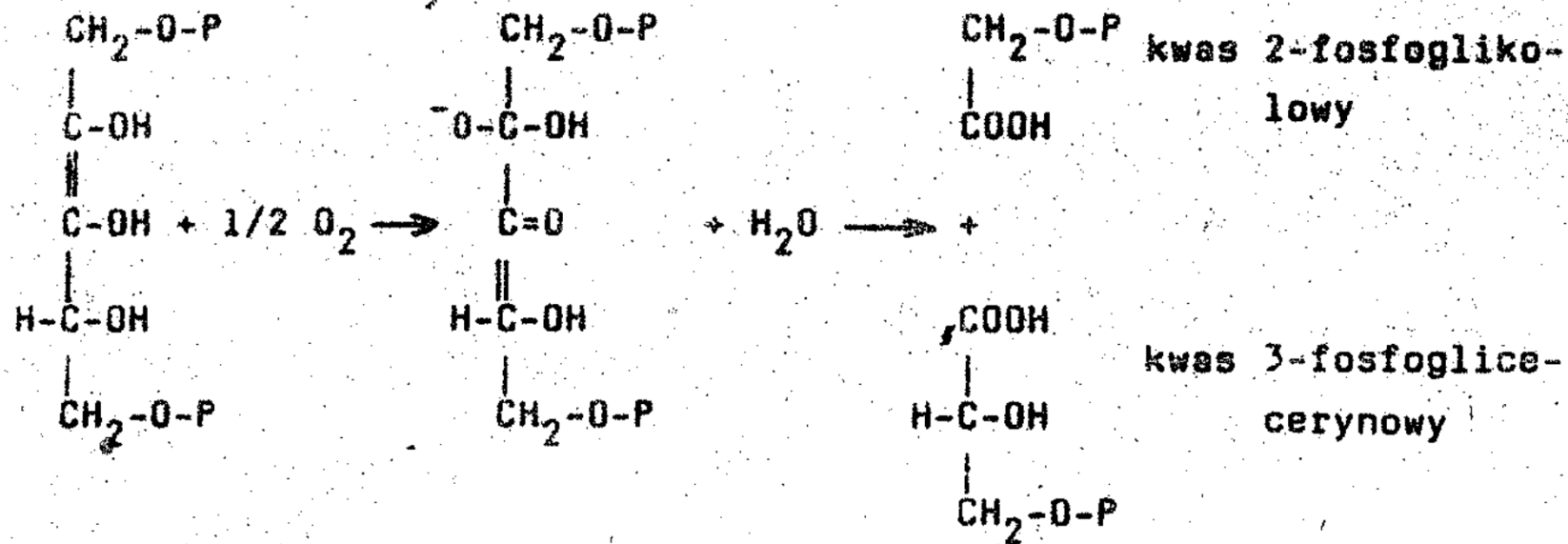
Natomiast uwolniony w komórkach pochwy okołowiązkowej dwutlenek węgla, jest wiązany rybulozo-1,5-bisfosforanem i chodzi do cyklu Calvin.

Dla tego typu roślin proces wiązania i uwalniania CO₂ jest przestrzennie rozdzielony.

Rośliny gruboszowate rozdzielają proces na dzienny i nocny, ponieważ w dzień aparaty szparkowe są zamknięte w celu uniknięcia utraty wody. Nocą szparki są otwarte i CO₂ może swobodnie dyfundować do tkanek, jest tam wiązany do dużych ilości kwasu jabłkowego, a w dzień jest uwalniany i wiązany w cyklu Calvin.

Efektywność wiązania CO₂ zależy od ilości enzymu (karboksylazy RuBP). Jest to prawdopodobnie połowa wszystkich rozpuszczalnych białek zielonych liści i podstawowe źródło białka dla zwierząt trawożernych.

Karboksylaza RuBP oprócz funkcji karboksylującej, posiada również w warunkach ograniczonej dostawy CO₂, aktywność oksigenacyjną, prowadzącą do rozkładu RuBP z wytworzeniem cząsteczki kwasu 3-fosfoglicerynowego i kwasu 2-fosfoglikolowego. Odbywa się to poprzez przyłączenie tlenu do węgla 2 formy enolowej rybulozobisfosforanu i hydrolizie powstałego karboanionu:



Po defosforylacji kwasu 2-fosfoglikolowego swobodny glikolan przenika do glioksosomów i tam podlega utlenieniu gliokasalanu i dalszym przemianom do glicyny i seryny.



Z kolei dwie cząsteczki glicyny mogą reagować z jedną cząsteczką seryny uwalniając cząsteczkę CO₂. Również bezpośrednie utlenianie glikosalanu za pomocą nadtlenu wodoru, może prowadzić do wydzielania się CO₂. To dodatkowe wydzielanie dwutlenku węgla nazwano **fotorespiracją** i znalazło zastosowanie jako zwiększenie dostawy CO₂ dla rośliny, co zwiększa produktywność biomasy.

Natężenie fotosyntezy roślin typu C₃ zależy w mniejszym stopniu od temperatury otoczenia, niż roślin typu C₄. W reakcjach niezależnych od temperatury należy spodziewać się zjawisk fizycznych, np. ograniczonego dostępu CO₂ do wnętrza komórek, natomiast w reakcjach zależnych od temperatury chemizm procesu decyduje o szybkości reakcji.

Odpowiedzialnym enzymem za sprawną karboksylację u roślin typu C₄ jest PEP-karboksylaza, natomiast u roślin typu C₃ – RuBP-karboksylaza.



Uwalnianie energii.

Organizmy żywe wytwarzają energię dzięki reakcjom oksydoredukcyjnym. Mogą one być przeprowadzone na trzech drogach:

- 1) Dehydrogenacja związków organicznych (usunięcie wodoru)
- 2) Oksydacja (dodanie tlenu)
- 3) Hydratacja – dehydrogenacja (dodanie wody i usunięcie wodoru).

Sposób 1 i 3 odbywa się w warunkach anaerobowych, sposób 2 wymaga warunków aerobowych. Organizmy, żyjące w warunkach beztlenowych zdobywają energię na drodze **fermentacji właściwej** – jest to starsza forma zdobywania energii i jest spotykana u organizmów niższych (bakterie, drożdże). **Oddychanie właściwe, tlenowe** wytworzyły organizmy wyższe.

Etapy adaptacji do oddychania tlenowego:

- 1) Unieszkodliwianie rodnika nadadtlenkowego (za pomocą dysmutazy nadadtlenkowej), a następnie katalaza do wody i tlenu, lub peroksydaza – utlenienie związku organicznego.
- 2) Wytworzenie peroksysomów (organelli zawierających powyższe enzymy)

Powyższe przemiany nie dostarczają użytecznej energii, służą tylko zabezpieczeniu przed szkodliwym wpływem tlenu.



Przejście z fazy beztlenowej w fazę tlenową oddychania dało duży zysk ekonomiczny dla organizmów: podczas oddychania beztlenowego powstają tylko dwie cząsteczki ATP w jednym cyklu, a dla oddychania tlenowego – 36 cząsteczek ATP.

Podczas oddychania beztlenowego materiał energetyczny nie jest w pełni wykorzystywany, a produkty odpadowe często stanowią trucizny dla wydzielających je organizmów (np. alkohol etylowy czy kwas mlekowy). Natomiast produkty spalania tlenowego (CO_2 i woda) nie są trujące dla żywych organizmów.

Metabolizm beztlenowy dla organizmów zwierzęcych to **glikoliza** (substratem jest glikogen), natomiast dla mikroorganizmów ten proces to **fermentacja**. Fermentacja prowadzi do etanolu, kwasów octowego, propionowego lub masłowego, butanolu, acetonu i innych produktów.

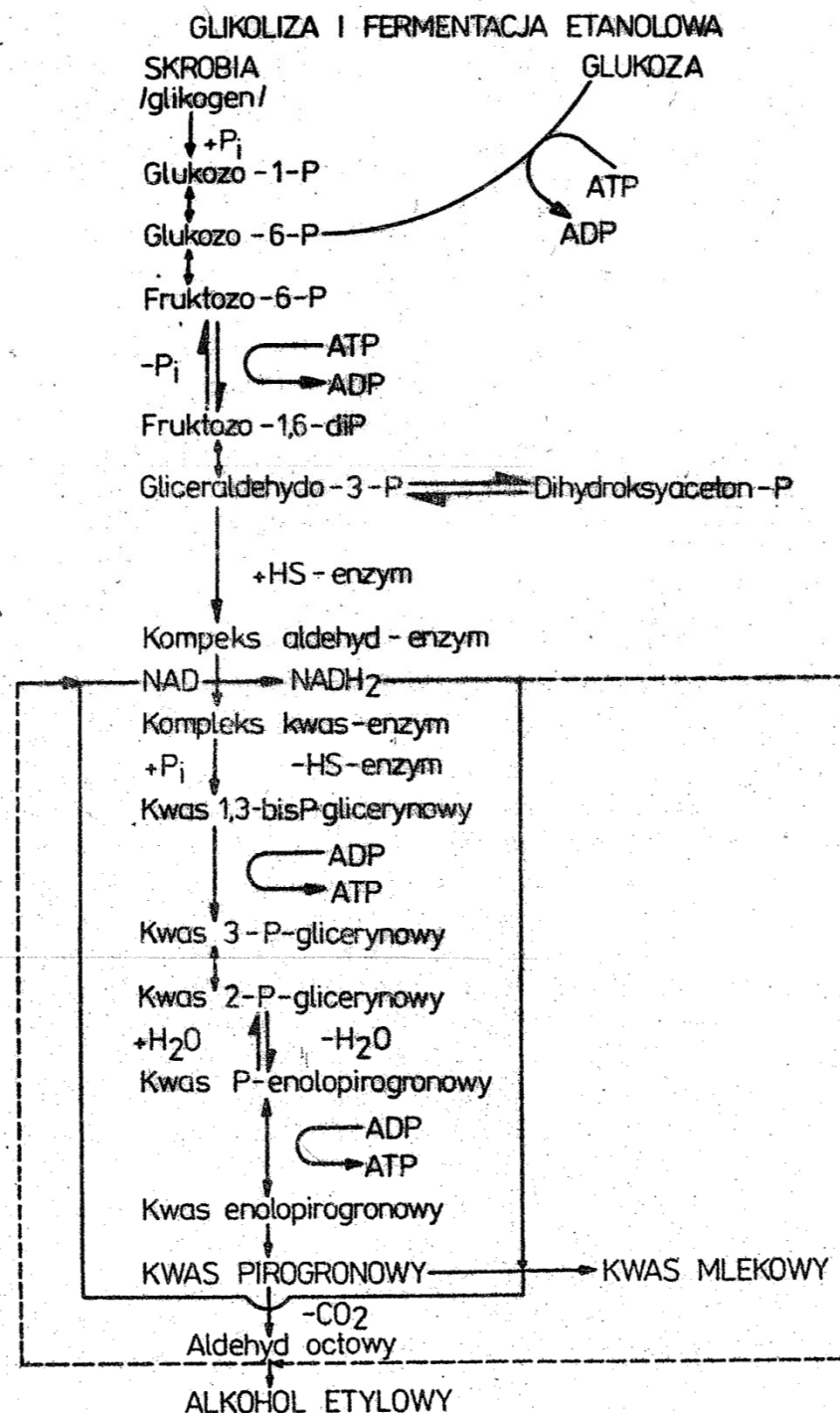
Mechanizm glikolizy i fermentacji

Degradacja glikogenu lub skrobi (enzym fosforylaza) do glukozo-1-fosforanu (energia wiązania glikozydowego zostaje zachowana w wiązaniu fosforanowym. Start od glukozы wymaga cząsteczki ATP. Izomeryzacja do fruktozo-6-fosforanu i fosforylacja do fruktozo-1,6-difosforanu, następnie rozpad na dwie triozy: aldehyd 3-fosfoglicerynowy i fosforan dihydroksyacetonu.

Utlenianie aldehydu 3-fosfoglicerynowego do kwasu 1,3-bisfosfoglicerynowego z utworzeniem bogatoenergetycznego wiązania fosforanowego przy pierwszym węglu. Energia ta jest przekazana na wytworzenie ATP.

Izomeryzacja fosforanu i dehydratacja do kwasu 2-fosfoenolopirogronowego. Oddanie energii do ATP i utworzenie kwasu pirogronowego, następnie redukcja do kwasu mlekowego lub dekarboksylacja do aldehydu octowego redukcja do etanolu (odzysk NAD).

Wykład 11





Glukoneogeneza jest odwrotnością ciągu glikolitycznego. Proces ten obejmuje syntezę glukozy z różnych niewęglowodanowych prekursorów, np. z rozpadu tłuszczów i białek.

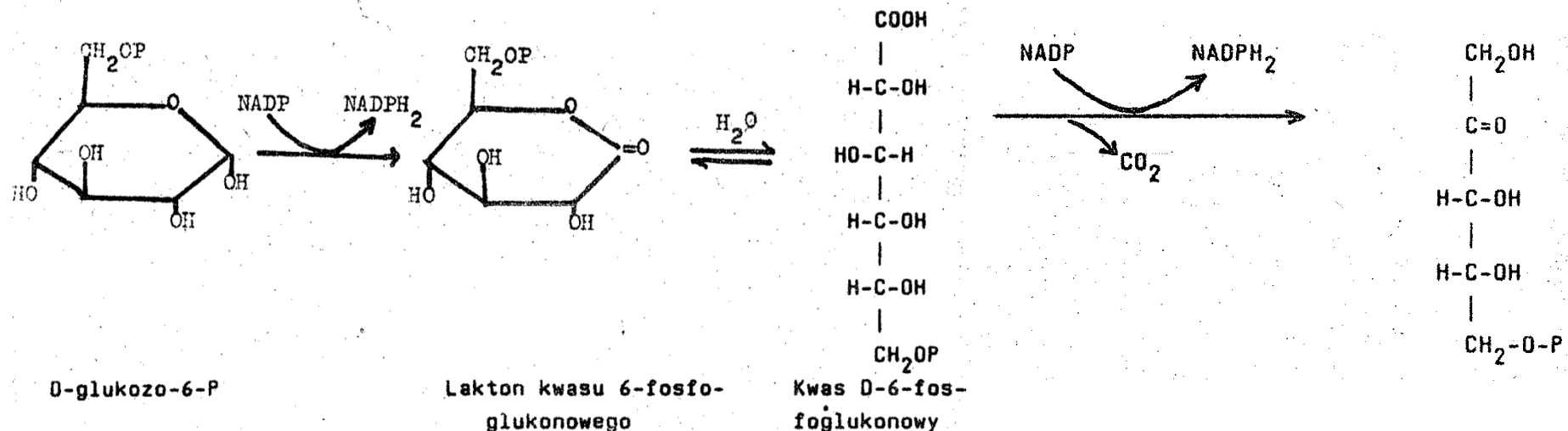
Jako substrat występuje kwas szczawiooctowy, który przy udziale karboksylazy fosfoenolopirogronianu przekształca się w fosfoenolopirogronian z uwolnieniem CO_2 . W trakcie tej reakcji zużywa się jedna cząsteczka ATP.

Fosfoenolopirogronian na drodze odwracalnych reakcji ciągu glikolitycznego odtwarza fruktozo-1,6-bisfosforan. Za pomocą hydrolizy wiązania estrowego, odrywa się resztę fosforanową. Dalsze reakcje są odwrotnością ciągu glikolitycznego i prowadzą do glukozo-6-fosforanu. Jego hydroliza za pomocą fosfatazy, daje swobodną glukozę.

Oksydacyjny cykl pentozofosforanowy – to alternatywny do ciągu glikolitycznego, cykl reakcji prowadzący do otrzymania pentoz, aminocukrów, kwasów uronowych i innych. W tym cyklu otrzymywane są m. in. ryboza i dezoksyryboza, erytroza, a także jest otrzymywane NADPH_2 .

Cykl zaczyna glukoza. ATP fosforyluje ją do glukozo-6-fosforanu, który jest utleniany do δ -laktonu kwasu 6-fosfoglukonowego. Hydroliza prowadzi do kwasu 6-fosfoglukonowego. Dalsze utlenienie i dekarboksylacja dają rybulozo-5-fosforan. W tym ciągu otrzymano 2 cząsteczki NADPH_2 .

Dalsze reakcje przypominają odwrotność reakcji redukującego cyklu pentozofosforanowego (podobnie jak fotosynteza). Ostatecznie uzyskuje się z trzech cząsteczek fosforanu pentozy dwie cząsteczki heksozofosforanu i jedną cząsteczkę triozofosforanu. Dodatkowo wytwarza się 6 cząsteczek NADPH_2 i sześć cząsteczek CO_2 .





Rola NAD i NADP

NAD – jest przede wszystkim koenzymem fermentacji, oraz pełni główną rolę w oddychaniu tlenowym. Występuje w formie utlenionej, żeby zawsze być w pogotowiu do przyjęcia wodorów.

NADP – występuje przede wszystkim w formie zredukowanej i trudno utlenialny tlenem atmosferycznym, nie jest więc wykorzystywany do sprzężonej fosforylacji ADP.

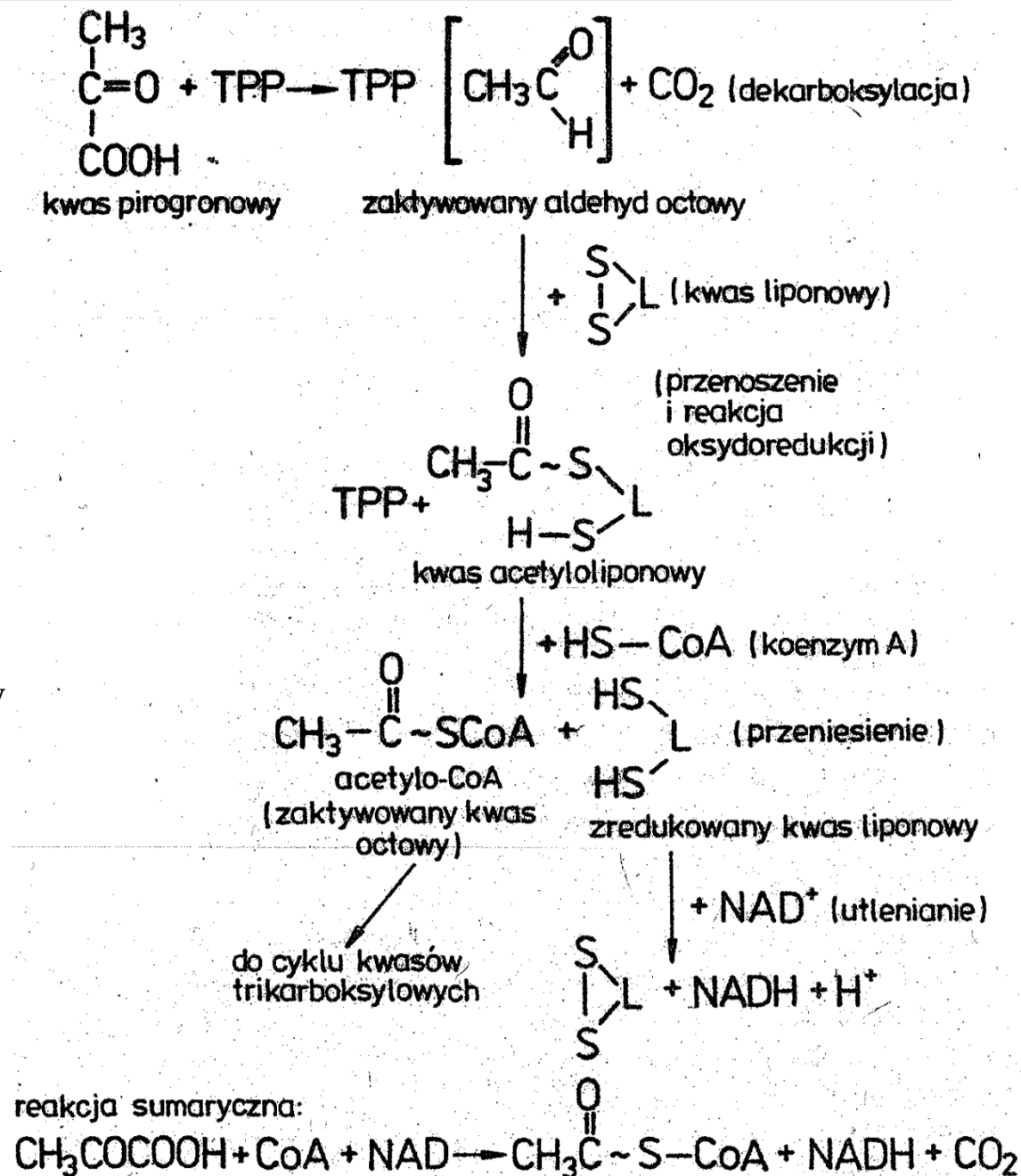
W razie potrzeby oba koenzymy mogą być wykorzystane w reakcji transhydrogenacji, czyli wymiany wodorów między nimi.

Oddychanie tlenowe.

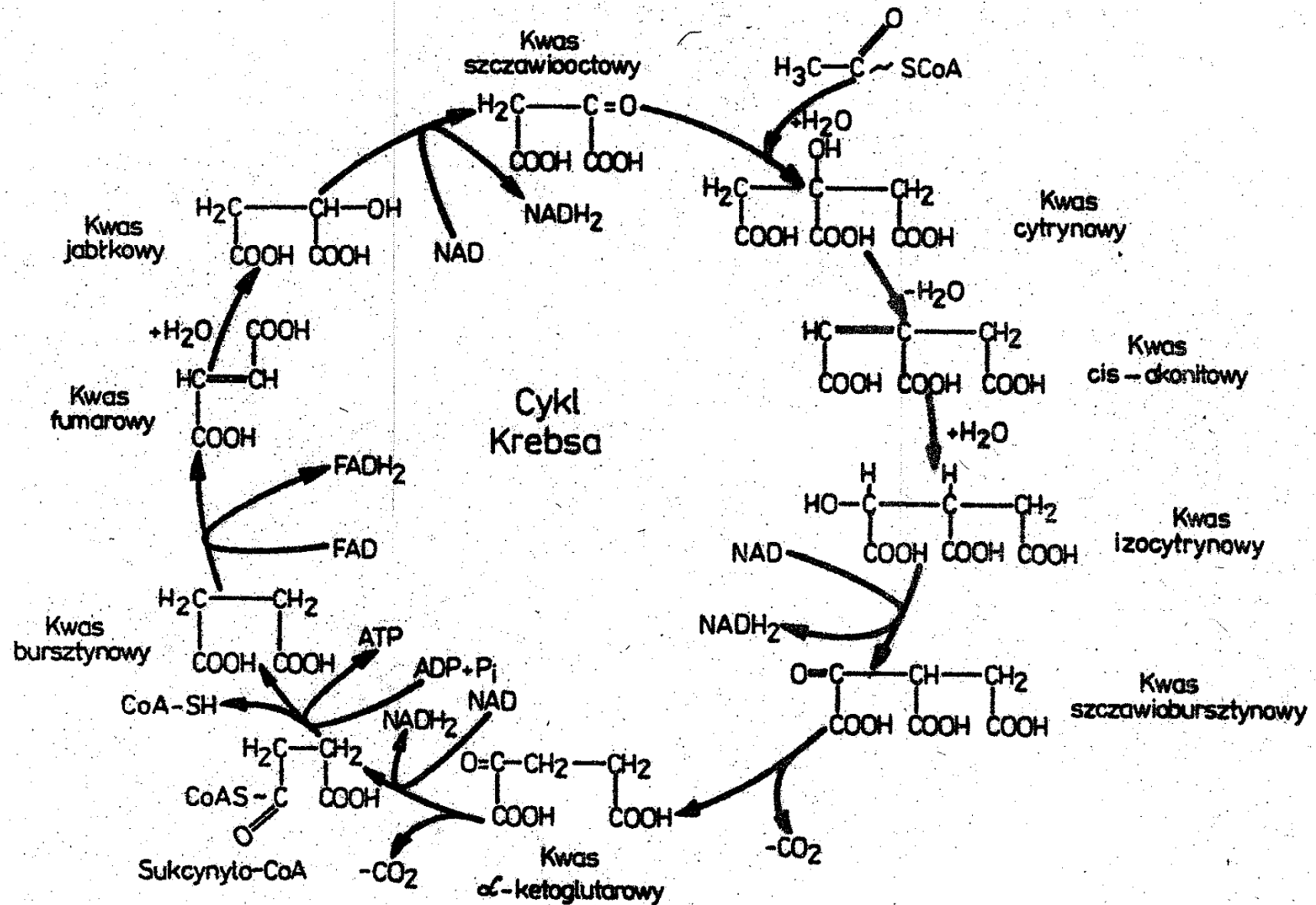
W oddychaniu tlenowym nie powstaje kwas mlekowy ani etanol, ale do dalszych reakcji jest używany kwas pirogronowy, który ulega **dekarboksylacji oksydacyjnej**.

Kwas pirogronowy ulega dekarboksylacji z utworzeniem aktywowanego aldehydu (z pirofosforanem tiaminy). Aldehyd jest utleniany kwasem liponowym do kwasu octowego, który z CoA tworzy acetylokoenzym A. Jednocześnie uwalnia się zredukowany kwas liponowy, który następnie jest utleniany za pomocą FAD i NAD.

Acetylokoenzym A jest substratem dalszych przemian cyklu kwasu cytrynowego (cyklu Krebsa).



Cykl kwasu cytrynowego (cykl Krebsa)



Utylizacja NADH_2 i FADH_2

W czasie jednego obrotu cyklu Krebsa powstaje jedna cząsteczka FADH_2 i trzy cząsteczki NADH_2 . Są one potem utleniane w procesie łańcucha oddechowego. W trakcie tego procesu powstają cząsteczki ATP – ten proces nazywa się fosforylacją oksydacyjną.

Kierunek przechodzenia elektronów i protonów jest następujący:

$\text{NAD} - \text{FAD} - \text{ubichinon} - \text{cytochrom b} - \text{cytochrom c}_1 - \text{cytochrom c} - \text{cytochrom a}_3 - \text{tlen}$

(cytochromy przenoszą już same elektrony, protony pozostały przy ubichinonie)

Miejsca sprzężenia fosforylacji z oksydacją występują podczas przenoszenia wodoru od NAD do FAD , pomiędzy FAD i ubichinonem, oraz cytochromem a_3 i tlenem. W tych miejscach tworzy się na tyle dużo energii chemicznej, że cząsteczki ADP mogą reagować z fosforanem nieorganicznym z wydzieleniem ATP .

Tłuszczowce jako źródło energii

Węglowodany mogą być zamieniane na bardziej wydajne energetycznie tłuszcze (stałe i oleje). Tłuszcze są jeszcze bardziej zredukowane niż węglowodany, w związku z tym magazynują większe ilości energii.

Ze względu na nierozpuszczalność tłuszczów w wodzie, są gromadzone w postaci bezwodnej, co jeszcze korzystniej wpływa na energetyczność tych związków. (1 g bezwodnego tłuszczu magazynuje ponad 6 razy więcej energii niż gram uwodnionego glikogenu).

Tłuszcze są odkładane w postaci kropelek lub emulsji w cytoplazmie lub w lipoplastach.

Z uwagi na charakter apolarny, w tłuszczach mogą się rozpuszczać substancje lipofilowe, np. karotenoidy, sterole, witaminy z grupy A, D, E, K.

Synteza tłuszczów zachodzi w cytozolu, a rozkład w matriks mitochondrialnym. Jako związek redukujący w syntezie tłuszczów występuje NADPH_2 oraz bierze udział białkowy nośnik grup acylowych, natomiast podczas degradacji uwalnia się NADH_2 i rozkład tłuszczów zachodzi z udziałem koenzymu A.

Enzymy katalizujące syntezę tłuszczów zwykle występują w postaci kompleksów enzymowych, co ułatwia kontrolę szybkości syntezy i eliminuje zjawisko dyfuzji pomiędzy enzymami.

Degradacja tłuszczów prostych

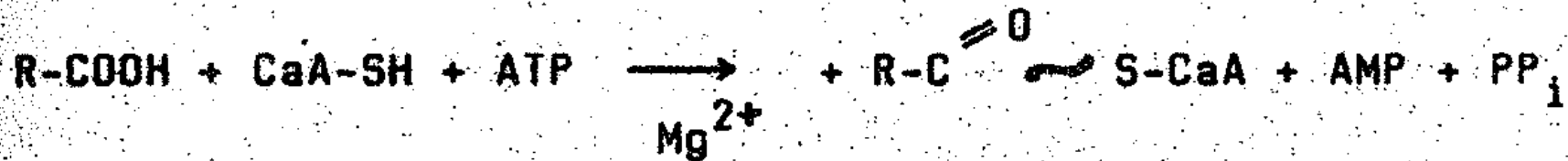
1. Hydroliza triglicerydu za pomocą lipaz. Proces deestryfikacji przebiega stopniowo do otrzymania mieszaniny glicerolu i kwasów tłuszczowych:



2. Glicerol ulega ufosforylowaniu do α -glicerofosforanu za pomocą ATP i kinazy, utlenia się do fosfodihydroksyacetonu i wchodzi do przemiany węglowodanowej:



3. Kwasy tłuszczowe ulegają β -oksydacji (spirala kwasów tłuszczowych Lynena). Najpierw wiążą się z koenzymem A, tworząc zaktywowany kwas tłuszczowy:



Reakcja ta jest odwracalna, dlatego komórka szybko hydrolizuje pirofosforan, przesuwając stan równowagi w prawo.

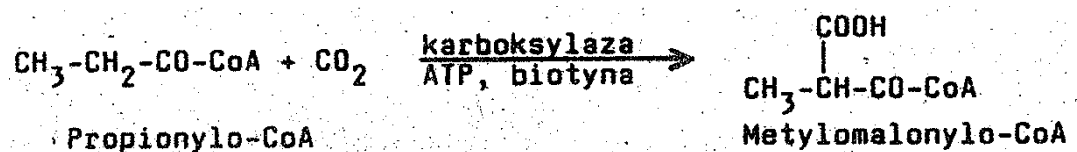
Kompleks acylokoenzymu A ulega dalszym przemianom w matriks mitochondrialnym, jest transportowany przez błonę mitochondrialną po zamianie koenzymu A na karnitynę. Po przejściu przez błonę z powrotem powstaje acylokoenzym A.

Sekwencja reakcji prowadzących do β -oksydacji kwasy tłuszczowego polega na dwóch odwodorowaniach, jednej hydratacji i odszczepieniu acetylokoenzymu A (do cyklu Krebsa).

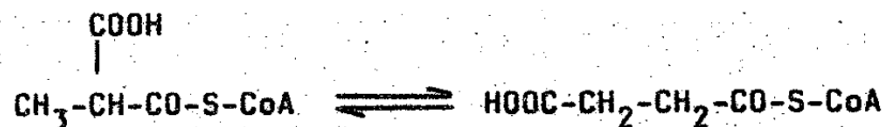
Pozostały kwas, krótszy o dwa węgle podlega następnej sekwencji powyższych reakcji (spirala kwasów tłuszczowych).

Pierwsze odwodorowanie zachodzi pomiędzy drugim i trzecim węglem, przy udziale koenzymu FAD. Nienasycony kwas przyłącza cząsteczkę wody i przechodzi w β -hydroksykwas, dalsza redukcja i odwodorowanie za pomocą NAD daje β -ketokwas, który rozpada się na acylo-koenzym A (krótszy o 2 węgle) i acetylokoenzym A, który wraz z NADH_2 i FADH_2 wchodzi do cyklu oddychania.

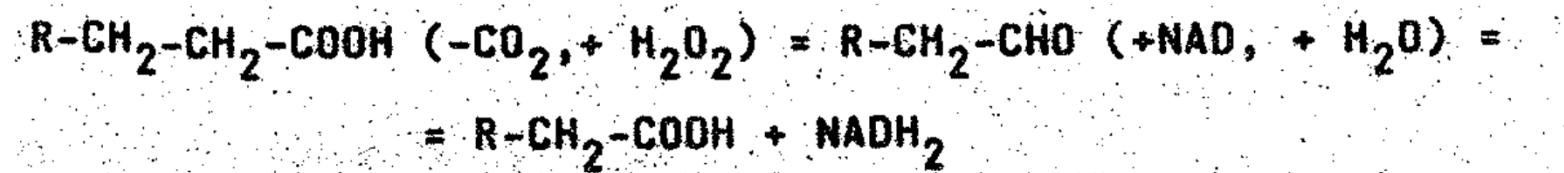
Większość kwasów tłuszczowych ma parzystą liczbę atomów węgla. Wyjątkowo zdarzają się nieparzyste, wtedy jako ostatni w spirali pojawi się propionylo-koenzym A, ten ulega przemianie do metylomalonylo-koenzymu A:



a następnie przegrupowuje do sukcyntylo-CoA, metabolitu cyklu Krebsa.



Wyższe kwasy tłuszczowe od C₁₃ do C₁₈ mogą podlegać procesowi α-oksydacji. Pod wpływem odpowiedniego enzymu następuje peroksydacyjna dekarboksylacja kwasu i odszczepia się CO₂, a węgiel α ulega utlenieniu za pomocą wody utlenionej. Dalej następuje odwodorowanie i tworzy się kwas krótszy o jeden węgiel:



Wydajność α-oksydacji w porównaniu z β-oksydacją jest mniejsza, bo zamiast pięciu cząsteczek ATP na jeden obrót, powstają tylko trzy cząsteczki ATP.

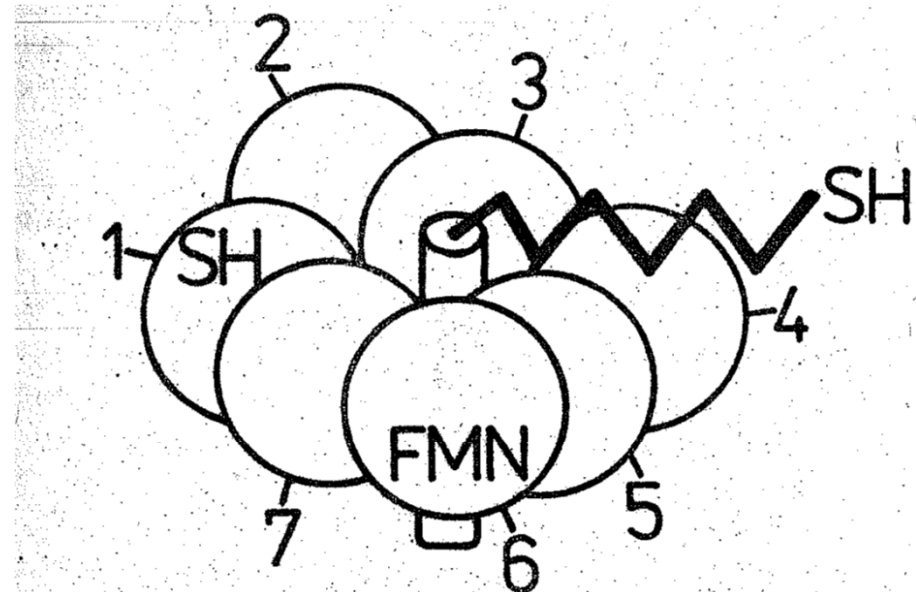
Biosynteza kwasów tłuszczowych

Substratem do biosyntezy kwasów tłuszczowych jest acetylo-CoA. Najpierw ulega on karboksylacji przy udziale karboksybiotyny i odpowiedniego enzymu:

Acetylo-CoA + karboksybiotyna $\rightarrow$ malonylo-CoA + biotyna.

Następnie malonylo-CoA łączy się z kompleksem enzymowym – syntetazą kwasów tłuszczowych, za pośrednictwem grupy $-SH$ w tym kompleksie:

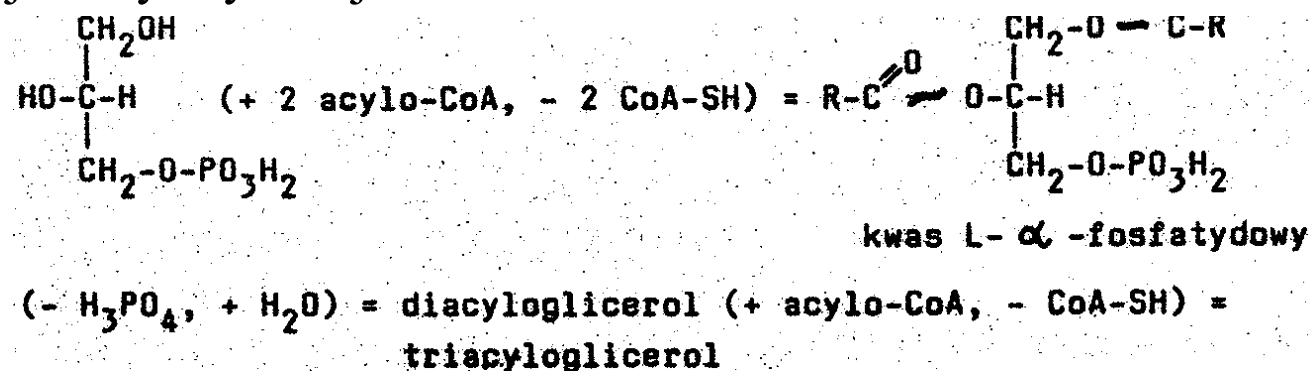
Kompleks składa się z 7 enzymów, otaczających białko ACP, zawierające fosforan panteteiny, które wiąże malonylo-CoA za pomocą centralnej grupy SH. Następnie acetylo-CoA jest przyłączany do peryferyjnej grupy SH, następnie kondensacja reszty acetylowej z malonową i uwolnienie CO_2 . Następne etapy biosyntezy przypominają odwrotność katabolizmu kwasów tłuszczowych, ale z udziałem innych koenzymów.



MODEL DROŹDZOWEJ SYNTETAZY KWASÓW TŁUSZCZOWYCH: 1-transferaza acetylowa, 2-transacylaza malonylowa, 3-syntetaza β -ketoacylo-ACP, 4-reduktaza β -ketoacylo-ACP, 5-dehydrazaza β -hydroksyacylo-ACP, 6-reduktaza enoilo-ACP, 7-transferaza acylowa.

Acetoacetylo-ACM ulega redukcji do β -hydroksykwasu (za pomocą NADPH_2). Dehydratacja tego kwasu prowadzi do kwasu 2,3-nienasyconego. Kolejna redukcja za pomocą koenzymu FMNH_2 i przetransportowanie powstałego połączenia do peryferyjnej grupy SH, natomiast do centralnej grupy SH przyłącza się kolejna cząsteczka malonylowa. Dalej cykl się powtarza do uzyskania 16-węglowej cząsteczki kwasu palmitynowego.

Aktywne kwasy tłuszczowe (acylo-CoA) reagują z glicero-3-fosforanem i powstaje kwas L- α -fosfatydowy, który ulega defosforylacji z przyłączeniem trzeciej reszty acylowej.



Kwasy nienasycone powstają wtórnie w wyniku utleniania tlenem cząsteczkowym i redukcji przy udziale NADH_2 . Niektóre kwasy nienasycone (np. kwas linolowy) muszą być wprowadzane do organizmów zwierzęcych z zewnątrz, ze względu na brak możliwości tworzenia wiązań podwójnych na dalszych węglach niż C_9 .



Błony biologiczne (cytoplazmatyczne) – służą oddzieleniu żywych komórek, lub organelli komórkowych od otoczenia. Umożliwiają one selektywną wymianę różnych związków, oraz ograniczają różne reakcje lub ciągi reakcji od siebie.

Komórki roślinne są jeszcze zabezpieczone przed urazami mechanicznymi lub oddziaływaniem chemicznym, ścianą komórkową. W komórkach zwierzęcych taką rolę pełni fibrylarna błona zewnętrzna.

Kontakt komórki z otoczeniem umożliwiają rozmieszczone na jej powierzchni, różne receptory i antygeny, będące pod względem chemicznym najczęściej glikoproteinami lub glikolipidami.

Istnieje szereg różnych hipotez dotyczących budowy i funkcjonowania błon komórkowych. Wydaje się, że najbardziej zbliżony do rzeczywistości jest model płynno-mozaikowy Singera i Nicolsona.



Model błony komórkowej Singera i Nicolsona

W modelu płynno-mozaikowym błony komórkowej zakłada się, że podwójna warstwa lipidowa jest poprzetykana cząsteczkami białka. Niektóre te cząsteczki są całkowicie zanurzone w błonie inne częściowo. Agregaty białek mogą tworzyć kanały w fazie lipidowej.

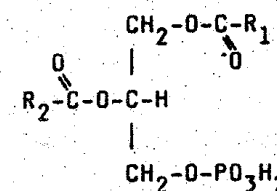
Białka zewnętrzne (peryferyczne) łatwo dysocjują z powierzchni lipidowej przy użyciu czynników chelatujących. Są zakotwiczone w błonie za pomocą oddziaływań z polarnymi grupami fosfolipidów. Białka te wykazują właściwości polarne.

Białka integralne (zatopione w dwuwarstwie fosfolipidowej) można usunąć tylko za pomocą specjalnych detergentów, powodujących dysocjację całej błony na pojedyncze łańcuchy polipeptydowe i lipidowe. Białka integralne są często proteolipidami, czyli lipoproteinami hydrofobowymi, nie rozpuszczalnymi w wodzie. Hydrofobowość ułatwia przenikanie w głąb dwuwarstwy, a wynika z większego udziału aminokwasów niepolarnych w strukturze białka.

Białka pływają w strukturze fosfolipidów, natomiast odwrócenie się białka (flip-flop) jest utrudnione, gdyż silnie polarny łańcuch cukrowy uniemożliwia tę operację. Dodatkowo najczęściej są asymetryczne, więc warstwa zewnętrzna różni się od wewnętrznej.

Skład chemiczny błon biologicznych

Fosfolipidy – pochodne kwasu L- α -fosfatydowego, połączonego np. z choliną, seryną lub inozytolem



R_1 i R_2 = reszty acylowe nasyconego kwasu tłuszczowego (R_1) i nienasyconego (R_2)

Glikolipidy – pochodne galaktozy, glukozy i mannozy łączące się z glicerolem wiązaniami glikozydowymi. Podklasą są sulfolipidy, np. sulfochinowozyldiacyloglicerol. Chinowoza jest 6-dezoksyglukozą.

Cholesterol – należący do steroli, pochodnych cyklopentanoperhydrofenantrenu. Cholesterol występuje głównie w tkankach zwierzęcych. W tkankach roślinnych jest zastąpiony β -sitosterolem, ergosterolem lub stigmasterolem.

Charakter ciekłokrystaliczny błony zależy od składu chemicznego. Nasycone kwasy tłuszczowe tworzą zwartą błoną połączoną siłami hydrofobowymi. Obecność kwasów nienasyconych o konfiguracji *cis* powoduje gorsze upakowanie łańcuchów i obniżenie temperatury płynięcia błony. Podobnie działają kwasy o rozgałęzionych łańcuchach. Natomiast sterole usztywniają błonę biologiczną. Komórka zmieniając skład chemiczny, może regulować stan ciekłokrystaliczny błony w zależności od potrzeb.



Transport przez błony

Przenikanie substancji przez błony biologiczne jest zróżnicowane, umożliwiając regulację procesów metabolicznych.

Dyfuzja prosta – dyfuzja proporcjonalna do gradientu stężeń. Związki wędrują od stężeń większych do mniejszych. Małe znaczenie w procesach biochemicznych.

Dyfuzja ułatwiona – zachodzi spontanicznie, bez nakładów energetycznych, np. przenikanie glukozy z krwi do erytrocytów. W dyfuzji ułatwionej bierze udział jakiś przenośnik, znajdujący się po zewnętrznej stronie błony, łączy się z przenoszonym metabolitem, kompleks przechodzi przez błonę i uwalnia metabolit do wnętrza komórki. Szybkość dyfuzji zależy ilości cząsteczek przenośnika.

Transport aktywny:

Transport aktywny pierwszorzędowy (prosty) – energię na pokonanie gradientu dostarcza reakcja chemiczna łącząca się z układem transportującym.

Transport aktywny wtórny – aktywny transport jednego związku łączy się z równoczesnym transportem innego zgodnie z gradientem chemicznym.



Transport aktywny, model permeazowy –permeaza ulega ufosforylowaniu (przez ATP), zdobywając w ten sposób energię na przejście przez błonę. Wykazuje ona również powinowactwo do metabolitu, pociągając go za sobą.

Transport aktywny, model chemiosmotyczny – energii dostarcza gradient protonów, otrzymanych w łańcuchu oddechowym, tu permeaza działa jako symport protonów i siłą napędzającą permeazę jest gradient protonów, a metabolit jest przyłącza się biernie do permeazy.

Transport wtórny, pompy jonowe – energię dostarcza ATP, fosforylacje i defosforylacje wiążą i uwalniają odpowiednie jony. Pompa sodowo-potasowa – sód wiąże się w cytoplazmie z białkiem enzymatycznym, stymulując fosforylację, białko wiąże potas na zewnątrz błony, sód jest przenoszony na zewnątrz błony, białko defosforyluje przenosząc potas do wnętrza komórki i tam go uwalnia.

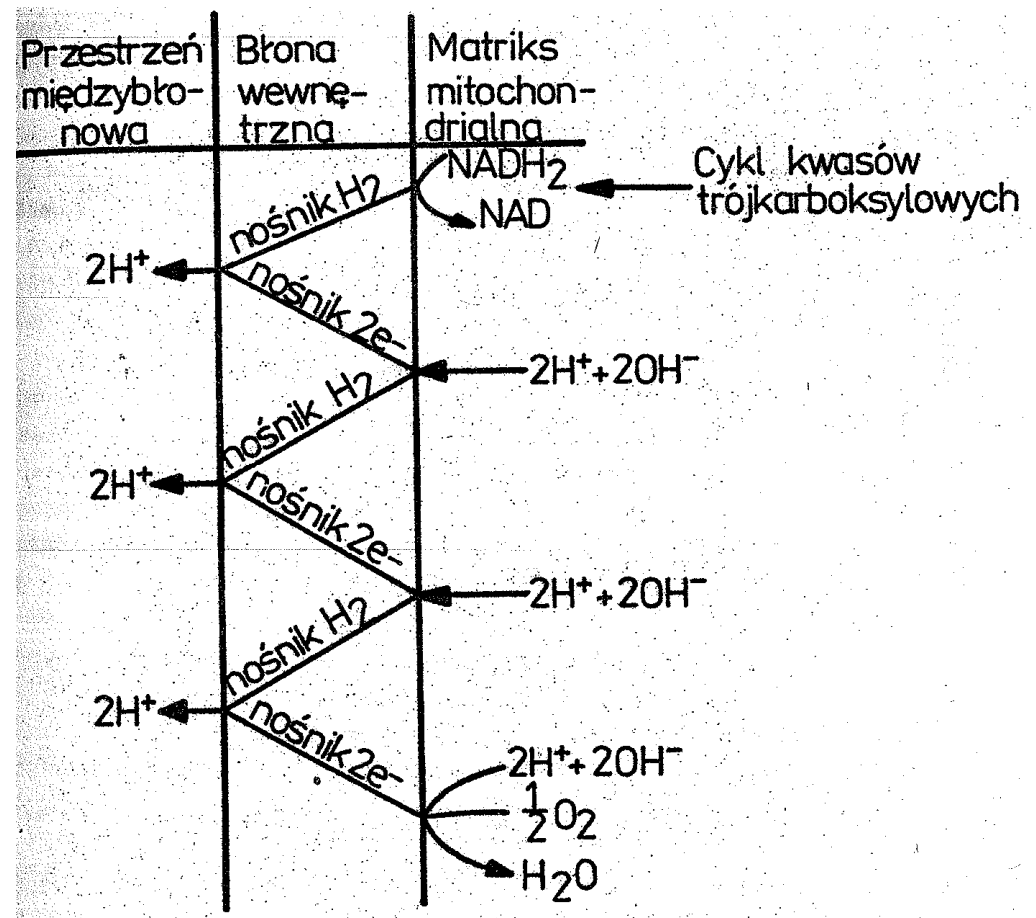
Jest to pompa nieelektrogenna – nie zmienia się ładunek po obu stronach błony. Może jednak być przenoszone 3 jony Na^+ i 1 jon K^+ oraz następuje hydroliza ATP. Wtedy zmienia się gradient elektryczny, a pompa jest elektrogenna.

Gradient Na^+ lub K^+ jest wykorzystywany do przenoszenia obojętnych cząsteczek (cukry, aminokwasy) na zasadzie symportu.

Mechanizm fosforylacji oksydacyjnej

Gradient jonów wodorowych może być również wykorzystany do syntezy ATP w mechanizmie fosforylacji oksydatywnej.

NADH_2 przekazuje wodory od strony matrix mitochondrialnej. Proton jest wypychane na zewnątrz błony, a elektrony redukują FAD. FAD pobiera wodory z matrix (dysocjacja wody) i przekazuje je przez błonę. Wtedy w przestrzeni międzybłonowej pojawi się nadmiar protonów, a od strony matrix mitochondrialnej – nadmiar grup OH^- , które redukują tlen do poziomu wody.



Podobnie działa syntaza ATP, wprowadzając protony do matrix, a usuwając jony hydroksylowe na zewnątrz. W ten sposób w bezpośrednim sąsiedztwie enzymu nie tworzy się woda, która przesuwająca by równowagę w przeciwną stronę:



Synteza ATP przebiega tak długo, jak długo istnieje gradient protonów i grup hydroksylowych oraz jak długo centrum aktywne ATP-azy będzie się znajdowało w środowisku hydrofobowym. Omawiana wcześniej fosforylacja fotosyntetyczna ma podobny mechanizm działania, lecz tam protony są wtłaczane do wnętrza tylakoidu

