الفصل الخامس

الإنتاج الصناعي للإنزيمات
THE INDUSTRIAL PRODUCTION OF ENZYMES

ريتا راني سينغانيا، أنيل كومار باتيل، و أشوك باندي

Reeta Rani Singhania, Anil Kumar Patel, and Ashok Pandey

(١ , ٥) المقدمة Introduction

الإنزيمات هي جزيئات بروتينية (ما عدا الريبوزيمات، التي هي جزيئات الحمض النووي الريبوزي، RNA) تحفز التفاعلات الكيميائية الحيوية. في التفاعلات الإنزيمية، يتم تحويل الجزيئات في بداية العملية، التي تدعى أوساط تفاعل، إلى جزيئات مختلفة، المنتجات. وتزيد الإنزيمات من سرعة التفاعل عن طريق تكوين متراكبات مع وسط التفاعل في مرحلة انتقالية، والتي تقلل من طاقة تنشيط التفاعل. وتعدُّ الإنزيمات جذابة للأغراض الصناعية؛ بسبب فعاليتها وانتقائيتها في التفاعلات الكيميائية التي تقوم بتسريعها، وهي تتصرف بطريقة مماثلة للمحفزات غير العضوية المستخدمة في الصناعة الكيميائية.

وتقنية الإنزيمات هي مجال متداخل التخصصات، وتستخدم الإنزيمات بصفة روتينية في كثيرٍ من القطاعات الصناعية غير الضارة بالبيئة. وقد فتحت التطورات الأخيرة في مجال التقنية الحيوية، وخصوصاً في مجالات الهندسة الوراثية والبروتينية، ساحة جديدة لتطبيق الكثير من الإنزيمات في العمليات الصناعية. وتعدُّ الإنزيمات الصناعية بمثابة القلب من العمليات الحيوية. وقد شهدت الكثير من مبادرات البحث والتطوير R&D الكبرى، ليس فقط تطوير عدد من المنتجات الجديدة، ولكن أيضاً تحسينات في العملية وأداء الكثير من العمليات القائمة. وتحتاج جميع العمليات تقريباً في الخلية الحيوية إلى الإنزيمات لكي تتم بمعدلات ذات دلالة. وحيث إن الإنزيمات انتقائية لأوساط تفاعلاتها وتزيد من سرعة القليل من التفاعلات فقط من بين الكثير من الاحتمالات، فإن مجموعة الإنزيمات الموجودة في الخلية تحدد المسارات الأيضية التي تحدث في الخلية.

وقد استخدمت الإنزيمات على مر التاريخ البشري في صناعة الجبن وتصنيع الغذاء بصورة غير مباشرة عن طريق الخمائر والبكتيريا. وقد استخدمت الإنزيمات المعزولة في المنظفات للمرة الأولى في عام ١٩١٤م، على الرغم

من عدم إثبات طبيعتها البروتينية حتى عام ١٩٢٦م، وقد بدأ الإنتاج البكتيري على نطاق كبير في ستينيات القرن العشرين. وتنمو تجارة الإنزيمات الصناعية باطراد؛ بسبب تحسين تقنيات الإنتاج، وهندسة خصائص الإنزيم، والتطبيقات الجديدة.

(٥ , ٢) إنتاج الإنزيم Enzyme Production

تنتج معظم الإنزيمات تجارياً بواسطة الكائنات الدقيقة من خلال التخمير المغمور، على الرغم من أن بعضها ينتج خلال التخمير الصلب. وتنتج الإنزيمات الصناعية الكبرى من الكائنات الحية الدقيقة المعترف بها عموماً ككائنات آمنة الاستخدام GRAS-Status في مفاعلات حيوية كبيرة تدعى المخمرات. ومع ذلك، لا يزال استخراج بعض الإنزيمات يتم من الأنسجة الحيوانية أو النباتية. وتشمل الإنزيمات التجارية المشتقة من النباتات الإنزيمات المحللة للبروتين البابين، البروميلين، والفايسين وبعض الإنزيمات التخصصية الأخرى، مثل إنزيم الليبوكسيجينيز من فول الصويا. وتشمل الإنزيمات المشتقة من الحيوانات الإنزيمات المحللة للبروتين مثل إنزيم الببسين والمنفحة. عادة ما يتم تعديل الكائن الدقيق المنتج وكذلك الإنزيم وراثياً للإنتاجية القصوى والخصائص المطلوبة للإنزيم. وتعتمد خطوات المعاملة النهائية للإنزيمات الصناعية على درجة النقاء المطلوبة، والتي تعتمد بدورها على التطبيق. وعادة لا تتم تنقية الإنزيمات الصناعية التي تنتج بأحجام كبيرة، ولكنها تباع على صورة سوائل مركزة أو حبيبات منتجات جافة. والإنزيمات المستخدمة في التطبيقات الخاصة، مثل تقنيات التشخيص أو الحمض النووي تحتاج إلى أن تكون نقية بصورة عالية جداً.

ويمكن تقسيم عملية إنتاج الإنزيم إلى مراحل كما هو مبين في الشكل رقم (١ , ٥).

(١ , ٢ , ٥) اختيار الإنزيم المناسب Selection of a Suitable Enzyme

تشمل المعايير المستخدمة في اختيار الإنزيم الصناعي التخصصية، ومعدل التفاعل، ودرجة الحموضة ودرجة الحرارة القصوى والثبات، وتأثير المثبطات، والانجذاب إلى أوساط التفاعل. وهناك إنزيمات خاصة مطلوبة بخصائص معينة على أساس التطبيقات، على سبيل المثال ينبغي ألاَّ تحتوي الإنزيمات المستخدمة في صناعة الورق على نشاط محلل للسليولوز كنشاط جانبي؛ لأن هذا سيضر بألياف السليلوز. يجب أن تتحمل الإنزيمات المستخدمة في صناعة العلف الحيواني درجات الحرارة لتنجو من عملية الدفع الساخنة المستخدمة في تصنيع العلف الحيواني، ولكن في الوقت نفسه يجب أن يكون لها درجة نشاط قصوى في درجة حرارة جسم الحيوان. ويجب أن تتحمل الإنزيمات المستخدمة في التطبيقات الصناعية عادة مختلف المعادن الثقيلة ولا تحتاج إلى العوامل المساعدة.

الشكل رقم (١ , ٥). الخطوات المستخدمة في إنتاج الإنزيم.

(٢ , ٢ , ٥) اختيار سلالة إنتاج مناسبة Selection of a Suitable Production Strain

يتعين مراعاة عدة جوانب عند اختيار مصدر مناسب لإنتاج الإنزيم. الكائنات الدقيقة هي المصدر المفضل للإنزيمات الصناعية بدلاً من النباتات أو الحيوانات؛ وذلك بسبب معدل تكاثرها السريع وسهولة زراعتها. خلال العقود القليلة الماضية، ازداد استخدام الفطريات الخيطية لإنتاج منتجات الأيض الأولية والثانوية بسرعة. بوجهٍ عام، تفضل الكائنات المنتجة للإنزيم خارج الخلية على الكائنات المنتجة للإنزيم داخل الخلية؛ لأن عمليات الاسترداد والتنقية تكون أبسط بكثير؛ فالإنزيمات المنتجة داخل الخلايا يجب تنقيتها من بين آلاف البروتينات الخلوية المختلفة والمكونات الأخرى. ثانياً، ينبغي أن يكون الكائن المنتج آمن الاستخدام (GRAS-Status)، وهذا أمر مهم خصوصاً عند استخدام الإنزيم المنتج في العمليات الغذائية. ثالثاً، ينبغي للكائن أن يكون قادراً على إنتاج كميات كبيرة من الإنزيم المطلوب في فترة زمنية معقولة.

وقد مكَّنَتْ التطورات الجديدة في الفحص من البدء بالظروف المثلى للعملية، تقرير الخصائص المطلوبة للمحفز الحيوي (الإنزيم)، والتحول من خلال التنوع الحيوي الطبيعي للمحفز الحيوي المثالي [١]. بالإضافة إلى

obeikandi.com

ذلك، يمكن دفع المحفزات الحيوية المتاحة لأقصى ظروف التشغيل والقيود المادية للبروتينات عن طريق التطور الموجه أو خلط الجينات [٢-٤]. ويخلق تطوير أساليب فعالة لإنشاء ومعاملة التنوع تحديات جديدة في مناهج الفحص ويسبب اتجاهاً نحو المعالجة الروبوتية، والمعدات الجديدة (على سبيل المثال، الكهربية الشعرية الموازية، وصفائف الثرمستور)، والفلوروفورات والكروموفورات الجديدة، والمناهج الجديدة للكشف عن الانتقائية المجسمة [٥]. بالإضافة إلى ذلك، أصبح الكثير من المصادر الجديدة للإنزيمات متاحاً مثل الكائنات المتحملة للظروف القاسية [٦-١٠]، والكائنات غير القابلة للزراعة (www.diversa.com)، وتسلسلات الجينوم الكاملة (www.ncbi.com).

إن استخدام السلالات الأصلية من الكائنات الدقيقة الحية له الكثير من المزايا؛ لأنها في كثيرٍ من الأحيان تنتج خليط من الإنزيمات اللازمة لتحليل أوساط التفاعل المعقدة. ولكن بعض الكائنات الدقيقة الحية الأصلية ليس من السهل تصعيد عملية إنتاجها، وقد يشكل بعضهم مخاطر على السلامة. في معظم الحالات، يمتلك الكائن الحي الدقيق المعدل وراثياً مدى أكبر من الإنزيمات ذات الخصائص المختلفة، مثل تحسين النشاط أو التخصصية، والاستخدام الآمن، وانخفاض المحتوى من البروتينات الخارجية. وعادة ما تنتج السلالات الصناعية أكثر من ٥٠ جم/ لتر من بروتينات الإنزيم خارج الخلية. ومعظم الإنزيمات الصناعية تنتج بواسطة ميكروبات قليلة نسبياً، مثل فطريات الأسبرجلس والترايكوديرما، وفطر الإستربتوميسيس إمبرفيكتاي، والبكتيريا العصوية. والخمائر ليست جيدة لإنتاج الإنزيمات خارج الخلية ونادراً ما تستخدم لهذا الغرض.

(٥,٢,٣) طريقة الإنتاج Production Methodology

بعد اختيار الكائنات الحية الدقيقة، يجب تطوير عملية الإنتاج. وقد استخدم تخمير الزراعة المغمورة على نطاقٍ واسع للإنتاج الصناعي من الإنزيمات حتى الآن، ولكن تكتسب تخميرات الزراعة بالحالة الصلبة الاهتمام في جميع أنحاء العالم بسرعة لإنتاج منتجات الأيض الأولية والثانوية [١١-١٣]. ويتيح استخدام المخلفات الزراعية الصناعية مزايا محتملة في عمليات تخمير الحالة الصلبة [١٤-١٧]. ويشمل تحسين عملية التخمير اختيار تكوين البيئة الغذائية، وطريقة الزراعة، وظروف العملية بغض النظر عن نوع العمليات الحيوية ويجب بذل المزيد من الجهد والوقت لإنجاز هذه المهام. وقبل البدء في أي عملية حيوية، يجب النظر إلى جوانب عدة: هل الكائن محل الدراسة آمن؟ هل تتطلب العملية احتياطات إضافية؟ أي نوع من المواد الغذائية يحتاجها الكائن الدقيق وما هي التركيزات المثلى/ الاقتصادية لها؟ كيف ينبغي تعقيم المواد الغذائية؟ أي نوع من المفاعلات الحيوية (نقل الكتلة، والتهوية والتبريد، ومراقبة الرغوة، وأخذ العينات)؟ ما المتغيرات التي يجب قياسها، وكيف يتم التحكم في

العملية؟ ما طريقة الزراعة الأفضل لهذا الكائن الحي (زراعة ذات دفعة واحدة، أو تغذيه على دفعات، أو زراعة مستمرة)؟ ما هي الظروف المثلى للنمو، ومعدل النمو النوعي ومعدل تكوين المنتج، والعائد والإنتاجية الحجمية؟ كيف يمكن تعظيم تركيز الخلية في المفاعل؟ كيف ينبغي تحليل الخلية إذا كان المنتج داخل الخلايا، وكيف يمكن استرداد المنتج، وتنقيته، وحفظه؟ واختيار عملية التخمير هو أمر بالغ الأهمية أيضاً، ويعتمد بصورة حصرية على المنتج النهائي وتطبيقاته النهائية.

(١, ٣, ٢, ٥) التخمير بالطريقة المغمورة Submerged Fermentation

يجري معظم الإنتاج الصناعي للإنزيمات بالتخمير المغمور، وتستخدم عادة السلالات المعدلة وراثياً. والمفاعلات الحيوية للتخمير المغمور متطورة بشكلٍ جيد وتتيح التحكم المباشر (Online control) للعديد من العوامل ولا توجد مشكلة في نقل الكتلة وإزالة الحرارة. وتنتج الإنزيمات الصناعية ذات حجم الإنتاج الكبير في مخمرات ذات سعة من ٥٠–٥٠٠ م^{٣}. وتكون البيئة الغذائية في التخمير المغمور سائلة وتبقى متصلة بالكائنات الحية الدقيقة. ومن الضروري وجود إمداد من الأوكسجين في التخمير المغمور.

هناك أربع طرق رئيسة لزراعة الكائنات الحية الدقيقة في التخمير المغمور: الدفعة الواحدة، والتغذية على دفعات، ونضح الدفعة الواحدة، والزراعة مستمرة. في زراعة الدفعة الواحدة يتم تلقيح الكائنات الدقيقة في حجم ثابت من البيئة الغذائية. وفي حالة زراعة التغذية على دفعات تتم إضافة المكونات الغذائية المركزة تدريجياً إلى زراعة الدفعة الواحدة، وفي زراعة نضح الدفعة الواحدة، يتم إضافة البيئة الغذائية وسحب حجم مساوي من البيئة الغذائية المستخدمة بدون خلايا. وفي الزراعة المستمرة تضاف بيئة غذائية جديدة إلى زراعة الدفعة الواحدة في مرحلة النمو الأسي أو الإطرادي للكائن الدقيق مع سحب مقابل للبيئة الغذائية المحتوية على المنتج. وتعطي الزراعة المستمرة نمو متوازن بصورة تقريبية، مع القليل من التأرجح في المواد الغذائية، ونواتج الأيض، وأعداد الخلايا، أو الكتلة الحيوية.

غالباً ما يتم استرداد الإنزيمات المنتجة خارج الخلية بعد إزالة الخلايا (عن طريق الترشيح بأسطوانات الفراغ، أو الأجهزة الفاصلة أو الترشيح الدقيق) بواسطة الترشيح الفائق. وإذا لزم الأمر، تتم التنقية بواسطة التبادل الأيوني أو الترشيح الهلامي. ويكون المنتج إما سائل مركز مع المواد الحافظة الضرورية مثل الأملاح أو البوليولات، وإما بصورة بديلة كمنتج محبب إلى جاف غير مغبر. وينبغي أن نتذكر أن الإنزيمات هي بروتينات، ويمكن على هذا النحو أن تسبب وقد سببت في الماضي تفاعلات حساسية. لذا من الضروري اتخاذ تدابير وقائية في إنتاجها وتطبيقها.

(٢,٣,٢,٥) التخمير بالحالة الصلبة Solid-State Fermentation

التكلفة العالية لإنتاج الإنزيمات بالطريقة المغمورة تجعلها غير اقتصادية لاستخدام الكثير من الإنزيمات في عدة عمليات صناعية. وللحد من تكاليف الإنتاج، فإن التخمير بالحالة الصلبة يعد بديلاً جذاباً. وهذه هي عملية تخمير منخفضة التكلفة، ومناسبةً بصفة خاصة لتطوير العمليات الحيوية باستخدام المخلفات الزراعية. ويبدو أن التخمير بالحالة الصلبة يمتلك عدة مزايا في التقنية الحيوية، مثل زيادة إنتاجية التخمير، وارتفاع التركيز النهائي للمنتجات، وزيادة ثبات المنتج، وقلة الكبح الهدمي، وزراعة الكائنات الدقيقة المتخصصة لأوساط التفاعل غير القابلة للذوبان في الماء أو الزراعة المختلطة للفطريات المختلفة، وأخيراً وليس آخراً، انخفاض الحاجة إلى التعقيم؛ بسبب نشاط المياه المنخفض [١٨]. على الرغم من أن معظمها يتم في الوقت الحاضر في نطاق المختبر. وقد أصبح التخمير بالحالة الصلبة شعبياً حيث إن عدداً كبيراً من الإنتاج الصناعي للإنزيمات يستخدم السلالات الفطرية التي هي أكثر ملاءمة لتخمير الحالة الصلبة، حيث تماثل بيئتها الطبيعية بصفة أكثر. فتخميرات الزراعة المغمورة لا تحاكي البيئات الطبيعية للكائنات الدقيقة الأصلية.

وتصعيد العملية، والتنقية، وتقدير الكتلة الحيوية هي التحديات الرئيسة التي أدت بالباحثين إلى البحث عن حلول. وقد كان تصعيد العملية في تخمير الحالة الصلبة لفترة طويلة عاملاً مقيداً، ولكن في الآونة الأخيرة مع ظهور هندسة الكيمياء الحيوية تم تصميم عدد من المفاعلات الحيوية التي تتغلب على مشكلات تصعيد العملية، وإلى حدٍ ما، أيضاً في التحكم المباشر للعوامل الكثيرة، وكذلك نقل الحرارة والكتلة.

على الرغم أن عمليات استرداد المنتج هي أكثر تكلفة في تخميرات الحالة الصلبة، حيث تستخدم دعائم طبيعية، فإن استخدامها يفترض الخفض في تكاليف الإنتاج وعادة ما يتم الحصول على نشاط عالي للإنزيم [١٩]. وعليه، ينبغي أن يتم إجراء تقييم اقتصادي للعملية الشاملة قبل تحديد جدواها لغرضٍ ما. ويكون هذا النظام مناسباً خاصةً لإنتاج منتجات عالية القيمة مثل الإنزيمات. هناك تطبيقات خاصة حيث تكون هناك حاجة أكثر لمنتجات نهائية مركزة بكميات مرتفعة بدلاً من المنتجات النقية. على سبيل المثال، يتطلب التحويل الحيوي للكتلة الحيوية إنزيم سليوليز خام مركز، وفي صناعة الجلود تكفي إنزيمات البروتييز الخام لإزالة الشعر من الجلود.

ويشكل فصل الكتلة الحيوية تحدياً كبيراً في تخميرات الحالة الصلبة، وهذا أساسي للدراسات الحركية. وبعض الطرق غير المباشرة متاحة، مثل تقدير الجلوكوزامين، وتقدير الإرجوستيرول، وتقدير البروتين (كيلدال)، وتقدير الحمض النووي، والتغيرات في الوزن الجاف، وانبعاث ثاني أكسيد الكربون، ولكن كل هذه الطرق لها نقاط ضعف. وحديثاً تم تطوير معالجة الصور الرقمية كأداة لقياس الكتلة الحيوية في تخميرات الحالة الصلبة. يتم الحصول على الصور بواسطة مجهر مجسم وكاميرا رقمية ومعالجتها باستخدام برنامج KS400 [٢٠]. وفي الآونة

الأخيرة اعتبر تقدير امتصاص الأوكسجين ومعدل انبعاث ثاني أكسيد الكربون هما الأكثر دقة لتحديد نمو الكائنات الحية الدقيقة [٢١-٢٢].

دافع تينجيردي [٢٣] عن أن تخمير الحالة الصلبة كان مناسباً بصفةٍ خاصة لإنتاج الإنزيم المحلل للجنوسليولوز في الكثير من تطبيقات التقنية الحيوية الزراعية. لتوضيح ذلك، تم مقارنة إنتاج السليوليز في تخمير الزراعة المغمورة وتخمير الحالة الصلبة [٢٣، ٢٤]. في مخمر الزراعة المغمورة، كانت إنتاجية السليوليز عموماً ١٠ جم/ لتر، وكانت تكلفة التخمير في المتوسط في مفاعل حيوي ذو المقلب حوالي ٢٠٠ دولار أمريكي / م^{3}. وعليه، فإن تكلفة الإنتاج للتخمير بالزراعة المغمورة دولار تقريباً ٢٠ دولاراً أمريكياً/ كجم. في تخمير الحالة الصلبة، كان مستوى الإنتاج المتوسط حوالي ١٠ملجم/ جم من الوسط، ومتوسط تكلفة التخمير فقط ٢٥ دولاراً أمريكياً / طن متري. وعليه، فإن تكلفة الوحدة من السليوليز المنتج بتخمير الحالة الصلبة تقريباً ٠,٢ دولار أمريكي/ كجم [١٦، ٢٣].

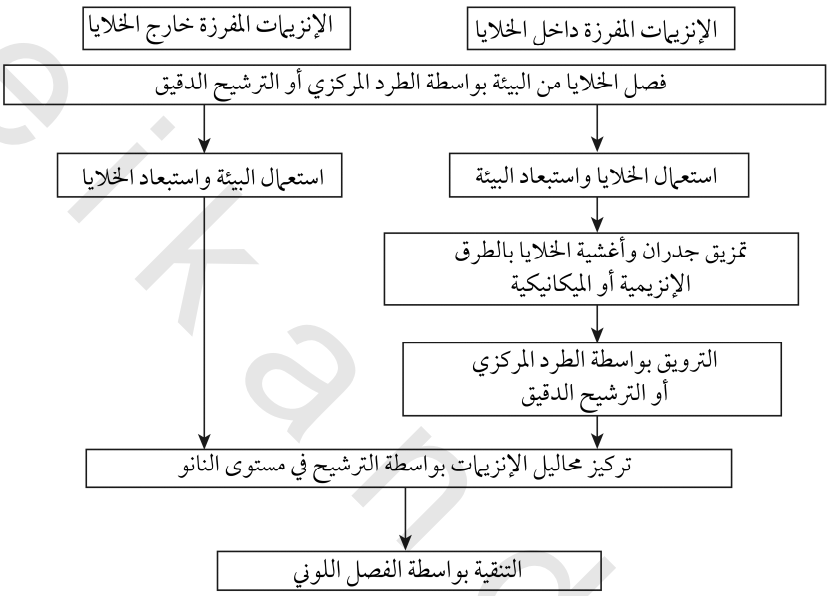
ويتوفر الكثير من المعلومات المنشورة عن إنتاج الإنزيمات ذات الأهمية الصناعية بالتخمير المغمور أو الصلب، مثل البروتييز، والسليوليزات، واللجنينزات، والزايلانيزات، والبكتينيز، والأميليز، والجلوكوأميليز، والإنيولينيزات، والفيتيز، والتنيز، واستريز الحامض الفينولي، والمنفحة الميكروبية، وأوكسيديز الكحول الأريلي، وأوكسيديز سكريات الأوليجو، وهيدروليز أسيل التانين، وألفا-أرابينوفيورانوسيديز [٢٥-٣٤].

(٤ , ٢ , ٥) المعاملة النهائية Downstream Processing

تعادل تكلفة تنقية وتكييف الإنزيمات للاستخدام النهائي، أي المعاملة النهائية، أكثر من ٥٠٪ من مجموع تكلفة إنتاج الإنزيم. وتعتمد تكلفة المعاملة النهائية على درجة النقاء المطلوبة، ومن ثم على الاستخدام النهائي للإنزيم. وبشكلٍ واضح تكون تكلفة المعاملة النهائية لإنزيم علاجي أعلى منها لإنزيم تقني بسبب النقاء المطلوبة، ويجب تحسين المعاملة النهائية بغية الحد من تكلفة الإنتاج. ويظهر الشكل رقم (٢ ,٥) الخطوات الأولية لتنقية الإنزيم.

بعد خطوات الترويق، يتم تنقية المحلول المحتوي على الإنزيمات الناتجة داخل وخارج الخلايا إضافياً بواسطة الترشيح الفائق. ويجب في هذه الخطوة الخاصة معرفة الوزن الجزيئي للبروتين المطلوب تنقيته، بحيث يمكن إزالة الشوائب مثل الأيونات والبروتينات صغيرة الوزن الجزيئي. وحتى بعد الترشيح الفائق، فإن محلول الإنزيم المركز لا يزال يحتوي على بروتينات أخرى، وأحماض نووية، وسكريات عديدة. وتتوقف إزالة هذه الشوائب بشكلٍ صارم على استخدام الإنزيم، وتعتمد أيضاً على ما إذا كانت الشوائب تثبط عمل الإنزيم كعامل

محفز في عملية معينة. وفي حالة الإنزيم المعدل وراثياً، فإن إزالة الحامض النووي ضرورية للحد من مخاطر نقل الجينات غير المرغوبة. ويفضل استخدام تقنية الفصل اللوني في تركيز الإنزيم، حيث تستخدم كمية قليلة من المادة المدمصة لادمصاص البروتين إذا كان في صورة مركزة. وعادة ما تتم تنقية الإنزيمات بالفصل اللوني. وتستخدم خصائص الإنزيم المختلفة، مثل الحجم الجزيئي، وشحنة السطح، وقابلية سطح الإنزيم للذوبان في المحاليل، لفصله باستخدام مواد مختلفة للفصل اللوني الإدمصاصي.



الشكل رقم (٢, ٥). الخطوات الأولية المستخدمة في عمليات التجهيز النهائية للإنزيمات.

وعادةً ما شملت تنقية الإنزيم من رائق مركز متجانس في السابق خمس خطوات على الأقل بما فيها الفصل اللوني، ومن الممكن خلال هذا فقد ١٠٪ من الإنزيم خلال كل خطوة تنقية، مما يؤدي إلى انخفاض استرداد الإنزيم. وتبعاً لذلك فإن زيادة استرداد الإنزيم ومن ثم تقليل خطوات التنقية مهمة جداً لخفض تكلفة الإنزيم. وقد تحسنت مؤخراً هندسة عملية الفصل اللوني إلى حدٍ كبير، بما في ذلك تطوير عملية فصل لوني مستمرة مثل محاكاة السرير المتحرك والفصل المستمر، والتي استحدثت مؤخراً في المعاملة النهائية للبروتينات [٣٥]. وعليه فمن الممكن تنقية الإنزيمات الآن مع معدل استرداد عالٍ وعدد محدود من الخطوات، مما يساعد في خفض تكلفة الإنزيم.

(٥, ٣) تحسين الإنزيم Enzyme Improvement

على الرغم من جاذبيتها العالية في عمليات التخليق الحيوية والكيميائية، فقد لا تمتلك الإنزيمات الخصائص المطلوبة عندما تعمل على نطاق صناعي. فعلى سبيل المثال، قد تفقد استقرارها أو ثباتها مع التغيرات في ظروف

التشغيل، أو نشاطها العالي في البيئات غير المائية، أو قدرتها على العمل بدون عوامل مساعدة. ولا يزال التعريف السريع والموثق لاستبدالات الأحماض الأمينية التي تولد التغييرات المطلوبة في أداء الإنزيم هو الهدف النهائي لبحوث هندسة البروتين.

ويمكن تحسين الثبات الحراري عن طريق التطفيرات موجهة المكان والتطفيرات العشوائية، وكذلك عن طريق التطفيرات الموجهة. وهذه الآن تقنيات مؤكدة.

ولقد ثبت أن الإنتاج الإفراطي للإنزيمات في كائن مناسب صعب جداً. والبديل الآخر هو أن تتم هندسة إنزيم متوفر بصورة تجارية ليكون محفزاً صناعياً بصورة أفضل. في المستقبل، قد يمكن إعادة تصميم الإنزيمات لتناسب العمليات الصناعية بصورة أفضل، على سبيل المثال، جعل إنزيم مصاوغة الجلوكوز أقل عرضة للتثبيط بواسطة الكالسيوم (٢+) الموجود في تيار معالجة تسكر النشا. ويمكن زيادة كمية الإنزيم المنتج بواسطة الكائن الحي الدقيق من خلال زيادة عدد نسخ الجين الذي يرمز لذلك الإنزيم. وقد استخدم هذا المبدأ لزيادة نشاط إنزيم البنسلين-ج-أميديز في إيشيريشيا القولون. وتعدُّ التطفيرات موجهة المكان نهج آخر لتخليق إنزيمات جديدة. وهي تشمل استبدال متدرج لحمض أميني واحد فقط أو اثنين من التركيب الكلي للبروتين.

على الرغم من توافر قاعدة بيانات كبيرة وسريعة النمو لارتباطات التسلسل بالتركيب، جنباً إلى جنبٍ مع البرمجيات اللازمة، فإنه لا يزال من المستحيل التنبؤ بدقة بالتغييرات ثلاثية الأبعاد الناتجة من إستبدالات من هذا القبيل. فالمشكلة الرئيسة هي تقييم الآثار طويلة المدى، بما في ذلك تفاعلات المذيبات على التركيب الجديد. وعلى ما يبدو، فحتى تغييرات التسلسل ولو كانت صغيرة جداً قد تؤدي إلى تغييرات كبيرة في التكوين الجزيئي، وهذه قد تؤثر في الخطوة المحددة لمعدل النشاط في الحفز الإنزيمي.

ومع ذلك، فمن المعقول أن نفترض أنه مع وجود قاعدة بيانات مفصلة بصورة كافية بالإضافة إلى البرمجيات المناسبة، فإن الإحتمال النسبي للنجاح سوف يزيد في السنوات القادمة، وسوف يكون لمنتجات هندسة البروتين تأثيراً رئيساً على تقنية الإنزيم.

(١, ٣, ٥) تقنية الحامض النووي المعدل Recombinant DNA Technology

تمثل الكائنات الحية الدقيقة المعزولة من بيئات متنوعة مصدراً للإنزيمات التي يمكن استخدامها في كيمياء العمليات الصناعية. باستخدام طرق الفرز عالية الإنتاجية (HTS) يمكن إيجاد محفزات حيوية جديدة من هذه الكائنات الحية الدقيقة. ولكن الكثير من الكائنات الحية الدقيقة ليس من السهل زراعتها في الظروف المعملية أو أن إنتاجية إنزيماتها منخفضة جداً لتكون مجدية اقتصادياً. وباستخدام تقنية الحمض النووي المعدل، فإن

استنساخ الجينات التي ترمز لهذه الإنزيمات والتعبير عنها بصورة مغايرة في السلالات الصناعية قد أصبح ممارسةً شائعة.

ويمكن الحصول على الإنزيمات الجديدة الملائمة لظروف خاصة عن طريق تعديل الكائنات الحية الدقيقة وراثياً. وتمكن تقنية الحمض النووي المعدل من إنتاج إنزيمات بمستويات أكبر بمائة ضعف من التعبير الأصلي، مما يوفرها بتكلفة منخفضة وبكميات كبيرة [٣٦]. ونتيجةً لذلك، تم توفير الكثير من إنزيمات تصنيع الغذاء المهمة، مثل الأميليز، والليبيز، مع خصائص مصممة لتطبيقات معينة في الغذاء. وقد تم هندسة عدة سلالات ميكروبية لزيادة إنتاجية الإنزيم عن طريق حذف الجينات الأصلية المرمزة لإنزيم البروتييز خارج الخلية. وعلاوةً على ذلك، فقد تم تعديل بعض السلالات الفطرية لتقليل أو القضاء على قدرتها على إنتاج منتجات الأيض الثانوية السامة [٣٧]. وهذا النهج يحول دون نقل أي حمض نووي خارجي أو غير معرف من الكائنات المانحة إلى سلالة الإنتاج.

(٢, ٣, ٥) هندسة البروتين Protein Engineering

على الرغم من أن استخدام تقنية الحمض النووي المعدل يخفض تكلفة إنتاج الإنزيم بصورة ملحوظة، فإن تطبيقات الإنزيمات المنتجة لا تزال محدودة. ومعظم المواد الكيميائية ذات الأهمية الصناعية ليست أوساط تفاعل طبيعية لهذه الإنزيمات. وإذا تم العثور على نشاط إنزيمي مرغوب، فغالبًا ما تكون الإنتاجية منخفضة. وعلاوةً على ذلك، عادة ما تكون الإنزيمات غير ثابتة في ظروف التفاعل القاسية، مثل ارتفاع أو انخفاض قيمة الرقم الهيدروجيني عن درجة ٧ الفسيولوجية، ودرجة الحرارة العالية، أو وجود المذيبات العضوية المطلوبة لإذابة الكثير من أوساط التفاعل. ومع التطورات الحديثة في تقنية تفاعل تسلسل البلمرة (PCR)، فإن التطفيرات موجهة المكان والتطفيرات العشوائية تتوفر لتحسين ثبات الإنزيم في مدى أوسع من قيم الرقم الهيدروجيني ودرجات الحرارة وتحمل مجموعة متنوعة من المذيبات العضوية.

وحيث إنه يمكن الحصول على كمية كبيرة من الإنزيم بواسطة التعبير المؤتلف، فإنه يمكن استخدام فصل البلورات لأشعة إكس لتسهيل فهم التركيب الرباعي للإنزيم ومواضع تعرفه وارتباطه بوسط التفاعل. ويمكن أن تساعد هذه المعلومات في التصميم الرشيد للإنزيم، والتنبؤ بتغيرات الأحماض الأمينية لتغيير تخصصية وسط التفاعل، ومعدل الحفز، وانتقائية المتشابهات (في حالة التخليق الفراغي للمركب).

عادةً ما تستخدم طريقتان لإنتاج الطفرات بواسطة تفاعل تسلسل البلمرة –التطفيرات موجهة المكان العشوائية أو المشبعة، وخلط الجينات– ولهندسة إنزيم متاح تجارياً ليكون محفزاً صناعياً أفضل يوجد نهجين مختلفين

متاحين في الوقت الحاضر: طريقة عشوائية تدعى التطور الموجه (انظر الفصل الرابع)، وطريقة هندسة البروتين تسمى التصميم الرشيد.

في هندسة البروتين يتم تغيير تسلسل البروتين لتحقيق النتيجة المرجوة، مثل تغيير تخصصية وسط التفاعل أو زيادة الثبات لدرجة الحرارة، والمذيبات العضوية، و/ أو قيم الرقم الهيدروجيني المتطرفة. ويوجد الكثير من الطرق المتخصصة لهندسة البروتين، ولكن يمكن تقسيمها إلى فئتين رئيستين: التصميم الرشيد والطرق الاندماجية. ويتطلب التصميم الرشيد، مثل التطفيرات الموجهة المكان، استبدالات مستهدفة للأحماض الأمينية، وعليه يتطلب معرفة واسعة عن المحفز الحيوي قيد التحسين، بما في ذلك التركيب ثلاثي الأبعاد والآلية الكيميائية للتفاعل. والميزة الرئيسة للتصميم الرشيد هي أنه يتم خلق عدد قليل جداً من متغيرات البروتين، مما يعني أن جهداً قليلاً جداً يكون ضرورياً للكشف عن الخصائص المحسنة.

والطرق الاندماجية، من الناحية الأخرى، تخلق عدد كبير من المتغيرات والتي يجب فحصها؛ ولكن لها ميزة أنها لا تتطلب مثل هذه المعرفة الواسعة للبروتين. بالإضافة إلى ذلك، في كثير من الأحيان تؤدي التغييرات غير الواضحة في تسلسل البروتين إلى تحسينات كبيرة في خصائصها، والتي من الصعب للغاية التنبؤ بها في التصميم الرشيد، وعليه، يمكن فقط تعريفها بالطرق الاندماجية.

وقد تم بالفعل هندسة الكثير من الإنزيمات لتعمل بشكلٍ أفضل في العمليات الصناعية. وتشمل هذه البروتينيزات، والليبيزات، والسليوليزات، والألفا-أميليزات، والزيلينيزات والجلوكوأميليزات. وإنزيم الزيلينيز هو مثال جيد للإنزيم الصناعي الذي يجب أن يكون ثابتاً عند درجة الحرارة العالية ونشط في درجات الحرارة ودرجة الحموضة الفسيولوجية عند استخدامه كمادة مضافة للغذاء، وفي الظروف القلوية عند استخدامه للتبييض في صناعة اللب والورق. وأحد الكائنات المستخدمة في الإنتاج الصناعي لإنزيم الزيلينيز هو جنس التريكوديرما. وقد تم تنقية وبلورة إنزيم الزيلينيز لها، وتم زيادة ثبات الإنزيم في درجات الحرارة بحوالي ١٥ درجة مئوية بالتطفير التصميمي. وقد زادت التغيرات التطفيرية فترة عمر النصف عند درجة حرارة ٦٥ من حوالي ٤٠ ثانية إلى ما يقرب من ٢٠ دقيقة، وعند درجة حرارة ٧٠ من أقل من ١٠ ثواني إلى حوالي ٦ دقائق [٣٨]. وقد زاد هذا من ثباته الحراري عند درجة حرارة ٧٠ بحوالي ٢٠٠٠ مرة، وتم ترحيل درجة الحموضة المثلى له تجاه المنطقة القلوية بوحدة رقم هيدروجيني واحدة. وتشمل الإستراتيجيات الأكثر نجاحاً لتحسين ثبات إنزيم الزيلينيز من التريكوديرما استقرار منطقة الحلزون في الوضع ألفا والنهاية-إن.

(٥ , ٤) تطبيقات الإنزيم على المستوى الكبير Large-Scale Enzyme Applications

وجدت الإنزيمات المعزولة الكثير من التطبيقات في صناعة الكيماويات الدقيقة. وتستخدم الإنزيمات في إنتاج الأحماض الأمينية نقية التركيب الفراغي والسكريات النادرة. وتستخدم أيضاً في إنتاج سكر الفواكه (الفركتوز) ومشتقات البنسلين وكذلك غيرها من المواد الكيميائية الكثيرة. وينبغي النظر للإنزيمات بوصفها جزءاً من صناعة المحفزات الحيوية المتنامية بسرعة، والتي تشمل أيضاً الخلايا الحية المحسنة وراثياً بوصفها مصانع إنتاج للمواد الكيميائية. ويلخص الجدول رقم (١ , ٥) التطبيقات الرئيسة الكبيرة للإنزيمات.

(١ , ٤ , ٥) المنظفات Detergents

كانت المنظفات هي التطبيق الصناعي الأول للإنزيمات الميكروبية. ويشيع الآن في البلدان المتقدمة استخدام الإنزيمات في تركيبات المنظفات، حيث تحتوي نصف المنظفات المتاحة على الإنزيمات. وتأتي الأوساخ والأقذار على صورٍ كثيرة، وتشمل البروتينات والنشويات، والدهون. ويسمح استخدام الإنزيمات باستخدام درجات حرارة أقل وفترات أقصر من التقليب، وغالباً بعد فترة نقع أولية. وبشكلٍ عام، فالمنظفات الإنزيمية تزيل البروتين من الملابس المتسخة بالدم، والحليب، والعرق، والعشب، وما إلى ذلك. وهي أكثر فعالية بكثير من المنظفات غير الإنزيمية.

لا تزال البروتينيزات هي أهم إنزيمات المنظفات المستخدمة لتحليل البقع التي تسببها البروتينات. واليبيزات تحلل الدهون إلى مركبات قابلة للذوبان في الماء بصورة أكبر عن طريق تحليل الروابط الإستيرية بين جزء الجلسرين الأساسي والأحماض الدهنية. وتستخدم الأميليزات في المنظفات لإزالة البقع الناشئة من النشا. وتحلل الأميليزات النشا الجيلاتيني، الذي يميل إلى الالتصاق بألياف النسيج ويربط مكونات البقع الأخرى. وكانت السليوليزات جزءاً من المنظفات منذ أوائل تسعينيات القرن العشرين. والسليوليز هو حقيقةً متراكب إنزيمي قادر على تحليل السليولوز البلوري إلى الجلوكوز. وفي غسيل المنسوجات تزيل السليوليزات ألياف السليولوز الدقيقة التي تتكون خلال الغسيل. وهذا ينتج عنه سطوع اللون وتنعيم المادة.

(٢ , ٤ , ٥) صناعة الغذاء Food Industry

(١ , ٢ , ٤ , ٥) الخبز Baking

تم على نطاقٍ واسع دراسة علاقة الألفا-أميليزات بجودة الخبز المحسنة وزيادة فترة التخزين. وتستخدم على حدٍ سواء الأميليزات الفطرية والبكتيرية. وتحتاج الكمية المضافة إلى توخي الدقة، حيث إن الجرعة الزائدة تؤدي إلى لزوجة العجين.

الجدول رقم (١ , ٥). تطبيقات الإنزيمات المختلفة في القطاعات الصناعية المهمة.

الصناعة	الإنزيم	التطبيقات / الوظيفة / الدور
المنظفات	البروتيز السليوليز الليبيز	إزالة بقع البروتين عن طريق تحليلها فك ارتباط ألياف السليولوز لسهولة إزالة الأقذار، وسطوع اللون إزالة بقع الدهون عن طريق تحليلها
الورق واللب	الزيلينز السليوليز اللاكيز والبيروكسيديز	التبييض الحيوي نزع الأحبار من الورق لإعادة تدويره بلمرة المواد مع الألياف المرتكزة على الخشب
المنسوجات	السليوليز الأميليز الكاتاليز	أحجار الغسيل الحيوية للأقمشة القطنية، التلميع الحيوي إدخال المواد الحيوية إلى ألياف المنسوجات تنظيف التبييض
الجلود	البروتيز، الليبيز	النقع، الضرب، نزع الشعر من الجلود الحيوية
الأعلاف	الفيتز الزيلينز	إطلاق الفوسفات ذوبان الألياف
الصناعات الغذائية النشا	ألفا-، بيتا- أميليز، بوليولانيز، الإنفيرتيز، مصاوغة الجلوكوز الجلوكوز أوكسيديز	إنتاج الكثير من أنواع شراب النشا والسكروز تحسين قابلية الغذاء للتخزين عن طريق نزع الأكسجين والجلوكوز من المواد الغذائية
عصائر الفواكه	السليوليز، الزيلينز، البكتينيز	ترويق واستخلاص العصائر
المخبوزات	الزيلينز ألفا-أميليز الجلوكوز أوكسيديز	تكييف العجين حجم الرغيف، وفترة عمر الرف (التخزين) جودة العجين
الألبان	المنفحة اللاكتيز البروتيز والليبيز	تخثر البروتين تحليل اللاكتوز نضج الجبن
تخمير البيرة	الجلوكانيز البابين	وسيلة ترشيح التحكم بدرجة التعكير
الوقود الحيوي	السليوليز و بيتا-جلوكوسيديز الزيلينز	تحليل الكتلة الحيوية السليولوزية لإنتاج الجلوكوز تحليل الهيميسليولوز لإنتاج السكريات الخماسية
منتجات العناية الشخصية	البروتينيز والليبيز الجلوكوز أميليز الجلوكوز أوكسيديز	تنظيف العدسات اللاصقة تحرير الجلوكوز من المواد المرتكزة على النشا في معاجين الأسنان لتحويل الجلوكوز إلى حمض الجلوكونيك وبيروكسيد الهيدروجين، حيث يعمل كلاهما كمطهر

obeikandl.com

ويأتي أحد دوافع دراسة تأثير الإنزيمات على العجين وصفات الخبز من الضغط للحد من الإضافات الأخرى. بالإضافة إلى النشا، يحتوي الدقيق عادةً على كميات ضئيلة من السليولوز، والجلوكانات، والهيميسليولوزات مثل الأرابينوزيلان والأرابينوجالاكتان. وهناك أدلة على أن استخدام الزيلنيزات يقلل من امتصاص الماء ومن ثم يقلل من كمية الماء المضافة في عملية الخبز. وهذا يؤدي إلى عجين أكثر استقراراً. وتستخدم الزيلنيزات على وجه الخصوص في خبز الشوفان الكامل والمقرمشات الجافة الشائعة في الدول الاسكندنافية.

ويمكن إضافة البروتينيزات لتحسين خصائص معالجة العجين؛ وقد استخدم الجلوكوز أوكسيديز ليحل محل المؤكسدات الكيميائية والليبيزات لتعزيز الجلوتين، الذي يؤدي إلى عجين أكثر استقراراً وتحسين نوعية الخبز.

(٢, ٢, ٤, ٥) تحليل النشا وإنتاج الفركتوز Starch Hydrolysis and Fructose Production

كان استخدام الإنزيمات المحللة للنشا أول تطبيق صناعي للإنزيمات الميكروبية في صناعة الأغذية. وهناك إنزيمان أساسيان يقومان بتحويل النشا إلى جلوكوز: الألفا-أميليز والجلوكوأميليز. في بعض الأحيان تضاف الإنزيمات غير المتفرعة مثل البوليولانيز لتحسين إنتاجية الجلوكوز. وينتج البيتا-أميليز تجارياً من حبوب الشعير ويستخدم في إنتاج السكر الثنائي المالتوز.

في الولايات المتحدة يتم تحويل كميات كبيرة من شراب الجلوكوز باستخدام إنزيم مصاوغة الجلوكوز بعد إزالة الكالسيوم$^{+٢}$ (يحتاج الألفا-أميليز الكالسيوم$^{+٢}$ للنشاط، ولكنه يثبط مصاوغة الجلوكوز) إلى شراب يحتوي على الفركتوز. ويتم ذلك بالإنزيمات البكتيرية، التي تحتاج إلى أيونات المغنيسيوم$^{+٢}$ للنشاط. ويتم فصل وبلورة الفركتوز من الجلوكوز بطرق الفصل الكروماتوجرافي كبيرة المستوى. وبدلاً من ذلك، يتم تركيز الفركتوز إلى ٥٥٪ ويستخدم كشراب ذرة عالي المحتوى من الفركتوز في صناعة المشروبات الغازية.

(٣, ٢, ٤, ٥) المشروبات والألبان Drinks and Diary

للإنزيمات الكثير من التطبيقات في مجال صناعة المشروبات. ويستخدم الكيموسين في صناعة الجبن حيث يخثر بروتين الحليب. والإنزيم الآخر الذي يستخدم في صناعة الحليب هو البيتا-جالاكتوزيديز أو اللاكتيز، الذي يقسم اللاكتوز إلى جلوكوز وسكر اللبن (الجالاكتوز). وتستخدم هذه العملية في منتجات الحليب للمستهلكين ذوي الحساسية تجاه اللاكتوز.

وتستخدم الإنزيمات أيضاً في تصنيع عصير الفاكهة. وتحسن إضافة البكتينيز، أولزيلانيز والسليوليز من تحرير العصير من اللب. وتستخدم البكتينيزات والأميليزات في ترويق العصير. وبالمثل، تستخدم الإنزيمات على

نطاقٍ واسعٍ في إنتاج النبيذ للحصول على أفضل استخلاص للمكونات الضرورية ومن ثم تحسين الإنتاجية. وتحلل الإنزيمات المواد مرتفعة الوزن الجزيئي، مثل البكتين.

ويمكن استخدام الإنزيمات لمساعدة تحليل النشا بالماء (عادةً ألفا-أميليزات)، لحل مشكلات الترشيح التي تسببها البيتا-جلوكانات الموجودة في الشعير (بيتا-جلوكانيزات)، لتحليل البروتين (البروتينيز المحايد)، والتحكم بدرجة التعكير خلال النضج، وللترشيح والتخزين (البابين، ألفا-أميليز وبيتا-جلوكانيز).

(٣, ٤, ٥) الأعلاف Animal Feed

تم استخدام إضافة الإنزيمات لأعلاف الحيوانات بشكلٍ مكثف منذ ثمانينيات القرن العشرين. فالإنزيمات تقلل اللزوجة، وتزيد امتصاص المواد الغذائية، وتحرر المواد الغذائية إما عن طريق تحليل الألياف غير القابلة للتحلل وإما عن طريق تحرير المواد الغذائية التي تمنع هذه الألياف امتصاصها، وتقلل من كمية البراز. وتضاف كمخلوطات إنزيمية أولية (مخلوط إنزيم-دقيق) خلال عملية تصنيع العلف، والتي تشمل قذف كتلة العلف الرطب عند درجات حرارة عالية (٨٠-٩٠ درجة مئوية). وهذا يعني أن إنزيمات الأعلاف يجب أن تكون متحملة للحرارة أثناء تصنيع الأعلاف ولكنها يجب أن تعمل في درجة حرارة جسم الحيوان.

وجاء النجاح التجاري الأول من إضافة البيتا-جلوكانيز لوجبات الأعلاف المعتمدة على الشعير. ويحتوي الشعير على البيتا-جلوكان، والذي يسبب لزوجة عالية في أمعاء الدجاج. وكان التأثير النهائي لاستخدام الإنزيم في علف الحيوان هو زيادة الوزن المكتسب للحيوان مع نفس الكمية من الشعير، مما أدى إلى زيادة نسبة تحويل الأعلاف. وزادت إضافة الزيلانيز إلى علف الفروج المعتمد على القمح من الطاقة التمثيلية المتاحة بنسبة ٧-١٠٪ في مختلف الدراسات.

وإنزيم آخر مهم في الأعلاف هو الفيتيز، وهو فسفوإستريز يحرر الفوسفات من حامض الفيتيك. ويوجد حمض الفيتيك عادة في مواد الأعلاف النباتية. وينتج عن التدعيم بالفيتيز خفض الفوسفور في البراز، مما يؤدي إلى خفض التلوث البيئي. كما أنه يقلل أيضاً الحاجة لإضافة الفوسفور إلى العلف. ويعدُّ الفيتيز حالياً واحداً من أقوى إنزيمات الأعلاف، ولا سيما التي من المصادر الفطرية [٢٩]. عادةً ما يكون مستحضر الأعلاف-الإنزيم مزيج من الكثير من الإنزيمات يحتوي على الجلوكانيزات، الزيلانيزات، البروتينيزات والأميليزات.

(٤, ٤, ٥) المنسوجات Textiles

إن استخدام الإنزيمات في صناعة الغزل والنسيج هو واحد من أسرع المجالات نمواً في علم الإنزيمات الصناعية. وتستخدم الأميليزات في إدخال المواد الحيوية إلى ألياف المنسوجات. ومجموعة أخرى مهمة من الإنزيمات

المستخدمة في صناعة الغزل والنسيج هي السليوليزات. وبسبب قدرتها على تعديل الألياف السليولوزية ومن ثم تحسين نوعية الأقمشة بطريقة جيدة التحكم، فإن هذه الإنزيمات (المتعادلة أو الحمضية) تقدم بديلاً ممتازاً لأحجار غسيل الملابس الزرقاء. وللقضاء على استخدام أحجار الغسيل الكثير من المزايا، مثل تقليل الضرر على الغسالات والملابس، وتحسين التعامل وتقليل المشكلات البيئية. وتسمح أحجار الغسيل الإنزيمية بما يصل إلى ٥٠٪ أكثر في التحميل وتنتج المظهر المطلوب وليونة الصقل النهائي. والسليوليز المتعادل هو الإنزيم المفضل لأحجار الغسيل؛ بسبب قلة درجة صبغه الرجعية، واتساع مدى قيم الأس الهيدروجيني له. وهذه الخاصية الأخيرة تقلل من الحاجة للتحكم القوي في درجة حموضة الغسيل، مما يؤدي إلى صقل نهائي أكثر تكراراً من غسلة لأخرى.

يعدُّ تكوين الزغب وبروزه من المشكلات الشائعة المرتبطة باستخدام أنسجة القطن أو الأنسجة الطبيعية الأخرى. وتستخدم السليوليزات لهضم نهايات الألياف الصغيرة التي تبرز من النسيج، مما يؤدي إلى صقل نهائي أفضل [٣٩].

في الآونة الأخيرة، تم اختبار فوق أكسيد الهيدروجين كمادة مبيضة للمنسوجات لتحل محل المواد الكيميائية المعتمدة على الكلور، وقد استخدم الكاتاليز لتحليل الزيادة من فوق الأكسيد. وهناك نهج آخر حديث وهو استخدام الإنزيمات المؤكسدة مباشرة لتبييض المنسوجات. واللاكيز-إنزيم مؤكسد عديد الفينولات من الفطريات- هو مرشح جديد في هذا المجال. وهو إنزيم يحتوي على النحاس الذي يتم أكسدته بواسطة الأكسجين. وفي حالة الأكسدة يمكنه أن يحلل الكثير من الأنواع المختلفة من الجزيئات عن طريق أكسدتها، بما في ذلك ألوان الصباغة.

(٥, ٤, ٥) الورق واللب Pulp and Paper

أجريت دراسات مكثفة خلال السنوات العشرين الماضية لاستخدام الكثير من الإنزيمات المختلفة في صناعة اللب والورق. وتستخدم الزيلانيزات في تبييض اللب، حيث تقوم بتحرير أجزاء اللجنين عن طريق تحليل الزيلان المتبقي. وهذا يقلل إلى حدٍ كبيرٍ من الحاجة إلى مواد التبييض الكيميائية المعتمدة على الكلور. وتستخدم السليوليزات في نزع الأحبار من ألياف السليولوز خلال إعادة التدوير.

في صناعة الورق، تستخدم الأميليزات، وبخاصة لتحوير النشا، مما يحسن من قوة، وصلابة، وقابلية المحو للورق. ويجب أن يكون لمعلق النشا درجة لزوجة معينة، والتي تتحقق من خلال إضافة إنزيمات الأميليز في عملية محكومة.

تعدُّ إزالة القار، وهو مادة لزجة مكونة من الدهون توجد أساساً في الأخشاب اللينة، هي مشكلة خاصة عند استخدام اللب الميكانيكي للصنوبر الأحمر كمادة خام. ويمكن إزالته بواسطة الليبيزات.

(٥ , ٤ , ٦) الجلود Leather

تستخدم صناعة الجلود الإنزيمات المحللة للبروتين والدهون في تجهيز الجلود. ويرتبط استخدام هذه الإنزيمات بتركيب جلد الحيوان كمادة خام. تستخدم الإنزيمات لإزالة الأجزاء غير المرغوب فيها. تضاف إنزيمات البروتييز القلوية في مرحلة النقع. وهذا يحسن امتصاص المياه من قبل الجلود الجافة، وإزالة وتحليل البروتينات والأوساخ والدهون، ويقلل من وقت المعالجة. وفي بعض الحالات يستخدم التربسين من البنكرياس في هذه المرحلة.

وتستخدم إنزيمات البروتييز في نزع الشعر والصوف من الجلد، وتحسين جودته (سطح أنظف وأكثر قوة، وجلد أكثر ليونة، وأقل بقع). وتستخدم الليبيزات في هذه المرحلة أو في مرحلة الضرب لإزالة الشحوم بصفة خاصة. واستخدام الليبيزات هو تطور جديد إلى حدٍ ما في صناعة الجلود.

(٥ , ٤ , ٧) الوقود الحيوي من الكتلة الحيوية Biofuel from Biomass

ربما كان استخدام كتلة اللجنوسليولوز الحيوية لإنتاج الوقود الحيوي هو أهم التطبيقات الناشئة للإنزيمات التي يجري حالياً التحقق منها. تمثل الكتلة الحيوية مورداً وفيراً متجدداً متاحاً للبشرية. ولكن يقتصر استخدامها، بسبب عدم وجود تقنية تحويل إنزيمية فعالة التكلفة؛ نتيجة لارتفاع تكلفة السليولوزات وعدم وجود تخصصية لأوساط التفاعل اللجنوسليولوزية المختلفة. والإستراتيجية المستخدمة حالياً في إنتاج الإيثانول الحيوي من الكتلة الحيوية هي عملية متعددة الخطوات تشمل التحلل الإنزيمي كخطوة حاسمة. وفي الجهود المبذولة لتطوير تقنيات فعالة لإنتاج الوقود الحيوي، تم توجيه بحوث مهمة نحو تعريف أنظمة سليوليز فعالة وظروف العملية، إلى جانب الدراسات الموجهة نحو التحسينات الكيموحيوية والوراثية للكائنات الموجودة المستخدمة في العملية [٤٠]. ولا يزال يتعين تقرير إستراتيجيات فعالة والبحث النشط مازال مستمراً في هذا الاتجاه.

(٥ , ٤ , ٨) تطبيقات الإنزيم في قطاعات الكيمياء والدواء

Enzyme Application in the Chemistry and Pharma Sectors

يعدُّ العدد الكبير من المركبات التي يجب اختبارها للنشاط الحيوي لإيجاد مركب واحد واعد مسألة مهمة في قطاع الدواء. وقد تلقى التحفيز الحيوي الاندماجي الكثير من الاهتمام في هذا المجال، حيث إنه يمكن أن يضيف مستوى من التعقد لتنوع المكتبات الكيميائية الموجودة، أو يمكن استخدامه لإنتاج المكتبات الجديدة [٤١]. والمثال على ذلك هو استخدام إنزيمات الجليكوزيل ترانسفيريزات لتغيير نمط ارتباط المركبات الحيوية الفعالة بالجليكوزيل. وعلى الرغم من أن القليل فقط من السلع الكيميائية، مثل الأكريلاميد، يتم إنتاجه بتقنية الإنزيمات (حجم الإنتاج السنوي ٤٠٠٠٠ طن)، فقد أثبت هذا النجاح بأنه يمكن تصعيد تقنية التحويل الحيوي.

ويتم أيضاً إنتاج الكثير من المواد الكيميائية الأخرى، بما في ذلك المركبات الفراغية [٢]، عن طريق التحفيز الحيوي على المستوى متعدد الطن.

(٩ , ٤ , ٥) الإنزيمات التخصصية Specialty Enzymes

بالإضافة إلى تطبيقات الإنزيمات على المستوى الكبير، فإنه يوجد عدد كبير من التطبيقات التخصصية للإنزيمات. وتشمل هذه استخدام الإنزيمات في التطبيقات التحليلية السريرية، وإنتاج النكهات، وتحوير البروتينات، ومنتجات العناية الشخصية، وتقنية الحمض النووي، وإنتاج المواد الكيميائية الدقيقة. وخلافاً لمعظم الإنزيمات الصناعية، يجب أن تكون هذه الإنزيمات خالية من الآثار الجانبية، مما يؤكد الحاجة إلى عمليات تنقية دقيقة.

تستخدم إنزيمات الفوسفاتيز القلوية والبيروكسيديزات في الفحوصات المناعية. وتعدُّ الحساسات الحيوية تطوراً مهماً في الكيمياء التحليلية. والتطبيق الأكثر استخداماً هو الحساس الحيوي للجلوكوز الذي يشمل تفاعل يحفزه إنزيم الجلوكوز أوكسيديز:

$$\text{glucose} + O_2 + H_2O \rightarrow \text{gluconic acid} + H_2O_2$$

جلوكوز + أوكسجين + ماء ← حمض الجلوكونيك + فوق أكسيد الهيدروجين

وتتوفر الكثير من الأجهزة التجارية التي تطبق هذا المبدأ لقياس الجزيئات مثل الجلوكوز، واللاكتات، واللاكتوز، والسكروز، والإيثانول، والميثانول، والكولسترول، وبعض الأحماض الأمينية.

(١٠ , ٤ , ٥) الإنزيمات في منتجات العناية الشخصية Enzymes in Personal Care Products

يعدُّ هذا مجال جديد نسبياً للإنزيمات، وتكون الكميات المستخدمة صغيرة، لكنه جدير بالذكر كمنطقة نمو مستقبلية. وأحد التطبيقات هو تنظيف العدسات اللاصقة. وتستخدم محاليل إنزيمية تحتوي على البروتينيز والليبيز لهذا الغرض. ويستخدم فوق أكسيد الهيدروجين في تطهير العدسات اللاصقة، ويمكن إزالة فوق أكسيد الهيدروجين المتبقي بعد التطهير بواسطة إنزيم كاتليز يحتوي على الهيم.

وتستخدم إنزيمات الجلوكوأميليز والجلوكوأوكسيديز في بعض معاجين الأسنان، حيث يحرر الجلوكوأميليز الجلوكوز من السكريات المعتمدة على النشا الناتجة بواسطة الألفا-أميليز، ويحول الجلوكوأوكسيديز الجلوكوز إلى حمض الجلوكونيك وفوق أكسيد الهيدروجين، ويعمل كلٍ منهما كمطهر. ويمكن تنظيف أطقم الأسنان بمحاليل إنزيمية لتحليل البروتين. كما تم أيضاً دراسة إنزيمات مثل الكيتينيز للتطبيقات في منتجات العناية بالبشرة والشعر.

(١١ , ٤ , ٥) الإنزيمات في تقنية الحمض النووي Enzymes in DNA Technology

تؤدي الإنزيمات المعدلة للحمض النووي دوراً حاسماً في تقنية الحمض النووي التي أحدثت ثورة في التقنية الحيوية التقليدية وكذلك الحديثة. ويمكن تقسيمها إلى فئتين:

- إنزيمات التقييد: تتعرف هذه الإنزيمات على تسلسلات معينة من الحمض النووي وتقطع سلسلة الحمض في مواقع التعرف.
- الإنزيمات المعدلة للحمض النووي: تخلق هذه الإنزيمات الأحماض النووية، وتحللها، وتربط قطعها معاً، وتزيل أجزاء من الحمض النووي.

وتنتج إنزيمات التقييد انقسام بعد التعرف على رمز تسلسل معين في الحمض النووي. وهي ضرورية في تقنية الجينات. وتخلق إنزيمات بلمرة الحمض النووي سلاسل الحمض النووي الجديد باستخدام قالب أو نموذج يتم نسخه. وتحلل إنزيمات النيوكلييزات روابط الفوسفات ثنائية الإستر بين سكريات الحمض النووي. وتضيف إنزيمات الكاينيزات مجموعات الفوسفات، وتزيلها إنزيمات الفوسفاتيزات من نهاية سلسلة الحمض النووي. وتضم إنزيمات الليجيزات النيوكليوتيدات المجاورة معاً من خلال تكوين روابط الفوسفات ثنائية الإستر بينها.

وتشارك الإنزيمات داخل الخلية في تضاعف الحمض النووي، وتحليل الحمض النووي الخارجي، وإصلاح طفرات الحمض النووي، وإعادة ربط جزيئات الحمض النووي المختلفة. ويتم إنتاج هذه الإنزيمات المستخدمة في تقنية الجينات مثل أي إنزيم آخر، ولكن تحتاج تنقيتها إلى عناية إضافية.

(٥ , ٥) الاستنتاجات Conclusions

لقد استخدمت الإنزيمات على نطاقٍ واسع لتحسين البيئة، ولحماية مواردنا، ولخلق فرص جديدة. لا يكاد يكون هناك أي منطقة بمنأى عن الإنزيمات. وقد نمت السوق العالمية للإنزيمات التجارية بشكلٍ مطرد نتيجة لتحسن كفاءة الإنتاج وكذلك عمليات المعالجة النهائية، مما أعطى إنزيمات أرخص وأكثر فعالية. وهي تستخدم على نطاقٍ واسع في الصناعة كما نوقش بالتفصيل في الفصل، ومازال هناك مجال للتحسين. وهذا يؤكد على ضرورة مواصلة الجهود لاكتشاف إنزيمات جديدة ذات خصائص جديدة من البيئات الغريبة من خلال برامج الفرز.

وبوضوح، سوف يتم استخدام الإنزيمات على نطاقٍ واسع في المستقبل، وهذا سوف ينعكس على عدد الإنزيمات المتوافرة على النطاق الصناعي والبحثي، تنوع التفاعلات التي يتم تحفيزها، والظروف البيئية التي تعمل

تحتها. وعلى وجه الخصوص، من المتوقع ظهور تطبيقات جديدة في مجال منتجات العناية الشخصية، ويمكن توقع تقدم مفاجئ فـي المعرفة في الجيل الثاني لإنتاج الوقود الحيوي من الكتلة الحيوية، حيث تؤدي السليوليزات دوراً رئيساً في تحويل الكتلة الحيوية إلى السكريات والتي يتم بعد ذلك تخميرها إلى الإيثانول. ومن المرجح أن تعطي زيادة الضغوط البيئية وارتفاع أسعار الطاقة هذا التطبيق أهمية حقيقية.

وتقنية الإنزيمات الصناعية هي مـجال للبحوث الجارية النشطة يمر بمرحلة النضج، فضلاً عن التطور. ويوحي الفهم الأفضل للإنزيمات المكتشفة سابقاً وأهميتها الوظيفية بأن هناك الكثير من التطبيقات الجديدة لأنشطتها الحفزية. وسوف يتم طرح الإنزيمات المعروفة للاستخدامات الجديدة، واستخدام الإنزيمات الجديدة، المكتشفة داخل محاريبها الحيوية أو المنتجة باستخدام هندسة تصميم الإنزيم، لتحفيز التفاعلات غير المستغلة حتى الآن. وهذا هو مـجرد بداية عصر تقنية الإنزيمات. ومن المتوقع أن تحل أدوات التطور الموجه وتقنيات الحيوية الجزيئية مقرونةً بتطوير طرق فرز واختيار قوية وعالية الإنتاجية المشكلات الصعبة فـي مجال هندسة البروتين والهندسة الأيضية في السنوات المقبلة.

المراجع References

[١] Burton, S.G., Cowan, D.A., and Woodley, J.M. (2002) The search for the ideal biocatalyst. *Nat. Biotechnol.*, **20,** 37–45.

[٢] Jaeger, K.E., Eggert, T., Eipper, A., and Reetz, M.T. (2001) Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55,** 519–530.

[٣] Powell, K.A., Ramer, S.W., del Cardayre, B., Stemmer, W.P.C., Tobin, M.B., Longchamp, P.F., and Huisman, G.W. (2001) Directed evolution and biocatalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40,** 3948–3959.

[٤] Farinas, E.T., Bulter, T., and Arnold, F.H. (2001) Directed enzyme evolution. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12,** 545–551.

[٥] Wahler, D. and Reymond, J.L. (2001) High-throughput screening for biocatalysts. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12,** 535–544.

[٦] Ferrer, M., Golyshina, O., Beloqui, A., and Golyshin, P.N. (2007) Mining enzymes from extreme environments. *Curr. Opin. Microbiol.*, **10,** 207–214.

[٧] Bruins, M.E., Janssen, A.E., and Boom, R.M. (2001) Thermozymes and their applications: a review of recent literature and patents. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **90,** 155–186.

[٨] Rothschild, L.J. and Mancinelli, R.L. (2001) Life in extreme environments. *Nature*, **409,** 1092–1101.

[٩] Breithaupt, H. (2001) The hunt for living gold: the search for organisms in extreme environments yields useful enzymes for industry. *EMBO Rep.*, **2,** 968–971.

[١٠] Demirijan, D., Morris-Varas, F., and Cassidy, C. (2001) Enzymes from extremophiles. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5,** 144–151.

[١١] Pandey, A. (1992) Recent process developments in solid-state fermentation . *Process Biochem.*, **27,** 109–117.

[١٢] Pandey, A. (1994) Solid-state fermentation, in *Solid-State Fermentation* (ed. A. Pandey), Wiley Eastern Limited, New Age International, New Delhi, India 2, pp. 3–10.

[١٣] Pandey, A. (2003) Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, **13,** 81–84.

[١٤] Pandey, A. and Soccol, C.R. (1998) Bioconversion of biomass: a case study of lignocellulosic bioconversion in solid-state fermentation. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **41,** 379–390.

obeikandl.com

[١٥] Pandey, A. and Soccol, C.R. (2000) Economic utilization of crop residues for value addition–A futuristic approach. *J. Sci. Ind. Res.*, **59,** 12–22.

[١٦] Pandey, A., Soccol, C.R., and Mitchell, A. (2000) New developments in solid-state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem.*, **35,** 1153–1169.

[١٧] Pandey, A., Soccol, C.R., and Larroche, C. (eds) (2007) *Current Developments in Solid-State Fermentation*, Asiatech Publishers Inc., New Delhi, India, p. 517.

[١٨] Hölker, U., Höfer, M., and Lenz, J. (2004) Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64,** 175–186.

[١٩] Rodr ı guez Couto, S. and Sanroman, M.A. (2005) Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochem. Eng J.*, **22,** 211–219.

[٢٠] Couri, S., Merces, E.P., Neves, B.C.V., and Senna, L.F. (2006) Digital image processing as a tool to monitor biomass growth in *Aspergillus niger* 3T5B8 solid-state fermentation: preliminary results. *J. Microsc.*, **224** (3), 290–297.

[٢١] Pandey, A., Soccol, C.R., and Larroche, C. (2007) Introduction, in *Current Developments in Solid-State Fermentation* (eds A. Pandey, C.R. Soccol, and C. Larroche), Springer Science, New York and Asiatech Publishers, Inc., New Delhi, pp. 3–12.

[٢٢] Pandey, A., Soccol, C.R., and Larroche, C. (2007) General consideration about solid-state fermentation processes, in *Current Developments in Solid-State Fermentation* (eds A. Pandey, C.R. Soccol, and C. Larroche), Springer Science, New York and Asiatech Publishers, Inc., New Delhi, pp. 13–25.

[٢٣] Tengerdy, R.P. (1998) Solid substrate fermentation for enzyme production, in *Advances in Biotechnology* (ed. A. Pandey), Educational Publishers & Distributors, New Delhi, pp. 13–16.

[٢٤] Tengerdy, R.P. (1996) Cellulase production by solid state fermentation. *J. Sci. Res.*, **55,** 313–316.

[٢٥] Pandey, A., Selvakumar, P., Nigam, P., and Soccol, C.R. (1999) Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.*, **77** (1), 149–162.

[٢٦] Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Kriger, N., and Soccol, V.T. (1999) The Realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **29** (2), 119–131.

[٢٧] Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Krieger, N., and Fontana, J.D. (1999) Recent developments in microbial inulinases-Its production, properties and industrial applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **81** (1), 35–52.

[٢٨] Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Singh, D., Soccol, V.T., and Mohan, R. (2000) Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **31,** 135–152.

[٢٩] Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A., and Soccol, V.T. (2001) Production, purifi cation and properties of microbial phytases. *Bioresour. Technol.*, **77** (3), 203–214.

[٣٠] Pandey, A., Larroche, C., and Soccol, C.R. (Guest eds) (2006) Food enzymes and additives, part 1: enzymes and organic acids for food applications. Special Issue of *Food Technol. Biotechnol.*, **44** (2), 123–300.

[٣١] Pandey, A., Webb, C., Soccol, C.R., and Larroche, C. (eds) (2006) *Enzyme Technology*, Springer Science, New York, p. 740.

[٣٢] Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Napoothiri, K.M., Soccol, C.R., and Pandey, A. (2006) Alpha amylase from microbial sources-an overview on recent developments. *Food Technol. Biotechnol.*, **44** (2), 173–184.

[٣٣] Sumantha, A., Larroche, C., and Pandey, A. (2006) Microbiology and industrial biotechnology of food grade proteases a perspective. *Food Technol. Biotechnol.*, **44**(2), 211–220.

[٣٤] Pandey, A. and Ramachandran, S. (2005) Process developments in solid-state fermentation for food applications, in *Food Biotechnology*, 2nd edn (eds K. Shetty, G. Paliyath, A. Pometto, and R.E. Levin), Taylor and Francis, New York, pp. 87–110.

[٣٥] Imamglu, S. (2002) Stimulated moving bed chromatography for application in bioseparation. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **76,** 211–231.

[٣٦] Shu-Jen, C. (2004) Strain improvement for fermentation and biocatalysis processes by genetic engineering technology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **31,** 99–108.

[٣٧] Olempska-Beer, Z.S., Merker, R.I., Ditto, M.D., and DiNovi, M.J. (2006) Food-processing enzymes from recombinant microorganisms–a review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **45,** 144–158.

[٣٨] Fenel, F., Leisola, M., Janis, J., and Turunen, O. (2004) A de novo designed N-terminal disulphide bridge stabilizes the. *Trichoderma reesei* endo-1,4-beta-xylanase II. *J. Biotechnol.*, **108** (2), 137–143.

[٣٩] Cavaco-paulo, A. (1997) Cellulases in the textile industry–an overview. *Carbohydr. Polym.*, **34,** 4.

[٤٠] Sukumaran, R.K., Singhania, R.R., and Pandey, A. (2006) Microbial cellulases-Production, applications and challenges. *J. Sci. Ind. Res.*, **64,** 832–844.

[٤١] Rich, J.O., Michels, P.C., and Khmelnitsky, Y.L. (2002) Combinatorial biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **6,** 161–167.

obeikandl.com