الفصل العاشر

التقنية الحيوية الصناعية في قطاع الغذاء والأعلاف
INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY IN THE FOOD AND FEED SECTOR

بيير مونسان وميشائيل ج. أودنوا
Pierre Monsan and Michael J. O' Donohue

(١٠,١) المقدمة Introduction

منذ بداية التاريخ البشري، تم استخدام المنظومات الحية ومستخلصاتها على أساس تجريبي كامل لحل واحدة من أكثر الاحتياجات الأساسية للإنسان: كيفية إنتاج وتخزين المواد الغذائية. إن إنتاج الجبن والبيرة هما مثالان منذ نعومة أظفارنا في هذا المجال. في حالة الجبن، يتم تحويل منتج قابل للتحلل، الحليب، إلى مشتقاتٍ ثابتة، قابلة للتخزين، ولذيذة. ووضعت الاكتشافات اللاحقة، لاسيما بواسطة لويس باستور الذي أوضح دور الكائنات الدقيقة في الأغذية والمشروبات وتوصيف الإنزيمات الهضمية، نقطة تحول كبرى في نهج الإنسانية لإنتاج وتخزين الغذاء. منذ النصف الثاني من القرن العشرين، أنجب استخدام الإنزيمات الرشيد والسلالات الميكروبية في مجموعةٍ واسعةٍ من تطبيقات الأغذية والأعلاف فرعاً جديداً من العلم المعروف باسم "الهندسة الحيوية كيميائية".

وفي الآونة الأخيرة، مهد إدخال الهندسة الوراثية الطريق لتصميم المحفزات الحيوية المحسنة لتحويل المواد الزراعية الخام. وحقيقة أنه لا يوجد دنا خارجي داخل تحضيرات الإنزيمات تسمح باستخدام أساليب الهندسية الجزيئية هذه لزيادة كفاءة الإنزيم الحفزية. وهذا أمر مهم لأن القلق العام فيما يتعلق بالكائنات المعدلة وراثياً (GMOs) يعوق بشدة إمكانية الابتكار في مجالات كثيرة. ويجب في هذا الشأن التأكيد على أنه حتى لو كانت قطاعات الأغذية والأعلاف تقليدية بين مجالات التطبيق الرئيسة للتقنية الحيوية، فإن تطوير المكونات والعمليات الجديدة أصبح صعباً على نحوٍ متزايد؛ بسبب القيود التنظيمية الضيقة.

(١٠,٢) تطبيقات الغذاء Food Applications

(١٠,٢,١) تحويل النشا Starch Transformation

في النباتات، يتم تخزين الطاقة المستمدة من التمثيل الضوئي أساساً على صورة نشا، والذي يعد بدوره المصدر الرئيس للطاقة في وجبات غذاء البشر والحيوان. و يحتوي النشا تخطيطياً على اثنين من البوليمرات:

- الأميلوز، وهو بوليمر خطي يتألف من روابط ألفا-٤،١-جلوكوسيديك، وهو عموماً مكون ضئيل في النشا (حوالي ٢٥-٣٣٪).
- الأميلوبكتين، الذي يظهر درجة عالية من البلمرة عن الأميلوز وله تركيب مماثل ولكنه يحتوي على الروابط المتفرعة ألفا-١،٦.

يستخدم النشا لإنتاج الممددات الغذائية وعصائر السكريات مثل المالتوديسكترينات، والجلوكوز، وسكر العنب (الجلوكوز المنقي)، وسكر الفواكه، والمالتوز، والمشتقات المهدرجة (على سبيل المثال، السوربيتول، والمانيتول). والمصادر الرئيسة للنشا هي الذرة، والبطاطس، والقمح، والشعير، والأرز، والكسافا، والذرة الرفيعة [١].

وحققت العملية الصناعية الأولى لمعالجة النشا التحليل المائي باستخدام التحفيز الحمضي. تم إجراء التفاعل على معجون النشا (٣٠-٤٠٪ مواد صلبة جافة) وضبط درجة حموضته من ١,٥-٢,٠ باستخدام حمض الهيدروكلوريك. وتم إنهاء التحليل المائي عند ١٤٠-١٥٠ درجة مئوية في فترة زمنية ٥-٨ دقيقة. ومع ذلك، ففي التطويرات الأخيرة تم استخدام إنزيم ألفا-أميليز المحلل الداخلي ونازع البلمرة من الباسيلاس أميلوليكويفاشينس لتجنب توليد منتجات ثانوية غير مرغوب فيها ناتجة من أكسدة الكربوهيدرات والمحتوى الملحي. في البداية، تم تحقيق خطوة التسييل الإنزيمية هذه في درجة حموضة ٦,٠-٦,٥ لمدة ٥-٨ دقائق عند درجة ٨٥ درجة مئوية. ثم، يتم تسخين خليط التفاعل عند درجة ١٤٠ درجة مئوية لمدة ٥ دقائق لتحفيز تكوين الجيلاتين من النشا، ثم يبرد إلى ٨٥ درجة مئوية ليكون قادراً على إدخال دفعة ثانية من الإنزيم. وتسمح إضافة الإنزيم الثانية هذه بإنهاء تسييل النشا.

تم تحسين هذه العملية من خلال إدخال إنزيمات ألفا-أميليز جديدة ثابتة لدرجات الحرارة العالية من باسيلاس ليشينيفورميس أو باسيلاس ستيروثيرموفيلاس. ويمكن إضافة هذه الإنزيمات مباشرةً إلى معجون النشا عند درجة حموضة ٥,٨-٦,٢ في وعاء طبخ سريع يعمل عند درجة ١٠٣-١٠٧ لمدة ٥-١٠ دقيقة. وعليه، يتم القضاء على ضرورة المعالجة عند ١٤٠ درجة. ولمتابعة عملية الدكسترة، يتم تبريد النشا المسال إلى درجة ٩٥ وإضافة أيونات الكالسيوم لتجنب تغير طبيعة إنزيم الألفا-أميليز (حوالي ١٠ جزء في المليون). واعتماداً على المنتجات المستهدفة (سكر العنب، أو دي-جلوكوز النقي، أو المالتوز أو المالتوديكسترينات) يتم الحصول على

درجة تحليل مائي من ١٢-٣٠، وتوصف بقيمة الـ DE (مكافيء سكر العنب: نسبة القدرة الاختزالية المعبر عنها بسكر العنب إلى القوة الاختزالية الكلية الممكنة مكافئة للمادة الجافة).

ويمكن زيادة درجة التحليل المائي لإنتاج سكر العنب (خطوة التسكر) باستخدام مزيج من إنزيم تحليل خارجي، الجلوكوأميليز (أميلوجلوكوسيدسيز) من الأسبرجيلس نيجر، والقادر على تحليل روابط ألفا-١،٤ وألفا-١،٦ الجلوكوسيدية (الأخيرة تتحلل بمعدل أبطأ) وإنزيم مفكك للتفرعات خاص لتحليل روابط ألفا-١،٦، مثل البوليولانيز. وبعد ٤٠-٧٢ ساعة في درجة حموضة ٤,٢-٤,٦ ودرجة حرارة ٦٠، تتحقق نسبة DE من ٩٧-٩٩ موافقة لـ ٩٦-٩٧٪ من دي-جلوكوز.

ويمكن الحصول على شراب المالتوز المحتوي على ٥٠-٦٠٪ من المالتوديكسترينيات باستخدام الألفا-أميليز المطفر من الأسبرجيلس أوريزي أو البيتا-أميليز من أصل نباتي أو ميكروبي.

وأحد أهم التطبيقات الرئيسة لشراب سكر العنب هو الشراب عالي المحتوى من سكر الفواكه (HFCS) بالمصاوغة الإنزيمية للجلوكوز إلى سكر الفواكه (أيزوجلوكوز أو ليفيولوز) باستخدام إنزيم مصاوغة الجلوكوز. بسبب توازن التفاعل، يتم الحصول على شراب يحتوي على ٤٢٪ فركتوز مباشرةً، ولكن يتطلب الشراب المحتوي على ٥٥٪ فركتوز (يستخدم كبدائل للسكروز في المشروبات الغازية) الفصل اللوني للجلوكوز والفركتوز على راتنجات تبادل أيونات الكالسيوم أو البوتاسيوم لإنتاج محلول فركتوز تركيزه ٩٠٪. وتوجد مصادر مختلفة لإنزيم مصاوغة الجلوكوز لإنتاج الـ HFCS: الأكروباكتر، والأكتينوبلانيس، والأرثروباكتر، والباسيلس، والستروبتوميسيس. ويتم استخدامها كإنزيمات مقيدة في مفاعلات الأعمدة المستمرة.

ويعد تطوير بلورة إنزيم مصاوغة الجلوكوز على المستوى الصناعي من أهم الإنجازات الرئيسة في هذا المجال، والتي تسفر عن تحضير إنزيم نقي للغاية. وحيث إن إنزيم مصاوغة الجلوكوز حساس جداً للتثبيط بأيونات الكالسيوم ويحتاج أيونات الماغنيسيوم للثبات، فإنه لابد من إزالة أيونات الكالسيوم الزائدة من شراب سكر العنب بواسطة فصل التبادل الأيوني اللوني وإضافة المغنيسيوم قبل خطوة المصاوغة. ومع ذلك، فقد حلت التطورات الأخيرة في الهندسة الجزيئية للإنزيمات هذه المشكلة عن طريق تخليق ألفا-أميليز غير معتمد على الكالسيوم [٢، ٣]. لتحقيق ذلك، تم إثبات التفاصيل الدقيقة لارتباط الكالسيوم بإنزيم الألفا-أميليز من باسيلس ليشينيفورميس [٤].

ويعدُّ تطوير ألفا-أميليز محلل للنشا الخام هو تطور كبير في مجال تحليل النشا المحفز بالإنزيمات، والذي يحلل حبيبات النشا الخام بكفاءة. ويحتوي هذا الإنزيم من الأنوكسيباسيلس كونتامينانس يحتوي على أربعة نطاقات، بما في ذلك النطاق المرتبط بالنشا، وليس هذا هو الحال في إنزيمات ألفا-أميليز المحللة للنشا التقليدية [٥]. وتوجد

هذه النطاقات الرابطة للنشا عادةً بكثرة في الـ CGTases، والألفا-أميليز المطفر بالنسبة للمالتوز، والجلوكوأميليز. وهذا الألفا-أميليز الرباعي الأبعاد الأصلي قادر على تحفيز التحليل المائي للنشا عند درجة حرارة أقل من درجة حرارة تكوين جيلاتين النشا، وبالتالي تجنب المعالجة مرتفعة الحرارة المعتادة. ويمكن الحصول عند ٦٠ درجة مئوية في مزيج من الجلوكوأميليز من أسبرجيلس نيجر على نسبة إسالة ٩٩٪، موافقة لـ ٩٥٪ من سكر العنب (بدلاً من ٩٦,٣-٩٦,٥٪ في العملية التقليدية). وتعد العملية المماثلة الجديدة لتحليل النشا واعدة إلى حدٍ كبير، ولا سيما في سياق إنتاج الإيثانول الحيوي من النشا بواسطة التخمير الكحولي.

وبالمثل، فقد ثبت أن إضافة النطاق الرابط للنشا المستمد من الجلوكوأميليز من أسبرجيلس نيجر إلى الجلوكوأميليز من سلالة محللة للنشا من خميرة الخباز (سكارواميسيس سيرفيسي نوع دياستاتيكاس) تنتج إنزيم شيميري يحلل النشا غير القابل للذوبان [٦].

(١٠,٢,٢) صناعة الألبان Dairy Industry

إن تحويل الحليب إلى جبن ومختلف المنتجات الغذائية المصنعة هو جوهرياً عملية حيوية تنطوي على الإنزيمات والميكروبات التي توفر طريقة فعالة لتخزين هذه المادة السائلة الخام. في البداية، تمت هذه التحولات بطريقة تجريبية تماماً، حتى بدأ البشر في السيطرة عليها. ويتم اليوم ضبط عمليات التحويل الصناعي للحليب لتوفير منتجات ذات خصائص حسية ثابتة من مادة خام متغيرة. واللاعبين الرئيسين في هذا الصناعة هي شركة كريستيان هانسن، ودانيسكو روديا، وDSM. وتستخدم السلالات البادئة بكتيريا حمض اللاكتيك المنتجة من قبل هذه الشركات على نطاقٍ واسع. والأهم من ذلك، أنه حتى الآن لم تخضع هذه السلالات الميكروبية لأي هندسة وراثية.

(١٠,٢,٢,١) إنزيمات تخثر اللبن Milk-Clotting Enzymes

يقع الكابا-كازين، والذي يمثل حوالي ١٥٪ من كازيين الحليب، على محيط مذيلات الحليب. وينتج عن التحلل المائي الخاص لرابطة الببتيد ١٠٥فينيل ألانين-١٠٦ميثيونين في الكابا-كازين بواسطة المنفحة زعزعة استقرار وتجميع المذيلات، ويتم تسهيله بأيونات الكالسيوم [٧]، مؤدياً إلى تركيب هيكل هلامي والذي يتم قطعه ليعطي اللبن الرائب لصنع الجبن. وتكوين الرائب الخام هو مثال ممتاز لتعقيد التقنية الحيوية. ومن الصعب جداً الحصول على بيانات دقيقة للسوق في هذا المجال. ومع ذلك، فإن ثلاثة أنواع من الإنزيمات تتنافس على هذا السوق ويتغير استخدامها بدرجةٍ كبيرة تبعاً للتقاليد المحلية، واعتبارات التكلفة، وضغط المستهلك [٨]:

● المنفحة الحيوانية، وهي مزيج من الكيموسين والبيبسين وتستخرج بشكلٍ رئيس من معدة العجول (أبوماسوم).

● المنفحة الميكروبية، وهي إنزيم محلل للبروتين يفرز خارج الخلية يتم الحصول عليها من السلالات الفطرية (الكريفونيكتريا بارازيتيكا، والميوكر بوسيلوس ليندت، والريزوميوكر مايهي).

● الكيموسين المؤتلف، وهو نتاج للهندسة الوراثية ويعبر في الأسبرجيلس نيجر، والأسبرجيلس أوريزي، وإيشيريشيا القولون، أو الكليفيرومايسيس ماركسياناس ركتيس.

وكل هذه البروتييزات هي أسبارتيك إندوبروتييزات [٩]. ويعطي الجدول رقم (١٠,١). أرقاماً مؤقتة لاستخدامها. ومع ذلك، فهذه خاضعة للتغيير البالغ، كما ذكر سابقاً. ومثل الكيموسين المؤتلف في نهاية تسعينيات القرن العشرين في المملكة المتحدة حوالي ٧٠٪ من السوق. ومع ذلك، تسبب ضغط المستهلكين بسبب تنامي الشعور المضاد للكائنات المعدلة وراثياً في انخفاض هذا الرقم إلى ما يقرب من ٣٠٪. في فرنسا، ويعدُّ استخدام الكيموسين المؤتلف محدود للغاية وتمثل المنفحة الميكروبية أقل من ١٥٪ من السوق.

الجدول رقم (١٠,١). أسهم سوق إنزيمات تخثر الحليب.

	أوروبا	أمريكا الشمالية وأستراليا	باقي دول العالم
المنفحة الحيوانية	٥٥-٦٠٪	١٠٪	١٠٪
المنفحة الميكروبية	٣٠٪	٦٠٪	٤٥٪
الكيموسين المؤتلف	١٥-١٥٪	٤٠٪	٤٥٪

(١٠,٢,٢,٢) إنضاج الجبن والنكهة Cheese Ripening and Flavor

تستخدم البروتييزات والليبيزات لتطوير نكهات الجبن في الجبن المعدل بالإنزيمات (EMC) [١٠]. ويتم الحصول على هذه المنتجات المجففة بالرذاذ من الجبن قصير الإنضاج والذي يضاف إليه الإنزيمات والمواد المضافة [٩].

(١٠,٢,٢,٣) الليبيزات Lipases

تحفز الليبيزات التحليل المائي للدهون الثلاثية، والأحادية، والأحماض الدهنية، والجليسرول. ويعد تحرير الأحماض الدهنية الحرة ذو أهمية خاصة في الجبن الأزرق وأنواع الجبن الإيطالية [١١]، حيث إنها مسؤولة عن النكهة الحادة واللاذعة لهذه المنتجات. وتستخدم الليبيزات من الريزوميوكر مايهي وأجناس الأسبرجيلس

لهذا الغرض [٩]. وهذه الإنزيمات متخصصة في التحليل المائي للأحماض الدهنية الموجودة في الوضع ١،٣ في الدهون الثلاثية.

(٤, ٢, ٢, ١٠) البروتييزات Proteases

بسبب تركيبها المتوازن جداً من الأحماض الأمينية، فإن بروتينات اللبن والشرش مصل اللبن تعد مواد بادئة مثالية لإنتاج المحللات لـ:

- التغذية المعوية وعن طريق الحقن.
- تغذية الرضع.
- مشروبات الصحة الرياضية والتحصين.
- أطعمة الحمية.

وتستخدم بروتييزات مختلفة تعمل داخلياً وخارجياً لتصنيع محلالات بروتين اللبن أو الشرش. وهي إما أن تكون من أصلٍ حيواني (البيبسين، وتربسين البنكرياس، والكيموتربسين)، وإما من أصلٍ نباتي (البابين، والبروميلين)، أو من أصلٍ ميكروبي (الباسيلس ساتليس، والباسيلس ليشينيفورميس) [٩]. وبالإضافة إلى استخدامها كبروتييزات، يمكن استخدام الأمينوببتيديزات الميكروبية على وجه الخصوص لإزالة الأحماض الأمينية الطرفية الكارهة للماء والتي تكون مسؤولة عن الطعم المر للببتيدات.

(٥, ٢, ٢, ١٠) الليسوزيم Lysozyme

فضلاً عن كونه موجود فـي الدموع البشرية، فقد وجد الليسوزيم أيضاً في بياض بيض الدجاج. ويحفز هذا "المضاد الحيوي الطبيعي" تحليل رابطة بيتا-١،٤ بين حمض إن-أسيتيل موراميك وإن-أسيتيل جلوكوزأمين الموجود فـي جدار خلايا البكتيريا المحبة لصبغة الجرام. ويستخدم الليسوزيم في صناعة الألبان لتجنب نمو بكتيريا حمض البيوتيريك المنتجة للغاز، وخاصةً كلوستريديوم تيروبيوتيريكوم، ومنع "الانتفاخ المتأخر" للجبن [١٢، ١٣].

(٦, ٢, ٢, ١٠) الإنزيم الناقل للجلوتامين Transglutaminase

تفاعل نقل الأسيل بين مجموعة جاما-كربوكسي الأميد للجلوتامين الطرفي ومجموعة إيبسلون- الأمينية لليسين الطرفية يتم تحفيزه بالإنزيم ناقل الجلوتامين. هذا ينتج في تشابك البروتينات وتناسجها ثلاثي الأبعاد. وهذا التفاعل مهم فـي الكثير من التطبيقات الغذائية، ولا سيما فـي صناعة الجبن الـجديدة وضـرب القشدة [١٤، ١٥].

(٧,٢,٢,١٠) بيتا-جالاكتوسيديز β-Galactosidase

يتحقق تحليل الاكتوز المائي وهو الكربوهيدرات الرئيس الموجود في الحليب الذي تنتجه الثدييات، باستخدام البيتا-جالاكتوسيديز، ويسمى أيضاً "اللاكتيز". ويحفز هذا الإنزيم تقسيم رابطة بيتا-١،٤ الجلوكوسيدية بين دي-جالاكتوبيرانوز ودي-جلوكوبيرانوز، السكرين اللذين يكونان اللاكتوز. تنتج حساسية الاكتوز المفرطة، الشائعة في سكان آسيا وأفريقيا من نقص إنزيم بيتا-جالاكتوسيديز في القناة الهضمية. وتؤدي هذه الحالة في الأشخاص المصابين إلى الانتفاخ، والإسهال، وامتلاء البطن بالغازات [١٦]. وتتميز إنزيمات اللاكتيزات الفطرية بدرجة حامضية مثلى، في حين تكون إنزيمات الخميرة والبكتيريا متعادلة. وتستخدم الأخيرة لإنتاج حليب منخفض اللاكتوز للأغراض الغذائية، فضلاً عن تحليل اللاكتوز في "الشرش الحلو". ويفضل في حالة "الشرش الحامض" الذي يحتوي على حمض اللاكتيك استخدام اللاكتيزات الفطرية [٩].

ونظراً لذوبان اللاكتوز المحدود فإن منع تبلور اللاكتوز يعد منطقة تطبيق أخرى له والتي تؤدي إلى ملمس "رملي" في الآيس كريم.

تم تقييد إنزيم البيتا-جالاكتوسيديز التجاري من كليفيرومايسيس فراجيليس (Lactozym^{TM}) تساهمياً على حبيبات السليلوز عن طريق ازدواجه مع الإيبيكلوروهيدرين. وميزة هذا التحوير هي أنه يمكن استخدام الإنزيم في مفاعل الوسادة المتخلخلة مما يسمح بأكثر من ٩٠٪ من تحليل لاكتوز الشرش خلال فترة خمس ساعات (على النقيض من ٤٨ ساعة عند استخدام الإنزيم بطريقة الدفعة المستمرة). وبالمثل، يحلل إنزيم البيتا-جالاكتوسيديز المقيد ٦٠٪ من اللاكتوز في الحليب في غضون خمس ساعات [١٧].

ويمكن أيضاً استخدام اللاكتوز كمادة أولية لإنتاج اللاكتوسكروز. ويتحقق هذا من خلال نقل وحدة بيتا-دي-فركتوفيورانوزيل من السكروز إلى وضع ألفا المصاوغ لشاردة دي-جلوكوبيرانوزيل من اللاكتوز. ويعد اللاكتوسكروز سكر تحلية صناعي غير قابل للهضم ذي خصائص محفزة لنمو البكتيريا في الجهاز الهضمي [١٨]. ويمكن تحفيز هذا التفاعل بإنزيم بيتا-فركتوفيورانوسيديز من جنس الأرثروباكتر K-1 باستخدام مفاعل محاكاة السرير المتحرك [١٩].

وقد اقترحت عملية جديدة لتحليل لاكتوز الحليب منزوع الدسم. وهي تشمل استخدام مفاعل أغشية الألياف المجوفة. يتم تدوير الحليب منزوع الدسم في تجويف الألياف، في حين يتم تدوير محلول إنزيم البيتا-جالاكتوسيديز عمودياً على التجويف. والمشكلة الرئيسة الموجودة هي نمو الميكروبات في محلول الإنزيم. ومع ذلك، يمكن تحقيق معدل تحويل ١١,٧٨٪ في مفاعل ألياف مجوفة ذو مساحة غشاء قدرها ٤,٩ م^{٢} باستخدام معدل تدفق الحليب منزوع الدسم قدره ٩,٩ لتر/ ساعة، ونشاط إنزيمي قدره ١٢٠ وحدة/ مل، ودرجة حرارة ٢٣±٢° [٢٠].

(١٠,٢,٣) صناعة الخبز Baking Industry

(١٠,٢,٣,١) الأميليزات Amylases

يعد إنزيم الألفا-أميليز الفطري من الأسبرجيلس أوريزي هو الإنزيم الأكثر استخداماً في الخبز [٩]. ويستخدم لإضافة نشاط الألفا-أميليز الموجود في الدقيق. والتأثير الرئيس هو الحد من لزوجة العجين خلال مرحلة تكوين جيلاتين النشا الأولي. بالإضافة إلى ذلك، يحسن الإنحلال المحدود للنشا إنتاج المالتوز بواسطة إنزيم البيتا-أميليز الداخلي، وبالتالي تخمر الخميرة وإنتاج ثاني أكسيد الكربون. يتميز هذا الإنزيم بثبات حراري محدود مما يسهل تعطيله بعد تكوين جيلاتين النشا الأولي عند ٧٠-٨٠ درجة مئوية، ويمنع التحليل المفرط للنشا. وبشكلٍ عام، فإن ينتج عن فعل الأميليز زيادة حجم الخبز وزيادة تجانس شكل لب الخبز.

والهدف الآخر لاستخدام الألفا-أميليز هو زيادة فترة عمر الرف للمنتجات المخبوزة من خلال تأثيره المضاد للتعفن. ويرجع التعفن أساساً إلى تدهور سلاسل الأميلوبكتين الجانبية [٢١، ٢٢]. وللحصول على تأثير مضاد للتعفن يلزم استخدام ألفا-أميليز ثابت حرارياً والذي يمكن أن يعمل بعد تكوين جيلاتين النشا. وللقيام بهذا، تم استخدام أميليز داخلي من الباسيلس أميلوليكويفاشينس [٩]. وكان استخدام الأميليز المطفر بالنسبة للمالتوز من الباسيلس ستيروثيرموفيلاس تحسناً واضحاً في مجال مكافحة التعفن (Novamyl®). وهذا الإنزيم هو أميليز خارجي يختصر سلاسل الأميلوبكتين الجانبية ويحرر سكريات المالتوأوليجو [٢٣، ٢٤]. وهو يقلل من تدهور الأميلوبكتين دون إضعاف شبكة الأميلوز اللازمة للحصول على شكل لب الخبز الأمثل [٢٥].

(١٠,٢,٣,٢) الزيلانيزات Xylanases

تشارك الأرابينوزيلانات غير القابلة للذوبان الموجودة في الدقيق في الإخلال باستقرار خلايا الغاز في العجين، بينما يكون للأرابينوزيلانات القابلة للذوبان خصائص وظيفية إيجابية، لا سيما الحفاظ على رطوبة المنتجات المخبوزة التي تكون ضرورية لأداء جيد لفترة التخزين [٢٤، ٢٦]. ولذلك، يجب أن تكون الزيلانيزات المستخدمة في الخبز متخصصة للغاية لتحليل الروابط بيتا-١،٤ الزيلوزيدية في الأرابينوزيلانات غير القابلة للذوبان، من أجل تجنب تحلل تلك القابلة للذوبان. وتوفر الزيلانيزات بنية محسنة للب، وزيادة الحجم، وقدرات تجهيز العجين الجيد [٢٧، ٢٨].

(١٠,٢,٣,٣) إنزيمات الأكسدة Oxidases

الجلوتين، جزء البروتين في الدقيق يلعب دوراً رئيساً في تركيب وثبات غلاف خلايا الغاز الناتجة خلال تخمير العجين. وحيث إن روابط السلفيد الثنائية بين جزيئات الجلوتين مهمة جداً لتقوية شبكة هذا البروتين، فإن

المؤكسدات تستخدم على نطاقٍ واسع في الخبز [٩، ٢٤]. وهي تحسن الثبات ضد إجهاد العجين، وحجم الخبز، وشكل اللب. ومن أجل تجنب استخدام المؤكسدات الكيميائية غير المرغوب فيها مثل البرومات والأزوداي كربون أميد (ADA)، فإنه يمكن استخدام الإنزيمات المؤكسدة التي تولد فوق أكسيد الهيدروجين. في وجود فوق أكسيد الهيدروجين، يقوم إنزيم الجلوتاثيون ديهيدروجينيز الداخلي بأكسدة الجلوتاثيون، وبالتالي يمنع تكوين الروابط ثنائية السلفيد بين جزيئات الجلوتين [٢٩]. وإنزيمات الأكسدة المنتجة لفوق أكسيد الهيدروجين المستخدمة بشكلٍ رئيس لهذا الغرض هي:

- جلوكوز أوكسيديز من أسبرجيلس نيجر، يؤكسد الجلوكوز إلى جلوكونولاكتون في وجود الأوكسجين.
- هيكسوز أوكسيديز من كوندرس كريسبس، عشب بحري منتج للكاراجينان، يؤكسد الجلوكوز، والجالاكتوز، والمالتوز، ...إلخ على نطاقٍ واسع [٣٠].
- الليبوأوكسيجينيز من فول الصويا أو دقيق الفول الذي يؤكسد الأحماض الدهنية غير المشبعة المحتوية على مجموعات سيس-سيس-١،٤ خماسية الداين ولها تأثير مبيض على لب الخبز من خلال تفاعل فوق أكسيد الهيدروجين للأحماض الدهنية الناتجة مع الكاروتينات في العجين [٩].
- موكسد السلفهيدريل من أسبرجيلس نيجر [٣١].
- مؤكسدات البيروكسيد التي تؤكسد مجموعة متنوعة من المركبات في وجود فوق أكسيد الهيدروجين [٩، ٣٢].
- مؤكسدات البولي فينول التي تؤكسد المجموعات ثنائية الفينول إلى الكينينات [٩].

(٤ , ٣ , ٢ , ١٠) الفوسفوليبيز Phospholipase

إن صفار البيض هو المستحلب الطبيعي المستخدم في إنتاج الكعك؛ وذلك لأن صفار البيض يحتوي على الليسيثين (٨ , ٢٪ من وزن البيضة)، والمكون الرئيس له هو الفوسفاتيديل كولين. وحيث إن الليزوفوسفاتيديل كولين له قوة استحلاب أكثر من الفوسفاتيديل، فقد تم تطوير إنزيم الفسفوليبيز A2 من الأسبرجيلس نيجر (CakeZyme™) بواسطة شركة DSM [٣٣] لتحفيز هذا التحليل انتقائي الفراغية. يؤدي هذا إلى ٢٠٪ خفض في استخدام البيض في وصفات الكعك. ويمكن تعويض فقدان الوزن المقابل (٧٥٪ أقل استخداماً للبيض) عن طريق إضافة كمية مناسبة من المياه. ويؤدي استخدام الفوسفوليبيز إلى زيادة حجم الكعك. وذلك لأن الليزوليسيتين يتراكب إلى جزء الأميلوز من النشا، والذي قد يؤدي إلى تأخر إعداد لب الخبز. بالمثل فإن المعالجة بالفوسفوليبيز توفر التحسن في لب الخبز والنعومة، وكذلك فترة تخزين أطول بسبب زيادة الاحتفاظ بالرطوبة.

(١٠,٢,٣,٥) الديكسترانسكريز Dextransucrase

يحتوي العجين الحامض على مجموعة متنوعة من بكتيريا حمض اللاكتيك، يوفر بعضها من بينها نشاط الديكسترانسكريز. وهذا الإنزيم هو ناقل للجلوكوز، ويحفز تخليق بوليمر متجانس من الجلوكان، والديكستران (انظر القسم ١٠,٣,٢,٤) من السكروز. وقد ثبت أن إضافة الديكستران إلى منتجات الخبز لها تأثير إيجابي على حجم الخبز ونعومة اللب. وقد عزلت شركة بوراتوس سلالة ليوكونوستوك ميزينتيرويديس LMGP-16878 من عجين البانيتون الحامض وطورت عملية للحصول على ديكستران عالي الوزن الجزيئي كمكون وظيفي جديدة لمنتجات الخبز [٣٤، ٣٥].

(١٠,٢,٤) صناعة البيرة Beer-Making Industry

(١٠,٢,٤,١) التخمير Malting

إن واحدة من السمات الرئيسة لتخمير البيرة هي عملية التخمير التي تنقسم إلى ثلاث مراحل: النقع، والإنبات، وإيقاف الإنبات. والهدف من التخمير هو تشجيع التحليل الأمثل لجدران لخلايا في حبات الشعير من أجل توفير مستخلص ذي جودة قابلة للتخمر عند النقع. ولذلك، فإن نشاط إنزيمات الجلوكانيز والإنزيم المحلل للبنتوزان الداخلية مهمة تماماً مثل الأميليزات والبروتييزات. ومع ذلك؛ نظراً للتغير الطبيعي في الشعير وإضافة المساعدات (حبوب أخرى تحتوي على النشا) وخطوات العملية المؤدية إلى تثبيط الإنزيمات، فإنه يشيع أثناء النقع تعزيز نشاط الجلوكانيز والزيلانيز من خلال إضافة إنزيمات خارجية من أجل تحسين استخلاص النبتة وتحقيق التحليل الكامل للبيتا-جلوكان [٣٦]. ويكون هذا مهماً لنوعية المنتج النهائي؛ لأن وجود البيتا-جلوكان يساهم في ظاهرة تسمى البرد الضبابي، المصطلح الصناعي لمظهر الرواسب الهلامية المستحثة بالبرودة في البيرة [٣٧].

(١٠,٢,٤,٢) منع البرد الضبابي في البيرة Prevention of Chill Haze in Beer

ينتج عن تفاعل البروتينات مع البولي فينولات خلال إنتاج البيرة تكوين الضباب، وخاصةً أثناء التخزين البارد. وينتج هذا التفاعل أساساً من التأثيرات الكارهة للماء [٣٨]. وتتمثل إحدى طرق التعامل مع هذه المشكلة في امتصاص بروتينات الضباب النشطة على دعامات صلبة مثل السيليكا [٣٩]، وهذا مفيد في البيرة ذات المحتوى المعتدل من الشعير وفترة ثبات تخزين محدودة [٤٠]، أو البولي فينيل بيروليدون (PVPP). ويكون العلاج البديل هو استخدام البروتييزات. وبالمثل تم استخدام البابين لمنع البرد الضبابي عن طريق تحليل البروتينات إلى الببتيدات [٤١].

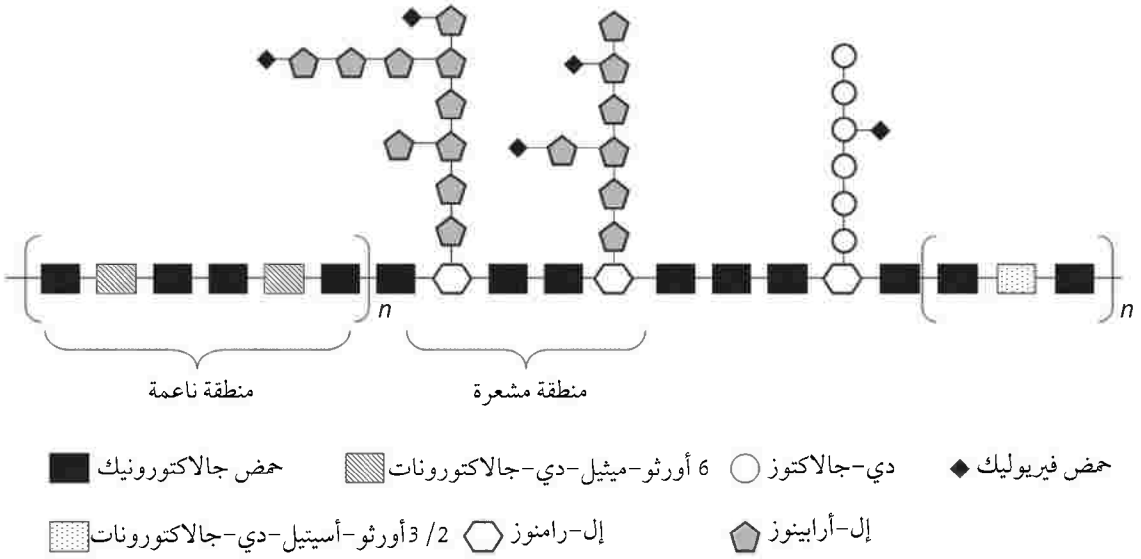
بدلاً من ذلك، واستناداً إلى ملاحظة أن البروتينات المشاركة في هذه الظاهرة غنية بالبرولين [٤٢، ٤٣]، فقد طور متخصصي الغذاء في شركة DSM بروتييز تخصصي للبرولين، BrewersClarex™، لهذا الغرض [٤٤]. وتم تطوير إنزيم برولييل البروتييز الداخلي الحامضي الذي يفرز خارج الخلايا من الأسبرجيلس نيجر، وينتمي إلى أسرة برولييل أوليجو ببتيديز [٤٥]، في البداية لإزالة الطعم المر من منتجات تحلل البروتين [٤٦]. ومن المثير للاهتمام، أنه بينما تتميز بروتينات رغوة البيرة النشطة بمحتوى منخفض للبرولين على عكس البابين، فإن المعالجة بهذا الإنزيم لا تؤثر على إستقرار الرغوة [٤٧]. وعلاوةً على ذلك، تجدر الإشارة إلى أن البيرة المعاملة بالإنزيم تحتوي على حوالي ٢٠٠ ملجم/ لتر من البولي فينول، في حين أن البيرة المعالجة بالـ PVPP تحتوي على ما يقرب من ١٢٥ ملجم/ لتر، والذي يكتسب أهمية غذائية؛ نظراً لتأثير البولي فينول المضاد للأكسدة.

(١٠,٢,٥) معاملة الفاكهة Fruit Processing

(١٠,٢,٥,١) البكتينيزات Pectinases

تتم المعالجة الإنزيمية للثمار باستخدام مجموعة متنوعة واسعة من أنواع الإنزيمات. ومع ذلك، رغم أن الحاجة المحددة للإنزيم يتم تعيينها بشكلٍ دقيق بواسطة نوع الفاكهة وطبيعة خطوة التجهيز، فإن البكتينيزات هي أحصنة العمل الرئيسة [٩]. وتنتج البكتينيزات التجارية عادة بواسطة الأسبرجيلس [٤٨]، وهي مجموعة من الإنزيمات المختلفة التي تؤدي إلى تحليل البكتين، وهو مصطلح عام لخليط من السكريات المعقدة التي يختلف تركيبها؛ تبعاً لنشأتها النباتية (الشكل رقم ١٠,١) [٤٩]. والإنزيمات الرئيسة المحللة للبكتين هي البولي جالاكتورونيزات (EC 3.2.1.15). وتهاجم هذه الإنزيمات الداخلية السلسلة الرئيسة وتقسيم روابط البيتا-١،٤ التي تربط نهايات حمض الجالاكتورونيك. وتتواجد تشكيلة واسعة من هذه الإنزيمات، بعضها يكون أكثر أو أقل حساسية لمثيلة وسط التفاعل (إضافة مجموعة الميثيل). والإنزيمات الداخلية الأخرى هي الألفا-إل-أرابينيزات (EC 3.2.1.99) التي تزيل بلمرة الراسيميات المحتوية على الأرابينوز في المناطق المشعرة.

وتشمل الإنزيمات خارجية المفعول الإكسوبولي جالاكتورونيزات (EC 3.2.1.67)، وإل-أرابينوفيورانزسيديزات (EC3.2.1.55)، والفيريوليل إستريزات (EC 3.2.1.73)، والبكتين ميثيل إستيريزات (EC 3.2.1.11). وتزيل هذه الأخيرة مجموعات الميثوكسيل من البكتين وتنتج البكتين الميثانولي الحمضي والميثانول. والإنزيمات المذكورة حتى الآن كلها محللة، ولكن توجد البكتين ليبزات (EC 4.2.2.10) أيضاً عادةً في التحضيرات الفطرية. وتزيل هذه الإنزيمات الداخلية بلمرة سلسلة الجالاكتورونان الرئيسة من خلال تفاعل مزيل للبيتا والذي ينتج أوليجو يورونويدات.



الشكل رقم (١٠,١). تخطيط لهياكل البكتين. تظهر هياكل البكتين المشعرة والناعمة.

(٢,٥,٢,١٠) التعطين الإنزيمي للثمار Enyzmatic Maceration of Fruit

إن التعطين الإنزيمي للثمار هو تقنية راسخة جيداً في تجهيز الفاكهة. في هذه العملية، تتحلل جدران الخلايا النباتية من خلال مزيجٍ من البولي جالاكتورونيزات الخارجية، والبكتين ميثيل إستيريزات، والبكتين ليبزات، وتعظم السليوليزات استخراج العصير. وبالمثل، تقلل هذه المعالجة من لزوجة اللب وتقلل حجم الثفل (النفايات الصلبة التي تم الحصول عليها بعد الضغط). في بعض الفواكه التي تحتوي على كميات معتبرة من النشا (على سبيل المثال، التفاح والكمثرى)، تكون الأنشطة الإنزيمية الأخرى مثل الأميليز ضرورية للحصول على نتائج مرضية وللحد من الضباب، والذي يسببه وجود السكريات المعقدة [٥٠].

وعلى عكس عصير التفاح الرائق، يباع عصير البرتقال كمشروب غائم. لذلك، فإن المعالجة الحديثة وخطوات تكييف العصير ينبغي أن تعزز وتثبت غيوم المشروب. وعند وقت العصر تحتوي بكتينات البرتقال على مجموعات ميثيل أقل من بكتينات التفاح؛ لأن البرتقال يحتوي بشكلٍ طبيعي على مستوى أعلى بكثير من البكتين ميثيل إستيريزات الداخلية. وللأسف، سيتفاعل البكتين في صورته الحمضية مع أيونات الكالسيوم لتكوين بكتات الكالسيوم، مما يؤدي إلى ترسيب الجزيئات الغائمة التي تتكون من البكتين والبروتينات. ولتجنب هذا الأمر، يمكن تسخين العصير لتثبيط إنزيمات البكتين ميثيل إستيريزات حرارياً. ومع ذلك، يؤدي هذا النهج إلى تغييرات غير مرغوب فيها في جودة العصير. وبدلاً من ذلك، يمكن تجميد العصير لتثبيط الإنزيم بالبرودة. ومع ذلك، فإن نقل العصير المجمد يؤدي حتماً إلى ارتفاع التكاليف [٥٠].

(٣, ٥, ٢, ١٠) العنب وصناعة النبيذ Grapes and the Wine Industry

يشكل العنب أعلى إنتاج للفاكهة في العالم (٦٠ مليون طن سنوياً) ويستخدم معظم العنب في إنتاج النبيذ. على الرغم من أن صنع النبيذ هو واحد من أقدم التقنيات الحيوية، إلا أن الفهم الأفضل للعمليات الحيوية الكيميائية المشاركة أدى فقط مؤخراً إلى تغذية تطوير تقنية الإنزيم. ومن بين أهداف التطوير بواسطة الإنزيم الخارجي، تم التركيز بشكلٍ خاص على الكربوهيدرات ومنتجات الأيض الثانوية الجليكوزيلاتية.

ويمكن استخدام الكربوهيدرات خارجية العمل (الجليكوسيديزات) التي تعمل على منتجات الأيض الثانوية الجليكوزيلاتية كمحسنات للنكهة في صنع النبيذ. وتحلل هذه الإنزيمات، وعموماً الألفا-إل-أرابينوفيورانوسيديزات، أو البيتا-دي-جلوكوسيديزات أو ألفا-إل-رامنوسيديزات بالتسلسل، شاردة الجليكون، التي غالباً ما تكون سكر ثنائي، وفي نهاية المطاف تحرر شاردة الأجليكون المتطايرة [٥١، ٥٢]. والأمثلة التجارية لمثل هذه الإنزيمات هي النوفاروم بلانك (Novozymes A/S Bagsvaerd)، وهو مستحضر بكتينيز يحتوي على أنشطة جليكوسيديز جانبية مهمة، ولالزيم بيتا (Lallemand Inc., Montreal)، وهو أيضاً مزيج من البكتينيزات التي تحتوي ألفا-إل-أرابينوفيورانوسيديز، وبيتا-دي-جلوكوسيديز، وبيتا-دي-أبيوسيديز، وألفا-إل-رامنوسيديزات.

والبديل لإضافة الجليكوسيديزات الخارجية أثناء إعداد النبيذ هو استخدام سلالات الكائنات المعدلة وراثياً. وبالمثل، تم تعديل سلالات الخميرة المستخدمة في صنع النبيذ وراثياً باستخدام الجينات المشفرة للجليكوسيديزات المختلفة. ورغم أن هذه السلالات أظهرت إنتاجية نبيذ ذي خصائص عطرية متفوقة [٥٣]، فإن أياً منها لم يستخدم تجارياً حتى الآن.

(٣, ١٠) الأغذية وتطبيقات الأعلاف Food and Feed Applications

(١, ٣, ١٠) البروبيوتيك Probiotics

تعرف منظمة الأمم المتحدة للأغذية والزراعة ومنظمة الصحة العالمية البروبيوتيك "بالكائنات الحية التي عندما تستخدم بكميات مناسبة تضفي منافع صحية على المضيف" [٥٤]. يحتوي جسم الإنسان على خلايا ميكروبية أكثر بحوالي عشرة أضعاف من الخلايا البشرية. بعد الولادة، تستعمر أمعاء الإنسان تدريجياً من قبل سلالات ميكروبية، بدءاً من بيئة مهبل الأم. ولا تزال معرفتنا وفهمنا لدور البكتيريا في الجهاز الهضمي محدودة للغاية، حتى لو وفرت طرق البيولوجيا الجزيئية مثل دراسات الميتاجينوميات رؤى أعمق في هذا المجال. ويبدو أن المحتوى الميكروبي للأمعاء مستقر نسبياً في الفرد، ولكن يختلف بصورةٍ كبيرة من فردٍ إلى آخر.

وقد ناقشت الأبحاث العلمية المنشورة أكثر وأكثر دور المحتوى الميكروبي للأمعاء في المشكلات الصحية مثل السمنة [٥٥] واضطرابات التمثيل الغذائي (مرض السكري، وأمراض القلب والأوعية الدموية) [٥٦]. وبالإضافة إلى ذلك، فإن التنشيط الميكروبي يلعب دوراً رئيساً في تطوير نظام المناعة في الجسم البشري، حيث تتفاعل الكائنات الحية الدقيقة مع كلٍ من نظام المناعة الفطرية والمكتسبة [٥٧].

لقد تم اختيار البروبيوتيك، أساساً اللاكتوباسيلاي والبيفيدوباكتيريا الناشئة من محتوى الأمعاء في البشر الأصحاء، لخصائصها الخاصة في طرق الفرز المفصلة. وهي متوفرة للمستهلك كمساحيق أو أقراص، ولكن أكثر شيوعاً كمنتجات قائمة على الحليب [٥٨]. يمكن الاستشهاد بذلك بوصفها نتائج مفيدة لبني البشر، وكذلك للحيوان المضيف [٥٧]:

- الخصائص المضادة للعدوي.
- الآثار المناعية.
- وظائف الحاجز المحسنة.
- التأثيرات الأيضية.
- تغيرات في حركة الأمعاء أو الوظيفة.

ومن أمثلة الاضطرابات المستهدفة:

- الإسهال، بما في ذلك ما ينجم عن فيروس الروتا في الأطفال [٥٩، ٦٠] أو كلوستريديوم ديفيسيلي في المرضى المسنين [٦١] أو الأسباب الأخرى عند الرضع [٦٢، ٦٣].
- الباوشيتيس [٦٤، ٦٥].
- متلازمة القولون العصبي [٦٦].
- سرطان المثانة باستخدام لاكتوباسيلس كازي [٦٧].
- عدوى الجهاز البولي التناسلي [٦٧].
- عدوى الكلوستريديوم ديفيسيلي باستخدام سكارروميسيس بولارديای [٦٨].
- الأكزيما الاستشرائية باستخدام لاكتوباسيلس رامنوساس ولاكتوباسيلس رويتيري [٦٩].

وتم مؤخراً تعزيز استخدام البروبيوتيك في حالة تربية الحيوانات بواسطة قرار الاتحاد الأوروبي بحظر استخدام المضادات الحيوية كمحفزات لنمو الماشية. ومبكراً في ١٩٧٣م تم بيان مقاومة الفراخ حديثة الفقس لمستعمرات السالمونيلا؛ نتيجة إعطائها محتويات الأمعاء للطيور البالغة السليمة [٧٠]. ويعرف هذا المفهوم بالاستبعاد التنافسي.

وبسبب التنوع الواسعة للمنتجات البروبيوتيك الحالية في السوق، لا تزال هناك حاجة مهمة للتجارب السريرية المحكومة المصممة بعناية، والعشوائية والوهمية. ومن الضروري أيضاً فك شفرة الآليات الجزيئية الخاصة المشاركة لكل سلالة بروبيوتيك من أجل تعزيز الإدعاءات المقابلة. والشركات الرئيسة المشاركة في سوق البروبيوتيك هي بيوجايا للحيويات، وكريستيان هانسن، وكوناجرا للأغذية الوظيفية، ودانيسكو، ودانون، ومعهد روسيل (Lallemande)، ولايف واي للأغذية، وناترين، ونستله، والبحار السبعة، وستوني فيلد فارم، وياكولت.

تم تعريض سلالات اللاكتوباسيلاي والبيفيدوباكتيريا للتعديل الوراثي. وقد كان الدافع وراء هذا التطور ليس فقط الرغبة في فهمٍ أفضل لدور هاتين المجموعتين من البكتيريا في الأمعاء، ولكن أيضاً لتحسين خصائص البروبيوتيك الموجودة لها (تنبيه المناعة، وتخليق الفيتامينات، ومحددات استعمار الخلايا)، وتطوير خصائص جديدة (تطوير اللقاحات الفمية، وإنتاج مضادات الجراثيم، والإنزيمات الهضمية، والأجسام المضادة، والسيتوكينات) [٧١، ٧٢]. ومع ذلك، فإن نقل الجينات داخل الكائنات الحية والقبول العام للكائنات المحورة وراثياً كان مفتاح القلق على هذا المستوى.

(٢, ٣, ١٠) البريبيوتيك Prebiotics

وكان النهج بديل أو المكمل لاستخدام البروبيوتيك هو إضافة المكونات الميكروبية الرئيسة للبيئة المعوية مباشرةً . لهذا الغرض تم تطوير الكربوهيدرات غير القابلة للهضم. وتم تصميمها في البداية كمكونات غذائية منخفضة السعرات الحرارية ("ألياف قابلة للذوبان")، وقد أظهرت سكريات الأوليجو غير القابلة للهضم هذه إمكانية امتصاصها جزئياً وتمثيلها غذائياً بتخصصية بواسطة مكونات البيئة المعوية. وأدى ذلك إلى مفهوم "البريبيوتيك" الموضوع أصلاً في اليابان والمعرف بأنه مكونات غذائية "غير قابلة للهضم تؤثر بصورة مفيدة في المضيف عن طريق تحفيز النمو انتقائياً و/ أو نشاط واحد أو عدد محدود من البكتيريا في القولون، ومن ثم تحسين صحة المضيف" [٧٣].

تتشارك البريبيوتيك في خاصية كونها تقاوم جزئياً أو كلياً فعل الإنزيمات الهضمية في البشر والحيوانات. وبالمثل، لا يتم تمثيلها غذائياً مباشرة من قبل المضيف ويمكنها الوصول إلى القولون، حيث تعمل كوسط تفاعل خاص للبيئة الميكروبية. وتتفاعل أيضاً مع مستقبلات الكربوهيدرات الموجودة على سطح الخلايا الميكروبية أو الطلائية، مما يؤثر في التصاق الخلايا والتعديل المناعي [٧٤]. ويتم الحصول على سكريات الأوليجو غير القابلة للهضم بواسطة طرق مختلفة:

- الاستخلاص من المصادر النباتية: سكريات الفركتوأوليجو، والألفا-جالاكتوأوليجو.
- التحليل الإنزيمي المحكوم للسكريات النباتية الكثيرة: سكريات الفركتوأوليجو، والزيلوأوليجو.
- التخليق الإنزيمي: سكريات الفركتوأوليجو، وسكريات الألفا-جالاكتوأوليجو، والبيتا-جلوكوأوليجو، والبيتا- جالاكتوأوليجو.

(١٠,٣,٢,١) الإنيولين Inulin

الإنيولين هو بوليمر خطي لسكر الفواكه يحتوي على روابط بيتا-٢،١ ووحدة سكروز في النهاية غير الاختزالية. يتم استخدامه من قبل عدة نباتات لتخزين الطاقة، وخاصةً الشيكوريا (شيكوريوم أنتيبوس) وخرشوف القدس (هيليانساس توبيروساس). ويمكن تحليله تماماً لإنتاج سكر الفواكه، باستخدام إينولينيز خارجي فقط أو في مزيج مع إينولينيز داخلي، أو لإنتاج سكريات الفركتوأوليجو باستخدام إينولينيز داخلي فقط [٧٥-٧٨]. والفائدة الرئيسة لهذا الفركتان هو أنه يحتوي على روابط جلوكوسيدية لا يمكن تحليلها بإنزيمات الإنسان والحيوان الهضمية. ومن ثم يمكن اعتبار الإنيولين وسكريات الأوليجو إنيولين الناتجة بالتحليل الإنزيمي المحكوم "بريبيوتيك" [٧٩، ٨٠]: يتم تمثيل هذه الكربوهيدرات غير القابلة للهضم تخصصياً بواسطة مكونات البيئة المعوية الدقيقة، البيفيدوباكتيريا، مما يؤدي إلى آثار صحية إيجابية [٨١].

وقد تم تطوير مفهوم "الأغذية الوظيفية" خلال السنوات الخمسة عشر الماضية، مع فهم أهمية البيئة المعوية في مشكلات الجهاز الهضمي. وقد تجلي الأثر الإيجابي لمثل هذه الألياف الغذائية في البيئة المعوية الدقيقة [٨٢]، وامتصاص المعادن [٨٣]، والتمثيل الغذائي للدهون، وتسرطن القولون، ووظائف المناعة في الجهاز الهضمي.

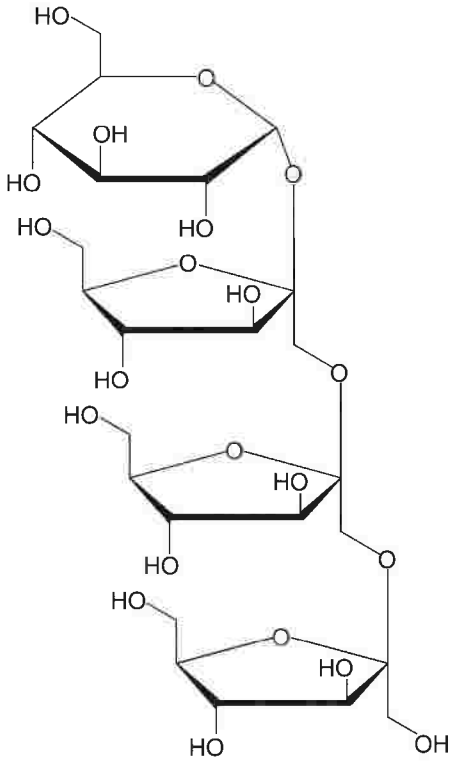
ويتم تسويق إنيولين البريبيوتيك وسكريات الفركتوأوليجو المشتقة من قبل شركات مختلفة، خاصةً أورافتي، فرع لشركة Südzucker، تحت الاسم التجاري Beneo®. وتوجد أيضاً سكريات فركتوأوليجو مماثلة في النباتات المختلفة [٨٤]، مع مستويات عالية خاصةً في البصل [٨٥] والأسبرجاس [٨٦].

(١٠,٣,٢,٢) سكريات الفركتوأوليجو Fructooligosaccharides

يتم الحصول على سكريات الفركتوأوليجو المحتوية على وحدات بيتا-دي-فركتوفيورانوز مرتبطة بروابط ٢،١-جلوكوسيدية أيضاً عن طريق التخليق الإنزيمي من السكروز، باستخدام إنزيم فركتوزيل ترانسفيراز من الأسبرجيلس نيجر أو الأوريوبازيديوم بوليولاناس [٨٧، ٨٨]:

$$\underset{\text{sucrose}}{n\ \text{Glc-Fru}} \xrightarrow{\text{fructosyltransferase}} \text{Glc-(Fru)}_n + (n-1)\ \text{Glc}$$

وعليه يتم الحصول على سلسلة من سكريات الفركتوأوليجو ذات زيادة في درجة البلمرة (الشكل رقم ٢, ١٠). ويتم تسويق هذه المنتجات من قبل شركة بيجين-ميجي، وهي شركة مشتركة بين تيريوس وميجي سايكا، تحت الأسماء التجارية Actilight® و Profeed®.



الشكل رقم (٢, ١٠). تركيب النيستوز، سكر رباعي من ألفا-١،٢-فركتوفيورانوزيل ذو شاردة جليكوزيل طرفية. من [٧٤].

(٣, ٢, ٣, ١٠) سكريات الجالاكتوأوليجو Galactooligosaccharides

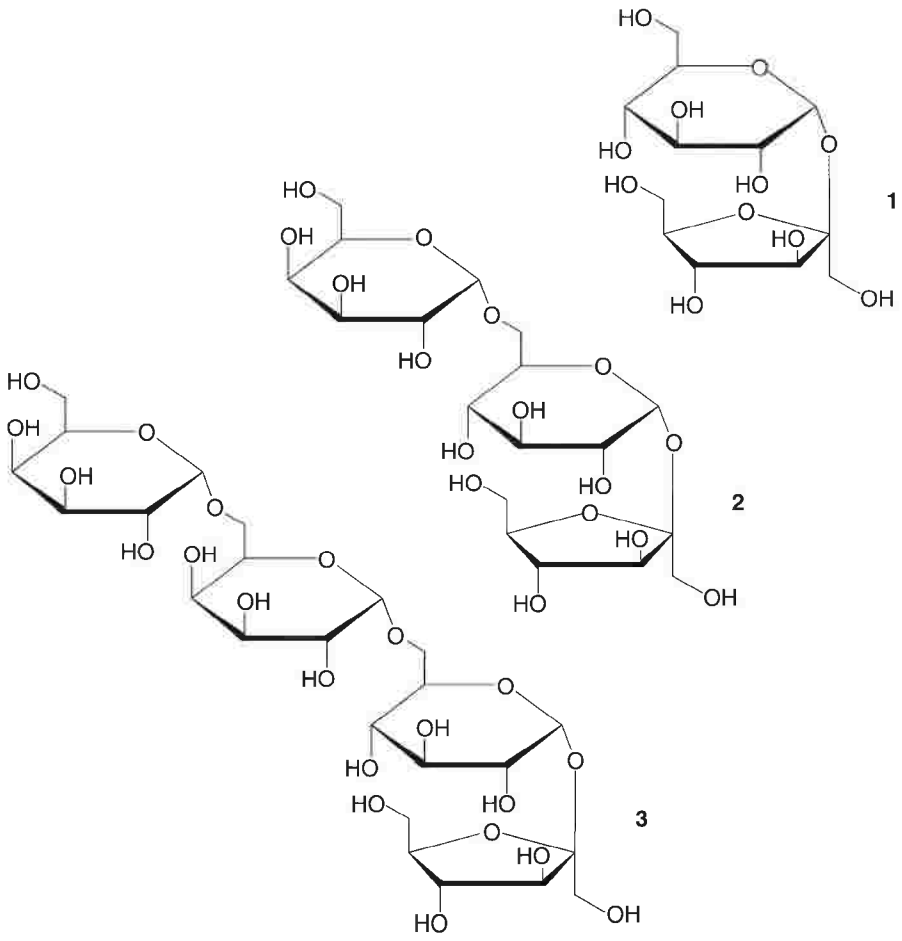
يتم إنتاج سكريات الألفا-جالاكتوأوليجو عن طريق الاستخلاص من المصادر النباتية، وخاصةً فول الصويا [٨٩]. وهي تتكون من سلسلة من مشتقات ألفا-١،٦-جالاكتوزيل من السكروز (الشكل رقم ٣, ١٠): الرافينوز، والستاكيوز، والفيرباسكوز، على التوالي، تحتوي على مجموعات طرفية لـ ١ و٢ و٣-ألفا-دي-جالاكتوزيل. تستخدم سكريات الألفا-جالاكتوأوليجو كبريبيوتيك في اليابان. كما أنها أيضاً مسؤولة عن مشكلات الانتفاخ بعد استهلاك البقوليات.

يتم الحصول على سكريات البيتا-جالاكتوأوليجو من نشاط الجالاكتوزيل ترانسفيريز لإنزيم البيتا-جالاكتوسيديز، من الأسبرجيلس أوريزي على سبيل المثال [٩٠]، على اللاكتوز، الموجود في الشرش، المنتج

الثانوي للألبان، وفقاً لمخطط التفاعل التالي:

$$\underset{\text{lactose}}{\beta\text{-D-Gal-1,4-D-Glc}} \xrightarrow{\beta\text{-galactosidase}} (\beta\text{-D-Gal})_n\text{-D-Glc} + (n-1)\ \text{D-Glc}$$

تحتوي هذه المنتجات على روابط بيتا-٦،١-دي-جالاكتوزيلية، بالإضافة إلى رابطة بيتا-٤،١ للاكتوز، ومعروفة كسكريات ترانس جالاكتوأوليجو (TOS).



الشكل رقم (٣,١٠). تركيب السكر الثلاثي الرافينوز (٢) والسكر الرباعي ستاكيوز (٣) مشتقات ألفا-٦،١ من السكر الثنائي السكروز (١). من [٧٤].

يحتوي تكوين المنتج الذي تم تطويره من قبل بوركولو دومو للمكونات، Lactifit®، سكريات أوليجو تصل إلى درجة بلمرة (DP) من ٨ (الجدول رقم ٢,١٠) [٩١]. وهي لا تهضم أنها وتحفز نمو البيفيدوباكتيريا بشكلٍ انتقائي وتقلل سمية محتويات القولون [٩٢].

الجدول رقم (٢ , ١٠). تركيب Lactifit® من [٩١].

المكون	٪ وزن/ وزن مادة جافة
سكريات ترانس جالاكتوأوليجو	٪٦٠
DP2	٪٣٣
DP3	٪٣٩
DP4	٪١٨
DP5	٪٧
DP6-8	٪٣
لاكتوز	٪٢٠
جلوكوز	٪١٩
جالاكتوز	٪١

(٤ , ٢ , ٣ , ١٠) سكريات الجلوكوأوليجو Glucooligosaccharides

سكريات الأيزومالتوأوليجو هي أوليجومرات دي-جلوكوبيرانوزيل تحتوي أساساً على روابط ألفا-١،٦ [٩٣]. يتم إنتاجها من محللات النشا عن طريق المعالجة بألفا-ترانس جلوكوسيديز من جنس الأسبرجيلس، لأن روابط ألفا-١،٦ أكثر استقراراً حرارياً من روابط ألفا-١،٤ [٩٤]. في هذه الحالة، يعمل المالتوز والمالتوديكسترينات الموجودة في محللات النشا كوحدتي دي-جلوكوبيرانوزيل مانحة ومتقبلة. وسكريات الأيزومالتوأوليجو هي واحدة من منتجات البريبيوتيك الرئيسة في السوق اليابانية، المنتجة على سبيل المثال عن طريق شركة هاياشيبارا [٩٥].

ويمكن أيضاً الحصول على سكريات الأيزومالتوأوليجو عن طريق الفعل المشترك للجلوكوأميليز والبوليولانيز على محللات النشا. وقد تم تطوير هذه العملية من قبل شركة شوا سانجيو اليابانية [٩٦]. وتكون الطريقة الأخرى للإنتاج باستخدام إنزيم نيوبوللبولانيز من الباسيلس ستيروثيرموفيلاس المعدلة بالطفرة موجهة الموقع لتحفيز تفاعل نقل الجلوكوزيل [٩٧].

والطريق الآخر لتخليق سكريات الجلوكوأوليجو هو استخدام تفاعل نقل الجلوكوزيل الذي يتم تحفيزه بإنزيمات الجلوكان سكريزات، واستخدام السكروز كمانح لمجموعة الدي-جلوكوزيل:

$$\underset{\text{sucrose}}{n\ \text{Glc-Fru}} \xrightarrow{\text{Glucansucrase}} (\text{Glc})_n + (n-1)\ \text{Glc}$$

في وجود السكروز وحده، يمكن الحصول على سكريات الجلوكان مرتفعة الوزن الجزيئي مع مجموعة واسعة من التركيبات [٩٨]، وفقاً للانتقائية الفراغية للجلوكان سكريز [٩٩]:

- الديكستران، يحتوي على أكثر من ٥٠٪ روابط ألفا-١،٦: ديكستران سكريز.
- الميوتان، يحتوي على أكثر من ٥٠٪ روابط ألفا-١،٣: ميوتان سكريز.
- ألترنان يحتوي على روابط ألفا-١،٣ و ألفا-١،٦ بالتناوب: ألترنان سكريز.
- أميلوز، يحتوي على ١٠٠٪ روابط ألفا-١،٤: أميلوسكريز.

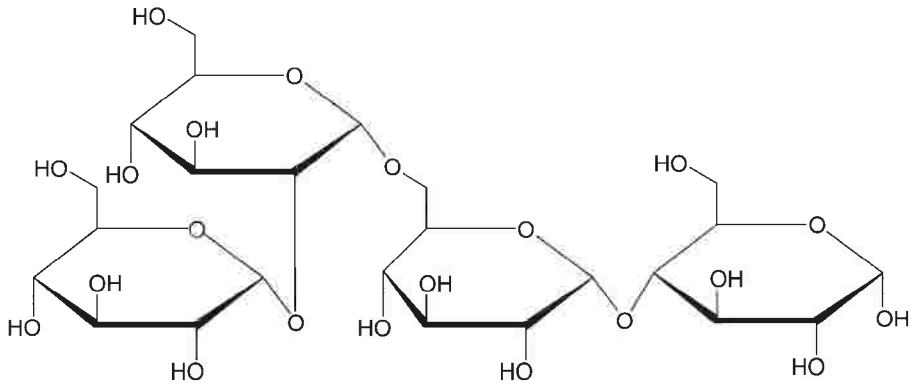
عند إضافة متقبل كفء إلى وسط تفاعل السكروز، مثل المالتوز أو الأيزومالتوز على سبيل المثال، فإنه يتم تخليق سكريات أوليجو منخفضة الوزن الجزيئي [١٠٠].

تستخدم شركة كارجيل ألترنان سكريز لتنتج من السكروز والمالتوز خليط تحلية من البريبيوتيك، Xtend™ Sucromalt [١٠١] يحتوي على كلٍ من الفركتوز المتبقي وسكريات الألترنان أوليجو. يمكن إنتاج ألترنان سكريز من ليوكونوستوك ميزينتيرويديس NRRL B-1355، والتي عزل منها جين الترميز المقابل [١٠٢، ١٠٣]. وجنس البنسليوم يكون أيضاً مصدراً محتملاً لهذا الإنزيم [١٠٤]. وتم توضيح كفاءة سكريات الأوليجو المقابلة للسيطرة على البكتيريا المعوية المسببة للأمراض [١٠٥]. ومن المثير للاهتمام، أنه قد تم تصميم أشكال اقتطاعية نشطة بشكلٍ كامل من ألترنان سكريز، محذوفة في قطاع نهاية الكربون ("قطاع ارتباط الجلوكان") بكفاءة [١٠٦].

يحفز الديكستران سكريز من ليوكونوستوك ميزينتيرويديس NRRL B-1299 تخليق بوليمرات الديكستران المحتوية على ٢٧-٣٥٪ روابط فرعية ألفا-١،٢، وغالباً غير قابلة للذوبان ومرتبطة بالطبقات الخارجية للخلية [٩٤، ٩٨]. يحتفظ هذا الإنزيم بتخصصيته عند استخدام المالتوز كمتقبل في وجود السكروز، ويتم الحصول على عائلتين رئيستين من المنتجات [١٠٧، ١٠٨]:

- تحتوي فقط روابط ألفا-١،٦ بالإضافة إلى رابطة ألفا-١،٤ للمالتوز (الموجود في النهاية الاختزالية).
- تحتوي على ١-٤ روابط ألفا-١،٦ ورابطة ألفا-١،٢ في النهاية غير الاختزالية (الشكل رقم ٤, ١٠).

يؤدي وجود روابط ألفا-١،٢ هذه إلى مقاومة عالية جداً لهجوم الإنزيمات الهضمية البشرية والحيوانية [١٠٩]. ولا يتم تمثيلها غذائياً بواسطة الفئران خالية الجراثيم [١١٠] ويتم تمثيلها على وجه الخصوص بواسطة البيفيدوباكتيريا، واللاكتوباسيلاي وأساساً البكتيريا العصوية [٧٤]. كما تم أيضاً ايضاح قدرتها على حث مجموعة واسعة من الإنزيمات الجليوكولية، بدون أي زيادة كبيرة في الإنتاج الثانوي للغازات، وعليه دون أي تأثير ضار [١١١].



الشكل رقم (٤ , ١٠). تركيب السكر الرباعي الجلوكوبيرانوزيل المرتبط برابطة ألفا-٢،١ (GOS). من [٧٤].

وقد أثبتت التجارب الميدانية على العجول أن اعطاء ١٥ , ٠٪ من سكريات الجلوكوأوليجو هذه في الأعلاف ينتج عنه خفض ٢٠٪ من التكاليف البيطرية [٧٤]. وللأسف، لم يتم اختبار هذا المنتج في التجارب على الإنسان وعليه يتم إنتاج فقط حوالي ٦٠ طن سنوياً، وذلك أساساً لتطبيقات مستحضرات التجميل البشرية [١١٢].

إلى جانب خصائص البريبيوتيك لها، فقد ثبت أن سكريات الجلوكوأوليجو المحتوية على روابط ألفا-٢،١ تمنع تطور مرض السكري من النوع ٢ في الفئران المغذاة بافراط [١١٣]. وتخضع هذه الخاصية المميزة جداً حالياً للدراسة المكثفة. ومن المستغرب، أن الديكستران سكريز المكون لرابطة ألفا-٢،١ من ليوكونوستوك ميزينتيرويديس NRRL B-1299 يمتلك موقعين للتحفيز بدلاً من موقعٍ واحد على عكس الجلوكان سكريزات الأخرى في عائلة محللات الجليكوسيدات ٧٠ [١١٤]. ويتميز هذا الإنزيم، كقاسم مشترك مع أعضاء العائلة ٧٠ الآخرين، بموقع تحفيز موجود في جزء النهاية النيتروجينية للإنزيم والذي يحفز تكوين روابط ألفا-٦،١ (تخليق الديكستران). ومع ذلك، فإن الموقع الثاني للتحفيز الموجود في منطقة النهاية الكربونية يكون في غاية التخصص لروابط ألفا-٢،١. ويؤدي هذا النشاط إلى تكوين ألفا-٢،١ ديكستران الراسمي.

وباستخدام تقنيات الهندسة الإنزيمية، تم اقتطاع الجين الأصلي المرمز للديكستران سكريز من ليوكونوستوك ميزينتيرويديس NRRL B-1299. وقد سمح هذا بتصميم إنزيم جديد لديه فقط مجال تحفيز واحد والذي يظهر نشاط مكون لرابطة ألفا-٢،١. ونشر هذا الإنزيم على الديكستران يسمح بالتطعيم التصميمي للراسيميات والذي يؤدي إلى تكوين مشتقتن جديدة للديكستران [١١٥].

(٥, ٢, ٣, ١٠) النشا المقاوم Resistant Starch

كان يعتقد لسنواتٍ عديدة أن النشا يتم هضمه بالكامل إلى الجلوكوز ومن ثم تمثيله غذائياً. ومع ذلك، فقد أظهرت الدراسات الحديثة أن جزءاً مهماً من النشا لا يهاجم بالإنزيمات الهضمية [١١٦، ١١٧]. ويصل هذا "النشا المقاوم" [١١٨] إلى الأمعاء الغليظة حيث يتم تمثيله غذائياً بواسطة البيئة البكتيرية. في هذا الصدد، يمكن اعتبار النشا المقاوم على أنه مركب بريبيوتيك ممتاز [١١٩-١٢١]. ويصف مصطلح "النشا المقاوم" في الأصل جزء النشا المتبقي السليم الذي يتم الحصول عليه بعد المعالجة الشاملة بالألفا-أميليز والبوليولانيز في المختبر [١٢٢]. ومع ذلك، فالتعريف الأكثر دقة هو الجزء من النشا الغذائي الذي ينجو من الهضم في الأمعاء الدقيقة المساوي للفرق بين النشا الكلي ومجموع النشا سريع الهضم والنشا بطيء الهضم [١٢٢].

يمكن تمييز أربعة أنواع من النشا المقاوم (RS) [١١٨]:

- RS_1: النشا الذي لا يمكن الوصول إليه فيزيائياً مثل ذلك الموجود في الحبوب والبذور والبقوليات الكاملة غير المعاملة. وهو ثابت حرارياً ويستخدم كمكون في الأطعمة التقليدية.
- RS_2: نشا في شكل حبيبات (حبيبات النشا الخام)، مثل النشا في البطاطس غير المطبوخة أو الموز الأخضر. ويتم هضمه ببطء وبشكلٍ غير كامل في الأمعاء الدقيقة.
- RS_3: الأميلوز المتحلل المتكون بعد الطبخ والتبريد، كما هو الحال في الخبز، رقائق الذرة، والبطاطس المطبوخة والمبردة. وهو جزء النشا الأكثر مقاومة.
- RS_4: يتم الحصول عليه بالتحوير الكيميائي للنشا، مثل إستر الفوسفات ثنائي النشا.

تؤثر تقنيات المعالجة كثيراً على تكوين النشا المقاوم. يحتوي دقيق الحبوب المجهز للغاية على مستويات من النشا المقاوم (حوالي ١,٥٪ وزن/ وزن) أقل بكثيرٍ من الفاصوليا، على سبيل المثال (ما يقرب من ٦٠٪ وزن/ وزن). وتزيد التقنيات مثل القذف المتبوع بالتبريد [١٢٣]، وطبخ البقوليات بالبخار [١٢٤]، وتعقيم نشا القمح [١٢٥]، وسلق الأرز [١٢٦]، والخبز [١٢٧]، والتحليل الحراري لفول الليما (فاصيلوس لوناتاس) [١٢٨] من محتوى المواد الغذائية من النشا المقاوم.

ويمكن أيضاً استخدام المعالجة الإنزيمية لإعداد النشا المقاوم. فيسمح عمل الألفا-أميليز على النشا الخام بتحلل جزء النشا غير المقاوم وعليه ينتج عنه تحضير نشا غني بالنشا المقاوم [١٢٩]. وبالمثل، فإن عمل الألفا-أميليز الثابت حرارياً على النشا المعزول من البازلاء ينتج جزءاً يحتوي على ٧٠٪ وزن/ وزن من النشا المقاوم [١٣٠]. والاحتمال الآخر هو استخدام إنزيم مفكك للتفرعات لتحليل روابط ألفا-١،٦ في الأميلوبكتين. وتنتج هذه المعالجة الأميليز، مما يكون حبيبات النشا المقاوم عند التسخين عن طريق تفاعل

تـحللي [١٣١]. وينطوي نهج مماثل علـى عمل البوليولانيز علـى النشويات منخفضة الأميلوز مثل نشا الأرز ودقيق الأرز [١٣٢].

يمكن تصنيع سلاسل أميلوز عالي النقاء مباشرةً من السكروز باستخدام ترانس جلوكوسيديز، مثل الأميلوسكريز من النيزيريا بولي ساكاريا [١٣٣، ١٣٤]. ويحفز هذا الإنزيم التفاعل التالي:

$$\underset{\text{sucrose}}{n\ \text{Glc-Fru}} \xrightarrow{\text{amylosucrase}} \underset{\text{amylose}}{(\alpha\text{-1,4-D-Glc})_{n-1}\text{-D-Glc}} + n\ \text{D-Fru}$$

ينتمي الأميلوسكريز إلى العائلة ١٣ في نظام تصنيف محللات الجليكوسيد [١٣٥]، والتي تعرف أيضاً باسم "عائلة ألفا-أميليز". وقد تم تحديد تركيبها ثلاثي الأبعاد وحتى الآن فإن هذا هو التركيب الوحيد المتاح للجلوكان سكريز. وتم توضيح آلية عمل الأميلوسكريز على المستوى الجزيئي [١٣٦] وتوصيف منتجات استطالة الألفا-جلوكانات [١٣٧] ومنتجات الأميلوز [١٣٨].

وتـطـور شركـة Südzucker حالياً إنتـاج النشا المقاوم باستخـدام الأميلوسكريز. والـمنتج التجاري هو NEO-amylose® [١٣٩].

للحصول على الفوائد الصحية للنشا المقاوم، فإن الاستهلاك اليومي الموصى به هو ٢٠ جرام. تحتوي البقوليات مثل الفاصوليا السوداء على محتوى عالي من النشا المقاوم (٦٣٪ وزن/ وزن). وقد ثبت أن استهلاك النشا المقاوم يعزز من أكسدة الدهون. ويزيد استبدال ٤,٥٪ من إجمالي الكربوهيدرات الغذائية بالنشا المقاوم من أكسدة الدهون بعد الوجبات في عينة من أفراد ١٢ دراسة بنسبة ٢٣٪، وعليه يمكن أن يقلل من تراكم الدهون على المدى الطويل [١٤٠]. ومع ذلك، فقد كشفت هذه الدراسة أيضاً أنه قد يكون هناك تأثير أقصى لإضافة النشا المقاوم إلى النظام الغذائي وأن الإضافة أكثر من هذا الحد لا تمنح أي فوائد أيضية أو تغيير من الوجبة المحتوية على صفر٪ من النشا المقاوم.

وقـد تم وصف إنتاج مـجموعة واسعة من سكريات البيتا-جليكوأوليجو [١٤١]. ومعظمها غير تنافسي من الناحية التجارية، حتى لو تم إثبات الاهتمام المحتمل لها علـى نطاق المختبر. ويؤدي عـمل البيتا-جلوكوسيديز على محلول جلوكوز مركز (٧٠٪، وزن/ وزن) إلى تخليق سكريات البيتا-جلوكوأوليجو [١٤٢]، أساساً سكريات ثنائية وثلاثية تـحتوي على روابط بيتا-٦،١ (جينتيوبيوز وجينتيوتريوز) وبيتا-٤،١ (سيلوبيوز وسيلوتريوز).

ويمكن استخـدام التحليل الإنزيمي أو الحراري لزيلانات النبات لإنتاج سكريات بيتا-زيلوأوليجو [١٤٣، ١٤٤]، التي توجد أيضاً بشكلٍ طبيعي فـي سيقان الخيزران [١٤٥]. ومع ذلك، عندما تستخدم

الزيلانيزات الداخلية، فإن درجة التحليل تتأثر بدرجة كبيرة بوجود سلاسل الأرابينوفيورانوزيل الجانبية في بوليمر الزيلان [١٤٦]. وفي الوقت الحاضر يقتصر التوزيع التجاري لسكريات الزيلوأوليجو (XOS) كإضافات غذائية على آسيا، حيث تبيع شركة سانتوري المتحدة الكثير من منتجات الـ XOS. وتجرى الأبحاث، ولكن، على آثار البريبيوتيك للـ XOS وأظهرت الكثير من الدراسات أنها تؤثر إيجابياً في نمو البيفيدوباكتيريا وربما اللاكتوباسيلاي [١٤٧، ١٤٨].

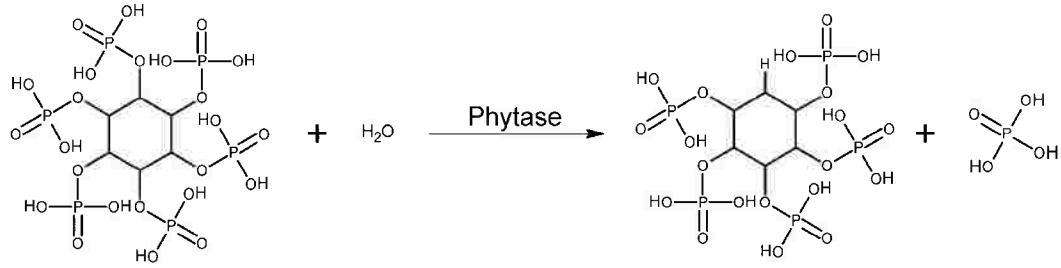
(١٠ ,٤) تطبيقات الأعلاف Feed Applications

ينتشر استخدام الإنزيمات الخارجية في تربية الحيوانات من أجل تحسين القيمة الغذائية للأعلاف على نطاقٍ واسع ومستمر منذ ثمانينيات القرن الماضي. وتستخدم حالياً مجموعة من كلٍ من الإنزيمات المحللة للكربوهيدرات (كربوهيدريزات) والفيتيزات وقد حصل حوالي ٤٠ منتجاً للإنزيمات على موافقة الاتحاد الأوروبي النهائية. ويقدر السوق الشامل لإنزيمات الأعلاف بحوالي ٢٧٠ مليون يورو.

(١٠ ,٤ ,١) تحليل الفيتات Phytate Hydrolysis

حمض الفيتيك أو الميو-إينوزيتول هيكساكي فوسفات (IP6) هو مكون واسع الانتشار وثابت ضد الحرارة والأحماض لمعظم الأعلاف والمواد الغذائية المشتقة من النبات، بما في ذلك الحبوب، والمكسرات، والبذور (الشكل رقم ١٠ ,٥). والـ IP6 هو حاجب قوي لمختلف الكاتيونات بما في ذلك الماغنيسيوم$^{+2}$، والكالسيوم$^{+2}$، والحديد$^{+2}$، والزنك$^{+2}$، والتي هي عناصر غذائية مهمة في الوجبات الغذائية البشرية والحيوانية. وبسبب هذا، وحقيقة أن الـ IP6 يمكن أن يكون متراكبات مع البروتينات والمعادن، فإن الـ IP6 يعدُّ في كثيرٍ من الأحيان عاملاً مضاداً للتغذية لكلٍ من الحيوانات والبشر. ومع ذلك، فإن الـ IP6 يعد أيضاً مصدراً وافراً من الفوسفات، العنصر الحاسم في الكثير من الجزيئات الحيوية المهمة ولذلك فهو مركب أساسي لجميع الحيوانات، بما في ذلك البشر. للأسف، في حين يمكن للحيوانات المجترة تحرير الفوسفات المخزنة في الـ IP6 من خلال النشاط الميكروبي في قنواتها الهضمية، فإن الدواجن، والخنازير، والبشر (بين غيرها) يمكنها فقط الاستفادة منه بدرجة ضعيفة للغاية لأنها تفتقر إلى الإنزيمات المناسبة. وهناك نتيجتان رئيستان لهذا النقص النسبي. أولاً، يكون الفوسفات المخزن في الـ IP6 غير متوفر للدواجن والخنازير، وهو ما يعني أنه في حالة تربية الحيوانات، فإن تكملة النظام الغذائي بمصدر فوسفات بديل تكون مرغوبة. ثانياً، حيث إن الـ IP6 يبقي غير مهضوم، فإن تربية الخنازير والدواجن المكثفة تعدُّ مصدراً مهماً للتلوث، حيث إن النفايات الغنية بالفوسفات المرتبطة بها تؤدي إلى تلوث المياه وزيادة المواد المغذية.

تشكل الفيتيزات فئة إنزيم الأعلاف الوحيدة الأكثر أهمية حيث تأخذ حوالي ٦٠-٧٠٪ من سوق الإنزيمات. والفيتيزات أو الميو-إينوزيتول هيكساكي فوسفات فوسفوهيدروليزات هي فوسفاتيزات متخصصة تحفز نزع الفوسفات المتتابع من الـ IP6. وقد تم عزل الفيتيزات من مجموعة متنوعة من المصادر بما في ذلك النباتات والحيوانات، وعلى وجه الخصوص، الكائنات الدقيقة [١٤٩-١٥٤]. يتضمن تصنيف الـ IUBMB للإنزيمات ثلاث مجموعات من الفيتيزات (EC 3.1.3.8, 26, 72)، ولكن يشار عموماً في المراجع إلى الإنزيمات EC 3.1.3.8 و٢٦ على أنها مجموعات الفيتيزات الرئيسة؛ كما أعطي EC 3.1.3.2 (فوسفاتيز حمضي واسع التخصصية) أيضاً اسم الفيتيز.



الشكل رقم (٥, ١٠). التفاعل الجيني المحفز بالفيتيزات.

والفيتيز الأول الذي تم تسويقه تجارياً كان فوسفاتيز حمض الهيستيدين من الأسبرجيلس نيجر NRRL3135، ولكن عادة ماتكون الإنزيمات الداخلة حديثاً إلى السوق من أصل بكتيري. وحالياً يقارب سوق الفيتيز ما قيمته ١٥٠ مليون يورو [١٥٥] ويهيمن عليه مستحضرات ثلاثة إنزيمات رئيسة: Natuphos (BASF، لودفيجسهافن) ٣-فيتيز (EC 3.2.1.8) ينتج بواسطة أسبرجيلس نيجر CBS 114.94، Phyzyme (دانيسكو لتغذية الحيوان) ٦-فيتيز مؤتلف (EC 3.2.1.26) أساساً من إيشيريشيا القولون، و Ronozyme (DSM، بازل)، ٦-فيتيز مؤتلف (EC 3.2.1.26) أساساً من بينيوفورا ليسيي [١٥٦].

تؤدي الفيتات عند إضافتها إلى أعلاف الدواجن إلى انخفاض إجمالي محتوى الفوسفات في الفضلات، وزيادة إنتاج البيض وكتلة البيض، وزيادة محتوى العظام المعدني ووزن جسم الحيوان. وبالمثل، عن طريق تقليل الحاجة إلى الفوسفات التكميلي، فإن إضافة الفيتات الخارجية إلى وجبات الخنازير الغذائية تؤدي إلى خفض تركيز الفوسفات الإجمالي والقابل للذوبان في المياه في الفضلات وتحسن قوة العظام.

من حيث التقنية الحيوية، كانت الفيتيزات موضوع الكثير من البحوث التي هدفت أساساً إلى إنتاج الإنزيمات الثابتة حرارياً. وقد تم اعتماد منهجين رئيسين: استكشاف التنوع الحيوي للفيتيزات الطبيعية الثابتة حرارياً [١٥٧-١٦١] وهندسة البروتين [١٦٢-١٦٤].

وقد أدى التقدم في التقنية الحيوية أيضاً إلى نشوء محاولات لهندسة الحيوانات والنباتات [١٦٥] لإنتاج الفيتيز. وبالمثل، وصف جولوفان وزملاؤه إنتاج فيتيز من إيشيريشيا القولون في الغدد اللعابية للخنازير [١٦٦]. وعلى الرغم من أن هذه الدراسة وفرت توضيحاً أنيقاً لفعالية هذه الإستراتيجية للحد من كلٍ من متطلبات الفوسفات غير العضوي ومحتوى الفضلات من الفوسفات، إلا أنه من غير الواضح حالياً ما إذا كانت القضايا الأخلاقية المحيطة بهذا النهج سوف تسمح بتنفيذه في المستقبل [١٦٧].

(٢, ٤, ١٠) تحليل الكربوهيدرات Carbohydrate Hydrolysis

السكريات العديدة غير النشوية (NSPs) هي مجموعة غير متجانسة من البوليمرات التي، عندما تؤخذ معاً، تشكل مصدراً وفيراً للغاية من الألياف الغذائية. في تغذية الحيوان، هناك ثلاثة أنواع رئيسة من NSP ذات أهمية خاصة: (١) بيتا-١،٣-١،٤ جلوكانات، التي هي مألوفة في غلاف وسويداء الحبوب مثل الشعير، (٢) والأرابينوزيلانات (AXs) ، أيضاً منتشرة في الحبوب، و(٣) المانانات (خاصةً جالاكتومانانات) التي تنتشر في بذور النباتات البقولية وهي عنصر مهم من وجبة فول الصويا وفول الجوار [١٦٨].

وعندما تستخدم لعلاج علف الحيوانات، فإن التأثير الرئيس للكربوهيدرات يكون هو الحد من لزوجة الهضامة [١٦٩]. ومع ذلك، فإن النتيجة الأساسية لهذا العمل هي انخفاض حدوث النفايات الرطبة وزيادة في هضم المواد الغذائية [١٧٠، ١٧١]. في الدجاج اللاحم، يزيد العلاج الإنزيمي بنظام غذائي قائم على القمح من توافر الطاقة التمثيلية [١٧٢، ١٧٣]، وفي حالة وضع الدجاج البياض، فإنه يحسن أداء التبييض [١٧٤].

في اطار الحظر الأوروبي لمنشطات النمو المحتوية على المضادات الحيوية في أعلاف الحيوانات، فمن المهم أن نلاحظ أن الكربوهيدرات أيضاً تعطي آثاراً مفيدة في الواجهات بين النظام الغذائي، والبيئة المعوية الدقيقة، والجراثيم الداخلية [١٧٥].

ويتعلق استخدام الإنزيمات الخارجية المحللة للكربوهيدرات، أو الكربوهيدريزات أساساً بالحيوانات وحيدة المعدة مثل الدواجن، وإلى حدٍ أقل، الخنازير. وحالياً، تستخدم عدة أنواع من الإنزيمات:

- **زيلانيزات بيتا-١،٤ الداخلية، المعروفة أكثر باسم الزيلانيزات (EC 3.2.1.8)**: تزيل بلمرة الأرابينوزيلانات وهي المكونات الرئيسة النشطة للتحضيرات التجارية مثل Natugrain (BASF، لودفيجسهافن، ألمانيا) المستخدمة لتحسين وجبات الديك الرومي.
- **١،٤-بيتا-دي-جلوكان ٤-جلوكانوهيدروليزات (EC 3.2.1.4)، و١،٣-بيتا-دي-جلوكان ٣-جلوكانوهيدروليزات (EC 3.2.1.39)، وبوجهٍ خاص ١،٣-١،٤-بيتا-جلوكانيزات (EC 3.2.1.73) أو ليشينيزات:**

هذه هي الإنزيمات الرئيسة المحللة للجلوكان التي تعمل على ١،٣-٤،١-بيتا-جلوكانات مثل تلك التي توجد في الحبوب وخاصةً الشعير (هورديوم فولغاري) والشوفان (أفينا ساتيفا). في تطبيقات الأعلاف، تكون الجلوكانيزات (المرتبطة بالزايلانيزات) هي المكونات النشطة لمنتجات مثل Endofeed وEndofeed W (شركة GNC Bioferm، ساسكاتون، كندا) التي تستخدم لتحسين الوجبات الغذائية اعتماداً على الشوفان/ الشعير والقمح /التريتيكال/ الجاودار على التوالي.

- **بيتا-دي-مانانيزات (منان إندو-١،٤-بيتا-مانانوسيديزات، EC 3.2.1.78)**: يقتصر الاستخدام التجاري لهذه الإنزيمات على قطاع أعلاف الحيوانات، حيث تستخدم تحضيرات مثل Hemicell (ChemGen Corp) لرفع امكانيات الطاقة التمثيلية لوجبات فول الصويا وفول الجوار [١٧٦-١٧٨].

والكثير من منتجات إنزيمات الأعلاف هي في الواقع مزيج من أنواع الإنزيمات أعلاه. وأحد الأمثلة على ذلك هو Rovabio™ Excel (أديسيو، أنتوني، فرنسا) وهو مزيج من سلالة بنسيليوم فونيكولوزوم (Rovabio™ Excel)، وهو خليط من إندو-١،٤-بيتا-زيلانيزات، وإندو-١،٣ (٤)-بيتا-جلوكانيزات، والبكتينيزات والمنانيزات. أظهرت دراسات المختبر باستخدام نموذج للجهاز الهضمي (حركية TNO، والنظام متعدد الأجزاء للمعدة والأمعاء الدقيقة: TIM-1) أن هذا المستحضر فعال بصفةٍ خاصة لإذابة أرابينوزيلانات القمح غير القابلة للذوبان [١٧٩].

وفيما يتعلق بتحسين كربوهيدرات الأعلاف، تم استعراض المعايير الرئيسة [١٧٠، ١٧٥، ١٨٠، ١٨١]. وتشمل هذه تطوير طرق تحليل أكثر حساسية وأكثر دقة، وتعريف وتوصيف أفضل لوسائط التفاعل، ومزيد من تطوير الإنزيمات المتحملة للحرارة (للحد من فقد الطبيعة الإنزيمية خلال تكون الحبيبات) وفهم أكبر للمنتجات النهائية للتحليل الإنزيمي من أجل فهم وتوثيق آثارها المفيدة على البيئة المعوية الدقيقة.

(٣, ٤, ١٠) إنتاج الأحماض الأمينية Amino Acid Production

يستهدف إنتاج التقنية الحيوية من الأحماض الأمينية الأسواق الغذائية (٣٢٪ في عام ٢٠٠٤م)، والأعلاف (٥٦٪)، والمواد الكيميائية الدقيقة (١٢٪) [١٨٢] ويوازي ما قيمته الإجمالية ٤,٥ مليار دولار أمريكي في عام ٢٠٠٤م. والأحماض الأمينية هي وحدت بناء البروتينات. وحيث إن هناك حاجة إليها في صورة إل- في معظم الحالات، فإن الإنتاج الميكروبي هو أفضل اختيار بشكلٍ عام. والاستثناء الوحيد هو الميثيونين، الذي يتم تصنيعه كيميائياً كخليط راسمي دي، إل من الأكرولين، وحمض الهيدروسيانيك، وميثيل الميركابتان، والأمونيا. وفي الواقع، يمتلك البشر والحيوانات نظام إنزيمات مؤكسدة/ ناقلة لمجموعة الأمين قادر

على تحويل دي-ميثيونين إلى إل-ميثيونين. إن توازن الأحماض الأمينية هو أمر حيوي لتغذية كلٍ من الإنسان والحيوان، حيث إن تسعة منهم ضرورية (أي، لا يمكن تخليقها بالتمثيل الغذائي للحيوانات العليا): الليسين، والثريونين، والميثيونين، والتربتوفان، والليوسين، والأيزوليوسين، والفالين، والهيستيدين، والفينيل ألانين [١٨٣]. وثلاثة أحماض أمينية هي مهمة لتطبيقات المواد الغذائية: حمض إل-جلوتاميك، وحمض إل-أسبارتيك، وإل-فينيل الأنين. وحمض إل-جلوتاميك هو أكثر الأحماض الأمينية إنتاجية (١,٥ مليون طن في السنة). وتتم صناعته، في شكل الجلوتامات أحادية الصوديوم (MSG)، باستخدام سلالة الكوراينيباكتريوم جلوتاميكوم. ويتم استخدام الـ MSG الناتج كمحسن للنكهة [١٨٤]. وقد درست هندسة الأيض الحيوي لتخليق الجلوتامات من كلوستريديوم جلوتاميكوم [١٨٥] وتم اكتشاف الجينوم لهذا الكائن الدقيق ذي الأهمية الصناعية البالغة بالكامل [١٨٦]. ويستخدم حمض إل-أسبارتيك وإل-فينيل ألانين لتخليق الأسبارتام مكثف التحلية (إستر الميثيل إل-أسبرتيل-إل-فينيل ألانيل). ويتم إنتاج حمض إل-أسبارتيك باستخدام إنزيم أسبارتيز، الذي يحفز إضافة الأمونيا إلى حمض الفيوماريك [١٨٧]، في حين يتم الحصول على إل-فينيل ألانين من سلالات إيشيريشيا القولون.

يمكن الحصول على الأسبارتام، الذي يتم إنتاجه حالياً بمستوى حوالي ١٥٠٠٠ طن في العام بالإقتران الإنزيمي المباشر لحمض الأسبارتيك المحمي بإن-فورميل مع إستر الميثيل إل-فينيل ألانين والمحفز بالثيرموليسين في تفاعل انتقائي فراغي وللمجسمات على حدٍ سواء [١٨٨].

وفيما يتعلق بأعلاف الحيوان، فإن الأحماض الأمينية الأساسية المستخدمة هي إل-ليسين، ودي،إل-ميثيونين، وإل-ثريونين، وإل-تربتوفان. وبلغ إنتاج إل-ليسين، الحمض الأميني الأول المحدد لتربية الخنازير والثاني، بعد الميثيونين، للدواجن، ٨٥٠٠٠٠ طن في عام ٢٠٠٥م [١٨٢] باستخدام الكوراينيباكتريوم جلوتاميكوم [١٨٩]. وكما سبق ذكره، خضعت هذه السلالة للهندسة الأيضية من أجل الحصول على تحسينات في الأداء [١٩٠]. وكان إل-ثريونين أول حمض أميني يتم إنتاجه باستخدام سلالة إيشيريشيا القولون المؤتلفة [١٩١]. ويقترب مستوى الإنتاج الحالي من ٨٠٠٠٠ طن في السنة. وينتج إل-تربتوفان أيضاً بما يقرب من ١٠٠٠٠ طن سنوياً باستخدام سلالات إيشيريشيا القولون والكوراينيباكتريوم جلوتاميكوم المؤتلفة [١٩٢].

وبالنسبة للأحماض الأمينية الأخرى ونظائر الأحماض الأمينية، غالباً ما يتم استخدام التفاعلات الإنزيمية [١٩٣]. وقد تم إنجاز العمل الرائد في هذا المجال من قبل أي شيباتا في تانابي سيياكو، اليابان، وذلك باستخدام إل- أو دي-أسيليز لتحويل دي، إل-إن-أسيتيل الحمض الأميني إلى إل- أو دي-الحمض الأميني، على التوالي، مع راسمية موازية للمصاوغة غير المحورة [١٩٤]. وتستخدم شركة ديجوسا الأسيليز من

الأسبرجيلس أوريزي لإنتاج عدة مئات الأطنان من إل-ميثيونين وإل-فالين. ويستخدم الإنزيم في مفاعل الغشاء المستمر من أجل تقليل استهلاك الإنزيم [١٩٥].

المراجع References

[١] Godfrey, T. and West, S. (1996) *Industrial Enzymology,* 2nd edn, Macmillan Press, London.

[٢] Norman, B.E., Pedersen, S., Bisgaard-Fransen, H., and Borchert, T.V. (1997) The development of a nex heat-stable alpha-amylase for calcium free starch liquefaction. *Starch/Stärke,* **49,** 371-379.

[٣] Bisgaard-Fransen, H., Svendsen, A., Norman, B., Pedersen, S., Kjaerulff, S., Outtrup, H., and Borchert, T.V. (1999) Development of industrially important a-amylases. *J. Appl. Glycosci.,* **46,** 199-206.

[٤] Nazmi, A.R., Reinisch, T., and Hinz, H.J. (2006) Ca-binding to *Bacillus licheniformis* α-amylase (BLA). *Arch. Biochem. Biophys.,***453,** 18-25.

[٥] Viksø-Nielsen, A., Andersen, C., Hoff, T., and Pedersen, S. (2006) Development of new α-amylases for raw starch hydrolysis. *Biocatal. Biotransformation,* **24,** 121-127.

[٦] Latorre-Garcia, L., Adam, A.C., Manzanares, P., and Polaina, J. (2005) Improving the amylolytic activity of *Saccharomyces cerevisiae* glucoamylase by the addition of a starch binding domain. *J. Biotechnol.,* **118,** 167-176.

[٧] Dalgleish, D.G. (1993) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology,* vol. **1,** 2nd edn (ed. P.F. Fox), Chapman and Hall, London, pp. 69-100.

[٨] Wigley, R.C. (1996) *Industrial Enzymology,* 2nd edn, Chapter 2.7 (eds T. Godfrey and S. West), Macmillan Press Ltd, London.

[٩] Aehle, W. (2004) *Enzymes in Industry,*2nd edn, Chapter 5, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

[١٠] West, S. (1996) *Industrial Enzymology,* 2nd edn, Chapter 2.12 (eds T. Godfrey and S. West), Macmillan Press Ltd, London.

[١١] Nelson, J.H., Jensen, R.G., and Pitas, R.E. (1976) Pregastric esterase and other oral lipases-a review. *J. Dairy Sci.,* **60,** 327-331.

[١٢] Cunningham, F.E., Proctor, V.A., and Goetsch, S.J. (1991) Egg-white lysozyme as a food preservative: an overview. *World's Poult. Sci. J.,* **47,** 141-163.

[١٣] Crawford, R.J.M. (1987) The use of lysozyme in the prevention of late blowing in cheese. *Bull. Int. Dairy Fed.,* **216,** 2-16.

[١٤] Dickinson, E. (1997) Enzymic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial utilization. *Trends Food Sci. Technol.,* **8,** 334-340.

[١٥] Lorensen, P.C. and Schlimme, E. (1998) Properties and potential fields of application of transglutaminase preparations indairying. *Bull. Int. Dairy Fed.,* **332,** 47-52.

[١٦] Vesa, H.T., Marteau, P., and Korpela, R. (2000) Lactose intolerance. *J. Am. Coll. Nutrit.,* **19,** 165S–167S.

[١٧] Roy, I. and Gupta, M.N. (2003) Lactose hydrolysis by Lactozym TM immobilized on cellulose beads in batch and fl uidized bed modes. *Process Biochem.,* **39,** 325-332.

[١٨] Fujita, K., Hara, K., Hashimoto, H., and Kitahata, S. (1990) Transfructosylation catalysed by β-fructofuranosidase I from Arthrobacter sp. K-1. *Agric. Biol. Chem.,***54,** 2655-2661.

[١٩] Kawase, M., Pilgrim, A., Araki, T., and Hashimoto, K. (2001) Lactosucrose production using a simulated moving bed reactor. *Chem. Eng. Sci.,* **56,** 453-458.

[٢٠] Novalin, S., Neuhaus, W., and Kulbe, K.D. (2005) A new innovative process for to produce lactose-reduced skim milk. *J. Biotechnol.,* **119,** 212-218.

[٢١] Schoch, T.J. (1965) Starch in bakery products. *Baker's Dig.,* **39,** 48-57.

[٢٢] Zobel, H.F. and Kulp, K. (1996) *Baked Goods Freshness, Technology, Evaluation, and Inhibition of Staling,* Chapter 1 (eds R.E. Hebeda and H.F. Zobel), Marcel Dekker, New York.

[٢٣] Christophersen, C., Otzen, D.E., Norman, B.E., Christensen, S., and Schäfer, T. (1998) Enzymatic characterization of Novamyl®, a thermostable α-amylase. *Starch,* **50,** 39-45.

[٢٤] Schäfer, T., Borchert, T.W., Nielsen, V.S., Skagerlind, P., Gibson, K., Wenger, K., Hatzack, F., Nilsson, L.D., Salmon, S., Pedersen, S., Heldt-Hansen, H.P., Poulsen, P.B., Lund, H., Oxenbøll, K.M., Wu, G.F., Pedersen, H.H., and Xu, H. (2007) *Industrial Enzymes,* vol. **105,** Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 59-131.

[٢٥] Morgan, K.R., Hutt, L., Gerrard, J., and Every, D. (1997) Stalingin starch breads: the effect of antistaling α-amylase. *Starch,* **49,** 54-59.

[٢٦] Courtin, C.M. and Delcour, J.A. (2001) Relative activity of endoxylanases towards water extractable and water unextractable arabinoxylan. *J. Cereal Sci.,* **33,** 301-312.

[٢٧] McCleary, B.V. (1986) Enzymatic modification of plant polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.,* **8,** 349-354.

[٢٨] Maat, J., Roza, M., Verbakel, J., Stam, H., Santos da Selva, M.J., Bosse, M., Egmond, M.R., Hagemansin, M.L.D., Visser, J., Beldman, G., Kusters-vanSomeren, M.A., and Voragen, A.G.J. (1992) *Xylans and Xylanases,* Elsevier, Amsterdam, pp. 349-360.

[٢٩] Sarwin, R., Laskawy, G., and Grosch, W. (1998) Changes in the levels of glutathione and cysteine during the mixing of doughs with L-threo and D-erythro-ascorbic acid. *Cereal Chem.,* **70,** 553-557.

[٣٠] Poulsen, C. and Høstrup, P.B. (1998) Purifi cation and characterization of a hexose oxidase with excellent strengthening effects in bread. *Cereal Chem.,* **75,** 51-57.

[٣١] Szalkucki, T. (1993) *Enzymes in Food Processing,* 3rd edn (eds T. Nagodawithana and G. Reed), Academic Press, New York, pp. 279-291.

[٣٢] Hammer, F.E. (1993) *Enzymes in Food Processing,* 3rd edn (eds T. Nagodawithana and G. Reed), Academic Press, New York, pp. 221-277.

[٣٣] http://www.dsm.com/le/en_US/bake/html/technology.htm. Accessed 25 January 2010.

[٣٤] Vandamme, E.J., Renard, C.E.F.G., Arnaut, F.R.J., Vekemans, N.M.F., and Tossut, P.P.A. (1997) Process for obtaining improved structure build-up of baked products, European Patent 0 790 003 B1.

[٣٥] Lacaze, G., Wick, M., and Cappelle, S. (2007) Emerging fermentation technologies: development of novel sourdoughs. *Food Microbiol.,* **24,** 155-160.

[٣٦] Scheffler, A. and Bamforth, C.W. (2005) Exogenous β-glucanases and pentosanases and their impact on mashing. *Enzyme. Microb. Technol.,***36,** 813.

[٣٧] McElroy, D. and Jacobsen, J. (1995) What's brewing in barley biotechnology? *Bio/technology,* **13,** 245-249.

[٣٨] Oh, H., Hoff, J.E., Armstrong, G., and Haff, L.A. (1980) Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. *J. Agric. Food Chem.,* **28,** 394-398.

[٣٩] Siebert, K.J. and Lynn, P.Y. (1997) Mechanisms of beer colloidal stabilization. *J. Am. Soc. Brew Chem.,* **55,** 73-78.

[٤٠] Bamforth, C.W. (1999) Beer haze. *J. Am. Soc. Brew. Chem.,***57,** 81-90.

[٤١] O'Rourke, T. (1996) *Industrial Enzymology* (eds T. Godfrey and S. West), Macmillan Press Ltd, London, pp. 103-131.

[٤٢] Asano, K., Shinagawa, K., and Hashimoto, N. (1982) Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill-haze formation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.,***40,** 147-154.

[٤٣] Siebert, K.J. (1999) Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis. *J. Agric. Food Chem.,* **47,** 353-362.

[٤٤] Lopez, M. and Edens, L. (2005) Effective prevention of chill-haze in beer using an acid proline-specific endoprotease from *Aspergillus niger. J. Agric. Food Chem.,* **53,** 7944-7949.

[٤٥] Barrett, A.J. and Rawlings, N.D. (1992) Oligopeptidases and the emergence of the prolyl oligopeptidase family. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler,***373,** 353-360.

[٤٦] Edens, L., Dekker, P., van der Hoeven, R., Deen, F., de Roos, A., and Floris, R. (2005) An extracellular prolyl endoprotease from *Aspergillus niger* and its use in the debittering of protein hydrolysates . *J. Agric. Food Chem.,* **53,** 7950-7957.

[٤٧] Posada, J., Almenar, J., and Galindo, J. (1971) A practical approach on protein stabilizers. *Proc. Eur. Brew. Conv.,* **13,** 379-391.

[٤٨] Jayani, R.S., Saxena, S., and Gupta, R. (2005) Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem.,* **40,** 2931.

[٤٩] de Vries, R.P. and Visser, J. (2001) *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*,**65,** 497-522.

[٥٠] Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., and Tewari, R. (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour. Technol.*, **77,** 215.

[٥١] Moreno-Arribas, M.V. and Polo, M.C. (2005) Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **45,** 265-286.

[٥٢] Sarry, J.-E. and Gunata, Z. (2004) Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chem.*, **87** (4), 509.

[٥٣] Cebollero, E., Gonzalez-Ramos, D., Tabera, L., and Gonzalez, R. (2007) Transgenic wine yeast technology comes of age: is it time for transgenic wine? *Biotechnol. Lett.*, **29,** 191.

[٥٤] FAO/WHO (2001) Evaluation of health and nutritional properties of prebiotics in food, including powder milk with live lactic acid bacteria, Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, Expert Consultation Report.

[٥٥] Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.H., Nagy, A., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*,**101,** 15718-15723.

[٥٦] Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauff, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., Waget, A., Delm é e, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrières, J., Tanti, J.F., Gibson, G.R., Casteilla, L., Delzenne, N.M., Alessi, M.C., and Burcelin, R. (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes,* **56,** 1761-1772.

[٥٧] Walker, R. and Buckley, M. (2006) Probiotic microbes: the scientifi c basis, Report of the American Academy of Microbiology.

[٥٨] Tannock, G.W. (1999) *Probiotics: A Critical Review,* Horizon Scientific Press, Wymondham, p. 1.

[٥٩] Szajewska, H., Kotowska, M., Mrukowicz, J.Z., Armanska, M., and Mikokajczyk, W. (2001) Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *J. Pediatr.,* **138,** 361-365.

[٦٠] Van Niel, C.W., Feudtner, C., Garrison, M.M., and Christakis, D.A. (2002) *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics,* **109,** 678-684.

[٦١] Kotowska, M., Albrecht, P., and Szajewska, H. (2005) *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol. Ther.,* **21,** 583-590.

[٦٢] Correa, N.B., Perret Filho, L.A., Penna, F.J., Lima, F.M., and Nicoli, J.R. (2005) A randomized formula controlled trial of *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus* for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants. *J. Clin. Gastroenterol.,* **39,** 385-389.

[٦٣] Figuereido, P.P., Vieria, E.C., Nicoli, J.R., Nardi, R.D., Raibaud, P., Duval-Ifl ah, Y., and Penna, F.J. (2001) Infl uence of oral inoculation with plasmid-free human *Escherichia coli* on the frequency of diarrhea during the first year of life in human newborns. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.,* **33,** 70-74.

[٦٤] Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A., Brigidi, P., Matteuzzi, D., Bazzochi, G., Poggioli, G., Miglioli, M., and Campieri, M. (2000) Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind placebo-controlled trial. *Gastroenterology,* **119,** 305-309.

[٦٥] Gionchetti, P., Morselli, C., Rizzello, F., Romagnolli, R., Campieri, M., Poggioli, G., Laureti, S., Ugolini, F., and Pierangeli, F. (2004) Management of pouch dysfunction or pouchitis with an ileoanal pouch. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.,* **18,** 993-1006.

[٦٦] O'Mahony, L., McCarthy, J., Kelly, P., Hurley, G., Luo, F., Chen, K., O'Sullivan, G.C., Kiely, B., Collins, J.K., Shanahan, F., and Quigley, E.M.M. (2005) *Lactobacillus* and *Biti dobacterium* in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profi les. *Gastroenterology,* **128,** 541-551.

[٦٧] Hoesl, C.E. and Altwein, J.E. (2005) The probiotic approach: an alternative treatment option in urology. *Eur. Urol.,* **47,** 288-296.

[٦٨] Castagluiuolo, I., Fiegler, M.F., Valenick, L., LaMont, J.T., and Pothoulakis, C. (1999) *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect. Immun.* **67,** 302-307.

[٦٩] Rosenfeldt, V., Benfeldt, E., Nielsen, S.D., Michaelsen, K.F., Jeppesen, D.L., Valerius, N.H., and Paerrogaard, A. (2003) Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **111,** 389-395.

[٧٠] Nurmi, E. and Rantala, M. (1973) New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nat. Lond.*, **241,** 210-211.
[٧١] Kullen, M.J. and Klaenhammer, T.R. (1999) *Probiotics: A Critical Review,* Chapter 6 (ed. G.W. Tannock), Horizon Scientific Press, Wymondham.
[٧٢] Steidler, L. and Neirynck, S. (2005) *Probiotics and Prebiotics: Scientitic Aspects,* Chapter 7 (ed. G.W. Tannock), Caister Academic Press, Wymondham.
[٧٣] Gibson, R.L. and Robertfroid, M.B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.,* **125,** 1401-1412.
[٧٤] Monsan, P.F. and Paul, F. (1995) *Biotechnology in Animal Feed and Animal Feeding,*Chapter 11 (eds R.J. Wallace and A. Chesson), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
[٧٥] Yun, J.W., Park, J.P., Song, J.P., Lee, C.Y., Kim, J.H., and Song, S.K.Continuous production of inulo-oligosaccharides from chicory juice by immobilized endoinulinase. *Bioprocess Eng.,* **22,** 189-194.
[٧٦] Rocha, J.R., Catana, R., Ferreira, B.S., Cabral, J.M.S., and Fernandes, P. (2006) Design and characterization of an enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chem.,* **95,** 77-82.
[٧٧] Gonzalez Diaz, E., Catana, R., Ferreira, B.S., Luque, S., Fernandes, P., and Cabral, J.M.S. (2006) Towards the development of a membrana reactorfor enzymatic inulin hydrolysis. *J. Membr. Sci.,* **273,** 152-158.
[٧٨] Catana, R., Eloy, M., Rocha, J.R., Ferreira, B.S., Cabral, J.M.S., and Fernandes, P. (2007) Stability evaluation of an immobilized enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chem.,* **101,** 260-266.
[٧٩] Roberfroid, M. (2002) Functional foods concept and its application to prebiotics. *Dig. Liver Dis.,* **34,** S105-S110.
[٨٠] Gibson, G.R. (2004) Fibers and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clin. Nutr. Suppl.,* **1,** 25-31.
[٨١] Janer, C., Rohr, L.M., Pelaez, C., Laloi, M., Cleusix, V., Requena, T., and Meile, L. (2004) Hydrolysis of oligofructoses by the recombinant β-fructofuranosidase from *Bitidobacterium lactis. Syst. Appl Microbiol.,* **27,** 279-285.
[٨٢] Van de Wiele, T., Boon, N., Possemiers, S., Jacobs, H., and Verstraete, W. (2004) Prebiotic effect of chicory inulinin the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiol. Ecol.,* **51,** 143-153.
[٨٣] Lopez, H.W., Coudray, C., Levrat-Verny, M.A., Feillet-Coudray, C., Demigné, C., and Rémésy, C. (2000) Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. *J. Nutr. Biochem.,* **11,** 500-508.
[٨٤] Fishbein, L., Kaplan, M., and Cough, M. (1988) Fructooligosaccharides: a review. *Vet. Hum. Toxicol.* **30,** 104-107.
[٨٥] Shiomi, N. (1978) Isolation and identifi cation of 1-kestose and neokestose from onion bulbs. *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.*. **58,** 548-556.
[٨٦] Shiomi, N., Yamada, J., and Izawa, M. (1976) Isolation and identifi cation of fructo-oligosaccharides in roots and asparagus. *Agric. Biol. Chem.,***40,** 567-575.
[٨٧] Hidaka, H., Hirayama, M., and Sumi, N. (1988) A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agric. Biol. Chem.,***52,** 1181-1187.
[٨٨] Hidaka, H. and Hirayama, M. (1991) Useful characteristics and commercial applications of fructo-oligosaccharides. *Biochem. Soc. Trans.,* **19,** 561-565.
[٨٩] Minami, Y., Yazawa, K., Tamura, Z., Tanaka, T., and Yamamoto, T. (1983) Selectivity of utilization of galactosyl oligosaccharides by bifidobacteria. *Chem. Pharm. Bull.,* **31,** 1688-1691.
[٩٠] Matsumoto, K., Kobayashi, Y., Ueyama, S., Watanabe, T., Tanaka, R., Kan, T., Kuroda, A., and Sumihara, Y. (1993) *Oligosaccharides: Production, Properties and Applications,* vol. **3** (ed. T. Nakakuki), Gordon and Breach Science Publishers, Tokyo, pp. 90-106.
[٩١] Ziggers, D. (2001) TOS, a new prebiotic derived from whey. *Feed Mix,* **9,** 7-9.
[٩٢] Alles, M.S., Harteminck, R., Meyboom, S., Harryvan, J.L., Van Laere, K.M.J., Nagengast, F.M., and Hautvast, J.G.A.J. (1999) Effect of transgalactooligosaccharides on the composition of the human intestinal microfl ora and on putative risk markers for colon cancer. *Am. J. Clin. Nutr.,* **69,** 980-991.
[٩٣] Monsan, P. and Auriol, D. (2004) *Bioprocesses and Biotechnology for Functional Foods and Nutraceuticals* (eds J.R. Neeser and J.B. German), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 135-149.

[٩٤] von Roper, H., and Koch, H. (1983) New carbohydrate-derivatives from biotechnical and chemical processes. *Starch,* **40,** 453-459.

[٩٥] Yoneyama, M., Shibuya, T., and Miyake, T. (1996) Saccharides in powder form, preparation and uses. US Patent 5, 550, 226.

[٩٦] Amarakone, S.P., Ishigami, H., and Kainuma, K. (1984) Conversion of oligosaccharides formed during starch hydrolysis by a dual enzyme system. *Denpun Kagaku,* **31,** 1-7.

[٩٧] Kuriki, T., Yanase, M., Takata, H., Takesada, Y., Imanaka, T., and Okada, S. (1993) A new way of producing isomalto-oligosaccharides syrup by using the transglycosylation reaction of neopullulanase. *Appl. Environ. Microbiol.,* **59,** 953-959.

[٩٨] Monsan, P., Potocki de Montalk, G., Sarçabal, P., Remaud-Siméon, M., and Willemot, R.M. (2000) *Food Biotechnology* (eds S. Bielecki, J. Tramper, and J. Polak), Elsevier, Amsterdam, pp. 115-122.

[٩٩] Hehre, E.J. (1955) *Methods Enzymol.,***1,** 178.

[١٠٠] Koepsell, H.J., Tsuchiya, H.M., Hellman, N.N., Kasenko, A., Hoffman, C.A., Sharpe, E.S., and Jackson, R.W. (1952) Enzymatic synthesis of dextran. Acceptor specificity and chain initiation. *J. Biol. Chem.,* **200,** 793-801.

[١٠١] Carlson, T.L., Woo, A., Zheng, G.-H. (2006) Methods of making syrups. WIPO WO/2006/088884.

[١٠٢] Argüello-Morales, M.A., Remaud-Siméon, M., Pizzut, S., Sarçabal, P., Willemot, R.M., and Monsan, P. (2000) Sequence analysis of the gene encoding alternansucrase a sucrose glycosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. *FEMS Microbiol. Lett.,* **182,** 81-85.

[١٠٣] Kossmann, J., Welsh, T., Quanz, M., and Karola, K. (2000) Nucleic acid molecules encoding alternansucrase, US Patent 6,570,065.

[١٠٤] Leathers, T.D., Nunnally, M., and Côté, G.L. (2002) Modified alternan, US Patent 7,049,105.

[١٠٥] Côté, G.L. and Holt, S.M. (2007) Prebiotic oligosaccharides via alternansucrase acceptor reactions, US Patent 7,182,954.

[١٠٦] Joucla, G., Pizzut, S., Monsan, P., and Remaud-Sim é on, M. (2006) Construction of a fully active truncated alternansucrase partially deleted of its C-terminal domain. *FEBS Lett.,* **580,** 763-768.

[١٠٧] Paul, F., López-Munguía, A., Remaud, M., Pelenc, V., and Monsan, P. (1992) Method for the production of α-1,2 oligodextrans using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299, US Patent 5,141,858.

[١٠٨] Remaud-Siméon, M., López-Munguía, A., Pelenc, V., Paul, F., and Monsan, P. (1994) Production and use of glucosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides NRRL* B-1299 for the synthesis of oligosaccharides containing α-1,2 linkages. *Appl. Biochem. Biotech.,***44,** 101-117.

[١٠٩] Valette, P., Pelenc, V., Djouzi, Z., Andrieux, C., Paul, F., Monsan, P., and Szylit, O. (1993) Bioavailability of new synthesised glucooligosaccharides in the intestinal tract of gnotobiotic rats. *J. Sci. Food Agric.,* **62,** 121-127.

[١١٠] Djouzy, Z., Andrieux, C., Pelenc, V., Somarriba, S., Popot, F., Paul, F., Monsan, P., and Szylit, O. (1995) Degradation and fermentation of α-gluco-oligosaccharides by bacterial strains from human colon: *in vitro* and *in vivo* studies in gnotobiotic rats. *J. Appl. Bacteriol.,* **79,** 117-127.

[١١١] Djouzi, Z. and Andrieux, C. (1997) Compared effects of three oligosaccharides on metabolism of intestinal microfl ora in rats inoculated with a human faecal flora. *Br. J. Nutr.,* **78,** 313-324.

[١١٢] Lamothe, J.P., Marchenay, Y., Monsan, P., Paul, F., and Pelenc, V. (1992) Compositions cosmétiques contenant des glucooligosaccharides, French Patent 2678166.

[١١٣] Boucher, J., Daviaud, D., Remaud-Sim é on, M., Carpéné, C., Saulnier-Blache, J.S., Monsan, P., and Valet, P. (2003) Effect of non-digestible gluco-oligosaccharides on glucose sensitivity in high fat diet fed mice. *J. Physiol. Biochem.,* **59,** 169-174.

[١١٤] Bozonnet, S., Dols-Laffargue, M., Fabre, E., Pizzut, S., Remaud-Siméon, M., Monsan, P., and Willemot, R.M. (2002) Molecular characterisation of DSR-E, an α-1,2 linkage synthesizing dextransucrase with two catalytic domains. *J. Bacteriol.,* **184,** 5753-5761.

[١١٥] Fabre, E., Bozonnet, S., Arcache, A., Willemot, R.M., Vignon, M., Monsan, P., and Remaud-Siméon, M. (2005) Role of the two catalytic domains of DSR-E and their involvement in the formation of highly α-1,2 branched dextran. *J. Bacteriol.,* **187,** 296-303.

[١١٦] Cummings, J.H. and Englyst, H.N. (1991) Measurement of starch fermentation in the human large intestine. *Can. J. Physiol. Pharmacol.,* **69,** 121-129.

[١١٧] Englyst, H.N., Kingman, S.M., and Cummings, J.H. (1992) Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur. J. Clin. Nutr.,* **46,** S33-S50.

[١١٨] Sajilata, M.G., Singhal, R.S., and Kulkarni, P.R. (2006) Resistant starch-a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.,* **5,** 1-17.

[١١٩] Asp, N.G. (1994) Nutritional classification of food carbohydrates. *Am. J. Clin. Nutr.,* **59,** S679-S681.

[١٢٠] Eerlingen, R.C. and Delcour, J.A. (1995) Formation, analysis, structure and properties of type III enzyme resistant starch. *J. Cereal Sci.,* **21,** 1-8.

[١٢١] Eerlingen, R.C. and Delcour, J.A. (1995) Formation, analysis, structure and properties of type III enzyme resistant starch. *J. Cereal Sci.,* **21,** 129-138.

[١٢٢] Englyst, H.N., Wiggins, H.S., and Cummings, J.H. (1982) Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst,* **107,** 307-318.

[١٢٣] Haralampu, S.G. (2000) Resistant starch-a review of the physical properties and biological impact of RS3. *Carbohydr. Polym.,* **41,** 285-292.

[١٢٤] Tovar, J. and Melito, C. (1996) Staem-cooking and dry heating produce resistant starch in legumes. *J. Agric. Food Chem.,* **44,** 2642-2645.

[١٢٥] Siljestrom, M. and Asp, N.G. (1985) Resistant starch formation during baking. Effect of baking time and temperature and variation in the recipe. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.,* **4,** 1-18.

[١٢٦] Marsono, Y. and Topping, D.L. (1999) Effects of particle size of rice on resistant starch and SCFA of the digesta in caecostomised pigs. *Indones. Food Nut. Prog.,* **6,** 44-50.

[١٢٧] Liljeberg, H., Akerberg, A., and Bjorck, I. (1996) Resistant starch formation in bread as influenced by choice of ingredients or baking conditions. *Food Chem.,* **56,** 389-394.

[١٢٨] Tester, R.F., Karkalas, J., and Qi, X. (2004) Starch structure and digestibility. Enzyme-substrate relationship. *World Poult. Sci.,* **60,** 186-195.

[١٢٩] Pomeranz, Y. and Sievert, D. (1990) Purified resistant starch products and their preparation, Patent No. WO/1990/015147.

[١٣٠] Soral, S.M. and Wronkowska, M. (2000) Resistant starch of pea origin. *Zywnosc,* **7,** 204-212.

[١٣١] Haralampu, S. and Gross, A. (1996) Granular resistant starch and method of making, US Patent 5,849,090.

[١٣٢] King, J.M. and Tan, S.Y. (2005) Resistant starch with cooking properties similar to untreated starch, US Patent Appl. No. 0,089,624.

[١٣٣] Buttcher, V., Welsh, T., Mitzer, L.S., and Kossmann, J. (1997) Cloning and characterization of the gene for amylosucrase from *Neisseria polysaccharea* : production of linear α-1,4 glucan. *J. Bacteriol.,* **179,** 3324-3330.

[١٣٤] Potocki de Montalk, G., Remaud-Siméon, M., Willemot, R.M., Planchot, V., and Monsan, P. (1999) Sequence analysis of the gene encoding amylosucrase from *Neisseria polysaccharea* and characterization of the recombinant enzyme. *J. Bacteriol.,* **181,** 375-381.

[١٣٥] Skov, L.K., Mirza, O., Henriksen, A., Potocki de Montalk, G., Remaud-Siméon, M., Willemot, R.M., Monsan, P., and Gajhede, M. (2001) Amylosucrase: a glucan-synthesizing enzyme from the α-amylase family. *J. Biol. Chem.,* **276,** 25273-25278.

[١٣٦] Albenne, C., Skov, L.K., Mirza, O., Gajhede, M., Feller, G., D'Amico, S., André, G., Potocki-Véronèse, G., van der Veen, B., Monsan, P., and Remaud-Siméon, M. (2003) Molecular basis of the amylase-like polymer formation catalysed by *Neisseria polysaccharea* amylosucrase. *J. Biol. Chem.,* **279,** 726-734.

[١٣٧] Rolland-Sabaté, A., Planchot, V., Potocki-Véronèse, G., Monsan, P., and Colonna, P. (2004) Elongation and insolubilisation of α-glucans by the action of *Neisseria polysaccharea* amylosucrase. *J. Cereal Sci.,* **40,** 17-30.

[١٣٨] Potocki-Véronèse, G., Puteaux, J.L., Dupeyre, D., Albenne, C., Remaus-Siméon, M., Monsan, P., and Buléon, A. (2005) Amylose synthesized *in vitro* by amylosucrase: morphology, structure and properties. *Biomacromolecules,* **6,** 1000-1011.

[١٣٩] http://www.suedzucker.de/en/Investor-Relations/Publikationen/Berichte/Berichte-2005-06/gb_e_2006.pdf. Accessed 25 January 2010.

[١٤٠] Higgins, J.A., Higbee, D.R., Donahoo, W.T., Brown, I.L., Bell, M.L., and Bessesen, D.H. (2004) Resistant starch consumption promotes lipid oxidation. *Nutr. Metab.,* **1,** 8-18.

[١٤١] Fujii, S. and Komoto, M. (1991) Novel carbohydrate sweeteners in Japan. *Zuckerindustrie,* **116,** 197-200.

[١٤٢] Ajisaka, K., Nishida, H., and Fujimoto, H. (1987) The synthesis of oligosaccharides by reversed hydrolysis reaction of β-glucosidase at high substrate concentration and at high temperature. *Biotechnol. Lett.,* **9,** 243-248.

[١٤٣] Morgan, A.J., Mul, A.J., Beldman, G., and Voragen, A.G.J. (1992) Dietary oligosaccharides. New insights. *Agro. Food Ind. Hi-Tech.,* **11/12,** 35-38.

[١٤٤] Parajo, J.C., Garrote, G., Cruz, J.M., and Dominguez, H. (2004) Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. *Trends Food Sci. Technol.,* **15,** 115.

[١٤٥] Imaizumi, K., Nakatsu, Y., Sato, M., Sedarnawati, Y., and Sugano, M. (1991) Effects of xylooligosaccharides on blood glucose, serum and liver lipids and caecum short-chain fatty acids in diabetic rats. *Agric. Biol. Chem.,* **55,** 199-205.

[١٤٦] Kormelinck, F.J.M., Gruppen, H., Wood, T.M., and Beldman, G. (1992) *Xylans and Xylanases* (eds J. Visser, G. Beldman, M.A. Kusters-Van Someren, and A.G.J. Voragen), Elsevier, London, pp. 141-147.

[١٤٧] Rycroft, C.E., Jones, M.R., Gibson, G.R., and Rastall, R.A. (2001) A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J. Appl. Microbiol.,* **91,** 878-887.

[١٤٨] Santos, A., San Mauro, M., and Diaz, D.M. (2006) Prebiotics and their long-term influence on the microbial populations of the mouse bowel. *Food Microbiol.,* **23,** 498.

[١٤٩] Konietzny, U. and Greiner, R. (2002) Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *Int. J. Food Sci. Technol.,* **37,** 791-812.

[١٥٠] Barrientos, L., Scott, J.J., and Murthy, P.P.N. (1994) Specificity of hydrolysis of phytic acid by alkaline phytase from lily pollen. *Plant Physiol.,* **106,** 1489-1495.

[١٥١] Haefner, S., Knietsch, A., Scholten, E., Braun, J., Lohscheidt, M., and Zelder, O. (2005) Biotechnological production and applications of phytases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **68,** 588.

[١٥٢] Mullaney, E.J., Daly, C.B., and Ullah, A.H. (2000) Advances in phytase research. *Adv. Appl Microbiol.,* **47** (1), 157-199.

[١٥٣] Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A., and Soccol, V.T. (2001) Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresour. Technol.,* **77,** 203-214.

[١٥٤] Vohra, A. and Satyanarayana, T. (2003) Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Crit. Rev. Biotechnol.,* **23,** 29-60.

[١٥٥] Greiner, R. and Konietzny, U. (2006) Phytase for food application. *Food Technol. Biotechnol.,* **44,** 125-140.

[١٥٦] Lassen, S.F., Breinholt, J., Ostergaard, P.R., Brugger, R., Bischoff, A., Wyss, M., and Fuglsang, C.C. (2001) Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: *Penicphora lycii, Agrocybe pediades,* a *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens. Appl. Environ. Microbiol.,* **67,** 4701-4707.

[١٥٧] Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M., and van Loon, A.P. (1997) Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus. Appl. Environ. Microbiol.,* **63,** 1696-1700.

[١٥٨] Kim, Y.-O., Kim, H.-K., Bae, K.-S., Yu, J.-H., and Oh, T.-K. (1998) Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme Microb. Technol.,* **22,** 2.

[١٥٩] Nampoothiri, K.M., Tomes, G.J., Roopesh, K., Szakacs, G., Nagy, V., Soccol, C.R., and Pandey, A. (2004) Thermostable phytase production by *Thermoascus aurantiacus* in submerged fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **118,** 205-214.

[١٦٠] Zhou, X.L., Shen, W., Zhuge, J., and Wang, Z.X. (2006) Biochemical properties of a thermostable phytase from *Neurospora cras* sa. *FEMS Microbiol. Lett.,* **258,** 61-66.

[١٦١] Casey, A. and Walsh, G. (2004) Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. *J. Biotechnol.,* **110,** 313-322.

[١٦٢] Lehmann, M., Loch, C., Middendorf, A., Studer, D., Lassen, S.F., Pasamontes, L., van Loon, A.P., and Wyss, M. (2002) The consensus concept for thermostability engineering of proteins: further proof of concept. *Protein Eng.,* **15,** 403-411.

[١٦٣] Lehmann, M., Lopez-Ulibarri, R., Loch, C., Viarouge, C., Wyss, M., and van Loon, A.P. (2000) Exchanging the active site between phytases for altering the functional properties of the enzyme. *Protein Sci.,* **9,** 1866-1872.

[١٦٤] Zhang, W., Mullaney, E.J., and Lei, X.G. (2007) Adopting Selected Hydrogen Bonding and Ionic Interactions from *Aspergillus fumigates* Phytase Structure Improves Thermostability of *Aspergillus niger* PhyA Phytase. *Appl. Environ. Microbiol.,* **2007, 73,** 3069-3076.

[١٦٥] Brinch-Pedersen, H., Sorensen, L.D., and Holm, P.B. (2002) Engineering crop plants: getting a handle on phosphate. *Trends Plant Sci.,* **7,** 118.

[١٦٦] Golovan, S.P., Meidinger, R.G., Ajakaiye, A., Cottrill, M., Wiederkehr, M.Z., Barney, D.J., Plante, C., Pollard, J.W., Fan, M.Z., Hayes, M.A., Laursen, J., Hjorth, J.P., Hacker, R.R., Phillips, J.P., and Forsberg, C.W. (2001) Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nat. Biotechnol.,* **19,** 741.

[١٦٧] Novoselova, T.A., Meuwissen, M.P.M., and Huirne, R.B.M. (2007) Adoption of GM technology in livestock production chains: an integrating framework. *Trends Food Sci. Technol.,* **18,** 175.

[١٦٨] Srivastava, M. and Kapoor, V.P. (2005) Seed galactomannans: an overview. *Chem. Biodivers.,* **2,** 295-17.

[١٦٩] Brufau, J., Francesch, M., and Pérez-Vendrell, A.M. (2006) The use of enzymes to improve cereal diets for animal feeding. *J. Sci. Food Agric.,* **86,** 1705-1713.

[١٧٠] Bedford, M.R. (2000) Exogenous enzymes in monogastric nutrition-their current value and future benefits. *Anim. Feed Sci. Technol.,***86,** 1-13.

[١٧١] Bedford, M.R. and Classen, H.L. (1992) Reduction of intestinal viscosity through manipulation of dietary rye and pentosanase concentration is affected through changes in the carbohydrate composition of the intestinal aqueous phase and results in improved growth rate and food conversion effi ciency of broiler chicks. *J. Nutr.,* **122,** 560-569.

[١٧٢] McKraken, K.J. and Quintin, G. (2000) Metabolisable energy content of diets and broiler performance as affected by wheat specific weight and enzyme supplementation. *Br. Poult. Sci.,* **41,** 332-334.

[١٧٣] Wu, Y.B., Ravindran, V., Thomas, D.G., Birtles, M.J., and Hendicks, W. (2004) Influence of phytase and xylanase, individually or in combination, on performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology in broilers fed wheat-based diets containing adequate level of phosphorus. *Br. Poult. Sci.,* **45,** 76-84.

[١٧٤] Roberts, J.R. and Choct, M. (2006) Effects of commercial enzyme preparations on egg and eggshell quality in laying hens. *Br. Poult. Sci.,* **47,** 501-510.

[١٧٥] Bedford, M.R. (2000) Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimise subsequent problems. *World Poult. Sci. J.,* **56,** 347-365.

[١٧٦] Daskiran, M., Teeter, R.G., Fodge, D., and Hsiao, H.Y. (2004) Evaluation of endo-beta-D-mannanase (Hemicell) effects on broiler performance and energy use in diets varying in beta-mannan content. *Poult. Sci.,* **83,** 662-668.

[١٧٧] Lee, J.T., Bailey, C.A., and Cartwright, A.L. (2003) Beta-mannanase ameliorates viscosity-associated depression of growth in broiler chickens fed guar germ and hull fractions. *Poult. Sci.,* **82,** 1925-1931.

[١٧٨] Odetallah, N.H., Ferket, P.R., Grimes, J.L., and McNaughton, J.L. (2002) Effect of mannan-endo-1,4-beta-mannosidase on the growth performance of turkeys fed diets containing 44 and 48% crude protein soybean meal. *Poult. Sci.,* **81,** 1322-1331.

[١٧٩] Maisonnier-Grenier, S., Clavurier, K., Saulnier, L., Bonnin, E., and Geraert, P.-A. (2006) Biochemical characteristics of wheat and their relation with apparent metabolisable energy value in broilers with or without non-starch polysaccharide enzyme. *J. Sci. Food Agric.,* **86,** 1714-1721.

[١٨٠] Choct, M. (2006) Enzymes for the feed industry: past, present and future. *Worlds Poult. Sci. J.,* **62,** 5-15.

[١٨١] Choct, M., Kocher, A., Waters, D.L.E., Pettersson, D., and Ross, G. (2004) A comparison of three xylanases on the nutritive value of two wheats for broiler chickens. *Br. J. Nutr.,* **92,** 53-61.

[١٨٢] Leuchtenberger, W., Huthmacher, K., and Drauz, K. (2005) Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,***69,** 1-8.

[١٨٣] Bercovici, D. and Fuller, M.F. (1995) Industrial amino acids in nonruminant animal nutrition, in *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*(eds R.J. Wallace and A. Chesson), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, pp. 93-113.

[١٨٤] Ikeda, M. (2003) Amino acid production processes, in *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology,* vol. **79** (eds T. Scheper, R. Faurie, and J. Thommel), Springer, Berlin, pp. 1-35.

[١٨٥] Kimura, E. (2003) Metabolic engineering of glutamate production, in *Advances in Biochemica Engineering/Biotechnology,* vol. **79** (eds T. Scheper, R. Faurie, and J. Thommel), Springer, Berlin, pp. 37-57.

[١٨٦] Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B.J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Kramer, R., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Moeckel, B., Pfefferle, W., Puehler, A., Rey, D.A., Ruckert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V.F., Wiegrabe, I., and Tauch, A. (2003) The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence. *J. Biotechnol.,* **104,** 5-25.

[١٨٧] Calton, G.J. (1992) The enzymatic production of L-aspartic acid, in *Biocatalytic Production of Amino Acid and Derivatives* (eds J.D. Rozzell and F. Wagner), Hanser, M ü nchen, pp. 59-74.

[١٨٨] Oyama, K. (1992) *Chirality in Industry,* Chapter 11 (eds A.N. Collins, G.N. Sheldrake, and J. Crosby), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.

[١٨٩] Pfefferle, W., Moeckel, B., Bathe, B., and Sahm (2003) *Marx in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology,* vol. **79** (eds T. Scheper, R. Faurie, and J. Thommel), Springer, Berlin, pp.59-112.

[١٩٠] de Graaf, A.A., Eggeling, L., and Sahm H. (2001) *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology,* vol. **73** (eds. T. Scheper, R. Faurie, and J. Thommel), Springer, Berlin, pp. 9-29.

[١٩١] Debabov, V.G. (2003) *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology,* vol. **79** (eds T. Scheper, R. Faurie, and J. Thommel), Springer, Berlin, pp. 59-112.

[١٩٢] Ikeda, M., and Katsumata, R. Hyperproduction of tryptophan by Corynebacterium glutamicum with the modified pentose phosphate pathway. *Appl. Environ. Microbiol.,* **65,** 2497-2502.

[١٩٣] Drauz, K., and Waldmann, H. (2002) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook,* 2nd edn, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

[١٩٤] Chibata, I. (1978) *Immobilized Enzymes,*Kodansha-Halsted Press, Tokyo.

[١٩٥] Woeltinger, J., Karau, A., Leuchtenberger, W., and Drauz, K. (2005) Membrane reactors at Degussa, in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology,* vol. **92** (ed. T. Scheper), Springer, Berlin, pp. 289-316.