

تكنولوجيا الإنزيمات

Enzyme Technology

الأستاذ الدكتور / محمد البسطويسى أمان

الأستاذ الدكتور / محمد محمود يوسف

كلية الزراعة - جامعة الإسكندرية - الشاطبي - الإسكندرية

مكتبة المعارف الحريثة

٢٣ ش تاج الرؤساء سلبا باشا الإسكندرية

ت: ٥٤٤٥٥٥١ - ٥٨٢٦٩٠٢

11-تكنولوجيا الإنزيمات Enzymes Technology

رقم الصفحة	المحتويات
1	1-11 مقدمة
3	2-11 تخصصية مادة التفاعل
4	3-11 فصل وتنقية الإنزيمات
9	1-3-11 طرق تعتمد على المقياس أو الكتلة
11	2-3-11 طرق تعتمد على الشحنة الكهربائية
13	3-3-11 طرق تعتمد على تغيرات الذائبية
16	4-3-11 طرق تعتمد على وجود أماكن مفضلة للربط
18	4-11 تسمية الإنزيمات
20	5-11 الصفات الحركية للإنزيمات
24	6-11 استخدامات الإنزيمات في التصنيع الغذائي
24	1-6-11 إنزيمات الأميليز
25	2-6-11 السليوليز
25	3-6-11 الجلوكوز أيوسومريز
25	4-6-11 إنزيمات الليباز
26	5-6-11 الإنفرتيز
26	6-6-11 اللاكتيز
26	7-6-11 الرنين
27	8-6-11 إنزيمات البروتياز
28	9-6-11 الإنزيمات البكتينية
29	10-6-11 الكاتاليز والبيروكسيداز
29	11-6-11 إنزيمات الفوسفاتيز
29	12-6-11 الجلوكوز أوكسيداز
29	13-6-11 التانيز والبولي فينول أوكسيداز
35	7-11 الإنزيمات المثبتة
35	1-7-11 طرق تثبيت الإنزيمات
35	أ- التثبيت الفيزيقي
36	ب- التثبيت الكيماوي

المحتويات	رقم الصفحة
2. 7-11. التقنيات المستخدمة فى التثبيت	36
أ- الإدمصاص	36
ب- المسك	36
ج- الكبسلة الدقيقة	36
د- التبادل الأيونى	37
هـ- الربط العرضى	37
و- الإدمصاص والربط العرضى	37
ز- البلمرة المساعدة	37
ح- الارتباط التعاونى	37
3. 7-11. العوامل المؤثرة على إستخدام الإنزيمات المثبتة	39
أ- التكلفة	39
ب- كفاءة التحويل	40
ج- الثبات	40
د- حالة الناتج	41
4. 7-11. إستخدامات الإنزيمات المثبتة فى التصنيع الغذائى	41
أولا : إنتاج شراب للذرة عالى الفركتوز	41
ثانيا : إنتاج السكر المحول	47
ثالثا : الأسترة للتبادلية للزيوت والدهون	50
رابعا: إزالة الرافينوز من بنجر السكر	54
خامسا: إنتاج مظهرات النكهة	54
سادسا: إنتاج اللبن والشرش الخاليين من اللاكتوز	55
سابعا : فى العمليات التصنيعية	55
8-11. مثبطات الإنزيمات بالأغذية	55
1. 8-11. المثبطات الإنزيمية بالأغذية النباتية	56
أ- مثبطات الإنزيمات المحللة للبروتين	56
ب- مثبطات إنزيمات الأميليز	57
2. 8-11. المثبطات الإنزيمية بالأغذية الحيوانية	59
9-11. تطبيقات تكنولوجيا الحمض لنسوى دى لوكسى ريبونيكليك (DNA) معاد الإتحاد فى إنتاج الإنزيمات	59
10-11. المراجع	61

11-تكنولوجيا الإنزيمات Enzyme Technology

الأستاذ الدكتور / محمد البسطويسى أمان

الأستاذ الدكتور / محمد محمود يوسف

قسم علوم وتكنولوجيا الأغذية - كلية الزراعة - جامعة الإسكندرية

1-11 مقدمة :

الإنزيمات هي عوامل حفز كيموحيوية biochemical catalysts لجميع التفاعلات التي تحدث في الكائنات الحية ، غير أن الإنزيمات تتباين عن عوامل الحفز الأخرى في أربع صفات رئيسية وهي :

أ- معدلات أعلى للتفاعل :

تصل معدلات التفاعلات التي يتم تحفيزها بواسطة الإنزيمات إلى نحو 10^6 - 10^9 مرة مقارنة بالتفاعلات التي لا تحفز بواسطة الإنزيمات ، كذلك فإن معدلات التفاعلات التي تحفزها الإنزيمات تكون أعلى عدة مرات من نظيراتها التي يتم تحفيزها كيميائياً .

ب- ظروف تفاعل أكثر اعتدالاً :

تحدث التفاعلات الإنزيمية تحت ظروف معتدلة عند درجات حرارة أقل من 100°C وعند الضغط الجوي وتقريباً عند قيم pH حول نقطة التعادل ، وهذه الظروف تتباين عن تلك التي تتطلبها التفاعلات التي يتم تحفيزها كيميائياً من درجات حرارة أعلى وتحت ضغط مرتفع وقيم حادة من الـ pH .

ج- تخصص أعلى للتفاعل :

تتسم الإنزيمات - كعامل حفز - بدرجة عالية من التخصصية لكل من مواد التفاعل reactants والتي تعرف بالـ substrates مما يحدد نواتج التفاعل وذلك مقارنة بالتفاعلات التي يتم تحفيزها كيميائياً ، ولقما ينتج عن التفاعلات الإنزيمية نواتج جانبية ، فعلى سبيل المثال فإن عملية التخليق الأنزيمي للبروتينات على الريبوسومات تشمل على عديدات ببتيد تتكون من أكثر من 1000 حامض أميني ، وعلى الرغم من ذلك فإن هذه العملية تحدث دون خطأ . أما في التخليق الكيمائى لعديدات الببتيد فإن التفاعلات الجانبية و التفاعلات غير الكاملة تحد من طول سلاسل عديدات الببتيد المتكونة حيث يدخل نحو 100 حامض أميني فقط في عملية التخليق .

د- القدرة على التنظيم :

تتباين القدرة التحفيزية للعديد من الإنزيمات في استجابتها لتركيز المواد الأخرى التي تختلف عن مواد تفاعل هذه الإنزيمات . وتتضمن آليات العمليات التنظيمية هذه التحكم الألوستيري allosteric control ، التحوير التعاوني covalent-modification- للإنزيم وكذا إختلاف كميات الإنزيمات التي يتم تخليقها .

ومن المنظور التاريخي فإنه يمكن القول بأن دراسة الإنزيمات في البداية كانت أكثر من دراسة الكيمياء الحيوية ذاتها فلقد بدأ التعرف على الإنزيمات منذ القرن التاسع عشر حيث درست عمليات التخمر fermentation والهضم digestion . وقد بدأت دراسة التخمر عام 1810 على يد جوزيف جاى لوساك Joseph Gay Lussac والذي أوضح أن الإيثانول و ثانى أكسيد الكربون يعتبران بمثابة للنواتج الرئيسية لتخطم السكر بواسطة الخميرة . وفي عام 1835 نشر جاكوب بريزليس Jacob Berzelius النظرية العامة الأولى للتخفيز الكيماوى موضحاً أن مستخلص المولت المعروف بالدياستيز diastase (معروف الآن أنه يحتوى على إنزيم الألفا أميلاز) يحفز التحلل المائى للنشا بطريقة أكثر كفاءة مقارنة بحامض الكبريتيك ، بيد أنه لم يكن فى المقدور إجراء تفاعلات كيموحيوية أخرى على نطاق معملى مما حدا بلويس باستير Louis Pasteur فى منتصف القرن التاسع عشر إلى وضع إفتراض مفاده أن عملية التخمر يمكن أن تحدث فقط فى الخلايا الحية التى تحتوى على "قوة عظيمة" (vital force) تمكنها من عدم الخضوع للقواتين المنظمة للتفاعلات التى تحدث فى النظم غير الحية ، غير أن جستس ليبج Justus Liebig أشار إلى أن العمليات الحيوية تحدث بفعل مواد كيماوية (عرفت فيما بعد بالمخمرات (ferments) و قد سميت هذه المركبات بالإنزيمات (enzymes) وهى كلمة لاتينية تتكون من شقين الأول en ومعناها "فى" والثانى zyme ومعناه الخميرة) ، ويعتبر فريدرخ ويلهلم كونى Fredrich Wilhelm Kuhne أول من استخدم هذا الأسم فى عام 1878 و قد أوضح أن هناك شيئاً ما فى الخميرة ذاتها يساعد على حدوث عملية التخمر وعلى الرغم من ذلك ففى عام 1897 تمكن إدوارد بوخنر Edward Buchner من الحصول على مستخلص خال من خلايا الخميرة أمكن استخدامه فى تخليق الإيثانول من الجلوكوز (التخمر الكحولى) .

وفى عام 1894 اكتشف إميل فيشر Emil Fischer أنه بمقدور الإنزيمات الجليكوليتية التفريق بين مشابهات السكريات الفراغية مما جعله يضع افتراضه المعروف بالضربة والمفتاح lock and key ومنطوقه أن تخصص الإنزيم (الضربة) لمادة متفاعلة (المفتاح) يتأتى من شكلهما المتواعمين هندسياً ، بيد أن التركيب الكيماوى

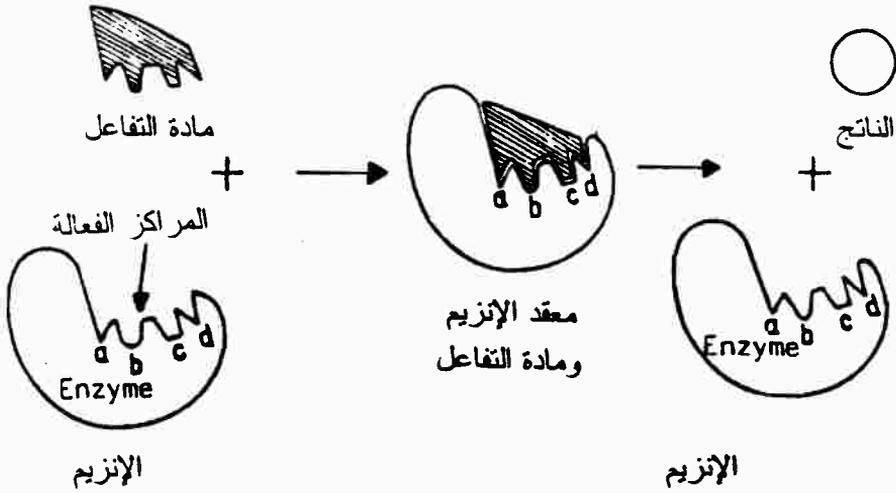
للإنزيمات لم يعرف إلا في عام 1926 على يد جيمس سمنر James Sumner والذي تمكن ولأول مرة من بلورة أول إنزيم وهو اليوريز urease وأوضح أن هذه البلورات تتكون من البروتين ، ولما كانت المستحضرات الإنزيمية التي حضرها سمنر غير نقية فلم يكن مقبولا حتى عام 1930 أن الإنزيم عبارة عن بروتين إلا حينما أوضح جون نورثروب John Northrop وموسيس كيونترز Moses Kunitz وجود علاقة تلازم مباشرة بين النشاط الإنزيمي لكل من الببسين ، التربيسين ، الكيموتريسين المبلورة وكميات البروتين الموجودة . ومنذ ذلك الحين تأكد أن الإنزيمات عبارة عن بروتينات (على الرغم مما تبين حديثا من أن لبعض أنواع حامض الريبونيوكلريك RNA نشاطاً تحفيزياً).

وعلى الرغم من أن لموضوع علم الإنزيمات تاريخا طويلا إلا أن المعلومات التي نعرفها الآن عن طبيعة الإنزيمات ووظائفها هي في واقع الأمر محصلة زخم هائل من الدراسات التي تم إنجازها في النصف الثاني من القرن العشرين . وبعد التقدم المذهل الذي تحقق في طرق الفصل والتحليل فقد أصبح ميسورا عزل وتوصيف أى إنزيم ولا سيما بعد أن تحقق في عام 1963 ولأول مرة معرفة تتابع الأحماض الأمينية لأول إنزيم وهو ريبونيوكليراز A ribonuclease المستخلص من بنكرياس الأبقار كما أمكن في عام 1965 معرفة بناء الليسوزيمات lysozymes ببياض بيض الدجاج بواسطة الأشعة السينية ، ومنذ ذلك التاريخ فقد أمكن عزل وتنقية عشرات الآلاف من الإنزيمات وتوصيفها ومعرفة طبيعة كل إنزيم وتركيبه .

11-2 تخصصية مادة التفاعل Substrate specificity

تعتبر القوى اللاتعاونية - التي من خلالها ترتبط مواد التفاعل والجزيئات الأخرى بالإنزيمات - متطابقة في صفاتها مع التوزيع الفراغي للبروتينات نفسها . وتشتمل كل منها على قوى فان دير فالس Van der Waals والروابط الألكتروستاتيكية، والروابط الهيدروجينية والتداخلات الكارهة للماء hydrophobic interactions وعامة فإن مكان الربط بمادة التفاعل يتكون من تجويف cleft يتواءم في الشكل مع جزء مقابل على سطح الإنزيم في تكامل هندسي كما هو موضح بالشكل رقم 11-1 . أضف إلى ذلك أن متبقيات الأحماض الأمينية والتي تكون مكان الربط تسترتب لتتداخل بطريقة متخصصة مع مادة التفاعل بطريقة جذابة في تكامل الكتروني electronic complementarity أما الجزيئات التي تختلف في الشكل أو المجموعة الوظيفية فإنه يكون في غير مقدورها الإرتباط بالإنزيم ومن ثم فإنها لا تكون معقدات مادة التفاعل مع الإنزيم . وطبقاً لافتراض الضبة والمفتاح lock-and-key hypothesis فإن منطقة الربط بمادة التفاعل يمكن أن تتواجد في غياب مادة التفاعل المرتبطة أو تبعاً

لافتراض التوافق الحثي induced fit hypothesis تتكون حول مادة التفاعل. وقد أوضحت دراسات الأشعة السينية أن أماكن ربط مادة التفاعل لمعظم الإنزيمات تتكون مسبقاً غير أن لمعظمها على الأقل درجة من للتوافق الحثي عند الارتباط بمادة التفاعل.



شكل 1-11 : شكل توضيحي يبين مفهوم التخصص الإنزيمي والمراكز الفعالة على سطح الإنزيم .

المصدر : (Stryer 1991) .

3-11 فصل وتنقية الإنزيمات

Separation and purification of enzymes

إن الهدف من تنقية إنزيم ما هو إمكانية عزل هذا الإنزيم بأعلى عائد ممكن على أساس النسبة المئوية للإستعادة recovery مقارنة بالنشاط الكلي للإنزيم في المستخلص الأصلي . بالإضافة إلى ذلك فإنه يجب أن يتميز المستحضر الإنزيمي بأعلى نشاط تحفيزي catalytic activity وبأعلى درجة نقاوة ممكنة ، بمعنى أن المستحضر الإنزيمي لا يحتوي على إنزيمات أخرى أو أي جزيئات كبيرة أخرى .

وفيما سبق فقد كانت البلورية crystallinity تؤخذ كدليل على نقاوة الإنزيم على الرغم من وجود أدلة الآن على وجود إنزيمات متبلورة قد تكون غير نقية ، بل إن عمليات عديدة لتنقية الإنزيمات والتي تتبع الآن لا تشمل على خطوة البلورة ، بيد أنه يجب أن نأخذ في إعتبارنا أن البلورة تعتبر عملية ضرورية إذا ما أريد دراسة

التركيب ثلاثي الأبعاد للإنزيم بواسطة الأشعة السينية X-ray crystallography. ويتم تقدير النشاط التحفيزي للمستحضر الإنزيمي إما بمعدل إختفاء مادة التفاعل أو معدل ظهور الناتج تحت ظروف محددة من تركيز مادة التفاعل ، درجة الحرارة ، الـ pH الخ . وعادة يعبر عن هذا النشاط بالميكرومول / دقيقة من مادة التفاعل التي تم استهلاكها أو التي نتجت من التفاعل وتسمى وحدات دولية international units أو يعبر عن وحدات النشاط للإنزيم بالمول / ثانية لمادة التفاعل التي تم إستهلاكها أو التي نتجت (الكاتال katal) وليس هناك سوى سبيل واحد للتنبؤ بالنشاط التحفيزي للإنزيم النقي ألا وهو الوصول إلى قيمة نشاط نوعي specific-activity (وحدات الإنزيم/ملجم أو كاتال/كجم مع ملاحظة أن كل 60 وحدة/ملجم = 1 كاتال/كجم) ثابتة أي لايمكن الحصول على قيمة أعلى منها بتقدم عملية التنقية . كذلك فإنه يمكن حساب العائد من الإنزيم من المعادلة الآتية :

$$\frac{\text{وحدات الإنزيم في المكون}}{\text{وحدات الإنزيم في المستحضر الأصلي}} = \text{العائد}$$

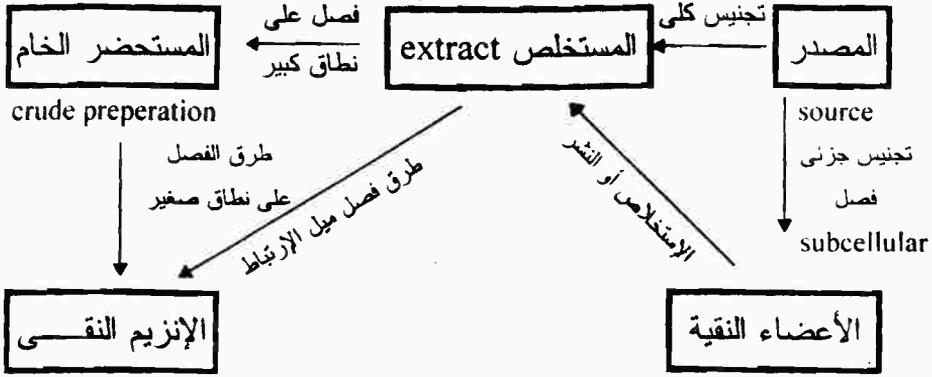
أما عدد مرات النقاوة fold purification فيمكن حسابها من المعادلة التالية :

$$\frac{\text{النشاط النوعي للمكون}}{\text{النشاط النوعي الأصلي}} = \text{عدد مرات النقاوة}$$

كذلك فإنه يمكن تقدير بعض الملوثات الموجودة بالمستحضر الإنزيمي بتقنيات مثل الطرد المركزي لفائق ultra centrifugation، طرق الهجرة الكهربائية electrophoresis (سواء الطريقة القياسية أو باستخدام المنظفات أي SDS-PAGE أو عند نقطة التعادل الكهربى isoelectric focusing) أو عن طريق تحليل النهايات الأمينية N-terminal analysis. ولتنقية أى إنزيم فإنه يجب إتباع ثلاث خطوات هي:

- 1- إختيار مصدر الإنزيم الذى يعطى عائداً عالياً منه .
- 2- تحديد طرق تجنيس homogenization المستخلص .
- 3- تحديد طرق الفصل .

وبوضح الشكل رقم 11-2 خطوات تنقية الإنزيمات



شكل 11-2 : خطوات تنقية الإنزيمات

المصدر : Price and Stevens (1982) .

أ- إختيار المصدر Choice of source

يتوقف إختيار المصدر الذي سيتم تحضير الإنزيم منه على عدة إعتبرات

أهمها:

1- تواجده الإنزيم :

يجب إختيار مصدر يتواجد به الإنزيم المزمع عزله واستخلاصه بكميات وفيرة ، فعلى سبيل المثال تعتبر الغدد اللبنيية اللبنية مصدراً ممتازاً لإنزيمات مثل كربوكسيليز أسيتايل مرافق الإنزيم أ acetyl COA-carboxylase والذي له دور تحفيزي في عملية التخليق الحيوي للأحماض الدهنية ، كذلك فإن الكلى تعتبر مصدراً جيداً لإنزيم الفوسفاتيز القلوي alkaline phosphatase والذي يحفز عملية التحلل المائي للأسترات عند الـ pH القلوي . أما في حالة الكائنات الحية الدقيقة فإنه بالمقدور زيادة العائد الناتج من إنزيم معين عن طريق التحوير الوراثي أو عن طريق تغيير تركيب البيئة التي ينمو عليها الميكروب ، فعلى سبيل المثال فإنه يمكن زيادة معدل تخليق إنزيم البيتا-D-جالاكتوسيديز β -D-galactosidase بواسطة بكتيريا *E. coli* وذلك إذا ما تم تنمية البكتيريا على بيئة تحتوي على اللاكتوز كمصدر وحيد للكربون، ومن ناحية أخرى فقد أمكن عزل طفرة mutant من بكتيريا *E. coli* تكون إنزيم كاربامويل ترانسفيريز أسبارتات- aspartate carbamoyltransferase - تحت ظروف النمو البطيء بمعدل يزيد عن 8% من البروتين الكلي الذي يتم تخليقه في حين أن الطرز العادية من هذه البكتيريا تنتج الإنزيم المذكور بكمية لا تزيد عن 1% من البروتين الكلي .

2- توافر المصدر :

يجب أن يكون المصدر الذي تم إختياره لاستخلاص الإنزيم منه متاحاً إقتصادياً وجغرافياً ، وفي بعض الحالات يكون المصدر الغنى بالإنزيم مرتفع الثمن (مثل الإستاكوزا lobster) أو من غير الممكن إستخدامها مثل الأنسجة الأدمية؛ لذا فإنه من الضرورة بمكان إجراء توازن بين غنى المصدر بالإنزيم وإمكانية الحصول على هذا المصدر .

3- الدراسات للمقارنة :

من المفيد المقارنة بين الدراسات التي تمت على الإنزيم المزمع إستخلاصه وذلك من مصادر أو أنسجة مختلفة وما إذا كان الإنزيم يوجد فى عدة صور (أيزو إنزيمات isoenzymes) وهى صور لنفس الإنزيم لها نفس الفعل التحفيزى لكنها تختلف فى بعض صفاتها الكيماوية والفيزيائية) .

4- مكان تواجد الإنزيم بالخلية :

إذا ما كان الإنزيم المراد إستخلاصه يحفز تفاعلاً يوجد فى موضع واحد فقط من الخلية (مثل إنزيم سكسينات ديهيدروجينيز succinate dehydrogenase وبعض الإنزيمات الأخرى التى تحفز تفاعلات فى دورة حمض الستريك وجميعها توجد فى الميتوكوندريا)، فإنه يمكن فى هذه الحالة إجراء تجنيس للنسيج بالكامل دونما الحاجة إلى فصل مكونات الخلية . ولكن فى بعض الحالات يوجد الإنزيم فى عدد من المواضع بالخلية ومن ثم فإن فصل الخلية إلى مكوناتها يكون أمراً ضرورياً قبل إجراء عملية التنقية وذلك للحيلولة دون تلوث الإنزيم المراد إستخلاصه من مكان محدد بنفس الإنزيم ولكن من أماكن أخرى بالخلية .

ب- طرق التجنيس Methods of homogenization

توجد عدة طرق لتكسير الخلايا المفتوحة واستخلاص محتوياتها . وعادة فإن إختيار طريقة معينة يعتمد على نوع الغشاء أو طبيعة الكائن الذى يستخدم كمصدر للإنزيم وذلك على النحو التالى :

أولاً: الأنسجة الحيوانية :

يؤدى غياب جدار خلوى صلب للخلية الحيوانية إلى سهولة عملية تجنيس هذه الأنسجة . وغالباً فإنه يتم تقطيع النسيج إلى أجزاء صغيرة أو تجرى عملية فرم له قبيل إجراء عملية التجنيس باستخدام مجنس homogenizer أو خلط عالى السرعة. وتجرى عملية الإستخلاص بواسطة محاليل أيزوتونية isotonic solutions (المحلول الأيزوتوني هو المحلول الذى له نفس الضغط الأسموزى لمكونات الخلية ويتكون إما

من 0.3 مول dm^{-3} من السكروز أو 0.15 مول dm^{-3} من كلوريد البوتاسيوم) وذلك للحيلولة دون حدوث خلل فى المكونات الخلوية ، ويعتبر هذا الإجراء ضرورياً ولا سيما فى أنسجة مثل الكبد والتي تحتوى على lysomes (وهى عضيات خلوية تحتوى على عدد من الإنزيمات المحللة مثل البروتينيز proteinases). وفى حالات أخرى غالباً ما يتم إستخدام قوة أيونية ionic strength متوسطة أو منخفضة (مثل 0.01 مول dm^{-3} من كلوريد البوتاسيوم) فى عملية الإستخلاص ، وقد يكون ضرورياً فى بعض الحالات إضافة مثبطات البروتينيز أو مواد أخرى (مثل ثنائى ثيو ثريتول dithiothreitol وهى مادة مختزلة) للحيلولة دون الإضرار بالإنزيم أثناء عملية الإستخلاص .

ثانياً : النباتات والفطريات والبكتيريا:

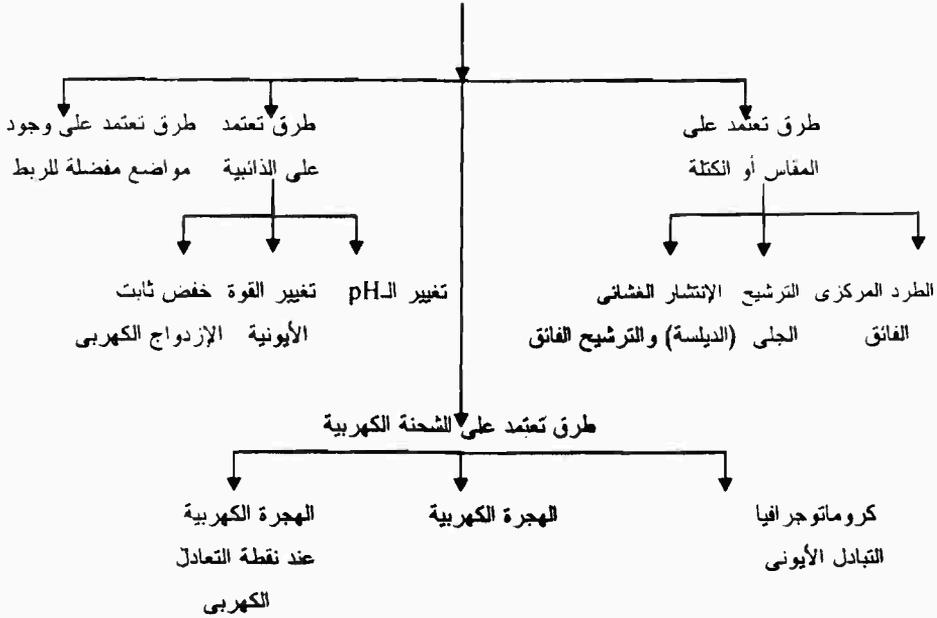
بسبب وجود جدار خلوى صلد يحيط بخلايا هذه المواد فإن الأمر يتطلب عادة إستخدام طرق إستخلاص تشتمل على إجراء طحن grinding مع التلامس بألومينا أو رمل ، التجميد والتفكيك ، مدة خلط طويلة أو إضافة حبيبات زجاجية glass beads خلال الخلط .

ومن ناحية أخرى فإنه يمكن تكسير الجدر الخلوية للنباتات والفطريات والبكتيريا ، وذلك باستخدام إنزيمات محللة مناسبة . ويمكن إعداد البروتوبلاست protoplasts (خلايا لاتحتوى كليا أو جزئيا على الجدار الخلوى) من البكتيريا الموجبة لجرام (مثل *Bacillus subtilis*) عن طريق التحضين مع ليسوزيم lysozyme. وعن طريق تحوير لهذه الطريقة بإضافة مركب EDTA فإنه يمكن إعداد البروتوبلاست من البكتيريا السالبة لجرام (مثل *E. coli*) . ويمكن إعداد البروتوبلاست من الفطريات والخمائر (مثل *Neurospora* ، *Aspergillus*) باستخدام مستخلصات إنزيمية تحتوى عامة على مخلوط من إنزيمات الكيتيناز chitinase، 3-جلوكونيز 3-gluconase. ويمكن كطريقة بديلة إستخدام طفرة من الفطر لا يوجد بها الجدار الخلوى (مثل طفرة من *Neurospora*) ومن ثم فإنه يمكن إجراء عملية تجنيس الخلايا بسهولة باستخدام محاليل ذات قيم ضغط اسموزى أقل .

طرق الفصل Methods of separation

يمكن فصل الإنزيمات بعدة طرق كما هو موضح بالشكل رقم 11-3.

طرق فصل الإنزيمات



شكل 11-3 : الطرق المختلفة التي يمكن استخدامها لفصل الإنزيمات

1-3-11 طرق تعتمد على المقاس أو الكتلة

وتشتمل على طرق الطرد المركزي وطرق الترشيح الجلى وهى تعتمد فى الفصل إما على مقاس size أو كتلة mass المواد المفصولة .

(أ) الطرد المركزي الفائق Ultracentrifugation

يمكن ترسيب الجزيئات الكبيرة (مثل الإنزيمات) باستخدام حقل طرد مركزي عال (لايزيد عن 300 ألف مرة قدر الجاذبية الأرضية) وعلى الرغم من أن المعدل الذى سيترسب به الإنزيم يعتمد على عدة عوامل تشتمل على مقاس size وشكل الجزيء ولزوجة المحلول فقد تبين أنه بشكل عام كلما زاد الوزن الجزيئى كلما كان معدل الترسيب أعلى . وتجدر الإشارة إلى أن طريقة الطرد المركزي الفائق ليست من الطرق شائعة الاستخدام لتنقية الإنزيمات على النطاق الصناعى وذلك بسبب محدودية الحجم (بضع مليلترات) التى يمكن إستخدامها غير أن الطرد المركزي يعتبر من الطرق الشائعة جدا لإزاحة الرواسب أو المواد غير الذائبة (كبقايا الخلايا بعد إجراء عملية التجنيس) أو لتجميع الإنزيم الذى يتم ترسيبه عن طريقة إضافة كبريتات الأمونيوم ، وفى هذه الحالة فإن الأمر يتطلب إستخدام طرد مركزي منخفض نسبيا (من 5000 إلى 50000 xg) ، ويمكن هنا إستخدام حجوم أكبر من المستخلصات .

(ب) الترشيح الجلىّ Gel filtration

يتم الفصل بين الجزيئات فى طريقة الترشيح الجلىّ على أساس مقدرة الجزيء للدخول إلى مسام حبيبات الجل. ويعتبر السفادكس (sephadex) (دكستران به روابط عرضية) وكذا بيوجل "Bio-Gel P" (بوليمر للأكريل أميد يحتوى على روابط عرضية) من أكثر أنواع الجل المستخدمة فى هذا الصدد. والمركبات ذات الأوزان الجزيئية العالية لا يمكن لجزيئاتها إختراق مسام حبيبات الجل ومن ثم فإنها تمر خلال العمود بعكس المركبات ذات الجزيئات الصغيرة التى يمكنها إختراق مسام حبيبات الجل ولذا يتطلب خروجها من العمود وقتاً أطول. وعن طريق إستخدام طرز مختلفة من السفادكس (يتم التحكم فى درجة الروابط العرضية عند الإعداد) فإنه يمكن تغيير مدى الأوزان الجزيئية التى يمكن فصلها، فعلى سبيل المثال يمكن باستخدام sephadex G-100 فصل مخلوط من البروتينات الكروية التى تتراوح أوزانها الجزيئية فى المدى من 4000 إلى 150000 دالتون. غير أنه إذا كان شكل جزيء الإنزيم غير كروي بشكل كبير فإنه يزاح من العمود عند وقت غير متوقع لوزنه الجزيئى.

ويمكن إستخدام الترشيح الجلىّ على نطاق كبير غير أن استخدام الأعمدة الكبيرة يستغرق وقتاً طويلاً كما أن كمية الجل المطلوبة لملء هذه الأعمدة تعتبر مكلفة، لذا فإن هذه الطريقة تستخدم على نطاق صغير وفى المراحل الأخيرة من تنقية الإنزيمات.

ج- الإنتشار الغشائى والترشيح الفائق Dialysis and ultrafiltration

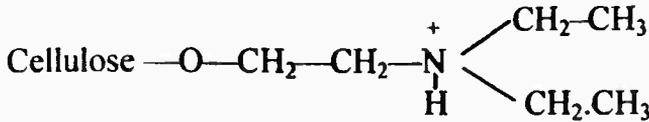
تعتمد طريقة الإنتشار الغشائى (الديليسة) على استخدام غشاء شبه منفذ semipermeable كالسلوفان حيث يعمل كغزبال sieve ذى فتحات واسعة تسمح بمرور البروتينات الكروية التى لايزيد وزنها عن 20000 دالتون فى حين لا يمكن مرور الجزيئات ذات الأوزان الجزيئية الأكبر. ويمكن تغيير حجم المسام بمعاملات ميكانيكية وكيميائية مختلفة. وعلى الرغم من أن طريقة الإنتشار الغشائى ليست طريقة مفيدة بوجه عام لفصل الإنزيمات عن بعضها فإنها تستخدم على نطاق واسع فى عمليات التنقية لإزالة الأملاح، المذيبات العضوية أو المثبطات ذات الأوزان الجزيئية المنخفضة التى قد تتواجد فى محاليل الإنزيمات. أما فى عملية الترشيح الفائق ultrafiltration فإن الجزيئات الصغيرة والأيونات تمر من خلال غشاء الديليسة تحت تأثير الضغط (عامية غاز نيتروجين عند نحو 4 ضغط جوى) وهو الأمر الذى يؤدي إلى تركيز محلول الإنزيم ومن ثم تقليل حجم العينة أثناء عملية التنقية.

11-3-2 طرق تعتمد على الشحنة الكهربائية

تشتمل هذه الطرق على تقنيات كروماتوجرافيا للتبادل الأيوني وطرق الهجرة الكهربائية ويعتمد الفصل فيها على الشحنة الموجودة على الجزيئات موضع الفصل :

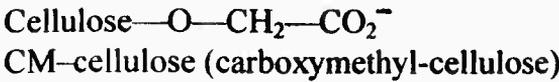
أ- كروماتوجرافيا التبادل الأيوني :

تعتمد طريقة كروماتوجرافيا التبادل الأيوني على التجاذب الإلكترونيستاتيكي بين شحنات مختلفة (أى شحنات موجبة وأخرى سالبة) . وعادة فإن المبادلات الأيونية تتكون من مشتقات محورة لبعض المواد الداعمة كالسليولوز ، السفادكس . ومن أكثر المواد المستخدمة لهذا الغرض ثنائي إيثايل أمينوايثايل سليلوز DEAE-cellulose ومركب الكربوكسى ميثايل سليلوز CM-cellulose



DEAE-cellulose (Diethylaminoethyl-cellulose)

وهو مبادل أيوني anion exchanger يربط الجزيئات المشحونة بشحنة سالبة له قيمة $10 = \text{pKa}$.



وهو مبادل كاتيوني cation exchanger يربط الجزيئات المشحونة بشحنة موجبة، له قيمة $4 = \text{pKa}$. وخلال عملية التنقية عادة ما يتم إستخدام الإنزيم فى محلول ذى قوة أيونية منخفضة وعند قيمة pH تتناسب عملية التبادل الأيوني (أى أن شحنة الإنزيم تكون مخالفة لشحنة المبادل الأيوني) . ويمكن إجراء عملية إزالة الجزيئات المرتبطة إما عن طريق تغيير الـ pH ومن ثم تغيير الشحنات أو عن طريق زيادة القوة الأيونية للمحلول الأمر الذى يؤدي إلى زيادة تركيز الكاتيونات أو الأنيونات التى تتنافس الإنزيم على الارتباط بمواضع الربط على المبادل الأيوني . ويؤدى استخدام محاليل ذات قوة أيونية متزايدة تدريجيا إلى فصل البروتينات الموجودة فى المخلول وفقاً لقدرتها على الارتباط بالمبادل الأيوني . وعند استخدام طرز محورة من السفادكس (مثل الـ DEAE-sephadex) فإن الفصل يتم على أساس الشحنة (وإلى حد معين) على أساس مقياس الجزيئات . ويمكن استخدام كروماتوجرافيا التبادل الأيوني على نطاق كبير أو صغير . ومن المناسب استخدام الطريقة المتقطعة عند استخدام هذه التقنية على نطاق كبير . أى إدمصاص الإنزيم بإضافة المبادل الأيوني إلى المحلول ثم صبب المادة فى

العامود للتحكم فى الـ desorption باستخدام تدرج فى القوة الأيونية . أما على النطاق الصغير فإن عمليتى الإدمصاص adsorption وعكسها desorption تحدثان فى العامود .

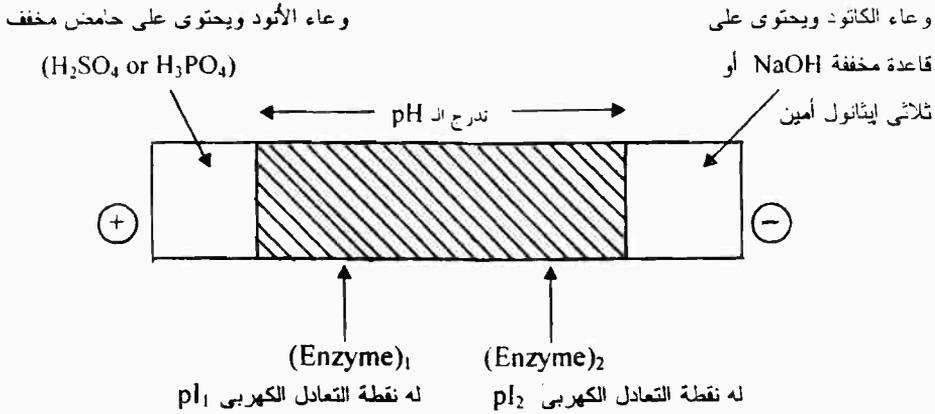
وتتأثر درجة النقاوة بخطوة التبادل الأيونى . ولكنها عامة تكون نحو عشر مرات (مقدرة كمنشاط نوعى) ولكن أمكن تحقيق نتائج أفضل . ولكروماتوجرافيا التبادل الأيونى تطبيقات واسعة جدا فى الوقت الحالى كطريقة من طرق التنقية .

ب- الهجرة الكهربائية Electrophoresis

يعتمد الفصل بالهجرة الكهربائية على الحركة التفريقية للجزيئات تحت تأثير فرق جهد كهربى . ويتحدد معدل هجرة الجزيئات بكم الشحنة التى توجد عليها وكذا بحجم وشكل الجزيء . ولتقليل تيارات الإتصالات يتم استخدام محلول بفر (الكتروليت) فى غمر مادة داعمة (الورق ، جل مسحوق السليلوز ، جل النشا ، جل البولى أكريل أميد). ويمكن تحديد مكان البروتين على المادة الداعمة باستخدام صبغة مثل صبغة أزرق كوماس coomassie blue والتى ترتبط بالبروتين . وعلى الرغم من أن هذه الطريقة عادة ما تستخدم على نطاق تحليلى محدود (ملابجرامات معدودة أو أقل) فإنه يمكن استخدامها على نطاق كبير كطريقة إعداد (أى preparative electrophoresis) . وبعد إجراء هذه الطريقة التحضيرية فإنه يمكن عمل إزاحة للإنزيم من على المادة الداعمة .

ج- الهجرة الكهربائية عند نقطة التعادل الكهربى Isoelectric focusing

تبنى هذه الطريقة على أساس هجرة الجزيئات المشحونة تبعاً لنقطة تعادلها الكهربى على جل مندرج الـ pH وليس على معدل هجرة الجزيئات فى الحقل الكهربى . ويمكن التحصل على تدرج الـ pH على الجل عن طريق غمر الجل فى مخلوط من الأمفولينات ampholytes وهى عبارة عن أحماض عديدة الأمين polyamino acids لها شحنات مختلفة ومن ثم نقط تعادل كهربى isoelectric points (pI) مختلفة . ونقطة التعادل الكهربى للمركب هى قيمة الـ pH التى عندها تكون محصلة الشحنة على المركب صفراً ولذا فإن المركب عند هذه القيمة لا يهاجر فى الحقل الكهربى . ويوضح الشكل 11-4 رسماً تخطيطياً لفصل الإنزيمات بواسطة طريقة الهجرة الكهربائية عند نقطة التعادل الكهربى .



شكل 11-4: فصل الإنزيمات بواسطة طريقة الهجرة الكهربائية عند نقطة

التعادل الكهربى isoelectric focusing

وعند مرور التيار فإن الجزيئات المشحونة بالشحنة السالبة تهجر فى إتجاه الأنود حتى يصاد encounter الحامض ويميل الحامض إلى معادلة الشحنة ولذا فإن الجزيء يتوقف . ويحدث العكس بالنسبة للجزيئات المشحونة الموجبة ، وبهذه الطريقة فإن الأمفوليتات سترتب نفسها على الجل بحيث يكون هناك زيادة متدرجة فى قيمة الـ pH من الأنود إلى الكاثود .

والإنزيم الذى يتم وضعه على الجل سيهاجر إلى الموقع على الجل والذى له قيمة للـ pH تساوى نقطة التعادل الكهربى للإنزيم . فعلى سبيل المثال إذا كان الإنزيم عند موضع له pH أعلى من نقطة تعادله الكهربى pI فإن صافى الشحنة السالبة ستضمن هجرة الإنزيم فى إتجاه الأنود حتى يصل إلى نقطة pI الخاصة به . ومن الممكن فصل مركبات تتفاوت تفاوتاً ضئيلاً فى نقط الـ pI لها (حتى 0.01 وحدة pH) ومن ثم فإن هذه الطريقة تعتبر من طرق التنقية الفعالة جداً . وهذه الطريقة تستخدم عامة على نطاق تحليلى ضيق وإن كان من الممكن استخدامها كطريقة تحضيرية . preparative method

11-3-3 طرق تعتمد على تغيرات ذاتية :

تعتمد ذاتية المركبات فى مذيب معين على توازن كل من القوى بين المذاب solute والمذيب solvent . فإذا ما كانت القوى الأولى هى السائدة فإن المركب يكون غير ذائب أما إذا كانت القوى بين المذاب والمذيب هى السائدة فإن المركب يكون ذاتياً . وفى عملية تنقية الإنزيمات فإنه يمكن تقليل التوازن بين هذه القوى مما يؤدي إلى

ترسيب الإنزيم المراد إستخلاصه أو إزالة الإنزيمات الأخرى غير المرغوب فى إستخلاصها .

وأهم ثلاث طرق لتغيير ذائبية الإنزيمات هى :

- أ- تغيير الأس الهيدروجينى .
- ب- تغيير القوة الأيونية .
- ج- خفض ثابت الإزدواج الكهربى .

ويمكن إستخدام هذه الطرق على نطاق كبير ، وغالباً ما تستخدم فى المراحل

الأولى للتقية :

أ- تغيير الأس الهيدروجينى **Change in pH**

للإنزيم - باعتباره بروتيناً - أدنى ذائبية عند نقطة التعادل الكهربى حيث أنه عند هذه القيمة من الـ pH ينعدم وجود قوى تنافر الكترولستاتيكى بين جزيئات الإنزيم، ومن ثم فإن ضبط الـ pH عند الـ pI يؤدي إلى ترسيب الإنزيم. وتستخدم هذه الطريقة فى ترسيب إنزيم أدينوزين ثلاثى فوسفاتيز *adenosinetriphosphatase* . كذلك فإنه يمكن تطويع تغيير الـ pH لترسيب الإنزيمات والبروتينات غير المرغوبة كما فى إستخلاص إنزيم أدنيلات كينيز *adenylate kinase* . ومن الأهمية بمكان للتأكد من أن الإنزيم المراد إستخلاصه لايفقد نشاطه نتيجة للتعرض لهذه التغييرات فى الـ pH .

ب- تغيير القوة الأيونية **Change in ionic strength**

عامة فإن الجزيئات الكبيرة المشحونة تكون قليلة الذوبان فى الماء النقى (منزوع الأيونات *deionized*) . وتؤدى إضافة الأيونات إلى ذائبية هذه الجزيئات وذلك عن طريق نثر *dispersion* الشحنات الموجودة عليها . وتعرف هذه الظاهرة بالتمليح الداخلى *salting in* . ومع ذلك فإن زيادة القوة الأيونية بعد نقطة معينة يؤدي إلى ترسيب هذه الجزيئات (ظاهرة التملح الخارجى *salting out*) . وعلى الرغم من أن الأساس النظرى لتفسير هذا المسلك ليس مفهوماً بدرجة كبيرة ، فمن المحتمل أن يكون التركيز العالى جداً من الملح عاملاً رئيسياً فى خفض تركيز الماء جوهرياً الأمر الذى يؤدي بالتبعية إلى خفض تداخلات المذاب والمذيب ومن ثم الذائبية . ويعتبر ملح كبريتات الأمونيوم من أكثر الأملاح إستخداماً فى تقية الإنزيمات وذلك لتمييز هذا الملح برخص ثمنه والذائبية العالية فى الماء (المحلول المشبع عند 25°م له قوة جزيئية نحو 4 مول) وليس له أية تأثيرات ضارة على الإنزيمات (يلاحظ أن كبريتات الأمونيوم عبارة عن حامض ضعيف . وعند إضافة هذا الملح إلى محلول بفر ضعيف فإنه يجب إضافة أمونيا وذلك للمحافظة على قيمة الـ pH عند 7 أو أعلى) . وعادة

فإن كل إنزيم يبدأ فى الترسيب عند تركيز معين من كبريتات الأمونيوم ، ويعتبر هذا بمثابة الأساس العلمى لعملية تجزىء fractionation أو فصل الإنزيمات بعضها عن بعض. فإذا ما كان معروفاً مثلاً من خلال التجارب المبدئية أن الإنزيم x يترسب عند قيمة 50% تشبع لمحلول كبريتات الأمونيوم فإنه يتم استخدام محلول درجة تشبعه 45% فى إستخلاص الإنزيم ثم تجرى عملية طرد مركزى لإزالة البروتينات المترسبة غير المطلوبة ، ثم تضاف كبريتات أمونيوم إلى السائل الرائق supernatant للوصول بدرجة التشبع إلى 55% ، ويمكن عن طريق الطرد المركزى الحصول على الإنزيم x فى الراسب .

وعامة فإن درجة النقاوة التى يمكن التحصل عليها عن طريق التجزىء بكبريتات الأمونيوم تكون أقل من عشر مرات ، غير أن هذه الطريقة تستخدم فى المراحل الأولى لعملية التنقية بغية إختزال حجم المحلول الذى يتم التعامل معه حيث أنه يمكن إعادة ذوبان الإنزيم المترسب فى حجم صغير من البفر ، ومع ذلك فإنه فى حالتين على الأقل يمكن الحصول على إنزيم نقى بطريقة التجزىء بكبريتات الأمونيوم (إنزيم جليسرالدهيد - فوسفات ديهيدروجينيز glycer-aldehyde-phosphate dehydrogenase وإنزيم فركتوز - باى فوسفات ألدوليز fructose-biphosphate aldolase من عضلات الأرانب) .

ويشيع إستخدام كبريتات الأمونيوم أيضاً فى عملية بلورة الإنزيمات . ويتم رفع تركيز الملح حتى ظهور عكارة خفيفة ، فإذا ما ترك المحلول ساكناً تكونت بلورات الإنزيم .

ج- خفض ثابت الإزدواج الكهربى Decrease in dielectric constant

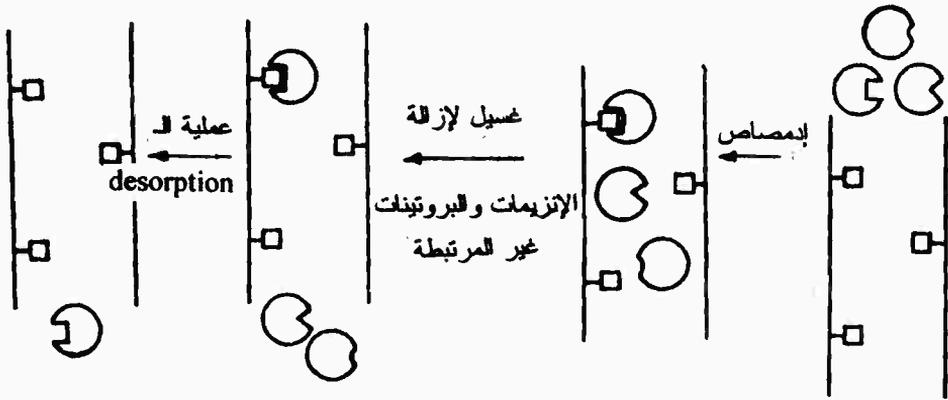
تؤدى إضافة مذيب عضوى قابل للإمتزاج بالماء (مثل الإيثانول والأسيتون) إلى خفض ثابت الإزدواج الكهربى للمحلول ، ومن ثم زيادة القوى الإلكتروستاتيكية. وعلى الرغم من أن هناك تأثيرات معقدة على كل من القوى بين المذاب والمذيب فإن محصلة التأثير هى ترسيب الجزيئات الكبيرة مثل الإنزيمات . ويمكن إستخدام هذه الطريقة على نطاق كبير كطريقة فصل أساسية، غير أنه يجب ألا يغيب عن الذهن أن إضافة المذيبات العضوية يمكن أن يؤدى فى بعض الأحيان إلى تثبيط الإنزيمات، كذلك فمن الضرورى العمل عند درجات حرارة منخفضة جداً تحت درجة التجمد لتقليل مثل هذا التأثير .

11-3-4 طرق تعتمد على وجود أماكن مفضلة متخصصة للربط :

تتميز الإنزيمات بتخصصها specificity للإرتباط بمواد التفاعل ، ويستفاد من هذه الخاصية فى طرق فصل الإنزيمات المعروفة باسم طرق الفصل المعتمدة على أفضلية الإرتباط affinity separation methods والتي تستخدم فى تنقية الإنزيمات. ومن أمثلة هذه الطرق كروماتوجرافيا أفضلية الإرتباط أو الإزاحة .

أ- كروماتوجرافيا أفضلية الإرتباط Affinity chromatography

فى طريقة كروماتوجرافيا أفضلية الإرتباط يتم ربط مادة تعرف باسم ligand لها تخصصية للإنزيم مثل مادة تفاعل الإنزيم أو مثبط تنافسى competitive inhibitor له ترتبط تعاونيا بمادة داعمة خاملة inert matrix (مثل الأجاروز agarose) . وعندما يتم إمرار المخلوط الذى يحتوى على الإنزيم المراد فصله على عمود يحتوى على هذه المادة الخاملة فإن هذا الإنزيم فقط هو الذى يتم مسكه فى حين تخرج كل الإنزيمات والبروتينات الأخرى خارج العمود دونما مسك . ويمكن تحرير الإنزيم الممسوك بتغيير إما الـ pH أو القوة الأيونية للمحلول حيث يودى ذلك إلى إضعاف ربط الإنزيم بالعمود (شكل 11-5) .



شكل 11-5 : رسم تخطيطى يوضح تنقية الإنزيمات باستخدام طريقة كروماتوجرافيا أفضلية الإرتباط .

المصدر : Price and Stevens (1982) .

غير أنه توجد بعض المشاكل لاستخدام طريقة كروماتوجرافيا أفضلية الإرتباط فى تنقية الإنزيمات ويمكن إيجاز هذه المشاكل فيما يلى :

أ- من الصعوبة إيجاد مشابهة مادة تفاعل substrate analogue أو مثبط تنافسي يمكن ربطه بالدعامة الخاملة وبحيث يحدث الربط التام بينه وبين الإنزيم .

ب- ربط الـ ligand بالمادة الداعمة قد يتداخل مع ربط الإنزيم مما يؤدي إلى فقد صفة تخصصية الارتباط . ويمكن التغلب على هذه المشكلة باستخدام مادة تسمى بالـ spacer تكون من المواد المحبة للماء hydrophilic حيث تعمل على إبعاد مادة الربط ligand عن الإنزيم .

ج- لكي ينجح الفصل بطريقة كروماتوجرافيا أفضلية الارتباط فإن قوة التداخل بين ligand المرتبطة بالدعامة والإنزيم يجب أن تكون في المدى الصحيح ، فإذا ماكانت ضعيفة جداً وثابت الانحلال أكبر من 2 ملليمول dm^{-3} فإن الإنزيم لن يحدث له إعاقة retardation بواسطة العامود . ومع ذلك فإذا كان التداخل قوياً جداً فإن إزالة الإنزيم المرتبط لن تكون ممكنة إلا باستخدام ظروف تؤدي إلى فقد الإنزيم لنشاطه . وتجدر الإشارة إلى أن المعلومات التي يتم التحصل عليها من دراسات تثبيط الإنزيمات في المحاليل تلعب دوراً هاماً في تصميم نظم كروماتوجرافيا أفضلية الارتباط .

د- هناك مشكلة بالنسبة للإنزيمات التي تحفز أكثر من مادة تفاعل واحدة . لذا فمن المتوقع أن كل إنزيمات الديهيدروجيناز dehydrogenase التي تعتمد على NAD^{+} يمكنها التعرف على المادة الداعمة الممسوك عليها NAD^{+} ، والفروق بين إنزيمات الديهيدروجيناز المختلفة تكمن في ربط مادة التفاعل الثانية ولكي تزيد من فعالية هذه الفروق فإنه ينبغي الإهتمام باختيار الطريقة المثلى لإزاحة elution الإنزيم من العامود . وعلى سبيل المثال يمكن إجراء إزاحة نوعية لإنزيم مرتبط بعامود يحتوي الـ AMP كـ ligand مرتبطة وذلك باستخدام مخلوط من الـ NAD^{+} والبيرازول pyrazole والذي يعتبر مثبطاً تنافسياً للإنزيم .

وعلى الرغم من هذه المشاكل التي تعترض كروماتوجرافيا أفضلية الارتباط فلقد وجدت هذه التقنية استخداماً واسعاً في مجال تنقية الإنزيمات وكذا الجزيئات البيولوجية الأخرى مثل المضادات الحيوية التي بها مواضع متخصصة للربط . ويمكن القول بأن نجاح هذه التقنية مرهون بالاستفادة القصوى من المعلومات المتوفرة عن الإنزيم في المحلول .

ب- أفضلية الإزاحة Affinity elution

تعتبر طريقة أفضلية الإزاحة مكملة لطريقة كروماتوجرافيا أفضلية الارتباط فيما يتعلق بتخصصية التداخل في مرحلة desorption من المادة الداعمة وذلك عكس

طريقة كروماتوجرافيا أفضلية الارتباط والتي تؤثر فيها التخصصية فى مرحلة الإدمصاص adsorption . وفى طريقة الـ affinity elution فإن الإنزيم المراد فصله (مع الإنزيمات الأخرى) يدمص على مبادل أيونى ion exchanger (مثل DEAE-cellulose) ثم تتم الإزاحة المتخصصة باستخدام مادة التفاعل المناسبة. وتتميز هذه الطريقة عن طريقة كروماتوجرافيا أفضلية الارتباط بما يلى :

- أ- ليس مطلوباً وضع تصميم معقد لربط ligand مناسب بالمادة الداعمة .
- ب- يمكن استخدام أعمدة ذات سعة عالية حيث أن المبادلات الأيونية تعتبر أرخص من مواد أفضلية الارتباط .

وقد أمكن فصل كل الإنزيمات التى تحفز المسار الجليكولى glycolytic pathway بطريقة الـ affinity elution فى عملية واحدة متعددة الخطوات ، لذا فإنه عند استخدام مخلوط من الإنزيمات الجليكوليتية التى تم بالفعل تفريدها جزئياً بواسطة كبريتات الأمونيوم (تترسب هذه الإنزيمات عند درجات تشبع على عامود CM-cellulose عند $\text{pH} = 6.5$) ، فإذا ماتمت الإزاحة بواسطة الفوسفواينول بيروفات phosphoenol-pyruvate (0.5 مليمول dm^{-3}) فإنه يمكن إزاحة إنزيم البيروفات كينيز ، أما إذا تمت الإزاحة بواسطة فركتوز 1 ، 6 ثنائى الفوسفات (0.2 مليمول dm^{-3}) فإنه يمكن إزاحة إنزيم الفركتوز-ثنائى فوسفات ألدوليز fructose-biphosphate aldolase .

11-4 تسمية الإنزيمات Enzymes nomenclature

كان من الشائع عند إكتشاف إنزيم جديد تسميته عن طريق إضافة المقطع ase- إلى مادة التفاعل التى يحفز الإنزيم تقاطعها أو أن يضاف هذا المقطع إلى نوع التفاعل الذى يحفزه الإنزيم . فمثلاً إنزيم اليوربيز urease يحفز تفاعل التحلل المائى لليوريا وإنزيم ديهيدروجينيز الكحول alcohol dehydrogenase يحفز أكسدة الكحولات إلى أدهيداتا المقابلة . ولما لم تكن هناك قواعد ثابتة لتسمية الإنزيمات فقد أصبح هناك أكثر من إسم للإنزيم الواحد بل أصبح الإسم الواحد يستخدم لإنزيمين مختلفين . أضف إلى ذلك أن بعض الإنزيمات قد تم تسميتها على غير أساس فمثلاً سُمى إنزيم الكاتاليز catalase (يحفز تحول H_2O_2 إلى ماء وأكسجين جزئى) بالإنزيم الأصفر القديم (old yellow enzyme) . ولمنع هذا التضارب فى تسمية الإنزيمات فقد وضع الإتحاد الدولى للكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئية International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUB MB) نظاماً لتقسيم وتسمية الإنزيمات يحول دون أى تداخل فى الأسماء ولا

سيما بعد إكتشاف العديد من الإنزيمات . وطبقاً لنظام الـ IUBMB فإنه يتم تقسيم وتسمية الإنزيمات بناء على طبيعة التفاعلات الكيماوية التي تحفزها . وتوجد ستة أقسام رئيسية للتفاعلات التي تحفزها الإنزيمات (جدول 1-11) .

جدول 1-11: تقسيم الإنزيمات تبعاً لنوع التفاعل .

نوع التفاعل الذي يتم تحفيزه	التفسير
تفاعلات الأكسدة والإختزال $AH_2 + B \rightleftharpoons A + BH_2$	1- الأكسدة والإختزال Oxidoreductase
نقل مجاميع وظيفية $A-G + B \rightleftharpoons A + B-G$	2- النقل Transferases
تفاعلات التحلل المائي $A-B+HOH \rightleftharpoons AH + BOH$	3- التحليل المائي Hydrolases
إزالة مجموعة لتكوين ربطة مزدوجة $\begin{array}{c} X \quad Y \\ \quad \\ -C-C- \end{array} \longrightarrow X-Y + \begin{array}{c} \quad \\ -C=C- \end{array}$	4- الفصل Lyases
تحول المشابهات $Cis \rightleftharpoons Trans \quad L \rightleftharpoons D$	5- المشابهات Isomerases
تكوين ربطة مصحوبة بتحلل مائي للـ ATP $A + B \rightleftharpoons AB$	6- التخليق Ligases

ويتم تقسيم كل قسم إلى تحت أقسام وإلى تحت - تحت أقسام . ويتم التعبير عن كل إنزيم بإسمين وأربعة أرقام ، وعادة يستخدم الإسم الشائع للإختصار ولكن الإسم العلمى يتطلب ذكر مادة (مواد) التفاعل متبوعة بكلمة تنتهى بالمقطع -ase وتدل على نوع التفاعل الذى يحفزه الإنزيم تبعاً لأقسام الـ IUBMB فعلى سبيل المثال إنزيم كربوكسى ببتيداز أ carboxypeptidase A يسمى على النحو التالى :

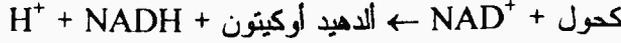
Peptidyl-L-amino acid hydrolase

أما رقم الإنزيم فهو EC 3.4.17.1 حيث ترمز "EC" إلى Enzyme commission ويشير الرقم الأول (3) إلى رقم القسم (إنزيمات التحلل المائي) أما الرقم الثانى (4) فهو رقم تحت القسم (يعمل على الروابط الببتيدية أى أنه ببتيداز peptidase) فى حين يشير الرقم الثالث (17) إلى رقم تحت تحت القسم (كربوكسى ببتيداز معدنى metalloproteinase) لأن إنزيم الكربوكسى ببتيداز أ يحتوى على أيون زنك

Zn^{2+} مرتبط والذى يعتبر ضروريا لنشاط الإنزيم) أما الرقم الرابع (1) فهو الرقم المسلسل للإنزيم فى تحت تحت القسم الخاص به ، وإذا ما أخذنا مثالا آخر هو إنزيم ديهيدروجينيز الكحول alcohol dehydrogenase نجد أن إسمه العلمى

Alcohol : NAD^+ oxidoreductase

أما رقم هذا الإنزيم فهو E.C.1.1.1.1 ، وهذا الإنزيم يحفز التفاعل التالى :



ولأنه من إنزيمات الأكسدة والإختزال فيرقم برقم القسم (1) ولأنه يعمل على $CH-OH$ كمجموعة معطية للألكترون من ثم فيرقم برقم تحت القسم الخاص بها (1) ولأن هذه المجموعة موجودة فى الكحول فيرقم برقم تحت القسم الخاص بها (1) أما الرقم الرابع (1) فهو رقم مسلسل للإنزيم فى تحت تحت القسم الخاص به .

5-11 الصفات الحركية للإنزيمات

Kinetic properties of enzymes

يقصد بالحركية دراسة المعدلات التى تحدث بها التفاعلات الكيماوية . والهدف الرئيسى من مثل هذه الدراسة هو تفهم ميكانيكية التفاعل أى وصف تفصيلى للخطوات المختلفة للتفاعل والتتابع الذى تحدث به . وكما نعلم فإن الديناميكا الحرارية thermodynamics تعطينا فكرة عن مدى إمكانية حدوث العملية تلقائياً لكنها لا تعطى فكرة واضحة عن طبيعة بل وحتى وجود خطوات تفاعل للمكون . وعلى النقيض من ذلك فإن معدل حدوث تفاعل ما وكيفية تغير هذا المعدل تبعاً للظروف المختلفة يكون مرتبطاً أساساً بالمسار الذى يسلكه التفاعل ومن ثم يكون مؤشراً لميكانيكية التفاعل . ويمكن القول أن لدراسة الصفات الحركية للإنزيمات أربعة أهداف من الوجهة العملية :

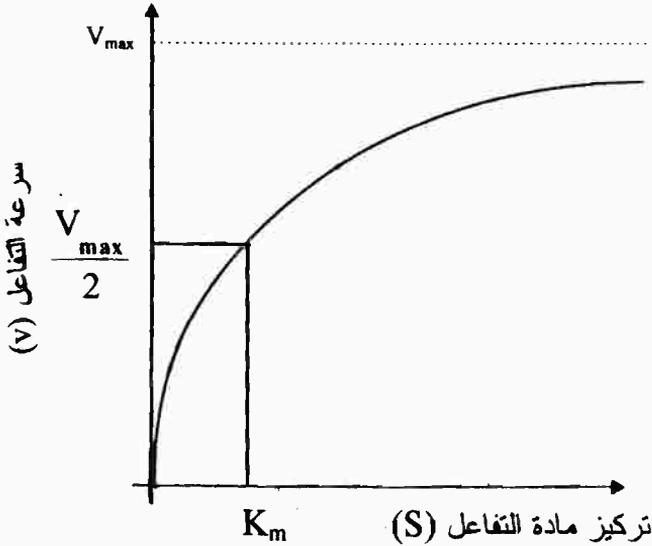
أ- إمكانية تحديد أفضلية الارتباط لكل من مادة التفاعل والمثبطات inhibitors بالإنزيم ومن ثم التعرف وتحديد الظروف المثلى للحصول على أقصى معدل تحفيزى للإنزيم .

ب- يمكن تفهم ميكانيكية التحفيز الإنزيمى عن طريق رصد تغير معدل التفاعل الإنزيمى تحت الظروف المختلفة وبمعلومية التركيب الكيماوى والبنائى للإنزيم .

ج- تعمل معظم الإنزيمات فى المسارات الحيوية للهدم والبناء (الأبيض) ، لذا فإن دراسة حركية التفاعل الإنزيمى ستمكننا من تفهم دور الإنزيم فى تلك العمليات الحيوية الهامة .

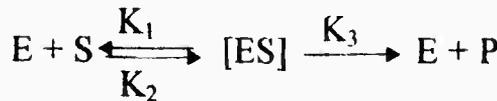
د- تحت الظروف المناسبة فإن معدل التفاعل المحفز إنزيميا يتناسب مع كمية الإنزيم ولذا فإن معظم طرق تحليل الإنزيمات (قياس كمية الإنزيم الموجودة) تبنى على الدراسات الحركية للإنزيم. ومن هنا يتبين أن قياس معدلات التفاعل المحفز إنزيميا تعد بمثابة إحدى الطرق الأكثر شيوعاً في التحليلات الكيموحيوية والطبية .

وقد إتضح أن معدل النشاط أو سرعته (v) لمعظم التفاعلات المحفزة إنزيميا يتوقف على تركيز مادة التفاعل (S) كما هو موضح بالشكل رقم 6-11 . وعند تركيز معين من الإنزيم فإن v تتناسب خطياً مع S عندما تكون قيمة S صغيرة ، أما عند قيمة S أعلى فإن قيمة v لاتعتمد تقريباً على تركيز S.



شكل 6-11 : العلاقة بين تركيز مادة التفاعل (S) وسرعته (v)

وقد تمكن العالمان ميكائيليس ومنتن Michaelis and Menten في عام 1913 من وضع نموذج يمكن عن طريقه حساب الصفات الحركية للإنزيمات ، وطبقاً لهذا النموذج فإن التفاعل الإنزيمي يحدث طبقاً للمعادلات التالية :



بمعنى أن الإنزيم E يرتبط مع مادة التفاعل S ليكون معقداً منهما [ES] بثابت تفاعل K_1 ، والمعقد المتكون إما أن ينحل إلى E ، S (التفاعل العكسي) بثابت تفاعل K_2 ، وإما أن يعطى ناتج التفاعل P بثابت تفاعل K_3 .

وقد فسر ميكائيليس ومنتن حركية التفاعل الإنزيمي بأربع عشرة معادلة رياضية (يمكن للقارئ الرجوع إليها تفصيلاً فى كتب الكيمياء الحيوية) أدت فى النهاية إلى اشتقاق المعادلة التالية :

$$v = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

حيث :

v = سرعة التفاعل الإنزيمى

V_{\max} = السرعة القصوى للتفاعل الإنزيمى .

$[S]$ = تركيز مادة التفاعل .

K_m = ثابت يسمى ثابت ميكائيليس ومنتن Michaelis-Menten constant

وهو عبارة عن تركيز مادة التفاعل عندما تكون سرعة التفاعل نصف سرعته القصوى (أنظر شكل رقم 6-11).

والمعادلة الأخيرة ما هى إلا تعبير كمي عن العلاقة التى تربط معدل التفاعل بتركيز مادة التفاعل والتى سبق توضيحها بالشكل رقم 6-11 . وعندما تكون قيمة $[S]$ أقل من قيمة K_m فإن :

$$v = [S]V_{\max} / K_m$$

بمعنى أن v تتناسب مباشرة مع تركيز مادة التفاعل أما إذا كانت قيم $[S]$ أكبر من

قيمة K_m فإن : $v = V_{\max}$

أى أن معدل التفاعل يصل أقصاه ولا يتأثر بتركيز مادة التفاعل .

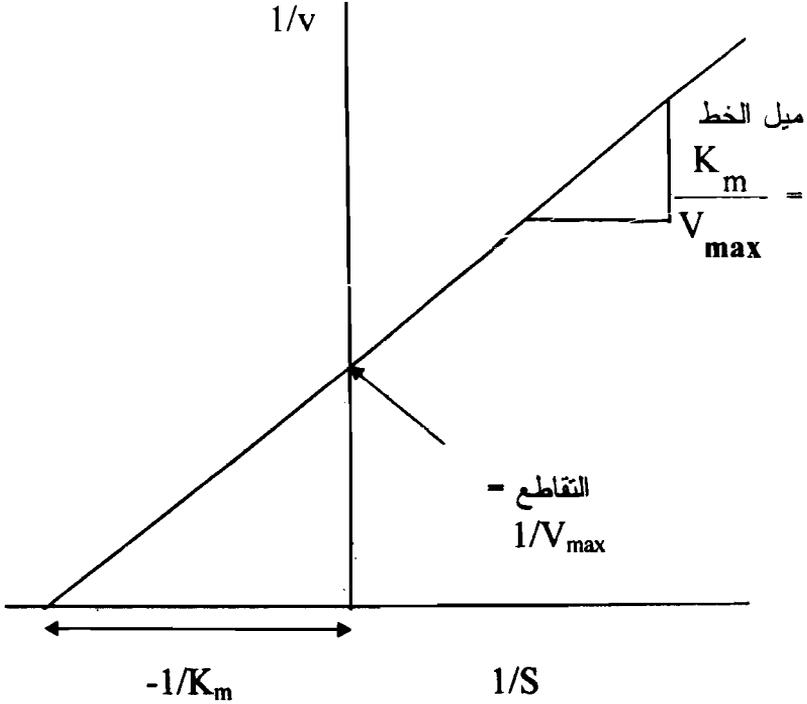
وعندما تكون قيمة $[S]$ مساوية لقيمة K_m فإن

$$v = V_{\max}/2$$

أى أن K_m عبارة عن تركيز مادة التفاعل الذى عنده يكون معدل (سرعة) التفاعل نصف قيمته القصوى .

ويمكن حساب قيمة K_m عن طريق رسم العلاقة بين مقلوب سرعة التفاعل

$\frac{1}{v}$ ومقلوب تركيز مادة التفاعل $\frac{1}{S}$ كما هو موضح بالشكل رقم 7-11 .



شكل 7-11 : طرق حساب ثابت ميكائيليس - منتن (K_m) .

ويمكن تقدير سرعة التفاعل الإنزيمي إما عن طريق قياس معدل إختفاء مادة التفاعل بالنسبة للزمن ($-dS/dt$) أو تكون ناتج التفاعل بالنسبة للزمن ($+dP/dt$) أما نشاط الإنزيم فيمكن قياسه عن طريق تقدير وحدة الإنزيم (U) enzyme unit والتي تعرف بأنها : كمية الإنزيم اللازمة لتحفيز تحول ميكروجزيئي واحد من مادة التفاعل (10^{-6} M) في الدقيقة الواحدة عند 25°M في حالة الإنزيمات التي تهاجم رابطة واحدة، أما إذا كان الإنزيم يهاجم أكثر من رابطة واحدة في جزيء مادة التفاعل فإن وحدة الإنزيم في هذه الحالة تكون عبارة عن (كمية الإنزيم اللازمة لتحفيز تحول ميكرومكافئ واحد من مادة التفاعل في الدقيقة الواحدة عند 25°M) .

وتقاس وحدة الإنزيم تحت الظروف المثلى للتفاعل الإنزيمي من حيث درجة الحرارة ، pH ، وغيرها من العوامل المرتبطة . أما نقاوة المستحضر الإنزيمي فيعبر

عنها بالنشاط النوعي *specific activity* ويعرف بأنه (عدد وحدات الإنزيم لكل 1 ملليجرام بروتين) .

كذلك فإنه يمكن التعبير عن النشاط الإنزيمي بما يعرف باسم رقم التحول *turnover number* وهو عدد المكافئات من مادة التفاعل التي تتحول إلى ناتج تفاعل (أو عدد المكافئات التي تتكون من ناتج التفاعل) لكل واحد مكافئ من الإنزيم.

ونوه إلى أن لكل إنزيم درجة حرارة مثلى ، pH أمثل يكون عندهما النشاط التحفيزي للإنزيم في أقصاه في حين يقل هذا النشاط جوهرياً كلما بعدنا عن القيمة المثلى لدرجة الحرارة أو الـ pH نقصاً أو زيادة .

6-11 استخدامات الإنزيمات في التصنيع الغذائي

Utilization of enzymes in food industry

للإنزيمات استخدامات متعددة - وأخرى ممكنة - في مجال تصنيع الأغذية وسنحاول هنا إيجاز أهم تطبيقات الإنزيمات ثم سنتناول بالشرح أهم التطبيقات الواحدة لها.

1-6-11 إنزيمات الأميليز Amylases

لأنزيمات الأميليز أهمية كبيرة في صناعة المخبوزات إذ أنها تحفز تحليل كمية من نشا الدقيق إلى سكريات مما يزيد من نشاط الخميرة ومن ثم زيادة كفاءة عملية التخمر ، كما أن تحويل جزء من النشا إلى دكستريانات وسكر يزيد من قدرة الدقيق على إمتصاص الماء . أما في عصائر الفاكهة فإن لإزالة النشا (تحلله) بواسطة إنزيمات الأميليز مردوداً إيجابياً على صفات شفافية العصير . وتستخدم إنزيمات الأميليز في صناعة البكتين من نفل التفاح *apple pomace* حيث أن التخلص من النشا يزيد من كفاءة عملية إستخلاص البكتين .

ويمكن إستخدام إنزيمات الأميليز لتطرية *tenderization* بعض الخضروات مثل الفاصوليا . وفي طرق التخمر التقليدية والتي يتم فيها إجراء تحليل مائي للنشا الموجود بالشعير قبيل التخمر ، فإنه يسمح بحدوث إنبات لحبوب الشعير إلى درجة تضمن إنتاج إنزيمي الألفا والبيتا أميليز بحيث لا تكون خطوات التحلل المائي عاملاً محدداً . وتجدر الإشارة إلى أن إضافة الإنزيمات المحللة قبيل التخمر ليست بالإتجاه السائد علمياً ، غير أن التدعيم بالإنزيمات *enzyme supplementation* يستخدم على نطاق واسع في إنتاج المشروبات الروحية عند إستخدام الذرة الرفيعة ، البطاطس، القمح ، الرأى كمصادر للنشا . وأكثر مصادر إنزيمات الأميليز الميكروبية على النطاق التجاري هي:

Bacillus subtilis

Aspergillus oryzae

Aspergillus niger

وإنزيم الألفا أميليز المستخلص من *B. subtilis* يعتبر ذا ثبات حرارى أعلى؛ وهو يستخدم عندما تتطلب ظروف التصنيع إجراء (إسالة) لحبوب معينة؛ غير أن هذا المستخلص يفتقر إلى وجود نشاط ألفا 1 ، 6 جلوكوسيديز α -1-6-glucosidase وم ثم فإنه يكسر النشا (الأميلوبكتين) إلى سكريات محدودة التسكر . أما الإنزيمات المستخلصة من *A. niger* ، *A. oryzae* فيمكنها تكسير الرابطة الجليكوسيدية 1-6 ولذا فإنها تحلل النشا تماماً إلى سكريات قابلة للتخمر . وعند استخدام هذه الإنزيمات فى عملية إنتاج البيرة brewing فإنها تؤدي إلى إنتاج بيرة منخفضة السعرات حيث أن كمية السكريات محدودة التسكر المتبقية تكون ضئيلة للغاية.

11-6-2 السيلوليز Cellulase

من التطبيقات الهامة لإنزيم السيلوليز تحليل الكربوهيدرات المعقدة بالجدر الخلوية خلال نقع واستخلاص الأغذية النباتية كالحبوب والبنور ، وكذا تحليل السليلوز خلال تجفيف حبوب البن . ويمكن استخدام إنزيم السيلوليز فى التخلص من التحبب graininess بثمار الكثرى كما يمكن استخدامه فى عملية تقشير ثمار كالبرقوق والطماطم .

11-6-3 الجلوكوز أيسومريز Glucose isomerase

من أكثر تطبيقات استخدام إنزيم الجلوكوز أيسومريز شيوعاً استخدامه فى تحويل الجلوكوز إلى فركتوز فى صناعة شراب الذرة عالى الفركتوز high fructose corn syrup (HFCS) .

وستحدث فيما بعد عن هذه الصناعة بأسهاب باعتبارها بمثابة أنجح التقنيات الإنزيمية المستخدمة فى مجال التصنيع الغذائى .

11-6-4 إنزيمات الليبيز Lipases

على الرغم من أن إنزيمات الليبيز تأثيرات سلبية غير مرغوبة فى الأغذية عن طريق تحفيزها لعملية التزنخ التحللى hydrolytic rancidity إلا أنه أمكن تطويع هذه الإنزيمات لكى يكون لها مردودات إيجابية على جودة الأغذية، ومن أمثلة ذلك التغيرات المرغوبة فى صفات نكهة بعض أنواع الجبن من خلال عمليتى التعتيق والإنضاج وكذا عملية إنتاج الجلسرول - الأحماض الدهنية من الزيوت وإنتاج لبن ذى

نكهة تعتيق cured flavor خفيفة واستخدامه فى إنتاج الشيكولاته باللبن . ومن التطبيقات الواعده لإنزيمات الليباز استخدامها فى عملية الأسترة التبادلية interesterification للزيوت والدهون ومخاليطها؛ وذلك بغية التحكم فى الصفات الفيزيائية والريولوجية والتغذوية للمخاليط الناتجة ، وسنتحدث تفصيلاً عن هذه العملية ومردوداتها المختلفة فيما بعد . وقد أمكن استخدام إنزيمات الليباز لزيادة كفاءة التنظيف للمنظفات الصناعية detergents .

11-6-5 الإنفرتيز Invertase

يستخدم إنزيم الإنفرتيز فى صناعة عسل النحل الصناعى حيث يحفز الإنزيم عملية التحويل inversion والتي يتحول خلالها السكروز إلى السكر المحول (خليط من الجلوكوز والفركتوز بنسبة 1:1) ، كذلك فإن إنتاج الكريمة الطرية soft cream وهى من منتجات القند (الحلوى) تعد من الإستخدامات الهامة لإنزيم الإنفرتيز ؛ وغنى عن القول فإن إجراء عملية التحويل (وهى عملية تحليل مائى من المنظور الكيماوى) بفعل تحفيز إنزيم الإنفرتيز تفضل عن نظيرتها التى تتم بتحفيز الأحماض المعدنية وذلك لما للإنزيمات من تخصصية أعلى فى تحفيز التفاعلات ، أضف إلى ذلك أن الإنزيمات أكثر أمناً من ناحية سلامة الغذاء إذ قلما تخلو الأحماض المعدنية المستخدمة فى التصنيع من المعادن الثقيلة وبتراكيزات مرتفعة .

11-6-6 اللاكتيز Lactase

من الإستخدامات الهامة لإنزيم اللاكتيز إستخدامه فى صناعة الآيس كريم للحيلولة دون تبلور سكر اللاكتوز ومن ثم منع تكون القوام الرملى والتحبب . كذلك فإنه يمكن إستخدام اللاكتيز فى الصناعات اللبنية لتثبيت بروتينات اللبن المجمد . ومن التطبيقات الهامة لإنزيم اللاكتيز إنتاج لبن خال من اللاكتوز وهو مفيد للأشخاص الذين لا يستطيعون تناول اللبن الطبيعى لإصابتهم بقصور وراثى يمنع تخليق اللاكتيز فى أجسامهم ومن ثم يصابون بأعراض حساسية شديدة إذا ما تناولوا اللبن المحتوى على اللاكتوز .

11-6-7 الرنين Renin

نظراً لسترايد الطلب على الجبن فى الوقت الذى تقل فيه كمية الكيموسين cyhmosin (الرنين) المتحصل عليه من المعدة الرابعة للعجول (المنفحة) فلقد أصبح لزاماً البحث عن مصادر أخرى بديلة للكيموسين والذى يسبب تخثر clotting اللبن . وتشتمل هذه العملية على تكسير رابطة ببتيدية فردية فى الكازين (casein K) ويصبح ملح الكالسيوم للنواتج غير ذائب . ويجب أن يكون للإنزيم البديل المستخدم فى صناعة

الجبن القدرة على تحفيز تحليل مائي محدود حيث أن التحليل المائي الزائد يؤثر سلباً على نكهة الجبن . وقد تبين إمكانية الحصول على إنزيمات بروتينيز proteinases يمكنها الإحلال محل الكيموسين وذلك من كل من :

Mucor pusillus

Mucor michei

Edothia parasitica

وقد تمكن الباحث عمرو البنا (El-Banna, 1976) من إستخلاص إنزيم الرنين من الفطريات التالية :

Alternaria sp.

Aspergillus niger

Rhodotorula rubra

كذلك فقد تمكنت الباحثة ملاك الصحن (El-Sahn, 1987) من الحصول على إنزيم الرنين من الخمائر التالية :

Candida parapsilosis

Endothia parasitica

وتجدر الإشارة إلى أن ما لا يقل عن 60% من الكيموسين المستخدم في عملية التجبن في صناعة الجبن بالولايات المتحدة الأمريكية يتم تحضيره من ميكروبات محورة وراثياً .
genetically modified microorganisms (GMM)

11-6-8 إنزيمات البروتينيز Proteases

من التطبيقات المفيدة لإنزيمات البروتينيز إستخدامها في تطرية العجائن واختصار وقت الخلط mixing time وزيادة مطاطية extensibility العجائن مما يحسن من قوام وحجم الرغيف الناتج ، كذلك فإن إنزيمات البروتينيز تساعد على تحرر إنزيم البيتا أميليز . أما في الصناعات التي تعتمد على التخمر فإن لهذه الإنزيمات دوراً مهماً في تحسين القوام والنكهة والقيمة التغذوية . ويؤدي استخدام إنزيمات البروتينيز إلى سهولة عمليات الترشيح والترويق التي تتطلبها بعض الصناعات الغذائية. أما في الحبوب فإنه يمكن إستخدام إنزيمات البروتينيز لزيادة معدل تجفيف الحبوب وتحسين صفات تداولها . وتساعد إنزيمات البروتينيز على تجميع الكازين وإضفاء النكهة المرغوبة خلال تعتيق الجبن كما أن إستخدام هذه الإنزيمات يحسن من صفات بذور الكاكاو أثناء عملية التخمر ويحسن من صفات التجفيف للبيض ومنتجاته . ومن التطبيقات الهامة لإنزيمات البروتينيز واستخدامها في عملية تطرية tenderization

القطيعات منخفضة الجودة من اللحوم واستعادة البروتين من العظام . ويعتبر إنتاج لبن الصويا soybean milk ونواتج تحلل البروتين protein hydrolysates (لإنتاج المشهيات condiments مثل صوص الصويا soy sauce والشوربات المجففة) أمثلة جيدة لتطبيقات إنزيمات البروتيز في مجال التصنيع الغذائي .

بيد أنه يجب أن ننوه إلى أنه بالرغم من كل التطبيقات المفيدة لإنزيمات البروتيز فإن لها بعض التأثيرات السلبية على جودة بعض الأغذية إذ أنها تؤثر سلباً على فترة حفظ shelf life البيض سواء كان طازجاً أو مجففاً كما أن وجود هذه الإنزيمات في الأسماك القشرية يؤدي إلى حدوث طراوة زائدة over tenderization غير مرغوبة للحوم ومن ثم فإنه يجب إجراء تثبيط سريع لهذه الإنزيمات بعد الصيد. كذلك فإن النشاط المرتفع لإنزيمات البروتيز بالدقيق يؤدي إلى تأثيرات سلبية على حجم وقوام الرغيف الناتج .

11-6-9 الإنزيمات البكتينية Pectic enzymes

من التطبيقات الهامة والمفيدة للإنزيمات البكتينية استخدامها خلال عملية تخمر بذور الكاكاو وكذا في تحفيز عملية التحلل المائي للغطاء خلال تخمر حبوب البن . أما بالنسبة للفواكه فإن للإنزيمات البكتينية تأثيراً جيداً للتطرية وكذا تحسين العائد من عصائر الفاكهة ومنع تكون العكارة وزيادة كفاءة عملية التركيز . ويؤدي وجود الإنزيمات البكتينية إلى زيادة كفاءة استخلاص زيت الزيتون . من ناحية أخرى فإن للإنزيمات البكتينية إذا ما تواجدت بتركيزات مرتفعة تأثيرات سلبية على ثمار الفواكه إذ تؤدي إلى التطرية الزائدة . وقد تمكنت الباحثة نجوى محسب (Mohasseb 1992) من تحديد الظروف المثلى لإنتاج بعض الإنزيمات البكتينية بواسطة الفطر *Volvariella volvacea* والذي تم تمييزه على قشور الموالح . وقد استخدمت الباحثة كلا من إنزيمي البكتين ميثايل أستيريز (PME) pectin methyl esterase والبولى جلاكتو يورينيز polygalactouronase بعد إجراء تنقية جزئية لهما - فى ترويق عصير البرتقال . وتبين أن استخدام إنزيم PME قد أدى إلى ارتفاع عائد العصير المتحصل عليه إلى نحو 32.6% من حجم العصير الابتدائي بينما إنخفضت اللزوجة النسبية بمقدار 54.6% . أما عند استخدام إنزيم البولى جلاكتو يورينيز فى عملية الترويق فقد وصلت نسبة عائد العصير إلى 53.8% وانخفضت اللزوجة النسبية بنحو 60% مما يوضح أن استخدام إنزيم البولى جلاكتو يورينيز فى عملية ترويق عصير البرتقال يعد أفضل من استخدام إنزيم الـ PME فى هذا الغرض .

10-6-11 الكاتاليز والبيروكسيداز Catalase and peroxidase

من التطبيقات الهامة لإزيم الكاتاليز استخدامه فى تحطيم فوق أكسيد الهيدروجين H_2O_2 والذي يستخدم فى البسترة الباردة cold pasteurization للبين ، كذلك فإن الكشف عن إنزيم الكاتاليز يعتبر مقياساً لكفاءة عملية سلق الخضروات المزمع حفظها . ويتم استخدام إنزيم الكاتاليز فى منتجات غذائية متنوعة بغية إزالة الجلوكوز و/أو الأوكسجين لمنع الإغمقاق و/أو الأوكسدة وذلك فى وجود إنزيم الجلوكوز أوكسيداز glucose oxidase . أما إنزيم البيروكسيداز فيمكن استخدامه فى وجود إنزيم الجلوكوز أوكسيداز glucose oxidase لتقدير الجلوكوز كما أنه يستخدم - كما هو الحال بالنسبة لإنزيم الكاتاليز - كمؤشر لقياس كفاءة عملية سلق الخضروات توطئة لحفظها بطرق الحفظ المختلفة .

11-6-11 إنزيمات الفوسفاتيز Phosphatase

تستخدم إنزيمات الفوسفاتيز فى أغذية الأطفال baby foods وذلك لزيادة الفوسفات المتاح ، ومن التطبيقات المفيدة لإنزيمات الفوسفاتيز تحفيز عملية التحليل المائى لمركبات الفوسفات فى الأغذية المتخمرة . أما فى صناعة الألبان فإن الكشف عن إنزيمات الفوسفاتيز يعد بمثابة مؤشر جيد لقياس عملية البسترة .

12-6-11 الجلوكوز أوكسيداز Glucose oxidase

يمكن استخدام إنزيم الجلوكوز أوكسيداز فى منتجات غذائية متنوعة وذلك لإزالة الأوكسجين و/أو الجلوكوز من منتجات مثل البيرة ، الجبن ، المشروبات الغازية ، البيض المجفف ، عصائر الفاكهة ، اللحوم ، الأسماك ، اللبن المجفف . وقد يستخدم إنزيم الجلوكوز أوكسيداز مع إنزيم الكاتاليز . من ناحية أخرى فإن إنزيم الجلوكوز أوكسيداز يستخدم مع إنزيم البيروكسيداز فى عملية التقدير الكمى للجلوكوز .

13-6-11 التانيز والبولى فينول أوكسيداز

Tannase and polyphenoloxidase

يستخدم إنزيم التانيز فى إزالة المركبات عديدة الفينول polyphenolic compounds فى الأغذية المتخمرة . أما إنزيم البولى فينول أوكسيداز فله تأثيرات مفيدة حيث يحسن من عملية الإغمقاق خلال عمليات الإنضاج ، التخمر للشاي وحبوب البن . بيد أن لإنزيم البولى فينول أوكسيداز تأثيرات سلبية على الفواكه والخضروات إذ يؤدى وجود هذا الإنزيم إلى الإغمقاق وتكون النكهات غير المرغوبة وفقد الفيتامينات .

ويخصص الجدول 2-11 استخدامات الإنزيمات المختلفة فى مجال التصنيع

الغذائى .

جدول 11-2 : الإستخدامات الفطرية والمقترحة للإيزيمات في التصنيع الغذائي .

الهدف من الإستخدام أو فصل الإيزيم	نوع الفعالة	نوع الإيزيم
زيادة محتوى السكر أثناء عملية التخمير بالخضيرة تحويل النشا إلى مالتوز يمكن تخميره ، وإزالة عكارة النشا تحويل النشا إلى دكستريكات وسكر ، وزيادة إمتصاص الماء تسهيل النشا مما يجعله ينسب بحرية كاملة إسترجاع السكر من بقايا الحلوى candy scraps المتخلفة عن التصنيع إزالة النشا لزيادة خواص اللعنان sparkling properties إزالة النشا لزيادة خواص اللعنان apple pomace كوسيلة للمساعدة في تحضير البكتين من ناتج عصر التفاح Com تحويل نشا إلى دكستريكات منخفضة الوزن الجزيئى مثل شراب لوزة syrup تحلل النشا كما هو الحال عند تطرية حبوب البسلة الخضراء تحلل معقد للكريوبيرت بالجدر الخلوية تحلل السلولوز أثناء تجفيف حبوب البن التخلص من خاصية التحبب graininess فى الكمشى ، أيضا فى عمليات تقشير ثمار المشمش والطماطم . زيادة لزوجة أو ثخانة thickening الشراب الناتج . إضافة الدكستران كعامل منظم اللقوام لإحساب الناتج اللقوام المناسب .	المخبرزات صنع البيرة الحبوب التشيكولاتة والكاكاو صنع الحلوى عصائر الفاكهة صنع الجيلي صنع البكتين صنع المحاليل السكرية المركزة الخضروات صنع البيرة البن الفواكه صنع المحاليل السكرية المركزة صنع الأيس كريم	Amylases Cellulase Dextane-sucrase

تابع جدول 11-2 : الإستخدامات المقترحة للإنزيمات فى التصنيع الغذائى .

الهدف من الإستخدام أو فصل الإنزيم	نوع الفعالة	نوع الإنزيم
تحويل السكروز إلى جلوكوز وفركتوز . صنع الحلوى الطرية المغلفة بالشيكولاتة والكرمية . منع تبلور اللاكتوز ، الذى ينتج عنه القوام المحبب والرملى . تحويل اللاكتوز إلى جالكتوز وجلوكوز . ثبات بروتينات اللبن فى اللبن المعمد عن طريق التخلص من اللاكتوز . التخلص من المركبات البولى فينولية . الحصول على النشا من تقوى القمح إزالة المرارة من بكتين الموالح وعصير الموالح عن طريق تحلل الجلوكوسيد glucoside والنارينجين naringin . نشاط تحللى أثناء تخمير الكاكو .	عسل النحل الصناعى الحلوى الأيس كريم العلائق الحيوانية اللبن صنع البيرة عملية الطحن الموالح الشيكولاتة و الكاكو	Invertase Lactase Tannase Pentosanase Naringinase الإنزيمات البكتينية (المفيدة) Pectic enzymes (useful)
تحلل الغلاف الخارجى أثناء تخمر حبوب البن . عملية التطرية أثناء التسخين . زيادة ناتج العصير المتحصل عليه من ضغط ثمار الفاكهة ، كما يمنع ظهور المظهر غير اللائق ويحسن من عمليات تركيز العصائر . يسهل من إستخلاص الزيت . الحصول على نبيذ رائق . تهتم وفصل المواد البكتينية بالمصير .	البن الفواكه عصائر الفواكه الزيتون النبيذ عصير الموالح	Deteriorative (الضارة)

تابع جدول 11-2 : الإستخدامات الفعلية والمقترحة للإنزيمات فى التصنيع الغذائى .

الهدف من الإستخدام أو فعمل الإنزيم	نوع الفئذ	نوع الإنزيم
<p>الطرواة الزائدة لثمار الفواكه . تطويرة العجائن ، تقليل مدة الخلط ، يزيد من إمكانية مطاطية أو فرد العجائن ، يحسن من القوام ويزيد من حجم الرغيف ويسهل أفراد إنزيم البيتا-أميلاز β-amylase . تحسن من القوام والنكهة مع إتاحة العناصر الغذائية أثناء التخمر ، كما يساعد فى الإسراع من عملية الترشيح والترويق أثناء التبريد . يقوم بتحويل البروتينات لزيادة معدل التجفيف مما يحسن من خواص لتداول المنتج. يعمل على تجمع أو تخرثر بروتين الكازين ، ويحسن من خواص النكهة أثناء التعتيق ageing . يعمل على حيوب الكاكاو أثناء التخمر . يحسن من خواص التجفيف . يستخدم فى معالجة مخلفات التصنيع الغذائى لتحويلها إلى علائق . يستخدم فى عمليات للتطرية - وفى الحصول على البروتينات من العظام وبقايا لحوم الأسماك الناتجة من عملية التشذيب trash fish ، ويسهل من عملية إستخلاص الزيوت . فى تجهيز لبن فول الصويا Soybean milk . الإستخدام فى ليهارات condiments مثل صوص فول لصويا soy sauce وصوص لتمر هدى tamar sauce ، ولإضا فى تصنيع وجبت معينة وفى لمرق bouillon ولشوربكت لمجفة ومسحوق ليهيريز gravy powders وللحوم لمصنفة .</p>	<p>الفواكه المخبوزات صنع البيرة الحبوب الجبن الشيكولاة والكاكاو البيض ومنتجاته العلائق الحيوانية اللحوم والأسماك اللبن نواتج تحلل البروتينات</p>	<p>البروتينيز (المفيدة) Proteases (useful)</p>

تابع جدول 11-2 : الإستخدامات الفعلية والمقترحة للإنزيمات فى التصنيع الغذائى .

نوع الإنزيم	نوع الغذاء	الهدف من الإستخدام أو فعمل الإنزيم
Deteriorative (الضارة)	الخبز الكابوريا و Crab والإستاكوزا Lobster	الترويق تسبب تطرية لحوم الكابوريا والإستاكوزا إذا لم تسرع بتثبيتها . تقلل من حجم الرغيف الناتج مع تدهور القوام إذا ما كان النشاط كبيرا . التتميق والإضجاج لإكساب الجبن النكهة المميزة . تحويل اللبيدات إلى جليسرول وأحماض دهنية . إنتاج لبن ذى نكهة مميزة لإستخدامه فى صنع شيكولاتة باللبن . الإعقاق وتكون اللون اللبنى الزائد عند تصنيع كيك الشعير (الشوفان) Oat cakes مع تكون اللون اللبنى غير المرغوب لخلالة القمح Wheat bran .
Lipase (useful) (الليبيز المفيد)	الزيت اللبن الحبوب	التزنج التحلىي . التزنج التحلىي تعمل على زيادة ناتج الفوسفات المتاحة . تحلل مركبات الفوسفات . إختبار مدى كفاءة عملية البسترة .
Deteriorative (الضار)	اللبن ومنتجاته الزيت أغذية الأطفال صنع البيرة	إنتاج النيوكليوتيدات nucleotides والنيوكليوسيدات nucleosides . إختبار مدى كفاءة عملية السلق blanching .
Phosphatases (الفوسفاتيز)	اللبن محتسبات النكهة الخضروات	إختبار مدى كفاءة عملية البسترة .
Nucleases (النيوكلييز)	تستخدم فى تقديرات الجلوكوز	glucose oxidase أو كسيديز الجلوكوز .
Peroxidases (useful) (البيروكسيديز المفيد)		

تابع جدول 11-2 : الإستخدامات المقترحة للإنزيمات فى التصنيع الغذائى .

الهدف من الإستخدام أو فعلى الإنزيم	نوع الغذاء	نوع الإنزيم (الضارة)
تكون نكهات غير مرغوبة . تشارك فى تفاعلات التلون البنى . تتم فوق أكسيد الهيدروجين (H_2O_2) فى البسترة على البارد . التخلص من الجلوكوز / أو الأوكسجين لمنع التلون البنى / أو الأوكسدة ، حيث يستخدم مع إنزيم جلوكوز أوكسيديز . التخلص من الأوكسجين / أو الجلوكوز من منتجات مثل لبيرة ، ولجين ، ومشروبات غازية ، ولييض لمجفف ، وعصقر لوقاه ، وللحوم والأسماك ، واللبن لمجبن ، وللبند لمنع الأوكسدة / أو لتلون لبني ، حيث يستخدم مع إنزيم كاتلايز . طريقة خاصة لتقدير الجلوكوز . تكون اللون البنى أثناء الإنضاج والتخمير / أو عملية التعتيق .	الخضروات الفواكه اللبن عدد من المنتجات عدد من المنتجات	Deteriorative Catalase Glucose oxidase
تلون لبني غير مرغوب ، وتكون نكهات غير مرغوبة ، وقد لغيتامينات . تتم الأحمض الدهنية لضرورية وقيمتين 10^4 مع تكون نكهات غير مرغوبة . تتم فيتامين C (حامض أسكوربيك أسيد) .	يستخدم فى تقدير الجلوكوز الشاي ، واللبن ، والدخان الفواكه ، والخضروات الخضروات الخضروات ، والفواكه اللحوم ، والأسماك	بولى فينول أوكسيديز (المفيد) Polyphenol oxidase (useful) Deteriorative Lipoxygenase أسكوربيك أسيد أوكسيديز Ascorbic acid oxidase Thiaminase
تتم التيامين .		Thiaminase

المصدر : Whitaker (1972) .

7-11 الإنزيمات المثبتة Immobilized enzymes

يعتبر تثبيت الإنزيمات من أهم التطورات الحديثة في تكنولوجيا الإنزيمات، وعلى الرغم من أن هذه العملية قد عرفت منذ زهاء السبعين سنة إلا أن استخدامها على نطاق صناعي لم ير النور إلا عام 1969 . وتتم عملية تثبيت الإنزيم على دعامة خاملة لمادة غير ذائبة في الماء . وتستخدم أعمدة تملأ بالمادة الخاملة بحيث يمكن إستخدام الإنزيم بطريقة مستمرة ولعدة مرات مما يقلل من تكلفة إستخدام الإنزيمات على النطاق الصناعي . ولقد تبين أن الإنزيمات المثبتة تسلك مسلكاً حركياً مغايراً لنظيراتها غير المثبتة ، ومن ثم فإن قيمة ثابت ميكائيلس K_m ، درجة الحرارة المثلى، الـ pH الأمثل للإنزيم تتغير إذا ما تم تثبيت هذا الإنزيم . وتفسير تباين المسلك الحركي للإنزيم المثبت يعتبر من الأمور المعقدة لأنه يرتبط بتأثيرات عملية التثبيت على البناء ثلاثي الأبعاد three dimensional structure للإنزيم وكذا على المراكز الفعالة للإنزيم المثبت . لذا فإن دراسة حركية الإنزيمات المثبتة يعتبر من الأمور الهامة لتفهم دور هذه الإنزيمات وفعلها داخل الخلية *in vivo* وكذا طرق التحكم فيها ولا سيما إذا ما تم تثبيت خلايا ميكروبية تنتج الإنزيم عوضاً عن إستخلاص وتنقية الإنزيم ثم تثبيته (وهي التقنيات المستخدمة في بعض تقنيات التكنولوجيا الحيوية biotechnology لخفض تكلفة إستخدام الإنزيمات على النطاق الصناعي) . وللإنزيمات المثبتة تطبيقات هامة في النواحي التحليلية والتصنيعية بل وتعد الآن أفضل من التقنيات الشائع إستخدامها في مجال الكيمياء العضوية .

1-7-11 طرق تثبيت الإنزيمات

Methods of enzymes immobilization

يمكن تثبيت الإنزيمات بعدة طرق لكنها تندرج تحت قسمين أساسيين هما التثبيت الفيزيقي والتثبيت الكيماوي :

أ- التثبيت الفيزيقي Physical immobilization

في هذه الطرق لا تتكون روابط تعاونية بين الإنزيم والدعامة supporting matrix حيث يعتمد التثبيت على الإدمصاص adsorption على فحم حيواني أو ألومينا ، وقد تم حديثاً تثبيت الإنزيمات باستخدام مبادلات أيونية أي أن التثبيت يتم عن طريق ما يعرف بالإدمصاص الأيوني ionic adsorption ومن أمثلة المبادلات المستخدمة في هذا الغرض السفادكس sephadex . ولتثبيت الإنزيمات عن طريق الإدمصاص عدة مزايا أهمها السهولة ، إمكانية التطبيق على نطاق واسع ، العائد

العالي ، القدرة على إعادة الشحن recharge بالإنزيم عندما ينخفض نشاطه التحفيزي تحت المستوى المقبول ، بيد أن لتثبيت الإنزيمات بواسطة الإدمصاص عدة مثالب أهمها ضرورة التحكم فى الظروف التى تعيق الإدمصاص . ويمكن مسك entraping للإنزيمات على كرات مركزة مشيدة من طبقتين bilayers للفسفوليبيدات (تسمى الليوسومات liposomes) وكذا تمسك الإنزيمات على بوليمرات غير ذائبة فى الماء مثل البولى أكريل أميد polyacrylamide والآجاروز agarose ، وعلى الرغم من أن هذه التقنيات تتميز بسهولة تطبيقها إلا أنها تفتر إلى صفات الإنسياب كما أن كفاءة تثبيت الإنزيم تكون منخفضة حيث يحدث إرتشاح leaching مستمر للإنزيم .

ب- التثبيت الكيماوى Chemical immobilization

ينتج عن تثبيت الإنزيمات بالطرق الكيماوية تكون رابطة تعاونية covalent bond واحدة على الأقل تتكون بين الإنزيم والدعامة أى المادة الحاملة . وتجدر الإشارة إلى أن الطرق الكيماوية المستخدمة فى تثبيت الإنزيمات تماثل تلك المستخدمة فى تقنية كروماتوجرافيا ميل الارتباط affinity chromatography . ويجب عند إجراء التثبيت الكيماوى للإنزيم مراعاة أن عملية ربط الإنزيم بالدعامة تكون بمنأى عن متبقيات الأحماض الأمينية للمركز الفعال للإنزيم . ويمكن أن تكون الدعامة المستخدمة للتثبيت سكرًا عديدًا أو بوليمر مثل النايلون أو حوامل غير عضوية مثل الزجاج وثانى أكسيد التيتانيوم titanium dioxide .

11-7-2 التقنيات المستخدمة فى التثبيت

Techniques of immobilization

توجد ثمانى تقنيات رئيسية لتثبيت الإنزيمات (شكل 11-8) وهى على النحو التالى:

أ- الإدمصاص Adsorption

يتم تثبيت الإنزيم على بوليمر عضوى أو على الزجاج (كرات الزجاج glass balls) أو الأكاسيد المعدنية أو السيليكا أو مركباتها مثل البنتونيت bentonite.

ب- المسك Entrapment

يتم تثبيت الإنزيم عن طريق مسكه داخل بوليمرات طبيعية أو مشيدة (عادة البولى أكريل أميد) .

ج- الكبسلة الدقيقة Microencapsulation

يثبت الإنزيم فى هذه الطريقة عن طريق تكوين أغشية من بوليمر منخفض القابلية للذوبان ، ويتكون البوليمر من وجهين أحدهما عضوى والآخر مائى ، وتستخدم

مادة تذوب في الوجهين ومادة أخرى تذوب في الوجه العضوى فقط . ويكون الإنزيم موجوداً في الوجه المائى ، أما المكون الآخر للبوليمر فإنه يضاف إلى المذيب العضوى مما يؤدي إلى تكوين غشاء membrane حول القطرات المائية aqueous droplets المحتوية على الإنزيم . ويعتمد مقياس المسام pore size للغشاء المتكون على ظروف التفاعل .

د- التبادل الأيونى Ion exchange

يعتمد تثبيت الإنزيم بهذه الطريقة على تبادل الشحنات الكهربائية (سواء كانت مبادلات كاتيونية cation exchangers أو مبادلات أنيونية anion exchangers).

هـ- الربط العرضى Cross linking

يثبت الإنزيم في هذه الطريقة عن طريق عمل روابط عرضية بين الإنزيم والمادة الحاملة التى يثبت عليها الإنزيم .

و- الإدمصاص والربط العرضى Adsorption and cross linking

في هذه الطريقة يتم تثبيت الإنزيم عن طريق الإدمصاص على المادة الخاملة مع تكوين روابط عرضية بين الإنزيم وهذه المادة فى ذات الوقت .

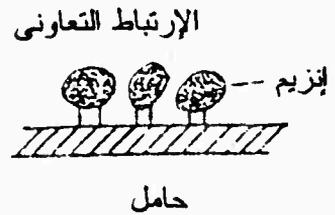
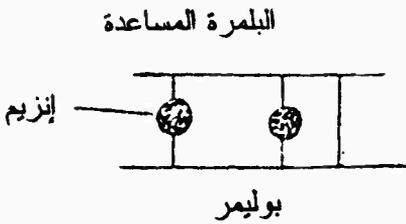
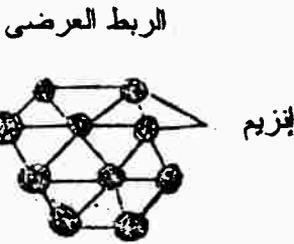
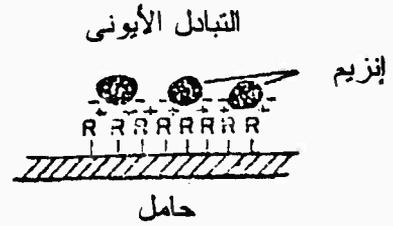
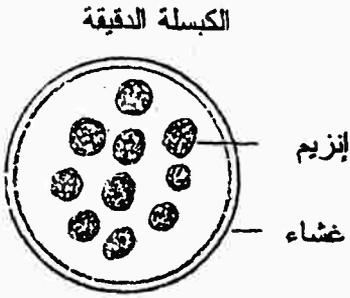
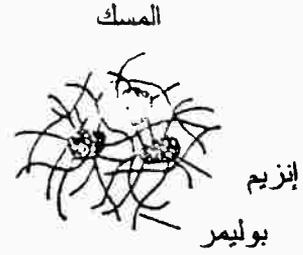
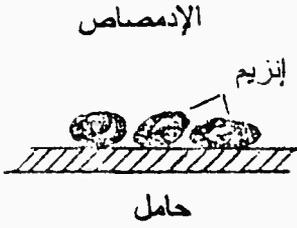
ز- البلمرة المساعدة Copolymerization

يتم تثبيت الإنزيم فى هذه الطريقة عن طريق ربط الإنزيم ببوليمر غير عضوى.

ح- الإرتباط التعاونى Covalent attachment

يثبت الإنزيم فى هذه الطريقة عن طريق ربطه تعاونياً ببوليمر عضوى أثناء تكوينه حيث يرتبط الإنزيم بالبوليمر ويصبح جزءاً من تكوينه . وفى هذه الطريقة يتم استخدام مادة ثنائية الوظيفة bifunctional agent ترتبط بإحدى مجموعتيها مع الإنزيم بينما ترتبط بالمادة الحاملة عن طريق مجموعتها الثانية .

وتجدر الإشارة إلى أنه فى حالة تثبيت الإنزيمات التى تحفز مواد تفاعل عالية الوزن الجزيئى فإن عملية التثبيت يجب ألا تتم بأى من طرق المسك أو الكبسلة الدقيقة أو البلمرة المساعدة وذلك لأنه من الصعب تحت هذه الظروف حدوث تلامس بين الإنزيم ومادة التفاعل.



شكل 11-8: طرق تثبيت الإنزيمات .

المصدر: (Weetall 1975)

11-3.7 العوامل المؤثرة على استخدام الإنزيمات المثبتة

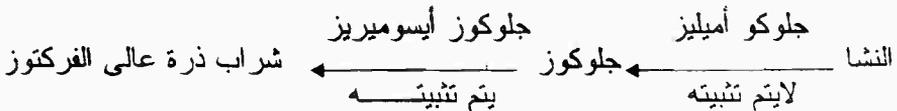
Factors affecting use of immobilized enzymes

على الرغم من التطورات الكثيرة التي أدخلت على تقنيات الإنزيمات المثبتة إلا أن المستخدم منها حتى الآن على النطاق الصناعي يعد محدوداً . ويرجع ذلك إلى وجود عوامل تعتبر بمثابة محددات لاستخدام الإنزيمات على الصورة المثبتة ، ومن أهم هذه العوامل :

تكلفة الإنزيم - تكلفة عملية التثبيت - كفاءة أداء الإنزيم المثبت - رأس المال المطلوب إستثماره - قدره على تنظيف الأعمدة بسهولة لمنع تلوث الغذاء بالكائنات الحية الدقيقة وأخيراً النواتج الثانوية والملوثات الكيماوية التي قد تنتج عن عملية تثبيت الإنزيمات :

أ- التكلفة Cost

لا شك أن استخدام تقنية الإنزيمات المثبتة - شأنها في ذلك شأن أية تقنية جديدة - لابد أن يكون ذا مردود إيجابي على تكلفة الإنتاج أى يكون لتطبيق هذه التقنية عائد إقتصادي . وقد يكون هذا العائد في صورة تقليل تكلفة الإنتاج أو في صورة ناتج أعلى جودة أو أن إستخدام هذه التقنية من شأنه إنتاج ناتج جديد لا يمكن إنتاجه إلا عن طريق التقنية الجديدة . فإذا ما انتقلنا من العام إلى الخاص فإننا نجد أن استخدام إنزيم الجلوكوز أيسوميريز glucose isomerase المثبت في إنتاج شراب الذرة على الفركتوز (HFCS) high fructose corn syrup يعد من أنجح إن لم يكن أنجح تطبيقات الإنزيمات المثبتة على النطاق الصناعي ، فما هي المقومات التي أدت إلى نجاح استخدام هذا الإنزيم في الصورة المثبتة على النطاق التجاري في إنتاج الـ HFCS ؟ للإجابة عن هذا السؤال فإننا نقارن بين إنزيم الجلوكو أيسوميريز وإنزيم آخر هو الجلوكو أميليز glucoamylase (يسمى أحياناً بالجاما أميليز γ -amylase) والذي لا يستخدم في الصورة المثبتة على نطاق تجاري على الرغم من كونه إنزيماً مهماً في صناعة شراب الذرة على الفركتوز حيث أن هذا الإنزيم يحفز فصل جزيء جلوكوز مفرد من النشا في المحلول الذي سبق تحليله مبدئياً بواسطة الحامض أو بتحفيز إنزيم إسالة liquifying enzyme مثل الألفا أميليز α -amylase أى أن:



وتجدر الإشارة إلى أن استخدام الجلوكوأميليز في تحفيز التحليل المائي لمحلول نشا ذى تركيز 30% يؤدي إلى إنتاج شراب جلوكوز بتركيز 94-95% على أساس الوزن الجاف مقارنة بتركيز 88% جلوكوز والذي يتم الوصول إليه فى حالة استخدام التحليل المائي بالحامض .

ومقارنة إنزيمى الجلوكو أسوميريز والجلوكو أميليز من منظور التطبيق على النطاق التجارى فإنه من الضروري أن نأخذ فى إعتبارنا بعض العوامل الأساسية المرتبطة باستخدام كل من هذين الإنزيمين فى الإنتاج التجارى لشراب الذرة ، ولا شك أن أول هذه الإعتبارات هو تكلفة الإنزيم فالجلوكوز أسوميريز من الإنزيمات مرتفعة الثمن مقارنة بالجلوكو أميليز . ومن ثم فإن إستعادة إنزيم الجلوكوز أسوميريز تعتبر أمراً أكثر أهمية من إستعادة الجلوكوأميليز . كذلك فإنه من الأهمية بمكان أن تكون تكلفة تثبيت الجلوكوأميليز منخفضة مع كفاءة أداء عالية للنظام وبحيث يكون تثبيت إنزيم الجلوكوأميليز منافساً لطريقة استخدام الإنزيم غير المثبت (الذائب) .

ب- كفاءة التحويل Conversion efficiency

من الأمور المهمة التى تحدد إمكانية استخدام الإنزيمات المثبتة على النطاق التجارى كفاءة الأداء performance للنظام وبحيث يؤدي إلى إنتاج الناتج النهائى المطلوب. فإذا ما رجعنا إلى إنزيمى الجلوكوز أسوميريز والجلوكوأميليز فإننا نجد أن الإنزيم الأول يؤدي وظيفته جيداً وهو على الحالة المثبتة وذلك بعكس إنزيم الجلوكوأميليز. والذي إذا ما تم تثبيته فإنه لا يعطى كمية الجلوكوز التى تنتج بفعل تحفيز الإنزيم الذائب (غير المثبت) .

ج- الثبات Stability

يعتبر ثبات الإنزيم من العوامل الهامة المحددة لنجاح استخدام تقنية الإنزيمات المثبتة، وعامة فإن إنتاج شراب الذرة على الفركتوز HFCS مثلاً يتم عند درجة حرارة تتراوح من 50 إلى 60°م مما يقلل من النمو الميكروبي واحتمالات تلوث الناتج . ونجد أن إنزيم الجلوكوز أسوميريز يعمل جيداً فى هذا المدى من درجات الحرارة . أما إنزيم الجلوكوأميليز فهو غير ثابت نسبياً تحت هذه الظروف . وعلى الرغم من أن الجلوكوأميليز يعتبر ثابتاً فى المفاعلات التى تعمل عند 45°م فإن هذا لا يحل المشكلة إذ أنه عند درجة الحرارة هذه يلزم استخدام مادة تفاعل مبسترة وذلك للحيلولة دون حدوث نمو ميكروبي . ولاشك أن إجراء مبسترة لمادة التفاعل إجراء غير عملى وناهيك عن التكلفة الإضافية فإذا أضفنا إلى ذلك قصر فترة ثبات الإنزيم وهو

فى الحالة المثبتة لأدرکنا أن تثبيت إنزيم الجلوكوأميليز يصبح غير ذى مردود إيجابى من الناحية التطبيقية .

د- حالة الناتج Status of product

عند تقويم تقنية الإنزيمات المثبتة فإنه يجب أن نأخذ فى إعتبارنا ما إذا كان الناتج جديداً أم أنه ناتج معروف ويتم إنتاجه ، فعلى سبيل المثال يودى إستخدام إنزيم الجلوكوز أيسوميريز المثبت إلى إنتاج ناتج جديد هو HFCS والذى يتسم بصفات تجارية معينة أهمها حلاوته التى تفوق حلاوة شراب الذرة ، ومن ثم فإن الـ HFCS ناتج جديد يتم إنتاجه بتقنية جديدة بمعنى أنه باستخدام تقنية الإنزيمات المثبتة أمكن تطوير العمليات التصنيعية والتكنولوجية فى آن واحد . من ناحية أخرى فإن تقنية تثبيت إنزيم الجلوكوأميليز لا بد وأن تحل محل العملية الإنزيمية التى استقرت جيداً وتم تحديد ظروفها المثلى (optimization) بالنسبة للإنزيم الذائب إذا ما أريد لعملية تثبيت هذا الإنزيم على نطاق تجارى . بمعنى آخر فإن الأمر يتطلب أداء performance أعلى لإنزيم الجلوكوز أميليز المثبت وأن تتحقق ميزة إقتصادية معنوية لكى تكون عملية تثبيت الإنزيم فعالة وجديدة إذا ما استخدمت عوضاً عن الإنزيم الذائب (غير المثبت) . بيد أنه ليس معنى ذلك أن إنزيم الجلوكوأميليز المثبت لن يحل محل الإنزيم الذائب فى إنتاج الـ HFCS مستقبلاً إذ أن تحقيق ذلك يمكن إذا ما تم حل المشاكل التى تواجه تثبيت هذا الإنزيم .

11-7-4 إستخدامات الإنزيمات المثبتة فى التصنيع الغذائى

Utilization of immobilized enzymes in food industry

سنحاول هنا شرح بعض التطبيقات الهامة سواء المستخدم منها بالفعل أو تلك التى تعتبر من التطبيقات الواعدة للإنزيمات المثبتة فى مجال التصنيع الغذائى :

أولاً : إنتاج شراب الذرة عالى الفركتوز

Production of high fructose corn syrup (HFCS)

يوضح الشكل رقم (9-11) خطوات تصنيع شراب الذرة عالى الفركتوز HFCS، ويمكن شرح عملية التصنيع على النحو التالى :

أ- الطحن وتحضير عجينة النشا :

يتم طحن حبوب الذرة الصفراء مع فصل الجنين لاستخلاص الزيت منه، ثم تحضر عجينة النشا starch-slurry بتركيز 33% مادة جافة .

ب- الإيسالة Liquefaction

يتم نقل عجينة النشا إلى حقل ضغط يتم تسخينها بالبخار ويضاف إنزيم الألفا أميليز لإحداث عملية الإيسالة وبعد هذه العملية تكون قيمة مكافئ الدكستروز dextrose equivalent أى DE مساوية 12-15% (مكافئ الدكستروز مقياس للتحلل المائي وهو عبارة عن النسبة بين الكمية الفعلية للمجاميع الألدهيدية بالعينة والكمية النظرية لمجاميع الألدهيد بالعينة عندما يحدث تحلل مائي كامل إلى الجلوكوز أى أنه كمية السكريات المختزلة مقدره كجلوكوز بالنسبة للمادة الصلبة الكلية ويقدر كنسبة مئوية ، لذا فإن الـ DE للنشا = صفراً فى حين أن الـ DE للجلوكوز النقى = 100% .

وعملية الإيسالة تتم بضبط pH عجينة النشا بين 3.7 ، 4.1 ثم تسخن العجينة بالبخار على 150°م وضغط 6 جوى . ثم يقلل الضغط إلى الضغط الجوى العادى حيث تنخفض درجة الحرارة إلى 95°م . وبعد ضبط الـ pH مرة ثانية إلى المدى من 5.9 إلى 6.0 باستخدام هيدروكسيد الصوديوم ثم يتم حقن الكمية المحسوبة من الألفا أميليز لإجراء عملية الإيسالة التى تتم على خطوات متعاقبة فى سبعة مفاعلات reactors وتستغرق هذه العملية من ساعتين إلى ثلاث ساعات . والمحلل الناتج من التفاعل الأخير يكون ذا قيمة DE تتراوح من 12 إلى 15% . بعد ذلك يتم ضبط pH الشراب إلى قيمة تتراوح من 4.5 إلى 4.8 باستخدام حامض الهيدروكلوريك .

ج- فصل الراسب Mud separation

الراسب mud المتكون عبارة عن شوائب من البروتين والدهون الموجودة مع النشا وتلك يجب التخلص منها قبل إجراء عملية التحلل المائي ، ذلك لأن وجود مثل هذه الشوائب يقلل من كفاءة عملية التحليل المائي الإنزيمى (الخطوة اللاحقة) كما أن وجود شوائب من البروتين والدهن يؤدي إلى تكوين رغوة على سطح شراب الجلوكوز ، كما أن وجود هذه الشوائب يعيق عمليات الترشيح اللاحقة . ويمكن إزالة هذه الشوائب باستخدام الطرد المركزي .

د- التحليل المائي Hydrolysis

تجرى عملية التحليل المائي بطريقة مستمرة وذلك فى سلسلة من المفاعلات حيث يضاف هنا إنزيم آخر هو الأميلوجلوكوسيداز (AMG) amyloglucosidase والذي يؤدي إلى زيادة الـ DE للنشا للمسال من نحو 12-15% ليصل إلى 96% . ويجب ضبط الـ pH (من 4-4.5) والتأكد من أن درجة الحرارة 60°م وذلك لضمان توافر الظروف المثلى للنشاط التحفيزى للإنزيم . وتتطلب عملية التحليل المائي نحو 72 ساعة.

هـ- الترشيح بالفحم **Carbon filtration**

يتم ترشيح الشراب الناتج على مرشحات فحم تحت ضغط وذلك لإزالة الشوائب الفيزيائية أى الشوائب التى تؤثر سلباً على لون ورائحة الشراب .

و- التبادل الأيوني **Ion exchange**

تستخدم بطارية من المبادلات الأيونية والكاتيونية وذلك لإزالة الأنيونات غير المرغوبة مثل : Cl^- , SO_4^{--} , CO_3^{--} , HCO_3^- وكذا الكاتيونات غير المرغوبة مثل Ca^{++} , Mg^{++} وتجرى عملية تنشيط regeneration لراتجات التبادل الكاتيوني باستخدام حامض الهيدروكلوريك فى حين يتم إجراء هذه العملية بواسطة هيدروكسيد الصوديوم أو هيدروكسيد الأمونيوم بالنسبة لراتجات التبادل الأنيونى .

ز- التبخير **Evaporation**

تعتبر عملية التبخير من العمليات الضرورية وذلك لأنها تؤدي إلى زيادة نسبة المادة الجافة فى الشراب من 30% إلى 48% - 50% وهو التركيز الذى تتطلبه الخطوة التالية (عملية تحويل المشابهات isomerization) . ويتم عملية التبخير بواسطة نظام التبخير متعدد التأثير multiple effect evaporation system تحت التفريغ .

ونوه إلى أنه يتم الآن إنتاج جلوكوز سائل على النطاق الصناعى باستخدام التحويل الإنزيمى ويتوافر الجلوكوز الناتج بهذه التقنية فى عدة صور هى :

أ- الجلوكوز النمطى **Standard glucose**

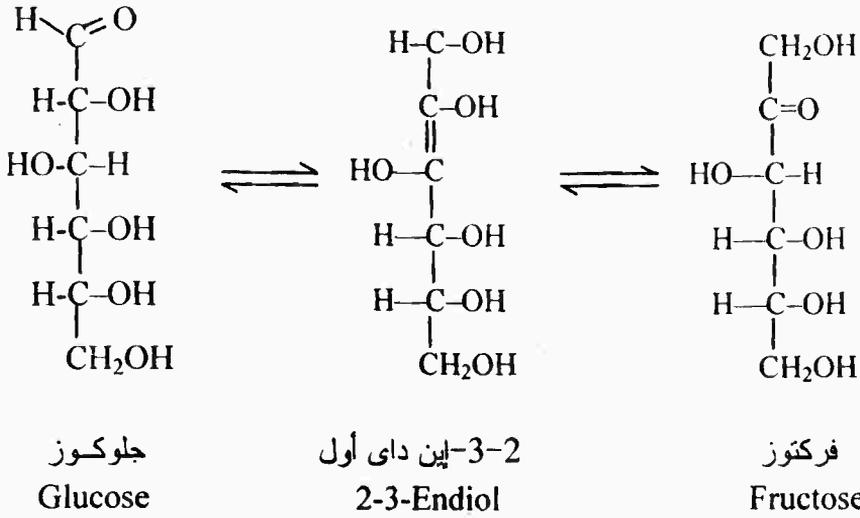
ب- الجلوكوز عالى مكافئ الدكستروز **Glucose HDE**

ج- الجلوكوز عالى المالتوز **Glucose HM**

كذلك فإنه يتم الآن إنتاج المالتودكسترين (malto 15-20) والجلوكوز الجاف (gluco dry) على النطاق الصناعى .

ح- تحويل المشابهات **Isomerization**

لإنتاج شراب الذرة عالى الفركتوز يتم تحويل الجلوكوز (أدوز) إلى الفركتوز (كيتوز) وذلك بتحفيز إنزيم الجلوكوز أيسوميريز **glucose isomerase** (ويسمى **D-xylose ketol isomerase**) وهو يحفز تحويل الجلوكوز إلى فركتوز . وقد بدأ الإهتمام الصناعى بهذا الإنزيم عندما إكتشف عام 1960 أن إنزيمات الزيلوز أيسوميريز **xylose isomerase** يمكنها تحفيز تحويل الجلوكوز إلى فركتوز . وقد تأخر التطبيق التجارى للإنزيم حتى أمكن تطوير طريقة لتثبيت الإنزيم وإعادة استخدامه بطريقة مستمرة . ويمكن توضيح ميكانيكية هذا التفاعل كما يلى :



أى أن عملية تحويل الجلوكوز إلى فركتوز تتم من خلال مركب وسطي هو 2-3-إين داى أول . وتجدر الإشارة إلى أن الإنزيم لا يحفز تحويل كل الجلوكوز إلى فركتوز إذ أن ما يتم تحويله من جلوكوز لا يتعدى نسبة تتراوح من 42% إلى 45% فقط . وتتأثر كفاءة عملية تحويل الجلوكوز إلى فركتوز بعدة عوامل هي :

- أ- تركيز أيونات الكالسيوم والماغنسيوم
- ب- وقت التفاعل .
- ج- درجة الحرارة .
- د- رقم الأس الهيدروجيني pH .
- هـ- وجود الأكسجين .
- و- نقاوة المحلول .
- ز- محتوى الجلوكوز من المادة الجافة .
- ح- محتوى الدكستروز (الجلوكوز) .
- ط- تركيز ثنائي أكسيد الكبريت SO_2 .

ويتم استخدام الإنزيم فى الصورة المثبتة باستخدام أعمدة تملأ بمادة حاملة يثبت عليها الإنزيم وتعرف هذه الأعمدة بأعمدة الوسادة bed columns تصمم بحيث يكون الإنسياب لأسفل downflow فيما عدا فترة قصيرة يتم فيها الإنسياب لأعلى upflow وذلك بغية تثبيت الوسادة بعد شحن الإنزيم . وترتّب الأعمدة بطريقة متوازية. وتستغرق العملية (residence time) عادة أقل من أربع ساعات، ويستخدم شراب جلوكوز ذو pH يتراوح من 7.3 إلى 8.0 دونما حدوث هدم خطير للشراب.

ويتناقص النشاط الإنزيمي أسياً exponentially مع الزمن ، بمعنى أن معدل التحلل يتناسب مع نشاط الإنزيم. وتعرف إنتاجية الإنزيم productivity بأنها الكمية الكلية من الفركتوز الناتج لكل 1 كجم من الإنزيم خلال فترة نشاطه الكلية . أما نشاط الإنزيم فيعرف بأنه كمية الفركتوز الناتجة لكل 1 كجم إنزيم في الساعة .

وبعد عملية تحويل المشابه isomerization يرشح الشراب خلال فحم نشط متبوعاً بإجراء عملية تبادل أيوني ion exchange . ثم تجرى عملية تبخير تحت تفريغ للوصول بتركيز المادة الجافة إلى 71%. ويسوق هذا الناتج تحت اسم فركتوز 42. أما لإنتاج الجيل الثاني من شراب الذرة عالي الفركتوز (فركتوز 55) فإنه يلزم استخدام تقنية معقدة حيث تجرى عملية فصل كروماتوجرافي chromatographic separation وتشتمل العملية على ضبط المادة الجافة بشراب الفركتوز 42 لتصل إلى 60% (التركيز الأمثل للمواد الصلبة D5) وذلك عن طريق خلط جزء من الفركتوز 42 (تركيز لا D5 = 71%) مع فركتوز 42 (تركيز لا D5 = 46%) باستخدام خلط استاتيكي . ثم يمرر الشراب على بطارية من أعمدة الكروماتوجرافي مملوءة بمنتجات معينة يمكنها فصل أو تفريد fractionation المخلوط إلى مكونين fraction هما :

أ- مكون للدكستروز dextrose fraction ويتكون من :

دكستروز 85-87%

فركتوز 5-7%

سكريات عالية 6-8%

ب- مكون الفركتوز fructose fraction ويتكون من :

فركتوز 96-98%

سكريات عالية 2-4%

ويتم إرجاع مكون الدكستروز ثانياً إلى خطوة التحلل المائي . وللحصول على فركتوز 55 والذي تتطلبه معظم صناعات المشروبات soft drinks فإنه يتم خلط فركتوز 98% مع فركتوز 42. وبعد الخلط يتم الترشيح خلال الفحم متبوعاً بالتبادل الأيوني وذلك لضمان إزالة الألوان والروائح غير المرغوبة . وكذا إزالة المعادن الموجودة في فركتوز 55 لكي يوائم مواصفات المشروبات المصنعة. يتبع ذلك تبخير الشراب تحت تفريغ للوصول إلى نسبة D5=77% وذلك لإنتاج الفركتوز 55. وتجدر الإشارة إلى أن تصنيع شراب الذرة عالي الفركتوز HFCS يؤدي إلى إنتاج نواتج (ثانوية) مهمة وهي زيت الذرة والجلوتين والأخير يتوافر في صورتين هما :

أ- الجلوتين فيد **Gluten feed**

ويحتوى على نسبة بروتين تتراوح من 16 إلى 20% ويستخدم أساساً فى صناعة أعلاف الماشية .

ب- الجلوتين ميل **Gluten meal**

ويحتوى على نسبة بروتين تتراوح من 60 إلى 62% ويستخدم فى صناعة أعلاف الثروة الداجنة .

وقد قامت الباحثة فاطمة الزهراء الشريف (El-Sherif, 1985) بإنتاج إنزيم الجلوكوز أيسوميريز من المصادر الميكروبية التالية :

Bacillus subtilis

Bacillus congulance

Bacillus megraterium.

وتبين أن الـ *B. subtilis* يعتبر أفضل المصادر الثلاثة إنتاجاً للإنزيم ، كما أن أفضل طريقة لإستخلاص الإنزيم من الخلايا البكتيرية كانت باستخدام الموجات فوق الصوتية . وأمكن الحصول على الإنزيم مع الإحتفاظ بنحو 68% من نشاطه الأسمى عن طريق الإستخلاص والتقية وذلك باستخدام كلوريد المنجنيز وكبريتات الأمونيوم ثم الديلسة والترسيب بالأسيتون . وقامت الباحثة بتثبيت الإنزيم على DEAE-sephadex A-50 وتبين ثبات الإنزيم تحت ظروف التشغيل المستمر على مدى شهر ، كما أمكن فى نهاية فترة التشغيل إستعادة المادة الحاملة وإعادة إستخدامها فى عملية تثبيت مستحضر إنزيمى جديد . من ناحية أخرى فقد تمكن الباحث السيد شعبان (Shaban, 1996) من إستخلاص إنزيم الجلوكوز أيسوميريز من مصادر نباتية مثل ثمار العنب البناتى ، التين الشوكى ، البطيخ ، الطماطم .

ثانياً : إنتاج السكر المحول **Production of invert sugar**

السكر المحول invert sugar هو مخلوط سكرى الجلوكوز والفركتوز (بنسبة 1:1) الناتج من عملية التحليل المائى للسكروز . ويمكن تحفيز عملية التحليل المائى هذه إما بالأحماض أو بواسطة إنزيم الانفرتيز invertase واسمه العلمى (β -fructofuranosidase EC 3.2.1.26) وهو يهاجم السكريات المحتوية على طرف غير مستبدل بمبقى β -D-fructofuranosyl بمعنى أنه يحفز فقط تحلل الـ β -D-fructoside (الموجود فى السكروز sucrose، الرافينوز raffinose، جينتيانوز gentianose والاستاكيوس stachyose) مع فصل الفركتوز .

وعملية التحليل المائي للسكروروز تسمى بعملية التحول ذلك لأن المخلوط الناتج من عملية التحليل المائي يكون يسارى الدوران laevorotatory فى حين أن السكروروز يمينى الدوران dextrorotatory :

مخلوط يسارى الدوران	جلوكوز + فركتوز °52.5+ -°92	السكروروز ← °66.5 +
------------------------	--------------------------------	------------------------

ويتميز السكر المحول بأنه أحلى من السكروروز . وتشير البحوث المنشورة على تثبيت إنزيم الايفرنتيز إلى إمكانية تثبيته بطرق مختلفة وعلى دعائم مختلفة كما يلي: طبقاً للإستعراض المرجعى الذى أعدته الباحثة هناء عبدالله (Abdellah, 1989) .

1- بالإمصاص على ثنائى إيثايل أمينو إيثايل السليلوز diethylaminoethyl cellulose (DEAE-cellulose) وقد نجحت هذه الطريقة فى تثبيت الايفرنتيز غير الذائب المستخلص من الخميرة ، وإجراء عملية توازن بواسطة بفر فوسفات 0.005 مول عند pH=5.2 ووجد أن نشاط الإنزيم المثبت يصل إلى نحو 30-50% من الإنزيم .

2- بالربط على سطح بولى ستيرين polystyrene matrix سواء فى صورة وسائد أو أنابيب .

3- بالإزدواج التعاونى مع جسيمات زجاج مسامى porous glass particles .

4- بالربط الأيونى للإنزيم على diethyl aminoacetyl cellulose (DEAA-cellulose) غير أن نحو 55 إلى 70% من نشاط الإنزيم يفقد بعد الربط .

5- بالتبادل الأيونى على راتنج أمبرليت للتبادل الأيونى ، وتبين أن نحو 50% من الإنزيم يتم تثبيته بعد 30 دقيقة وعند pH = 5 .

6- تثبيت خلايا خميرة *Saccharomyces pastorianous* عن طريق المسك entrapment على كريات pellets من الآجار .

7- ربط الإنزيم على جل البولى أكريل أميد مع المعاملة بواسطة itaconic anhydride لتحسين الصفات الهيدروديناميكية للجل . كذلك فقد أمكن ربط خلايا الـ *Saccharomyces cervisiae* على البولى أكريل أميد .

8- إنتاج الخلايا الميكروبية المثبتة على الجيلاتين gelatin-immobilized microbial cells - واستخدام جزيئات الجل المحتوية على هذه الخلايا كإنزيم انفرنتيز مثبت فى النظم التى يستخدم فيها التقلب أو فى نظم الوسائد أو فى أنابيب .

9- تثبيت خلايا *Saccharomyces cerevisiae* على جل الجينات الكالسيوم وذلك عن طريق تعليق الخلايا المجمدة للخميرة فى الجينات صوديوم (3.5-8.0%) فى الماء ، ويشكل الجل خلال اير قطرها 0.6 مم داخل محلول كلوريد كالسيوم 0.5 مول ويعامل بالجلوتارالدهيد .

10- مسك خلايا *Saccharomyces cerevisiae* فى أكريل أميد تتم بلمرته بإشعاعات جاما (200 كيلوراد) ، وقد تبين أن الإنزيم يحتفظ بنحو 85% من نشاطه بعد التثبيت كما أنه يكون أكثر ثباتاً إزاء كل من الحرارة وإشعاعات جاما.

11- استخدام بياض بيض الدجاج كحامل بروتينى فعال لتثبيت إنزيم الانفرتيز ، ويتميز بياض البيض بعدم سميته وكذا رخص ثمنه . وفى المتوسط فإن كل 35 مل من بياض البيض (يمكن الحصول عليه من بيضة واحدة) يعطى نحو 170 جراماً كوزن رطب من الإنزيم المثبت . ويحتفظ الإنزيم المثبت بنحو 25% من نشاطه .

12- تثبيت الإنزيم على كينتين الكريل (الكريل يشبه الجمبرى الصغير) عن طريق الإدمصاص فى وجود جلوتارالدهيد ، غير أن الإنزيم المثبت يحتفظ بنحو 16% فقط من نشاطه .

13- استخدام طين البنتونيت bentonite clay لتثبيت الانفرتيز . وقد تبين أن معقد البنتونيت والانفرتيز يحتفظ بنحو 55.5% من نشاط الإنزيم ، وقد أمكن زيادة النشاط بنحو من 7 إلى 22% عن طريق استخدام مواد ربط تعاونية .

14- تثبيت الانفرتيز بالربط الأيونى على سطح غشاء من كحول البولى إيثيلين فينايل poly (ethylene-vinyl-alcohol) ويعبر عنه بالمختصر PVA تم تحويله بمركبين للأمينواستينال لهما أطوال جزيئية مختلفة . كذلك فلقد أمكن مسك الانفرتيز على غشاء من الـ PVA الذى يحتوى على روابط عرضية بفعل الأشعة فوق البنفسجية .

15- استخدام مركب diazotized 4-aminobenzoyl cellulose لتثبيت الانفرتيز أو ربط الإنزيم تعاونياً بواسطة البنزوكينون والجلوتارالدهيد بمبادل أنيونى للبولى ستيرين ذى المسام الواسعة . وتبين زيادة نشاط الإنزيم كلما زادت كمية الإنزيم المرتبط. وأمكن الحصول على أقصى نشاط عندما يكون الإنزيم المرتبط 2000 وحدة/جم من الحامل الجاف .

وقد وجدت الباحثة هناء عبدالله (1989) ان كفاءة نشاط إنزيم الانفرتيز المثبت على الداى إيثايل أمينو سليولوز ، والبولى أكريل أميد وبياض بيض الدجاج كانت 75% ، 31.1% ، 42% على الترتيب . وتبين أنه بزيادة تركيز الإنزيم يزداد نشاط الإنزيم المثبت على الحوامل الثلاثة المختلفة فى الفترة الأولى ثم تقل الزيادة بعد ذلك بزيادة تركيز الإنزيم . وقد أوضحت الباحثة المذكورة إمكانية التشغيل المستمر لإنزيم الانفرتيز المثبت على البولى أكريل أميد المعبأ فى عامود وذلك بإمرار تركيز ثابت من السكروز (50%) عند 50°م وبمعدل سريان 60 مل /ساعة لمدة خمسة أيام . ولم يحدث خلال تلك الفترة إنخفاض فى نشاط الإنزيم حيث ظل معدل التحويل حول القيمة 74% . غير أنه عندما أعيد إختبار نفس الإنزيم فى العامود بعد التخزين على درجة حرارة 4°م تبين إنخفاض معدل تحلل السكروز إلى نحو 61% .

ثالثا : الأسترة التبادلية للزيوت والدهون

Interesterification of oils and fats

من المعروف أن الزيوت والدهون الطبيعية عبارة عن مخاليط من جلسريدات ثلاثية (مركبات ثلاثى أسايل جليسرول). وتتوقف الصفات الفيزيكية والكيمائية على التركيب الجزيئى مثل طول سلسلة الأحماض الدهنية الداخلة فى التركيب ، درجة عدم التشبع ومواقع إرتباط الأحماض الدهنية على جزيء الجليسرول . وتجرى عملية التحويل modification للزيوت والدهون عن طريق تغيير التركيب الجزيئى لمركبات ثلاثى أسايل جليسرول (الجليسريدات الثلاثية) وذلك من خلال تقنيات معينة بعضها كيمائى وبعضها إنزيمى .

وتؤدى عمليات تحويل الزيوت والدهون إلى إنتاج مركبات زيوت ودهون جديدة ذات صفات وظيفية جديدة تتباين عن نظيراتها للزيوت والدهون قبل التحويل مثل مسلك الإنصهار ، الثبات التأكسدى ، الصفات البلاستيكية . ويمكن التحكم فى عملية التحويل للحصول على ناتج ذى تركيب مطلوب (ولذا تسمى العملية بالتفصيل tailor-made) وتعتبر عملية الأسترة التبادلية إحدى الطرق الهامة التى تستخدم فى تحويل الزيوت والدهون إذ يمكن بواسطتها تبديل مواضع الأحماض الدهنية أو إستبدال أحماض دهنية بأخرى فى تركيب جزيء ثلاثى أسايل الجليسرول . ويمكن إجراء الأسترة التبادلية إما بالطرق الكيمائية أو بالطرق الإنزيمية، ويمكن إجراء العملية إنزيميا باستخدام إنزيم الليبيز lipase تحت ظروف لا مائية anhydrous . وتسمح عملية الأسترة التبادلية المحفزة بإنزيم الليبيز من إنتاج منتجات أعلى قيمة مثل مشابهات وبديلات زبد الكاكاو . كذلك فإنه يمكن بواسطة الأسترة التبادلية تغيير

تركيب زيت مثل زيت الشلجم rapeseed oil وتغيير حامض الأيروسيك eurcic acid الضار والموجود في تركيب الزيت بحامض آخر آمن مثل البالميتيك .

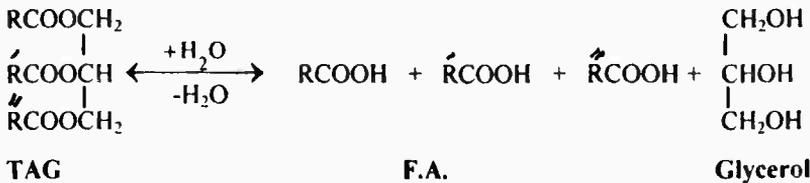
وفي الحقبة الأخيرة فقد أدى التقدم في تقنيات تثبيت إنزيمات الليبيز إلى زيادة إمكانية التطبيق الصناعي لهذه العملية سواء باستخدام طرق متقطعة أو مستمرة . وعلى النطاق الصناعي فقد تم بدء تشغيل مصنع لودرز كروكلان Loders Croklan عام 1993 بهولندا ، وهذا المصنع يستخدم تقنية الليبيز المثبت لإجراء الأسترة التبادلية للزيوت والدهون مما يتيح إنتاج منتجات ذات صفات أفضل من النواحي الوظيفية ، التغذوية ، والريولوجية .

وقد تبين أن إنزيمات الليبيز الميكروبية (Triacylglycerol acyl-hydrolases, EC 3.1.1.3) تتباين في درجة تخصصها وذلك على النحو التالي :

أ- إنزيمات ليبيز غير متخصصة Non-specific lipases

إنزيمات هذه المجموعة غير متخصصة لمهاجمة موقع معين على جزئ الجلسرول وأيضاً لا تتطلب أحماضاً دهنية معينة تكون مرتبطة عند موقع الهجوم بمعنى أن هذه الإنزيمات تحفز تحليل أي رابطة إستر في تركيب الثلاثي أسايل جليسرول ، مما يؤدي إلى تحليل كامل لروابط الأستر وانفراد الأحماض الدهنية والجلسرول ، غير أنه يتم تكوين ثنائي وأحادي أسايل جلسرول كمركبات وسطية. ومن أمثلة إنزيمات هذه المجموعة تلك المستخلصة من *Candida eylindracea*. وإذا ما استخدمت إنزيمات الليبيز غير المتخصصة في تحفيز عملية الأسترة التبادلية لمخلوط من الثلاثي أسايل جلسرول فإن المكونات الناتجة تكون مشابهة لتلك المتحصل عليها من الأسترة التبادلية بالطرق الكيماوية والتي تستخدم فيها عوامل حفز كيماوية مثل ميثيلات الصوديوم sodium methylate أو معدن الصوديوم مع التسخين عند 80° م .

ويمكن تفسير الفعل التحفيزي لإنزيمات الليبيز غير المتخصصة بالمعادلات التالية:



TAG: Triacylglycerol

FA: Fatty acid

ثلاثي أسايل جليسرول

حامض دهني

ب- إنزيمات ليبيز متخصصة للموضعين 1، 3 1,3-specific lipases

تشتمل هذه المجموعة على إنزيمات ليبيز ذات تخصص فضائي stereospecificity أى أنها تهاجم الروابط الأسترية عند موضعين هما 1، 3 على جزئ ثلاثى أسايل الجليسرول . وتسمى هذه المجموعة باسم regioselectivity وتعتبر أهم إنزيمات الليبيز ويمكن الحصول عليها من كائنات حية دقيقة أهمها :

Aspergillus niger

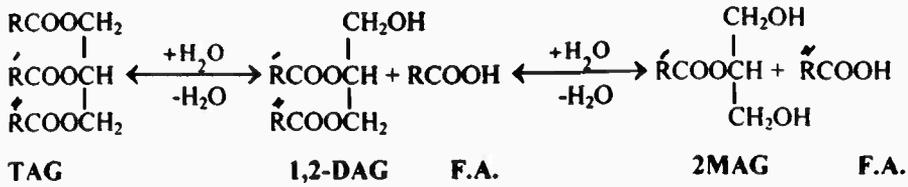
Mucor javanicus

Mucor miehei

Rhizopus arrhizus

وإذا ما استخدمت هذه الإنزيمات فى تحفيز الأستره الداخلية لمخاليط الزيوت والدهون فإنها تعطى منتجات لا يمكن الحصول عليها بالطرق الكيماوية، وناهيك عن إمكانية التحكم فى معدل التفاعل الإنزيمى ومن ثم الحصول على منتجات ذات صفات ريولوجية مرغوبة . ويلاحظ أن الأستره التبادلية بالطرق الإنزيمية لاتؤدى إلى تغيير الموضع رقم 2 فى جزئ ثلاثى أسايل الجليسرول ، وهذا أمر مطلوب إذ أن الموضع رقم 2 هو موضع ربط الأحماض الدهنية الأساسية .

ويمكن توضيح الفعل التحفيزى لإنزيمات الليبيز المتخصصة للموضعين 1، 3 على النحو التالى :



TAG: Triacylglycerol

DAG: Diacylglycerol

FA: Fatty acid

MAG: Monoacylglycerol

ثلاثى أسايل الجليسرول

ثنائى أسايل الجليسرول

حامض دهنى

أحادى أسايل جليسرول

ج- إنزيمات ليبيز متخصصة للأحماض الدهنية

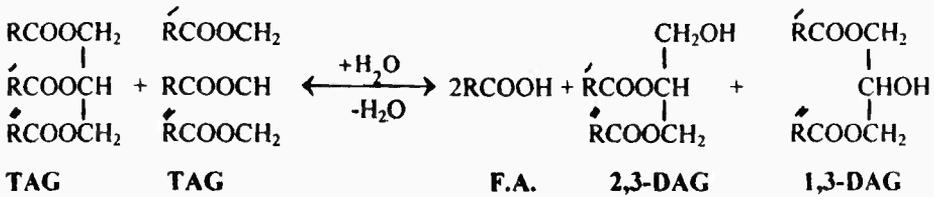
Fatty-acid specific lipases

تشتمل هذه المجموعة على إنزيمات ليبيز تحفز التحلل المائى لروابط أستر شريطة تواجد أحماض دهنية معينة تدخل فى تركيب هذا الإستر .

ويلاحظ في الأسترة التبادلية بالطرق الإنزيمية أهمية أن يكون تركيز الماء مساوياً 50 جزءاً في المليون لأن التركيز الأعلى من الماء يؤدي إلى حدوث عملية تحلل مائي hydrolysis بمعدل أسرع من حدوث الأسترة التبادلية، أما عند تركيز أقل من 50 جزء في المليون فإن الإنزيم لا يحفز حدوث أى من عمليتي التحلل المائي وعملية الأسترة الداخلية . ويمكن استخدام مفاعلات reactors لإجراء عملية الأسترة التبادلية ويوجد من هذه المفاعلات نوعان الأول هو مفاعل الوسادة الثابتة fixed bed reactor . والثاني هو مفاعل الغشاء membrane-reactor . والنوع الثاني يمثل طريقة واعدة ذات كفاءة عالية في عملية التحويل الحيوى bioconversion وكذا عمليات الفصل ، حيث تعتمد هذه الطريقة على استخدام عوامل حفز حيوية بين وجهين غير قابلين للإمتزاج يفصل بينهما غشاء membrane الأمر الذى يجعل لهذه الطريقة قيمة تطبيقية في صناعة الزيوت والدهون .

وتقوم إنزيمات الليبيز المتخصصة للأحماض الدهنية بتحفيز التفاعل على

الوجه التالى :



TAG: Triacylglycerol

ثلاثى أسايل الجليسرول

DAG: Diacylglycerol

ثنائى أسايل الجليسرول

FA: Fatty acid

حامض دهنى

وقد قامت الباحثة أمل عبدالرازق (Abd-El-Razek 1996) باستخدام الليبيز المثبت في تحفيز الأسترة التبادلية لست خلطات مختلفة من الزيوت والدهون ، وقد استخدمت هذه الخلطات قبل وبعد الأسترة التبادلية في صناعة الكيك والبسكويت بالإضافة إلى تفصيل بعض بدائل زبد الكاكاو ومقارنة المنتجات المستخدم فيها بتلك المستخدم فيها كل من زبد الكاكاو وبدل تجارى مستورد . وعامة فقد زادت قيمة الحجم النوعية للكيك المصنع من دهون مؤسرة تبادلياً مقارنة بنظيره المصنع من الدهون الأصلية . وقد حدثت زيادة معنوية في عمق الإختراق مقاساً بجهاز الإختراق penetrometer غير أنه تبين عدم وجود علاقة تلازم بين الإختراق وقوة القص shearing force مقاسة بجهاز Ottawa texture measuring system (OTMS)

كما لم يحدث تغير فى لون الكيك نتيجة لإستخدام الخلطات المؤسّرة تبادلياً . وقد أوضحت نتائج الخواص العضوية الحسية أن البسكويت المصنع من الخلطات المؤسّرة تبادلياً حظى بأعلى تقبل من المحكمين خاصة بالنسبة للقوام والهشاشة . وقد أوضحت الباحثة أمل عبدالرازق (Abd-El-Razek 1996) إمكانية تفصيل بدائل لزبد محتوية أو غير محتوية على حمض اللوريك .

ونوه إلى أن إستخدام الأسترة التبادلية تعد من التقنيات الواعدة فى مجال تكنولوجيا الزيوت والدهون ولاسيما فى ضوء التقارير العلمية التى تشير إلى مثالب عملية الهدرجة hydrogenation والتى تؤدى إلى تحويل نسبة من الأحماض الدهنية غير المشبعة والموجودة طبيعياً فى صورة المشابه الهندسى سيس *cis* إلى المشابه الهندسى ترانس *trans* والأخير يؤدى إلى زيادة الليبوبروتين منخفض الكثافة low density lipoprotein (LDL) والذى له تأثيرات ضارة على صحة الإنسان لأنه يزيد من فرصة حدوث إنسداد الشرايين بينما يؤدى وجود المشابه ترانس إلى خفض الليبوبروتين عالى الكثافة high density lipoprotein (HDL) والذى له تأثير معاكس للـ LDL . ولذا فإنه يمكن القول بأن وجود المشابه ترانس يعتبر أسوأ من وجود الأحماض الدهنية المشبعة ذاتها حيث أنها تؤدى إلى زيادة كل من الـ LDL الضار ، والـ HDL المفيد .

رابعاً : إزالة الـ رافينوز من بنجر السكر

Removal of raffinose from sugar beet

يمكن إستخدام إنزيم الألفا جالاكتوسيديز α -galactosidase المثبت فى صناعة سكر البنجر وذلك لإزالة الـ رافينوز من مستخلصات بنجر السكر . ولهذه العملية أهمية تصنيعية إذ أن وجود سكر الـ رافينوز يؤدى إلى إعاقة عملية بلورة السكر . ويمكن تثبيت كريات من فطر *M. vinaceae* المنتج لإنزيم الألفا جالاكتوسيديز .

خامساً : إنتاج مظهرات النكهة Flavour enhancers

تمكن الباحثون اليابانيون من إنتاج مركب $\bar{5}$ -أحادى نيوكليوتيد- $\bar{5}$ -mononucleotide الذى يعتبر من مركبات إظهار النكهة وذلك باستخدام تقنية الإنزيمات المثبتة وتعتمد الطريقة على معاملة الحمض النووى ريبونوكليك (RNA) بواسطة إنزيم $\bar{5}$ -فوسفوداى استيريز $\bar{5}$ -phosphodiesterase لإنتاج مركبات $\bar{5}$ -ريبونوكليوتيدات $\bar{5}$ -ribonucleotides مثل أدينوزين أحادى الفوسفات adenosine monophosphate (AMP) ، والجوانوزين أحادى الفوسفات guanosine monophosphate (GMP) ، ويمكن تحويل الـ AMP إلى مركب إينوزين أحادى

الفوسفات (IMP) inosine monophosphate ويعتبر كل من الـ AMP والـ IMP من المركبات المظهرة للنكهة flavour enhances ولا سيما للمنتجات الغذائية التى تتركب أساسا من البروتين.

سادسا : إنتاج اللبن والشرش الخاليين من اللاكتوز

Lactose-free milk and whey

يمكن إستخدام إنزيم اللاكتيز (البيتا جالاکتوسيديز) (lactase (β -galactosidase) واسمه العلمى (β -D-galactoside galactohydrolase) EC.3.2.1.23 فى التحليل المائى لللاكتوز إلى جلوكوز ، جالاکتوز وذلك بغرض إنتاج لبن أو شرش خال من اللاكتوز ، وتفيد هذه المنتجات بعض الأشخاص الذين لديهم حساسية للبن ومنتجاته بسبب وجود قصور وراثى لديهم فى إنتاج إنزيم اللاكتيز .

ويمكن إستخدام الشرش الخالى من اللاكتوز ك مكون فى بعض المشروبات أو كمادة غذائية أو كمادة رافعة leavening agent فى صناعة المخبوزات ، كذلك فإن هذا النوع من الشرش يمكن أن يلعب دوراً كبيراً فى إنتاج الخميرة والكحول من خلال الصناعات الميكروبية .

سابعا : فى العمليات التصنيعية

يمكن إستخدام الإنزيمات المثبتة فى بعض العمليات التصنيعية مثل إستخدام إنزيم البابين papain المثبت فى منع العكارة التى تتكون عند تبريد البيرة chill- haze وكذا إستخدام الإنزيمات البكتينية كمواد مروقة clarifying agents لعصائر الفاكهة واستخدم إنزيم النارجينيز naringinase لإزالة المرارة من عصير الجريب فروت .

8-11 مثبطات الإنزيمات بالأغذية Enzyme inhibitors of foods

تحتوى الأغذية على مثبطات إنزيمية طبيعية ؛ وأغلب هذه المثبطات هى تلك التى تثبط الإنزيمات المحللة للبروتينات antiproteinase activity . وتجدر الإشارة إلى أن مغزى تواجد مثل هذه المثبطات تعتبر بمثابة وسيلة من وسائل التحكم فى النشاط الإنزيمى بالمواد الغذائية .

من ناحية أخرى فإن بعض هذه المثبطات قد يسبب مشاكل للمستهلك سواء من الناحية التغذوية أو من منظور سلامة الغذاء .

11-8-1 المثبطات الإنزيمية بالأغذية النباتية

Enzyme inhibitors in plant foods

تبين وجود مثبطات طبيعية بالبقوليات لكل من إنزيمات التربسين ، الأميليز ، الليباز . وتتواجد مثبطات إنزيمات البروتينيز proteinases inhibitors في كل أفراد العائلة البقولية . وفي الحبوب كالقمح والأرز والذرة وكذا درنات البطاطس وجذور البنجر .

أ- مثبطات الإنزيمات المحللة للبروتين

تبين وجود ثمانية أنواع من مثبطات إنزيمات البروتينيز بفول الصويا ، ومن أهم هذه المثبطات ذلك المعروف باسم مثبط كونتز Kunitz inhibitor ومثبط بومان برك Bowman-Birk inhibitor نسبة إلى مكتشفى هذين المثبطين . ووجد أن الصورة النشطة لمثبط كونتز تحتفظ بنشاطها في مدى pH من 1 إلى 12 عند درجات حرارة أقل من 30° م ، وتحدث دنثرة عكسية لهذا المثبط وذلك بالتسخين لفترة قصيرة عند 80° م ، في حين تحدث دنثرة غير عكسية للمثبط إذا ما سخن لدرجة حرارة 90° م . وفي مقدور مثبط كونتز تثبيط إنزيمات التربسين بأنواعها المختلفة بما فيها النوع الموجود بالإنسان . أما مثبط بومان-برك فيعتبر أكثر ثباتاً ضد الدنثرة مقارنة بمثبط كونتز إذ أن المثبط الأول لا يفقد نشاطه حتى إذا ما سخن (في الصورة الجافة) عند درجة 105° م أو في محلول مائي بتركيز 0.02% ولمدة 10 دقائق عند 100° م ، بينما يسبب التعقيم الحراري لمدة 20 دقيقة عند 121° م تهدماً لنشاط مثبط بومان-برك . ويعتبر هذا المثبط ثابتاً تحت الظروف الحامضية (عند pH = 1.5 ودرجة حرارة 37° م لمدة ساعتين) ، وهو يثبط النشاط البروتوليتي وتحلل الأستر لإنزيمات التربسين والكموتربسين . وتشير الدراسات إلى أن مجموعة الثيول بالحامض الأميني سستئين تدخل في التفاعلات المتبادلة للثيول وثنائي الكبريتيد مع مثبط كونتز مما يؤدي إلى هدمه ومن ثم إيقاف فعله التثبيطي ؛ لذا فإن إيقاف فعل المثبطات في وجود السستئين يتطلب معاملة حرارية معتدلة وهو أمر ينعكس إيجاباً على المحافظة على الصفات الوظيفية لبروتينات فول الصويا (للقارئ أن يرجع إلى الباب السادس من هذا الكتاب "تكنولوجيا البقوليات" للوقوف على المزيد من تأثيرات المعاملات التكنولوجية المختلفة على مثبطات إنزيم التربسين بالبقوليات) . وتتواجد مثبطات إنزيمات البروتينات بالمصادر النباتية أساساً في البذور ؛ غير أن هذه المثبطات تتركز أيضاً في أجزاء نباتية أخرى كالأوراق والجذور في نبات كالبطاطا وفي الأوراق والدرنات في البطاطس . أما في حبوب القمح فإن مثبط إنزيم التربسين يتركز في الفلقات والجنين.

وتجدر الإشارة أيضاً إلى تواجد مثبط إنزيم البابين في جنين حبوب فول الصويا والفول البلدى والبسلة .

وقد لاحظ أسبورن ومندل Osborne and Mendel في عام 1917 أن تغذية فئران التجارب على حبوب فول الصويا غير المطبوخة طبخاً جيداً لعدة ساعات لم تؤد إلى نمو هذه الفئران بطريقة جيدة ، ولقد تبين صحة هذا الإستنتاج فيما بعد بالنسبة لأنواع أخرى من حيوانات التجارب . كذلك فقد إتضح أن تدعيم مسحوق حبوب فول الصويا غير المعاملة حرارياً بالحامض الأميني ميثيونين methionine (الحامض الأميني الحدى بفول الصويا) أو الحمض الأميني سستين cystine قد أدى إلى تحسين الإستفادة من البروتين بنفس الدرجة تقريباً كما لو كان فول الصويا قد عومل حرارياً بطريقة مناسبة . وكما هو متوقع فإن مسحوق فول الصويا المعامل حرارياً والمضاف إليه ميثيونين يكون ذا قيمة تغذية أعلى من نظيره غير المعامل حرارياً والمضاف إليه ميثيونين . وأوضحت الدراسات أن تغذية الفئران والكتاكيت على عليقة تحتوى فول الصويا الخام تؤدي إلى زيادة نشاط البنكرياس . ويعتقد أن التأثير الضار لدقيق فول الصويا الخام على بنكرياس الفئران يأتي من الميل القوي لمثبطات التربسين الموجودة بفول الصويا للتفاعل مع إنزيم التربسين بالفئران ومن ثم منع زيادة التخليق الحيوي للتربسين بالبنكرياس . وتوجد أدلة تشير إلى أن زيادة نشاط البنكرياس في الفئران قد يشجع على إصابته بالسرطان ، ولقد أظهرت التجارب إصابة فئران التجارب بسرطان الكبد عند تغذيتها على علائق تحتوى على دقيق فول الصويا الخام ، بيد أنه يعتقد عدم حدوث ذلك بالنسبة للإنسان وذلك بسبب الميل الضعيف لمثبطات التربسين للإرتباط بالإنزيم الموجود في الإنسان .

ب- مثبطات إنزيمات الأميليز Amylase inhibitors

تؤدي مثبطات إنزيمات الأميليز إلى تأخير عملية هضم النشا في الوجبة الغذائية وهو الأمر الذي يمكن أن يؤخذ كأساس لبرامج إنقاص الوزن (الرجيم) لأولئك الأشخاص الذين يعانون من السمنة obese individuals ففي عام 1982 تم تسويق ما سمي بماسكات النشا starch blockers بالولايات المتحدة الأمريكية باعتبار هذه المركبات بمثابة مساعدات تغذية dietary aids ؛ بيد أن كفاءة مثل هذه المنتجات في التحكم في الوزن ما زالت موضع شك وهو الأمر الذي حدا بهيئة الغذاء والدواء الأمريكية Food and Drug Administration (FDA) تنظيم بيع مثل هذه المركبات بحيث تتم معاملتها كدواء ومن ثم فإنه يتحتم صرفها عن طريق التذاكر الطبية مع ضرورة التأكد في ذات الوقت من كفاءتها ومدى فاعليتها .

ومن الأهمية بمكان أن ننوه إلى أن مثبطات إنزيمات الأميليز لا تعتبر العامل الوحيد المسئول عن تأخير هضم النشا ، ذلك لأنه في حقبة الثمانينات أشار العديد من البحوث إلى وجود جزء من النشا في الأغذية النشوية المطبوخة يمر من الأمعاء الدقيقة للإنسان دون أن يهضم . ولقد تبين أن ظهور هذا المكون مرهون أساسا بإجراء عملية الطهي ؛ ولقد إصطلح على تسميته بالنشا المقاوم للإنزيمات enzyme resistant starch (RS) .

ومن المعروف أن العوامل التي تؤثر على هضم النشا تشمل على :

- أ- درجة جليئة النشا .
- ب- مفاص حببيات النشا .
- ج- نسبة الأميلوز إلى الأميلوبكتين في جزيء النشا .
- د- وجود إرتباطات النشا بالبروتين .
- هـ- وجود معقدات بين الأميلوز والليبيدات .
- و- نسبة النشا الذي حدث له تجلد retrogradation .

ويمكن تقسيم النشا بناء على قابليته للهضم إلى ثلاثة أنواع هي :

- أ- نشا سهل الهضم في الأغذية للمطبوخة توا.
- ب- نشا مقاوم جزئيا للهضم كما في البطاطس الخام والموز .
- ج- نشا مقاوم للهضم (RS) ويكون نتيجة للمعاملة الحرارية للأغذية .

ولقد تبين أن كمية الـ RS في المخبوزات والعجائن الغذائية والبقوليات والبطاطس تعتبر كمية ضئيلة لا تزيد عن 3%.

ويعزى الإهتمام بالنشا المقاوم إلى أنه يدخل ضمن المكون غير الذائب الموجود بالأغذية (ولذا فإن البعض يعتبر الـ RS بمثابة أحد مكونات الألياف الغذائية) حيث أنه يقاوم الهضم بالإنزيمات في طرق التقدير الوزنية .

وقد أوضحت الدراسات التي أجريت على الصفات التغذوية للنشا المقاوم RS في الأغذية المطبوخة أنه لايقاوم التحليل المائي الإنزيمي في المعمل *in vitro* فحسب ولكن هذه المقاومة تمتد أيضاً إلى القناة الهضمية للإنسان *in vivo* وعند وصول النشا المقاوم إلى القولون فإنه يتخمر مع تكوين أحماض دهنية طيارة . وبالإضافة إلى الدراسات الفسيولوجية فقد أجريت دراسات فيزيوكيماوية لإماطة اللثام عن كيفية تكون النشا المقاوم . ويمكن القول بأن النظرية المتاحة حالياً مفادها أن النشا المقاوم يتكون نتيجة لعملية التجلد retrogradation أي عملية إعادة بلورة النشا ، فعند تبريد النشا المجلسن يتم إتحاد تلقائي لجزيئات النشا المعلقة ، ويتبلور جزء من النشا ويكون مقاوماً للتحلل الإنزيمي . ويتبين أنه

يمكن إذابة الـ RS فى محلول جزئى من هيدروكسيد البوتاسيوم أو فى محلول ثانى ميثايل سلفوكسيد . والنشا المذاب تحت هذه الظروف يمكن تحليله بالإنزيمات .

وقد أجريت دراسات حديثة باستخدام الطرق الإنزيمية وطرق المسح الحرارى التفريقى differential scanning calorimetry (DSC) وطرق قياس تشتت الأشعة السينية x-ray diffractometry وطرق الترشيح الجلى gel filtration ، ويتبين من هذه الدراسات أن الأميلوز يعد بمثابة العامل الرئيسى المسئول عن تكوين النشا المقاوم RS.

2-8-11 المثبطات الإنزيمية بالأغذية الحيوانية

Enzyme inhibitors in animal foods

تم إكتشاف مثبطات للإنزيمات البروتئوليتية فى مختلف إفرازات جسم الحيوانات وفى بنكرياس الأبقار وفى الدم وفى زلال البيض . ويتبين وجود نوعين أساسيين من مثبطات البروتئينز فى زلال البيض وهما الأوفوميوكيد ovomucoid ومثبط الأوفو ovoinhibitor . ويتميز الأول فى حالته النقية بثبات غير عادى ضد الحرارة إذ يكون فى مقفور هذا المثبط الإحتفاظ بنحو 90% من نشاطه بعد التسخين لدرجة حرارة 80°م لمدة 30 دقيقة وعند قيم pH تتراوح بين 3، 7 . أما مثبط الأوفو النقى المستخلص من الدجاج فإنه يتفاعل مع إنزيمات التربسين والكيموترپسين من عجول الأبقار ، وهذا المثبط يعتبر ثابتاً فى المحلول الحامضى حيث يحتفظ بنسبة تصل إلى نحو 93-95% من نشاطه بعد التسخين لدرجة حرارة 90°م لمدة 15 دقيقة عند قيم pH بين 3، 5 . أما عند pH = 7 فإن المثبط يفقد نشاطه إذا ما تم التسخين عند 90°م لمدة 15 دقيقة .

وتجدر الإشارة إلى أن المثبطات الموجودة بزلال البيض لا تسبب تثبيطاً لفعل الإنزيمات البروتئوليتية الموجودة طبيعياً بالبيض ، لكنها قد تقوم ببعض الوظائف الفسيولوجية فى أثناء تكوين الجنين أو أنها قد تعمل كمركبات مضادة لفعل الميكروبات أو الفيروسات .

9-11 تطبيقات تكنولوجيا الحمض النووى دى أوكسى ريبونيوكلريك (DNA) معاد الإتحاد فى إنتاج الإنزيمات

Application of recombinant deoxyribonucleic acid (DNA) technology in enzyme production

إن التطور الهائل فى تقنيات التكنولوجيا الحيوية biotechnology ومن بينها تقنية الـ DNA معاد الإتحاد قد إنعكس بدوره على إنتاج الإنزيمات وذلك باستخدام كائنات حية دقيقة مهندسة وراثياً genetically modified microorganism (GMM) . عامة

فإنه يمكن إستخدام تكنولوجيا الـ DNA معاد الإتحاد فى مجال الأغذية ، فى مجالات أربعة رئيسية هى :

- 1- دراسة العلاقة التركيبية والوظيفية للبروتينات والإنزيمات .
- 2- تحويل الكتلة الحيوية غير القابلة للأكل إلى كتلة قابلة للأكل .
- 3- إعادة برمجة المسارات الميتابولزمية فى الكائنات الحية المسنولة عن عمليات التخمر .
- 4- إنتاج بروتينات وبيبتيدات غذائية جديدة novel .

ويعتبر إنتاج الإنزيمات بواسطة الكائنات الحية الدقيقة المهندسة وراثيا (GMM) من أهم الإنجازات التى تحققت بواسطة تكنولوجيا الـ DNA معاد الإتحاد . بيد أنه ولسوء الحظ فإن معظم المعلومات المتاحة فى هذا الصدد ترتبط باستخدام بكتيريا القولون *Escherichia coli* وهى بكتيريا من منظور سلامة الغذاء . تلقى تحفظاً واضحاً من قبل المشتغلين بالتغذية وإنتاج الإنزيمات على حد سواء . لذا فقد بدأت بحوث دعوية لإجراء تحويل هندسى فى أنواع أخرى من البكتيريا وقد تحقق بالفعل نجاح ملحوظ إذ أمكن هندسة الميكروبات التالية وراثيا :

Bacillus subtilis

Streptococcus lactis

Streptococcus cremoris

وبالإضافة إلى نجاح هندسة البكتيريا وراثيا باعتبارها خلايا بدائية (*Prokaryote cells*) فقد نشط الباحثون لهندسة الخلايا الأكثر تعقيداً (*Eukaryotic cells*) مثل الخميرة والخلايا النباتية والحيوانية . وتجدر الإشارة إلى أن الكائنات الأخيرة إذا ماتت هندستها وراثيا فإنه سيكون فى مقدورها إنتاج منتجات متصلة tailor made من خلال تركيبها الوراثى . ولقد حدث تقدم ملموس فى إستخدام الـ DNA معاد الإتحاد فى إنتاج سلالات ميكروبية ومنتجات ميتابولزمية على درجة كبيرة من الأهمية فى مجال التصنيع الغذائى ، كما أن لهذا التكنيك عائداً مباشراً فى التصنيع الغذائى فى إنتاج المواد الغذائية الخام أو المصنعة .

وغنى عن القول بأن التقدم المذهل فى الهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية يأتى كل يوم بجديد فى مجال تطبيق الإنزيمات فى التصنيع الغذائى (فعلى سبيل المثال يعنى فريق بحثى بمعهد بحوث الغذاء IFR بإنجلترا حالياً بتحضير مركب الفانيلين من مخلفات التصنيع الزراعى agro-industrial wastes ، فلقد تمكن العالم تونى ميكائيل Tony Michael وفريقه البحثى من إكتشاف إنزيم ميكروبي جديد (تم تسجيل براءة إختراع به) يمكنه تحفيز تكسير حمض الفريوليك ferulic acid إلى مركب الفانيلين من خلال المسار الميتابولزى

لتكسر المركب الفينولي المعروف باسم الهيدروكسي سيناميت hydroxy cinnamate فلقد تبين أن الإنزيم المكتشف يحفز التفاعل التالي :



مما يشير إلى إمكانية تحضير الفانيلين من مخلفات التصنيع الزراعي والتي يمكن عن طريق معاملةها بإنزيم استيريز حمض الفريوليك ferulic acid esterase والذي يوجد في الجدر الخلوية النباتية تحفيز تحرر حمض الفريوليك من الجدر الخلوية ، والمركب الأخير يمكن تحويله في خطوة لاحقة إلى مركب الفانيلين (الفانيليا) .

References

10-11 المراجع

- Abdellah, H.A. (1989). Studies on Invertase : Immobilization, Properties and Utilization in Food Industries. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, University of Alexandria, Alexandria, Egypt.
- Abd El-Razek, A.M. (1996). Studies on the preparation and evaluation of vegetable oils and fats Interesterified by Immobilized lipase and their applications. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, University of Alexandria, Alexandria, Egypt.
- Caraskik, W. and Carrell, J. O. (1983). Development of immobilized enzymes for production of high fructose corn syrup. *Food Tech.*, **37(10)**: 85-91.
- Chibata, I and Tosez, T. (1980). Immobilized microbial cells and their applications. *Trends Biochem. Sci.* **5**: 88-90.
- Cyuchagawska, Z.; Sievert, D. and Pomeranz, Y. (1991). Enzyme resistant starch. IV. effects of complexing lipids. *Cereal Chem.*, **68**: 537-542.
- de Man, J.M. (1990). Principles of Food Chemistry-Second Edition. The AVI Book, Van Nost-Rand Reinhold, New York, USA.

- Dixon, M. and Webb, E. (1980). *Enzymes*. Third Edition. Academic Press, New York.
- El-Banna, A.A. (1976). Studies on the production of microbial renin. Ph.D. Thesis, Faculty of Agriculture, University of Alexandria, Alexandria, Egypt.
- Eerlingen, R.C.; Decevninck, M. and Delcovr, J.A. (1993). Enzyme resistant starch. II. Influence of amylose chain length on resistant starch formation. *Cereal Chem.*, **70**: 345-350.
- Eerlingen, R.C.; Grombez, M. and Delcour, J.A. (1993). Enzyme resistant starch. I. Quantitative and qualitative influence of incubation time and temperature of autoclaved starch on resistant starch formation. *Cereal Chem.*, **70**: 339-344.
- El-Sherif, F.E.A. (1985). Chemical and technological studies on food-glucose isomerase, induction, purification, properties, immobilization and technological application Ph.D. Thesis, Faculty of Agriculture, University of Alexandria, Alexandria, Egypt.
- El-Sahin, M.A. (1987). Studies on isolation of yeast producing milk-clotting enzyme and the factors affecting the enzyme production. Ph.D. Thesis, Faculty of Agriculture, University of Alexandria, Alexandria, Egypt.
- Englyst, H.N. and MacFarlane, G.T. (1986). Breakdown of resistant and readily digestible starch by human gut bacteria. *J. Sci. Food Agric.*, **37**, 699-706.
- Gee, J.M. and Johrson, T.T. (1985). Rates of starch hydrolysis and changes in viscosity in a range of common food subjected to simulated digestion *in vitro*. *J. Sci. Food Agric.*, **36**: 614-620.
- Gruchala, L. and Pomeranz, Y. (1992). Raw-starch degradation amylase (S) effect enzyme resistant starch. *J. Food Sci.*, **57**: 1433-1434.

- Gruchala, L. and Pomeranz, Y. (1993). enzyme-resistant starch: Studies using differential scanning calorimetry. *Cereal Chem.*, **70**: 163-170.
- Huttin, H.O. (1983). Current and potential uses of immobilized enzymes. *Food Technol.*, **37(10)**: 66-82.
- Ismail, H. (1992). Technology of producing high fructose syrups Lecture Given in the Second Alexandria Conference Held on March, 1992. Faculty of Agriculture, University of Alexandria, Alexandria, Egypt.
- Mohaseb, N.A.E. (1992). Studies on some pectinolytic enzymes produced by *Volvariella volvaceae* using citrus peels wastes and factors affecting their production. M.Sc., Thesis, Faculty of Agriculture, University of Alexandria, Alexandria, Egypt.
- Old, R.W. and Primrose, S.B. (1980). Principles of gene manipulation. University of California Press-Berkeley, U.S.A.
- Olson, N.F. and Richardson, T. (1974). Immobilized enzymes in food processing and analysis. *J. Food Sci.*, **39**: 653-659.
- Pomeranz, Y. (1992). Research and development regarding enzyme resistant starch (RS) in the USA. A Review. *Eur. J. Nutr.* **46**: 563-568.
- Price, N.C. and Stevens, L. (1982). Fundamentals of enzymology. Oxford University Press, New York.
- Ring, S. G., Gee, J. M.; Wittam, M.; Orford, P. and Johnson, L. T. (1988). Resistant starch: its chemical form in food stuff and effect on digestibility *in vitro*. *Food Chem.*, **228**: 97-109.
- Shaban, E.A. (1996). Chemical and technological studies on some foods: Studies on glucose isomerase produced from some plant

sources. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Kafr El-Sheikh, Tanta University, Egypt.

- Sievert, D. and Pomeranz, Y. (1989). Enzyme-resistant starch. I. Characterization and evaluation by enzymatic, thermoanalytical and microscopic methods. *Cereal Chem.*, **66**: 342-347.
- Sievert, D. and Pomeranz, Y. (1990). Enzyme-resistant starch. II. Differential scanning calorimetry studies on heat treated starches and enzyme resistant starch residues. *Cereal Chem.*, **67**: 217-221.
- Sprossler, B. and Plainer, H. (1983). Immobilized lactose for Processing Whey. *Food Technol.* **37**(10): 93-95.
- Stanley, W. L. and Olson, A. C. (1974). The chemistry of immobilizing enzymes. *J. Food Sci.*, **39**: 660-666.
- Stryer, L. (1991). Biochemistry W. H. Freeman and Company San Francisco, USA.
- Szczodrak, J. and Pomeranz, Y. (1992). Starch. lipid interactions and formation of resistant starch in high amylase barley. *Cereal Chem.*, **69**: 626: 632.
- Voet, D. and Voet, J. (1995). Biochemistry. Second Edition John Wiley & Sons Inc. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Watson J. D., Tooze, J. and Kurtz, D. T. (1983). Recombinant DNA. A Short Course. W.H. Freeman and Company, New York, USA.
- Weetall, H.H. (1975). Immobilized enzymes and their application in the food and beverage industry. *Process Biochem.*, **10**: 3-6.
- Wilson, K. and Walker, J. (eds) (1995). Practical Biochemistry. Principles and Techniques. Fourth Edition. Cambridge University Press, New York, USA.