تكنولوجيا الإنزيمات

Enzyme Technology

الأستاذ الدكتور / محمد البسطويسى أمان

الأستاذ الدكتور / محمد محمود يوسف

كلية الزراعة - جامعة الإسكندرية - الشاطبى - الإسكندرية

مكتبة المعارف الحديثة

٢٣ ش تاج الرؤساء سابا باشا الإسكندرية

ت: ٥٤٤٥٥٥١ - ٥٨٢٦٩٠٢

obeikandl.com

obeikandl.com

11-تكنولوجيا الإنزيمات
Enzymes Technology

المحتويـــــــــات	رقم الصفحة
11-1. مقدمـــــة	1
11-2. تخصصية مادة التفاعل	3
11-3. فصل وتنقية الإنزيمات	4
11-3. 1. طرق تعتمد على المقاس أو الكتلة	9
11-3. 2. طرق تعتمد على الشحنة الكهربية	11
11-3. 3. طرق تعتمد على تغيرات الذائبية	13
11-3. 4. طرق تعتمد على وجود أماكن مفضلة للربط	16
11-4. تسمية الإنزيمات	18
11-5. الصفات الحركية للإنزيمات	20
11-6. إستخدامات الإنزيمات فى التصنيع الغذائى	24
11-6. 1. إنزيمات الأميليز	24
11-6. 2. السليوليز	25
11-6. 3. الجلوكوز أيوسومريز	25
11-6. 4. إنزيمات الليبيز	25
11-6. 5. الإنفرتـــيز	26
11-6. 6. اللاكتيـز	26
11-6. 7. الرنيـــن	26
11-6. 8. إنزيمات البروتييز	27
11-6. 9. الإنزيمات البكتينيـة	28
11-6. 10. الكاتاليز والبيروكسيديز	29
11-6. 11. إنزيمات الفوسفاتيز	29
11-6. 12. الجلوكوز أوكسيديز	29
11-6. 13. التانيز والبولى فينول أوكسيديز	29
11-7. الإنزيمات المثبتة	35
11-7. 1. طرق تثبيت الإنزيمات	35
أ- التثبيت الفيزيـقى	35
ب- التثبيت الكيماوى	36

obeikandl.com

المحتويـــــــــات | رقم الصفحة

11-7 .2. 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- الإرتباط التعاونى 37
11-7 . 3. العوامل المؤثرة على إستخدام الإنزيمات المثبتة 39
أ- التكلفة 39
ب- كفاءة التحويل 40
ج- الثبات 40
د- حالة الناتج 41
11-7 . 4. إستخدامات الإنزيمات المثبتة فى التصنيع الغذائى 41
أولا : إنتاج شراب الذرة عالى الفركتوز 41
ثانيا : إنتاج السكر المحول 47
ثالثا : الأسترة التبادلية 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
11-8. مثبطات الإنزيمات بالأغذية 55
11-8 .1. المثبطات الإنزيمية بالأغذية النباتية 56
أ- مثبطات الإنزيمات المحللة للبروتين 56
ب- مثبطات إنزيمات الأميليز 57
11-8 .2. المثبطات الإنزيمية بالأغذية الحيوانية 59
11-9. تطبيقـــات تكنولوجيـــا الحمـض النـووى دى أوكـسى ريبونيوكليك (DNA) معاد الإتحاد فى إنتاج الإنزيمات 59
11-10. المراجع 61

11-تكنولوجيا الإنزيمات
Enzyme Technology

الأستاذ الدكتور / محمد البسطويسى أمان

الأستاذ الدكتور / محمـــد محمـــود يوسف

قسم علوم وتكنولوجيا الأغذية - كلية الزراعـة - جامعة الإسكندريـة

11-1 مقدمـــــة :

الإنزيمات هى عوامل حفز كيموحيوية biochemical catalysts لجميع التفاعلات التى تحدث فى الكائنات الحية ، غير أن الإنزيمات تتباين عن عوامل الحفز الأخرى فى أربع صفات رئيسية وهى :

أ- معدلات أعلى للتفاعل :

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

ب- ظروف تفاعل أكثر إعتدالاً :

تحدث التفاعلات الإنزيمية تحت ظروف معتدلة عند درجات حرارة أقل من 100°م وعند الضغط الجوى وتقريبا عند قيم pH حول نقطة التعادل ، وهذه ظروف تتباين عن تلك التى تتطلبها التفاعلات التى يتم تحفيزها كيماويا 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 والتى تعرف بالـ substrates مما يحدد نواتج التفاعل وذلك مقارنة بالتفاعلات التى يتم تحفيزها كيماوياً ، وقلما ينتج عن التفاعلات الإنزيمية نواتج جانبية ، فعلى سبيل المثال فإن عملية التخليق الأنزيمى للبروتينات على الريبوسومات تشتمل على عديدات ببتيد تتكون من أكثر من 1000 حامض أمينى، وعلى الرغم من ذلك فإن هذه العملية تحدث دون خطأ . أما فى التخليق الكيماوى لعديدات الببتيد فإن التفاعلات الجانبية و التفاعلات غير الكاملة تحد من طول سلاسل عديدات الببتيد المتكونة حيث يدخل نحو 100 حامض أمينى فقط فى عملية التخليق .

د- القدرة على التنظيم :

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

ومن المنظور التاريخى فإنه يمكن القول بأن دراسة الإنزيمات فى 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 والذى أوضح أن الإيثانول و ثانى أكسيد الكربون يعتبران بمثابة النواتج الرئيسية لتحطم السكر بواسطة الخميرة . وفى عام 1835 نشر جاكوب بريزليس Jacob Berzelius النظرية العامة الأولى للتحفيز 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 للقوانين 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 شيئا 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 أكتشف إميل فيشر Emil Fischer أنه بمقدور الإنزيمات الجليكوليتية التفريق بين مشابهات السكريات الفراغية مما جعله يضع افتراضه المعروف بالضبة والمفتاح lock and key ومنطوقه أن تخصص الإنزيم (الضبة) لمادة متفاعلة (المفتاح) يتأتى من شكلهما المتواءمين هندسيا ، بيد أن التركيب الكيماوى

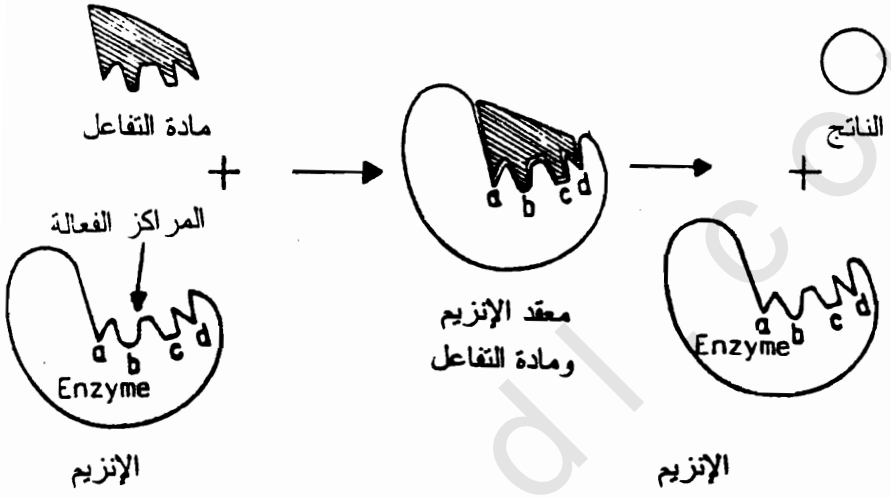
للإنزيمات لم يعرف إلا فى عام 1926 على يد جيمس سمنر James Sumner والذى تمكن ولأول مرة من بلورة أول إنزيم وهو اليورييز urease وأوضح أن هذه البللورات تتكون من البروتين ، ولما كانت المستحضرات الإنزيمية التى حضرها سمنر غير نقية فلم يكن مقبولاحتى عام 1930 أن الإنزيم عبارة عن بروتين إلا حينما أوضح جون نورثروب John Northrop وموسيس كيونتز Moses Kunitz وجود علاقة تلازم مباشرة بين النشاط الإنزيمى لكل من الببسين ، التريبسين ، الكيموتربسين المبلورة وكميات البروتين الموجودة . ومنذ ذلك الحين تأكد أن الإنزيمات عبارة عن بروتينات (على الرغم مما تبين حديثا من أن لبعض أنواع حامض الريبونيوكليك RNA نشاطاً تحفيزياً).

وعلى الرغم من أن لموضوع علم الإنزيمات تاريخا طويلا إلا أن المعلومات التى نعرفها الآن عن طبيعة الإنزيمات ووظائفها هى فى واقع الأمر محصلة زخم هائل من الدراسات التى تم إنجازها فى النصف الثانى من القرن العشرين . وبعد التقدم المذهل الذى تحقق فى طرق الفصل والتحليل فقد أصبح ميسوراً عزل وتوصيف أى إنزيم ولا سيما بعد أن تحقق فى عام 1963 ولأول مرة معرفة تتابع الأحماض الأمينية لأول إنزيم وهو ريبونيوكليز أ ribonuclease A المستخلص من بنكرياس الأبقار كما أمكن فى 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 ـ التى من خلالها ترتبط مواد التفاعل والجزيئات الأخرى بالإنزيمات ـ متطابقة فى صفاتها مع التوزيع الفراغى للبروتينات نفسها . وتشتمل كل منها على قوى فان در فالس Van der Waals والروابط الالكتروستاتيكية، والروابط الهيدروجينية والتداخلات الكارهة للماء hydrophobic interactions وعامة فإن مكان الربط بمادة التفاعل يتكون من تجويف cleft يتواءم فى الشكل مع جزء مقابل على سطح الإنزيم فى تكامل هندسى كما هو موضح بالشكل رقم 11-1 . أضف إلى ذلك أن متبقيات الأحماض الأمينية والتى تكون مكان الربط تترتب لتتداخل بطريقة متخصصة مع مادة التفاعل بطريقة جذابة فى تكامل الكترونى electronic complementarity أما الجزيئات التى تختلف فى الشكل أو المجموعة الوظيفية فإنه يكون فى 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 فى غياب مادة التفاعل المرتبطة أو تبعاً

لافتراض التواؤم الحثى 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 التواؤم الحثى عند الإرتباط بمادة التفاعل.



شكل 11-1 : شكل توضيحى يبين مفهوم التخصص الإنزيمى والمراكز الفعالة على سطح الإنزيم .

المصدر : Stryer (1991) .

11-3 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 الكلى للإنزيم فى المستخلص الأصلى . بالإضافة إلى ذلك فإنه يجب أن يتميز المستحضر الإنزيمى بأعلى نشاط تحفيزى catalytic activity وبأعلى درجة نقاوة ممكنة ، بمعنى أن المستحضر الإنزيمى لا يحتوى على إنزيمات أخرى أو أى جزيئات كبيرة أخرى .

وفيما سبق فقد كانت البللورية 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 والتى تتبع الآن لا تشتمل على خطوة البلورة ، بيد أنه يجب أن نأخذ فى إعتبارنا أن البلورة تعتبر عملية ضرورية إذا ما أريد دراسة

التركيب ثلاثى الأبعاد للإنزيم بواسطة الأشعة السينية X-ray crystallography. ويتم تقدير النشاط التحفيزى للمستحضر الإنزيمى 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 التى تم استهلاكها أو التى نتجت من التفاعل وتسمى وحدات دولية international units أو يعبر عن وحدات النشاط للإنزيم بالمول / ثانية لمادة التفاعل التى تم إستهلاكها أو التى نتجت (الكاتال katal) وليس هناك سوى سبيل واحد للتنبؤ بالنشاط التحفيزى للإنزيم النقى ألا وهو الوصول إلى قيمة نشاط نوعى specific-activity (وحدات الإنزيم/ملجم أو كاتال/كجم مع ملاحظة أن كل 60 وحدة/ملجم = 1 كاتال/كجم) ثابتة أى لايمكن الحصول على قيمة أعلى منها بتقدم عملية التنقية . كذلك فإنه يمكن حساب العائد من الإنزيم من المعادلة الآتية :

$$\text{العائد} = \frac{\text{وحدات الإنزيم فى المكون}}{\text{وحدات الإنزيم فى المستحضر الأصلى}}$$

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

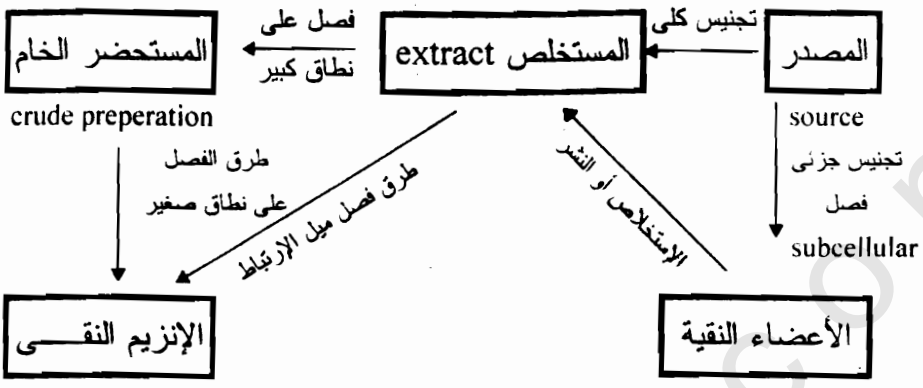
$$\text{عدد مرات النقاوة} = \frac{\text{النشاط النوعى للمكون}}{\text{النشاط النوعى الأصلى}}$$

كذلك فإنه يمكن تقدير بعض الملوثات الموجودة بالمستحضر الإنزيمى بتقنيات مثل الطرد المركزى الفائق ultra centrifugation، طرق الهجرة الكهربية electrophoresis (سواء الطريقة القياسية أو باستخدام المنظفات أى 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 هى:

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

ويوضح الشكل رقم 11-2 خطوات تنقية الإنزيمات

obeikan.com



شكل 11-2 : خطوات تنقية الإنزيمات

المصدر : Price and Stevens (1982) .

أ- إختيار المصدر Choice of source

يتوقف إختيار المصدر الذى سيتم تحضير الإنزيم منه على عدة إعتبارات أهمها:

1- تواجد الإنزيم :

يجب إختيار مصدر يتواجد به الإنزيم المزمع عزله واستخلاصه بكميات وفيره ، فعلى سبيل المثال تعتبر الغدد الثديية اللبنية مصدراً ممتازاً لإنزيمات مثل كربوكسيليز أسيتايل مرافق الإنزيم أ acetyl COA-carboxylase والذى له دور تحفيزى فى عملية التخليق الحيوى للأحماض الدهنية ، كذلك فإن الكلى تعتبر مصدراً جيداً لإنزيم الفوسفاتيز القلوى alkaline phosphatase والذى يحفز عملية التحلل المائى للأسترات عند الـ pH القلوى . أما فى حالة الكائنات الحية الدقيقة فإنه بالمقدور زيادة العائد الناتج من إنزيم معين عن طريق التحوير الوراثى أو عن طريق تغيير تركيب البيئة التى 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 تحتوى على اللاكتوز كمصدر وحيد للكربون، ومن ناحية أخرى فقد أمكن عزل طفرة mutant من بكتيريا *E. coli* تكون إنزيم كارباميول ترانسفيريز أسبارتات- aspartate carbamoyltransferase - تحت ظروف النمو البطىء بمعدل يزيد عن 8٪ من البروتين الكلى الذى يتم تخليقه فى حين أن الطرز العادية من هذه البكتيريا تنتج الإنزيم المذكور بكمية لا تزيد عن 1٪ من البروتين الكلى .

2- توافر المصدر :

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

3- الدراسات للمقارنة :

من المفيد المقارنة بين الدراسات التى 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 والفيزيقية) .

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 اختيار طريقة معينة يعتمد على نوع الغشاء أو طبيعة الكائن الذى يستخدم كمصدر للإنزيم وذلك على النحو التالى :

أولا: الأنسجة الحيوانية :

يؤدى غياب جدار خلوى صلد 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 خلاط عالى السرعة. وتجرى عملية الإستخلاص بواسطة محاليل أيزوتونية isotonic solutions (المحلول الأيزوتونى 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 والتى تحتوى على lysomes (وهى عضيات خلوية تحتوى على عدد من الإنزيمات المحللة مثل البروتينيز proteinases). وفى حالات أخرى غالبا 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 .

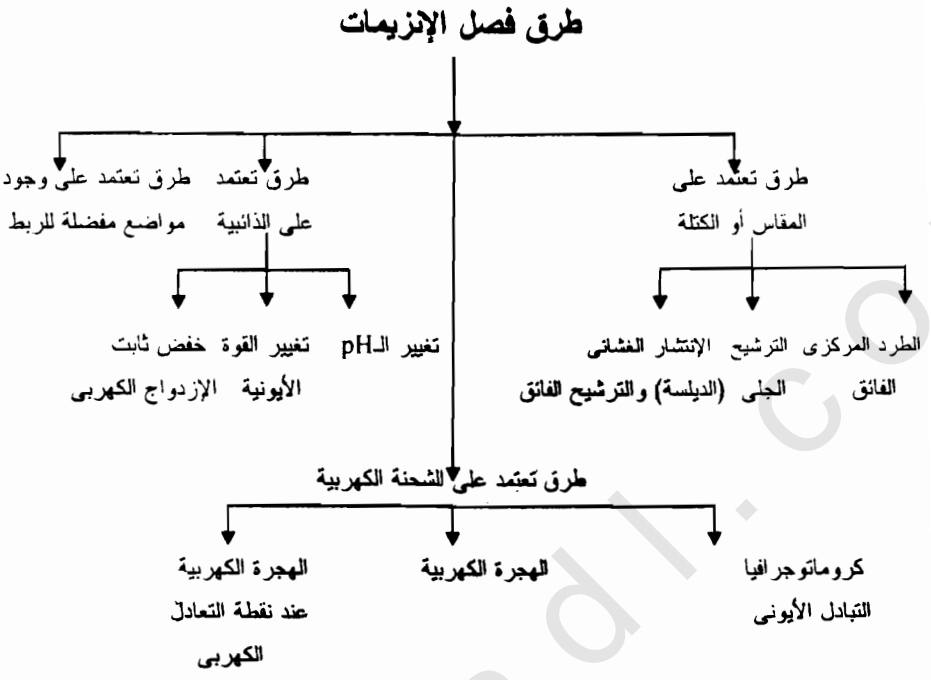
ثانيا : النباتات والفطريات والبكتيريا:

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 *Neuropora* ، *Aspergillus*) باستخدام مستخلصات إنزيمية تحتوى عامة على مخلوط من إنزيمات الكيتيناز chitinase، 3-جلوكونيز 3-gluconase. ويمكن كطريقة بديلة إستخدام طفرة من الفطر لايوجد 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.



شكل 11-3 : الطرق المختلفة التى يمكن إستخدامها لفصل الإنزيمات

11-3-1 طرق تعتمد على المقاس أو الكتلة

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

(أ) الطرد المركزى الفائق Ultracentrifugation

يمكن ترسيب الجزيئات الكبيرة (مثل الإنزيمات) باستخدام حقل طرد مركزى 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 الجزىء ولزوجة المحلول فقد تبين أنه بشكل عام كلما زاد الوزن الجزيئى كلما كان معدل الترسيب أعلى . وتجدر الإشارة إلى أن طريقة الطرد المركزى الفائق ليست من الطرق شائعة الإستخدام لتنقية الإنزيمات على النطاق الصناعى وذلك بسبب محدودية الحجوم (بضع ملليلترات) التى يمكن إستخدامها غير أن الطرد المركزى 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 مركزى 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 الجزىء للدخول إلى مسام حبيبات الجل. ويعتبر السفادكس sephadex (دكستران به روابط عرضية) وكذا بيوجل P "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 العامود بعكس المركبات ذات الجزيئات الصغيرة التى يمكنها إختراق مسام حبيبات الجل ولذا يتطلب خروجها من العامود 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 جزىء الإنزيم غير كروى بشكل كبير فإنه يزاح من العامود 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

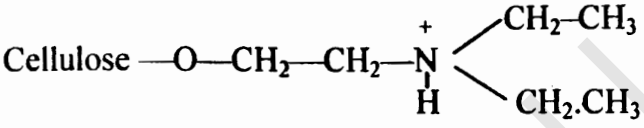
تعتمد طريقة الإنتشار الغشائى (الديلسة) على استخدام غشاء شبه منفذ semipermeable كالسلوفان حيث يعمل كغربال sieve ذى فتحات واسعة تسمح بمرور البروتينات الكروية التى لايزيد وزنها عن 20000 دالتون فى حين لا يمكن مرور الجزيئات ذات الأوزان الجزيئية الأكبر . ويمكن تغيير حجم المسام بمعاملات ميكانيكية وكيماوية مختلفة . 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 والتى قد تتواجد فى محاليل الإنزيمات. أما فى عملية الترشيح الفائق ultrafiltration فإن الجزيئات الصغيرة والأيونات تمر من خلال غشاء الديلسة تحت تأثير الضغط (عامة غاز نيتروجين عند نحو 4 ضغط جوى) وهو الأمر الذى يؤدى إلى تركيز محلول الإنزيم ومن ثم تقليل حجم العينة أثناء عملية التنقية .

11-3-2 طرق تعتمد على الشحنة الكهربية

تشتمل هذه الطرق على تقنيات كروماتوجرافيا التبادل الأيونى وطرق الهجرة الكهربية ويعتمد الفصل فيها على الشحنة الموجودة على الجزيئات موضع الفصل :

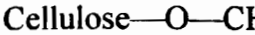
أ- كروماتوجرافيا التبادل الأيونى :

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



DEAE-cellulose (Diethylaminoethyl-cellulose)

وهو مبادل أنيونى anion exchanger يربط الجزيئات المشحونة بشحنة سالبة له قيمة pKa=10 .



CM–cellulose (carboxymethyl-cellulose)

وهو مبادل كاتيونى cation exchanger يربط الجزيئات المشحونة بشحنة موجبة، له قيمة pKa=4 . وخلال عملية التنقية عادة ما يتم إستخدام الإنزيم فى محلول ذى قوة أيونية منخفضة وعند قيمة pH تناسب عملية التبادل الأيونى (أى أن شحنة الإنزيم تكون مخالفة لشحنة المبادل الأيونى) . 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 يؤدى إلى زيادة تركيز الكاتيونات أو الأنيونات التى تنافس الإنزيم على الإرتباط بمواضع الربط على المبادل الأيونى . ويؤدى استخدام محاليل ذات قوة أيونية متزايدة تدريجيا إلى فصل البروتينات الموجودة فى المخلوط وفقاً لقدرتها على الإرتباط بالمبادل الأيونى . وعند استخدام طرز محورة من السفادكس (مثل الـ DEAE-sephadex) فإن الفصل يتم على أساس الشحنة (وإلى حد معين) على أساس مقاس الجزيئات . ويمكن استخدام كروماتوجرافيا التبادل الأيونى على نطاق كبير أو صغير . ومن المناسب استخدام الطريقة المتقطعة عند استخدام هذه التقنية على نطاق كبير ، أى إمصاص الإنزيم بإضافة المبادل الأيونى إلى المحلول ثم صب 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 .

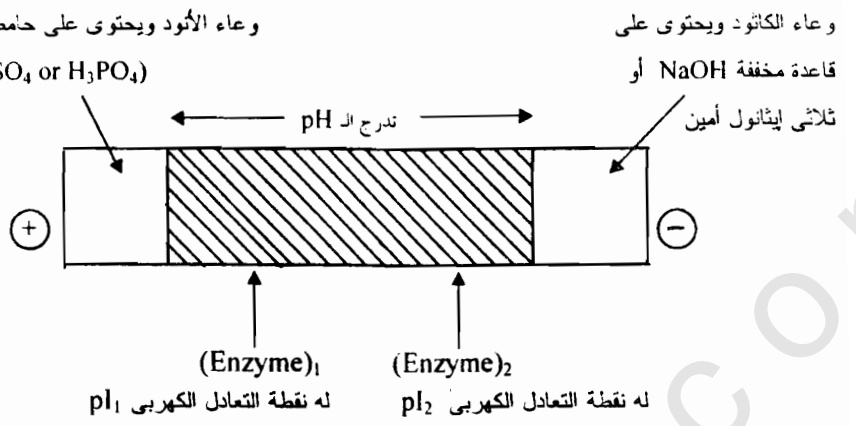
وتتأثر درجة النقاوة بخطوة التبادل الأيونى . ولكنها عامة تكون نحو عشر مرات (مقدرة كنشاط نوعى) ولكن أمكن تحقيق نتائج أفضل . ولكروماتوجرافيا التبادل الأيونى تطبيقات واسعة جدا فى الوقت الحالى كطريقة من طرق التنقية .

ب- الهجرة الكهربية Electrophoresis

يعتمد الفصل بالهجرة الكهربية على الحركة التفريقية للجزيئات تحت تأثير فرق جهد كهربى . ويتحدد معدل هجرة الجزيئات بكم الشحنة التى توجد عليها وكذا بحجم وشكل الجزىء . 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 (ملليجرامات 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 الكهربية عند نقطة التعادل الكهربى Isoelectric focusing

تبنى هذه الطريقة على أساس هجرة الجزيئات المشحونة تبعاً لنقطة تعادلها الكهربى على جل متدرج الـ pH وليس على معدل هجرة الجزيئات فى الحقل الكهربى. ويمكن التحصل على تدرج للـ pH على الجل عن طريق غمر الجل فى مخلوط من الأمفوليتات 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 رسما تخطيطيا لفصل الإنزيمات بواسطة طريقة الهجرة الكهربية عند نقطة التعادل الكهربى .



شكل 11-4: فصل الإنزيمات بواسطة طريقة الهجرة الكهربية عند نقطة التعادل الكهربى isoelectric focusing

وعند مرور التيار فإن الجزيئات المشحونة بالشحنة السالبة تهاجر فى إتجاه الأنود حتى يضاد encounter الحامض ويميل الحامض إلى معادلة الشحنة ولذا فإن الجزىء 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 جدا . وهذه الطريقة تستخدم عامة على نطاق تحليلى ضيق وإن كان من الممكن استخدامها كطريقة تحضيرية preparative method .

11-3-3 طرق تعتمد على تغيرات الذائبية :

تعتمد ذائبية 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 ذائباً . وفى عملية تنقية الإنزيمات فإنه يمكن تقليل التوازن بين هذه القوى مما يؤدى 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 للتنقية :

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 الكتروستاتيكى بين جزيئات الإنزيم، ومن ثم فإن ضبط الـ pH عند الـ pI يؤدى 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 التأكد من أن الإنزيم المراد إستخلاصه لايفقد نشاطه نتيجة للتعرض لهذه التغيرات 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 يؤدى إلى ترسيب هذه الجزيئات (ظاهرة التمليح الخارجي 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 رئيسيا فى خفض تركيز الماء جوهرياً الأمر الذى يؤدى بالتبعية إلى خفض تداخلات المذاب والمذيب ومن ثم الذائبية . ويعتبر ملح كبريتات الأمونيوم من أكثر الأملاح إستخداماً فى تنقية الإنزيمات وذلك لتميز هذا الملح برخص ثمنه والذائبية العالية فى الماء (المحلول المشبع عند 25°م له قوة جزيئية نحو 4 مول) وليس له آية 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 جلسر الدهيد – فوسفات ديهيدروجينيز glyceraldehyde-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 بللورات 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 جدا تحت درجة التجمد لتقليل مثل هذا التأثير .

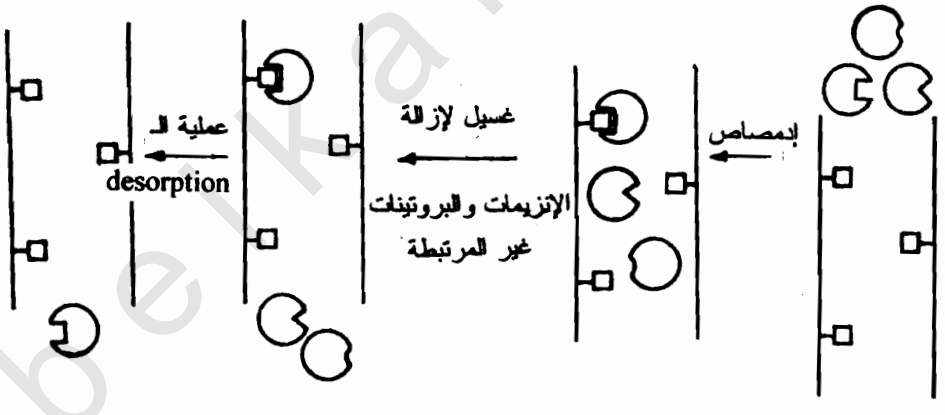
11-3-4 طرق تعتمد على وجود أماكن مفضلة متخصصة للربط :

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 والتى 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 عامود يحتوى على هذه المادة الخاملة فإن هذا الإنزيم فقط هو الذى يتم مسكه فى حين تخرج كل الإنزيمات والبروتينات الأخرى خارج العامود دونما مسك . ويمكن تحرير الإنزيم الممسوك بتغيير إما الـ pH أو القوة الأيونية للمحلول حيث يؤدى ذلك إلى إضعاف ربط الإنزيم بالعامود (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 مشابه مادة تفاعل substrate analogue أو مثبط تنافسى يمكن ربطه بالدعامة الخاملة وبحيث يحدث الربط التام بينه وبين الإنزيم .

ب- ربط الـ ligand بالمادة الداعمة قد يتداخل مع ربط الإنزيم مما يؤدى إلى فقد صفة تخصصية الإرتباط . 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- لكى ينجح الفصل بطريقة كروماتوجرافيا أفضلية الإرتباط فإن قوة التداخل بين ligand المرتبطة بالدعامة والإنزيم يجب أن تكون فى المدى الصحيح ، فإذا ماكانت ضعيفة جداً وثابت الإنحلال أكبر من 2 ملليمول dm^{-3} فإن الإنزيم لن تحدث له إعاقة retardation بواسطة العامود . ومع ذلك فإذا كان التداخل قوياً جداً فإن إزالة الإنزيم المرتبط لن تكون ممكنة إلا باستخدام ظروف تؤدى إلى فقد الإنزيم لنشاطه . وتجدر الإشارة إلى أن المعلومات التى يتم التحصل عليها من دراسات تثبيط الإنزيمات فى المحاليل تلعب دوراً هاماً فى تصميم نظم كروماتوجرافيا أفضلية الإرتباط .

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

وعلى الرغم من هذه المشاكل التى تعترى كروماتوجرافيا أفضلية الإرتباط فلقد وجدت هذه التقنية إستخداماً واسعاً فى مجال تنقية الإنزيمات وكذا الجزيئات البيولوجية الأخرى مثل المضادات الحيوية التى بها مواضع متخصصة للربط . ويمكن القول بأن نجاح هذه التقنية مرهون بالإستفادة القصوى من المعلومات المتوفرة عن الإنزيم فى المحلول .

ب- أفضلية الإزاحة Affinity elution

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

طريقة كروماتوجرافيا أفضلية الإرتباط والتى 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 الإرتباط 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 الإرتباط .

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 جزئيا بواسطة كبريتات الأمونيوم (تترسب هذه الإنزيمات عند درجات تشبع على عامود CM-cellulose عند pH = 6.5) ، فإذا ماتمت الإزاحة بواسطة الفوسفوإينول بيروفات phosphoenol-pyruvate (0.5 ملليمول dm^{-3}) فإنه يمكن إزاحة إنزيم البيروفات كينيز ، أما إذا تمت الإزاحة بواسطة فركتوز 1 ، 6 ثنائى الفوسفات (0.2 ملليمول dm^{-3}) فإنه يمكن إزاحة إنزيم الفركتوز-ثنائى فوسفات ألدوليز fructose-biphosphate aldolase .

4-11 تسمية الإنزيمات Enzymes nomenclature

كان من الشائع عند إكتشاف إنزيم جديد تسميته عن طريق إضافة المقطع -ase إلى مادة التفاعل التى يحفز الإنزيم تفاعلها أو أن يضاف هذا المقطع إلى نوع التفاعل الذى يحفزه الإنزيم . فمثلاً إنزيم اليوريز urease يحفز تفاعل التحلل المائى لليوريا وإنزيم ديهيدروجينيز الكحول alcohol dehydrogenase يحفز أكسدة الكحولات إلى ألدهيداتها 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 سمى إنزيم الكاتاليز catalase (يحفز تحول H_2O_2 إلى ماء وأكسجين جزيئى) 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 التى تحفزها . وتوجد ستة أقسام رئيسية للتفاعلات التى تحفزها الإنزيمات (جدول 11-1) .

جدول 11-1: تقسيم الإنزيمات تبعاً لنوع التفاعل .

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

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 المائى) أما الرقم الثانى (4) فهو رقم تحت القسم (يعمل على الروابط الببتيدية أى أنه ببتيديز peptidase) فى حين يشير الرقم الثالث (17) إلى رقم تحت تحت القسم (كربوكسى ببتيديز معدنى metallocarboxypeptidase لأن إنزيم الكربوكسى ببتيداز أ يحتوى على أيون زنك

obeikandl.com

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 :

كحول + NAD^+ ← ألدهيد أوكيتون + H^+ + NADH

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 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 الإرتباط لكل من مادة التفاعل والمثبطات inhibitors بالإنزيم ومن ثم التعرف وتحديد الظروف المثلى للحصول على أقصى معدل تحفيزى للإنزيم .

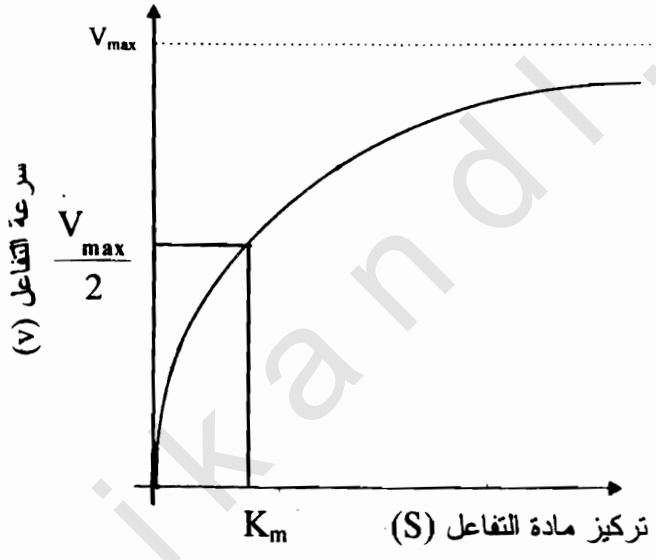
ب- يمكن تفهم ميكانيكية التحفيز الإنزيمى عن طريق رصد تغير معدل التفاعل الإنزيمى تحت الظروف المختلفة وبمعلومية التركيب الكيماوى والبنائى للإنزيم .

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

obeikandl.com

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 فى 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 11-6 . وعند تركيز معين من الإنزيم فإن v تتناسب خطيا مع S عندما تكون قيمة S صغيرة ، أما عند قيمة S أعلى فإن قيمة v لاتعتمد تقريبا على تركيز S.



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

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

$$E + S \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} [ES] \xrightarrow{K_3} E + P$$

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 العكسى) بثابت تفاعل K_2 وإما أن يعطى ناتج التفاعل P بثابت تفاعل K_3 .

وقد فسر ميكائيلس ومنتن حركية التفاعل الإنزيمى بأربع عشرة معادلة رياضية (يمكن للقارىء الرجوع إليها تفصيلاً فى كتب الكيمياء الحيوية) أدت فى النهاية إلى إشتقاق 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 ميكائيلس ومنتن Michaelis-Menten constant وهو عبارة عن تركيز مادة التفاعل عندما تكون سرعة التفاعل نصف سرعته القصوى (أنظر شكل رقم 11-6).

والمعادلة الأخيرة ما هى إلا تعبير كمى عن العلاقة التى تربط معدل التفاعل بتركيز مادة التفاعل والتى سبق توضيحها بالشكل رقم 11-6 . 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 .

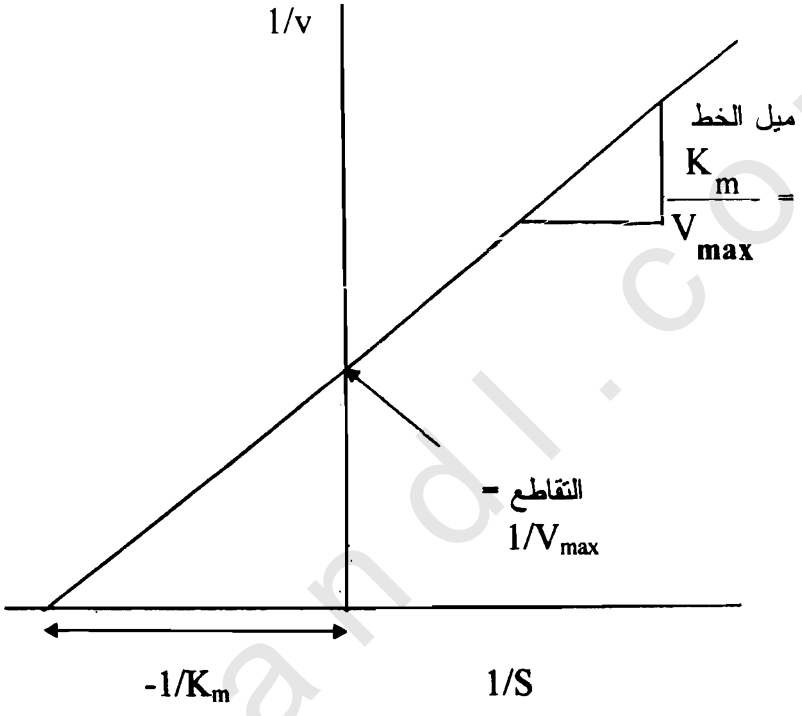
وعندما تكون قيمة [S] مساوية لقيمة K_m فإن

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

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

obeikandl.com

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 11-7 .



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

ويمكن تقدير سرعة التفاعل الإنزيمى 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 enzyme unit (U) والتى تعرف بأنها : كمية الإنزيم اللازمة لتحفيز تحول ميكروجزيئى واحد من مادة التفاعل (10^{-6} M) فى الدقيقة الواحدة عند 25°م فى حالة الإنزيمات التى تهاجم رابطة واحدة، أما إذا كان الإنزيم يهاجم أكثر من رابطة واحدة فى جزىء مادة التفاعل فإن وحدة الإنزيم فى هذه الحالة تكون عبارة عن (كمية الإنزيم اللازمة لتحفيز تحول ميكرومكافىء واحد من مادة التفاعل فى الدقيقة الواحدة عند 25°م) .

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

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

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

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

11-6 إستخدامات الإنزيمات فى التصنيع الغذائى

Utilization of enzymes in food industry

للإنزيمات إستخدامات متعددة - وأخرى ممكنة - فى مجال تصنيع الأغذية وسنحاول هنا إيجاز أهم تطبيقات الإنزيمات ثم سنتناول بالشرح أهم التطبيقات الواعدة لها.

11-6-1 إنزيمات الأميليز Amylases

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

ويمكن إستخدام إنزيمات الأميليز لتطرية tenderization بعض الخضروات مثل الفاصوليا . وفى طرق التخمير التقليدية والتى يتم فيها إجراء تحليل مائى للنشا الموجود بالشعير قبيل التخمير ، فإنه يسمح بحدوث إنبات لحبوب الشعير إلى درجة تضمن إنتاج إنزيمى الألفا والبيتا أميليز بحيث لا تكون خطوات التحلل المائى عاملاً محدداً . وتجدر الإشارة إلى أن إضافة الإنزيمات المحللة قبيل التخمير ليست بالإتجاه السائد علميا ، غير أن التدعيم بالإنزيمات enzyme supplementation يستخدم على نطاق واسع فى إنتاج المشروبات الروحية عند إستخدام الذرة الرفيعة ، البطاطس، القمح ، الراى كمصادر للنشا . وأكثر مصادر إنزيمات الأميليز الميكروبية على النطاق التجارى هى:

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. oryzae* ، *A. niger* 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 تؤدى إلى إنتاج بيرة منخفضة السعرات حيث أن كمية السكريات محدودة التسكر المتبقية تكون ضئيلة للغاية.

11-6-2 السيليوليز Cellulase

من التطبيقات الهامة لإنزيم السيليوليز تحليل الكربوهيدرات المعقدة بالجدر الخلوية خلال نقع واستخلاص الأغذية النباتية كالحبوب والبذور ، وكذا تحليل السليلوز خلال تجفيف حبوب البن . ويمكن إستخدام إنزيم السيليوليز فى التخلص من التحبب graininess بثمار الكمثرى كما يمكن إستخدامه 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) .

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

11-6-4 إنزيمات الليبيز Lipases

على الرغم من أن لإنزيمات 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 ـ الأحماض الدهنية من الزيوت وإنتاج لبن ذى

نكهة تعتيق cured flavor خفيفة واستخدامه فى إنتاج الشيكولاته باللبن . ومن التطبيقات الواعدة لإنزيمات الليبيز استخدامها فى عملية الأسترة التبادلية interesterification للزيوت والدهون ومخاليطها؛ وذلك بغية التحكم فى الصفات الفيزيقية والريولوجية والتغذوية للمخاليط الناتجة ، وسنتحدث تفصيلاً عن هذه العملية ومردوداتها المختلفة فيما بعد . وقد أمكن استخدام إنزيمات الليبيز 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 والتى 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 تحلل 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 وبتركيزات 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 لايستطيعون 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 لتزايد 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 للناتج غير ذائب . ويجب أن يكون للإنزيم البديل المستخدم فى صناعة

الجبن القدرة على تحفيز تحليل مائى محدود حيث أن التحليل المـائى 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 لايقل عن 60٪ من الكيموسين المستخدم فى عملية التجبن فى صناعة الجبن بالولايات المتحدة الأمريكية يتم تحضيره من ميكروبات محورة وراثيا genetically modified microorganisms (GMM) .

11-6-8 إنزيمات البروتييز Proteases

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

القطعيات 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 البروتييز فى مجال التصنيع الغذائى .

بيد أنه يجب أن ننوه إلى أنه بالرغم من كل التطبيقات المفيدة لإنزيمات البروتييز فإن لها بعض التأثيرات السلبية على جودة بعض الأغذية إذ أنها تؤثر سلبا على فترة حفظ shelf life البيض سواء كان طازجاً أو مجففاً كما أن وجود هذه الإنزيمات فى الأسماك القشرية يؤدى إلى حدوث طراوة زائدة over tenderization غير مرغوبة للحم ومن ثم فإنه يجب إجراء تثبيط سريع لهذه الإنزيمات بعد الصيد. كذلك فإن النشاط المرتفع لإنزيمات البروتييز بالدقيق يؤدى 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 فى تحفيز عملية التحلل المائى 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 . ويؤدى وجود الإنزيمات البكتينية إلى زيادة كفاءة إستخلاص زيت الزيتون . من ناحية أخرى فإن للإنزيمات البكتينية إذا ما تواجدت بتركيزات مرتفعة تأثيرات سلبية على ثمار الفواكه إذ تؤدى إلى التطرية الزائدة . وقد تمكنت الباحثة نجوى محسب (Mohasseb 1992) من تحديد الظروف المثلى لإنتاج بعض الإنزيمات البكتينية بواسطة الفطر *Volvariella volvaceae* والذى تم تنميته على قشور الموالح . وقد استخدمت الباحثة كلا من إنزيمى البكتين ميثايل أستيريز pectin methyl esterase (PME) والبولى جلاكتو يورينيز polygalactouronase بعد إجراء تنقية جزئية لهما ـ فى ترويق عصير البرتقال . وتبين أن استخدام إنزيم PME قد أدى إلى إرتفاع عائد العصير المتحصل عليه إلى نحو 32.6٪ من حجم العصير الإبتدائى بينما إنخفضت اللزوجة النسبية بمقدار 54.6٪ . أما عند إستخدام 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 إستخدام إنزيم الـ PME فى هذا الغرض.

11-6-10 الكاتاليز والبيروكسيديز Catalase and peroxidase

من التطبيقات الهامة لإزيم الكاتاليز استخدامه فى تحطيم فوق أكسيد الهيدروجين H_2O_2 والذى يستخدم فى البسترة الباردة cold pasteurization للبن ، 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 الأكسجين لمنع الإغمقاق و/أو الأكسدة وذلك فى وجود إنزيم الجلوكوز أوكسيديز glucose oxidase . أما إنزيم البيروكسيديز فيمكن إستخدامه فى وجود إنزيم الجلوكوز أوكسيديز glucose oxidase لتقدير الجلوكوز كما أنه يستخدم ــ كما هو الحال بالنسبة لإنزيم الكاتاليز ـ كمؤشر لقياس كفاءة عملية سلق الخضروات توطئة لحفظها بطرق الحفظ المختلفة .

11-6-11 إنزيمات الفوسفاتيز Phsphatase

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 .

11-6-12 الجلوكوز أوكسيديز Glucose oxidase

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

11-6-13 التانيز والبولى فينول أوكسيديز Tannase and polyphenoloxidase

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

ويلخص الجدول 11-2 إستخدامات الإنزيمات المختلفة فى مجال التصنيع الغذائى .

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

نوع الإنزيم	نوع الغذاء	الهدف من الإستخدام أو فعل الإنزيم
الأميليز Amylases	المخبوزات	زيادة محتوى السكر أثناء عملية التخمر بالخميرة
	صنع البيرة	تحويل النشا إلى مالتوز يمكن تخميره ، وإزالة عكارة النشا
	الحبوب	تحويل النشا إلى دكسترينات وسكر ، وزيادة إمتصاص الماء
	الشيكولاتة والكاكاو	تسييل النشا مما يجعله ينساب بحرية كاملة
	صنع الحلوى	إسترجاع السكر من بقايا الحلوى candy scraps المتخلفة عن التصنيع
	عصائر الفاكهة	إزالة النشا لزيادة خواص اللمعان sparkling properties
	صنع الجيلى	إزالة النشا لزيادة خواص اللمعان
	صنع البكتين	كوسيلة للمساعدة فى تحضير البكتين من ناتج عصر التفاح apple pomace
	صنع المحاليل السكرية المركزة	تحويل النشا إلى دكسترينات منخفضة الوزن الجزيئى مثل شراب الذرة Com syrup.
	الخضروات	تحلل النشا كما هو الحال عند تطرية حبوب البسلة الخضراء
السليوليز Cellulase	صنع البيرة	تحلل معقد الكربوهيدرات بالجدر الخلوية
	البن	تحلل السليولوز أثناء تجفيف حبوب البن
	الفواكه	التخلّص من خاصية التحبّب graininess فى الكمثرى ، وأيضا فى عمليات تقشير ثمار المشمش والطماطم .
الدكستران - سكراز Dextane-sucrase	صنع المحاليل السكرية المركزة	زيادة لزوجة أو ثخانة thickening الشراب الناتج .
	صنع الآيس كريم	إضافة الدكستران كعامل مغلّظ للقوام لإكساب الناتج القوام المناسب .

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

نوع الإنزيم	نوع الغذاء	الهدف من الإستخدام أو فعل الإنزيم
الإنفرتيز Invertase	عسل النحل الصناعى	تحويل السكروز إلى جلوكوز وفركتوز .
	الحلوى	صنع الحلوى الطريّة المغلّفة بالشيكولاتة والكريمة .
اللاكتيز Lactase	الآيس كريم	منع تبلور اللاكتوز والذى ينتج عنه القوام المحبّب والرملى .
	العلائق الحيوانية	تحويل اللاكتوز إلى جالكتوز وجلوكوز .
	اللبن	ثبات بروتينات اللبن فى اللبن المجمّد عن طريق التخلّص من اللاكتوز .
التانيز Tannase	صنع البيرة	التخلّص من المركبات البولى فينولية .
البنتوزانيز Pentosanase	عملية الطحن	الحصول على النشا من دقيق القمح
نارنجينيز Naringinase	الموالح	إزالة المرارة من بكتين الموالح وعصير الموالح عن طريق تحلّل الجلوكوسيد glucoside والنارنجين naringin .
الإنزيمات البكتينية (المفيدة) Pectic enzymes (useful)	الشيكولاتة والكاكاو	نشاط تحلّلى أثناء تخمير الكاكاو .
	البن	تحلّل الغلاف الخارجى أثناء تخمر حبوب البن .
	الفواكه	عملية التطرية أثناء النضج .
	عصائر الفواكه	زيادة ناتج العصير المتحصل عليه من ضغط ثمار الفاكهة ، كما يمنع ظهور المظهر غير اللائق ويحسّن من عمليات تركيز العصائر .
	الزيتون	يسهّل من إستخلاص الزيت .
	النبيذ	الحصول على نبيذ رائق .
(الضارّة) Deteriorative	عصير الموالح	تهتّم وفصل المواد البكتينية بالعصير .

obeikandl.com

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

نوع الإنزيم	نوع الغذاء	الهدف من الإستخدام أو فعل الإنزيم
البروتييز (المفيدة) Proteases (useful)	الفواكه	الطرواة الزائدة لثمار الفواكه .
	المخبوزات	تطرية العجائن ، تقليل مدة الخلط ، يزيد من إمكانية مطاطية أو فرد العجائن، يحسّن من القوام ويزيد من حجم الرغيف ويسهل إنفراد إنزيم البيتا-أميلاز β-amylase .
	صنع البيرة	تحسن من القوام والنكهة مع إتاحة العناصر التغذوية أثناء التخمير ، كما يساعد فى الإسراع من عملية الترشيح والترويق أثناء التبريد .
	الحبوب	يقوم بتحوير البروتينات لزيادة معدل التجفيف مما يحسّن من خواص التداول للناتج.
	الجبن	يعمل على تجمّع أو تخثر بروتين الكازين ، ويحسّن من خواص النكهة أثناء التعتيق ageing.
	الشيكولاتة والكاكاو	يعمل على حبوب الكاكاو أثناء التخمير .
	البيض ومنتجاته	يحسّن من خواص التجفيف .
	العلائق الحيوانية	يستخدم فى معاملة مخلفات التصنيع الغذائى لتحويلها إلى علائق .
	اللحوم والأسماك	يستخدم فى عمليات التطرية - وفى الحصول على البروتينات من العظام وبقايا لحوم الأسماك الناتجة من عملية التشذيب trash fish ، ويسهل من عملية إستخلاص الزيوت .
	اللبن	فى تجهيز لبن فول الصويا Soybean milk .
	نواتج تحلل البروتينات	الإستخدام فى البهارات condiments مثل صوص فول الصويا soy sauce وصوص التمر هندى tamar sauce ، وأيضا فى تصنيع وجبات معينة وفى المرق bouillon والشوربات المجففة ومسحوق البهريز gravy powders واللحوم المصنعة .

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

نوع الإنزيم	نوع الغذاء	الهدف من الإستخدام أو فعل الإنزيم
	النبيذ	الترويق
(الضارّة) Deteriorative	الكابوريا Crab والإستاكوزا Lobster	تسبّب تطرية لحوم الكابوريا والإستاكوزا إذا لم نسرع بتثبيطها .
	الدقيق	تقلّل من حجم الرغيف الناتج مع تدهور القوام إذا ما كان النشاط كبيرا .
الليبيز (المفيد) Lipase (useful)	الجبن	التعتيق والإنضاج لإكساب الجبن النكهة المميّزة .
	الزيوت	تحويل الليبيدات إلى جليسرول وأحماض دهنية .
	اللبن	إنتاج لبن ذى نكهة مميّزة لإستخدامه فى صنع شيكولاتة باللبن .
(الضار) Deteriorative	الحبوب	الإغمقاق وتكون اللون البنى الزائد عند تصنيع كيك الشعير (الشوفان) Oat cakes مع تكون اللون البنى غير المرغوب لنخالة القمح Wheat bran .
	اللبن ومنتجاته	التزنخ التحلّلى .
	الزيوت	التزنخ التحلّلى
الفوسفاتيز Phosphatases	أغذية الأطفال	تعمل على زيادة ناتج الفوسفات المتاحة .
	صنع البيرة	تحلّل مركبات الفوسفات .
	اللبن	إختبار مدى كفاءة عملية البسترة .
النيوكلييز Nucleases	محسّنات النكهة	إنتاج النيوكليوتيدات nucleotides والنيوكليوسيدات nucleosides .
البيروكسيديز (المفيدة) Peroxidases (useful)	الخضروات	إختبار مدى كفاءة عملية السلق blanching .
	تستخدم فى تقديرات الجلوكوز	وذلك مع إنزيم جلوكوز أوكسيديز glucose oxidase .

obeikandl.com

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

نوع الإنزيـــم	نـــوع الغـــذاء	الهدف من الإستخدام أو فعـــل الإنزيـــم
(الضارة) Deteriorative	الخضروات	تكوّن نكهات غير مرغوبة .
	الفواكه	تشترك فى تفاعلات التلوّن البنى .
الكتالاز Catalase	اللبن	تهدّم فوق أكسيد الهيدروجين (H_2O_2) فى البسترة على البارد .
	عدد من المنتجات	للتخلّص من الجلوكوز / أو الأكسجين لمنع التلوّن البنى / أو الأكسدة ، حيث يستخدم مع إنزيم جلوكوز أوكسيديز .
جلوكوز أوكسيديز Glucose oxidase	عدد من المنتجات	للتخلّص من الأكسجين / أو الجلوكوز من منتجات مثل البيرة ، والجبن ، والمشروبات الغازية ، والبيض المجفف ، وعصائر الفواكه ، واللحوم والأسماك ، واللبن المجبن ، والنبيذ لمنع الأكسدة / أو التلوّن البنى ، حيث يستخدم مع إنزيم الكتاليز .
	يستخدم فى تقدير الجلوكوز	طريقة خاصة لتقدير الجلوكوز .
بولى فينـول أوكسـيديز (المفيـد) Polyphenol oxidase (useful)	الشاى ، والبن ، والدخان	تكون اللون البنى أثناء الإنضاج والتخمّر / أو عملية التعتيق .
(الضار) Deteriorative	الفواكه ، والخضروات	التلون البنى غير المرغوب ، وتكون نكهات غير مرغوبة ، وفقد الفيتامينات.
ليبوكسجينيز Lipoxygenase	الخضروات	تهدّم الأحماض الدهنية الضرورية وفيتامين "أ" مع تكون نكهات غير مرغوبة .
أسـكوربيك أسـيد أوكسـيديز Ascorbic acid oxidase	الخضروات ، والفواكه	تهدّم فيتامين "حـ" (حامض أسكوربيك أسيد) .
ثيامينيز Thiaminase	اللحوم ، والأسماك	تهدّم الثيامين .

المصدر : Whitaker (1972) .

obeikandl.com

11-7 الإنزيمات المثبتة Immobilized enzymes

يعتبر تثبيت الإنزيمات من أهم التطورات الحديثة فى تكنولوجيا الإنزيمات، وعلى الرغم من أن هذه العملية قد عرفت منذ زهاء السبعين سنة إلا أن استخدامها على نطاق صناعى لم ير النور إلا عام 1969 . وتتم عملية تثبيت الإنزيم على دعامة خاملة لمادة غير ذائبة فى الماء . وتستخدم أعمدة تملأ بالمادة الخاملة بحيث يمكن إستخدام الإنزيم بطريقة مستمرة ولعدة مرات مما يقلل من تكلفة إستخدام الإنزيمات على النطاق الصناعى . 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 الحركى للإنزيم المثبت يعتبر من الأمور المعقدة لأنه يرتبط بتأثيرات عملية التثبيت على البناء ثلاثى 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 (وهى التقنيات المستخدمة فى بعض تقنيات التكنولوجيا الحيوية biotechnology لخفض تكلفة إستخدام الإنزيمات على النطاق الصناعى) . وللإنزيمات المثبتة تطبيقات هامة فى النواحى التحليلية والتصنيعية بل وتعد الآن أفضل من التقنيات الشائع إستخدامها فى مجال الكيمياء العضوية .

11-7-1 طرق تثبيت الإنزيمات

Methods of enzymes immobilization

يمكن تثبيت الإنزيمات بعدة طرق لكنها تندرج تحت قسمين أساسيين هما التثبيت الفيزيقى والتثبيت الكيماوى :

أ- التثبيت الفيزيقى Physical immobilization

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

العالى ، القدرة على إعادة الشحن recharge بالإنزيم عندما ينخفض نشاطه التحفيزى 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 للفوسفوليبيدات (تسمى الليبوسومات 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 تفتقر 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 الإرتباط 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 سكرا عديدا 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 فى الوجهين ومادة أخرى تذوب فى الوجه العضوى فقط . ويكون الإنزيم موجوداً فى الوجه المائى ، أما المكون الآخر للبوليمر فإنه يضاف إلى المذيب العضوى مما يؤدى إلى تكوين غشاء membrane حول القطرات المائية aqueous droplets المحتوية على الإنزيم . ويعتمد مقاس المسام pore size للغشاء المتكون على ظروف التفاعل .

د- التبادل الأيونى Ion exchange

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

هـ- الربط العرضى Cross linking

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

و- الإدمصاص والربط العرضى Adsorption and cross linking

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

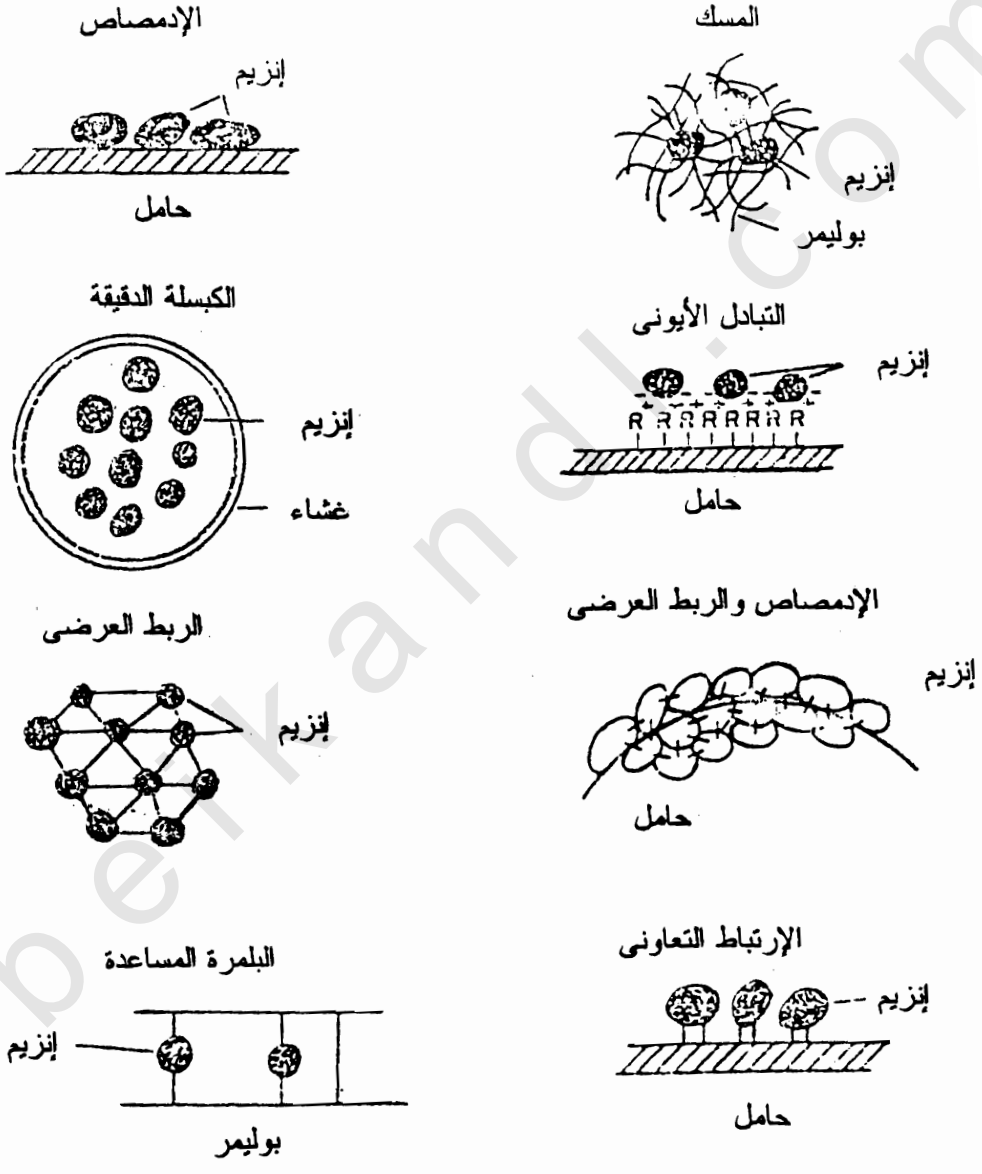
ز- البلمرة المساعدة Copolymerization

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 تعاونيا ببوليمر عضوى أثناء تكوينه حيث يرتبط الإنزيم بالبوليمر ويصبح جزءاً من تكوينه . وفى هذه الطريقة يتم إستخدام 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) .

obeikandl.com

3.7-11 العوامل المؤثرة على إستخدام الإنزيمات المثبتة
Factors affecting use of immobilized enzymes

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

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

أ- التكلفة Cost

لا شك أن استخدام تقنية الإنزيمات المثبتة – شأنها فى ذلك شأن آية تقنية جديدة – لابد أن يكون ذا مردود إيجابى على تكلفة الإنتاج أى يكون لتطبيق هذه التقنية عائد إقتصادى . وقد يكون هذا العائد فى صورة تقليل تكلفة الإنتاج أو فى صورة ناتج أعلى جودة أو أن إستخدام هذه التقنية من شأنه إنتاج ناتج جديد لايمكن إنتاجه إلا عن طريق التقنية الجديدة . فإذا ما انتقلنا من العام إلى الخاص فإننا نجد أن استخدام إنزيم الجلوكوز أيسوميريز glucose isomerase المثبت فى إنتاج شراب الذرة عالى الفركتوز high fructose corn syrup (HFCS) يعد من أنجح إن لم يكن أنجح تطبيقات الإنزيمات المثبتة على النطاق الصناعى ، فما هى المقومات التى أدت إلى نجاح استخدام هذا الإنزيم فى الصورة المثبتة على النطاق التجارى فى إنتاج الـ HFCS ؟ للإجابة عن هذا السؤال فإننا نقارن بين إنزيم الجلوكو أيسوميريز وإنزيم آخر هو الجلوكو أميليز glucoamylase (يسمى أحيانا بالجاما أميليز γ-amylase) والذى لايستخدم فى الصورة المثبتة على نطاق تجارى على الرغم من كونه إنزيماً مهما فى صناعة شراب الذرة عالى الفركتوز حيث أن هذا الإنزيم يحفز فصل جزىء جلوكوز مفرد من النشا فى المحلول الذى سبق تحليله مبدئيا بواسطة الحامض أو بتحفيز إنزيم إسالة liquifying enzyme مثل الألفا أميليز α-amylase أى أن:

النشا ——جلوكو أميليز (لايتم تثبيته)——◄ جلوكوز ——جلوكوز أيسوميريز (يتم تثبيته)——◄ شراب ذرة عالى الفركتوز

obeikandl.com

وتجدر الإشارة إلى أن إستخدام الجلوكوأميليز فى تحفيز التحليل المائى لمحلول نشا ذى تركيز 30٪ يؤدى إلى إنتاج شراب جلوكوز بتركيز 94-95٪ على أساس الوزن الجاف مقارنة بتركيز 88٪ جلوكوز والذ يتم الوصول إليه فى حالة إستخدام التحليل المائى بالحامض .

ونمقارنة إنزيمى الجلوكو أيسوميريز والجلوكو أميليز من منظور التطبيق على النطاق التجارى فإنه من الضرورى 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 أيسوميريز من الإنزيمات مرتفعة الثمن مقارنة بالجلوكو أميليز . ومن ثم فإن إستعادة إنزيم الجلوكوز أيسوميريز 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 إستخدام الإنزيم غير المثبت (الذائب) .

ب- كفاءة التحويل Conversion efficiency

من الأمور المهمة التى تحدد إمكانية إستخدام الإنزيمات المثبتة على النطاق التجارى كفاءة الأداء performance للنظام وبحيث يؤدى إلى إنتاج الناتج النهائى المطلوب. فإذا ما رجعنا إلى إنزيمى الجلوكوز أيسوميريز والجلوكوأميليز فإننا نجد أن الإنزيم الأول يؤدى وظيفته جيدا وهو على الحالة المثبتة وذلك بعكس إنزيم الجلوكوأميليز. والذى 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 إستخدام تقنية الإنزيمات المثبتة، وعامة فإن إنتاج شراب الذرة عالى الفركتوز HFCS مثلاً يتم عند درجة حرارة تتراوح من 50 إلى 60°م مما يقلل من النمو الميكروبى واحتمالات تلوث الناتج . ونجد أن إنزيم الجلوكوز أيسوميريز يعمل جيدا فى هذا المدى من درجات الحرارة . أما إنزيم الجلوكوأميليز فهو غير ثابت نسبيا 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 إستخدام مادة تفاعل مبسترة وذلك للحيلولة دون حدوث نمو ميكروبى . ولاشك أن إجراء بسترة لمادة التفاعل إجراء غير عملى وناهيك عن التكلفة الإضافية فإذا أضفنا إلى ذلك قصر فترة ثبات الإنزيم وهو

فى الحالة المثبتة لأدركنا أن تثبيت إنزيم الجلوكوأميليز يصبح غير ذى مـردود إيجـابى من الناحية التطبيقية .

د- حالة الناتج Status of product

عند تقويم تقنية الإنزيمات المثبتة فإنه يجب أن نأخذ فـى إعتبارنـا مـا إذا كـان الناتج جديداً أم أنه ناتج معروف ويتم إنتاجه ، فعلى سبيل المثال يـؤدى إسـتخدام إنزيـم الجلوكوز أيسوميريز المثبت إلى إنتـاج نـاتج جديـد هـو HFCS والـذى يتسـم بصفـات تجارية معينة أهمها حلاوته التى تفوق حلاوة شراب الذرة ، ومن ثـم فـإن الـ HFCS ناتج جديد يتم إنتاجه بتقنية جديـدة بمعنـى أنـه باسـتخدام تقنيـة الإنزيمـات المثبتـة أمكـن تطوير العمليات التصنيعية والتكنولوجيـة فـى آن واحـد . مـن ناحيـة أخـرى فـإن تقنيـة تثبيت إنزيم الجلوكوأميليز لابد وأن تحل محل العملية الإنزيمية التى استقرت جيداً وتـم تحديد ظروفها المثلى (optimization) بالنسبة للإنزيم الذائب إذا ما أريد لعملية تثبيت هذا الإنزيم على نطاق تجارى . بمعنى آخـر فـإن الأمـر يتطلـب أداء performance أعلى لإنزيم الجلوكوز أميلـيز المثبـت وأن تتحقـق ميـزة إقتصاديـة معنويـة لكـى تكـون عملية تثبيت الإنزيم فعالة وجديدة إذا ما استخدمت عوضـاً عـن الإنزيـم الذائـب (غـير المثبت) . بيد أنه ليس معنى ذلك أن إنزيم الجلوكوأميليز المثبت لن يحل محـل الإنزيـم 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 تلـك التى تعتبر من التطبيقات الواعدة للإنزيمات المثبتة فى مجال التصنيع الغذائى :

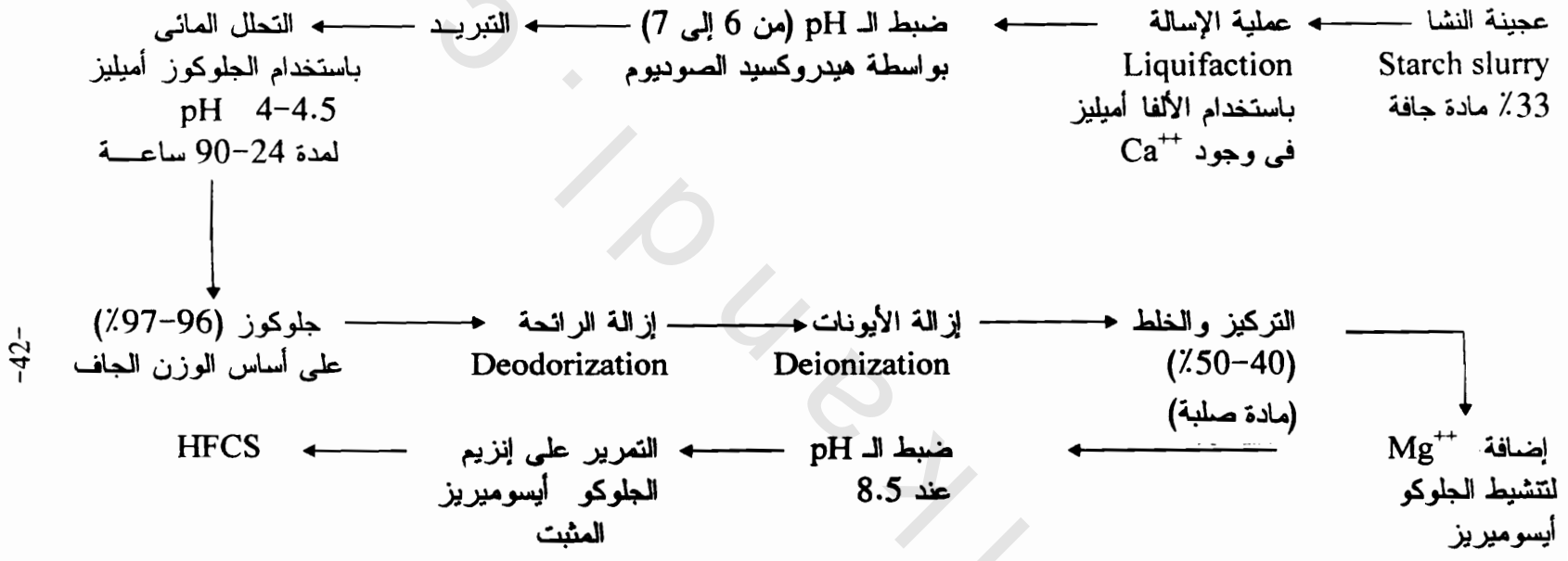
أولا : إنتاج شراب الذرة عالى الفركتوز

Production of high fructose corn syrup (HFCS)

يوضح الشـكل رقم (11-9) خطـوات تصنيـع شـراب الـذرة عـالى الفركتـوز HFCS، ويمكن شرح عملية التصنيع على النحو التالى :

أ- الطحن وتحضير عجينة النشا :

يتم طحن حبوب الذرة الصفراء مع فصل الجنين لاستخلاص الزيـت منـه، ثـم تحضر عجينة النشا starch-slurry بتركيز 33٪ مادة جافة .



شكل 11-9 : خطوات تصنيع شراب الذرة عالى الفركتـــوز (HFCS) .

ب- الإسالـــــة Liquifaction

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

وعملية الإسالة 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 . ويعاد 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 الإسالة التى تتم على خطوات متعاقبة فى سبعة مفاعلات reactors وتستغرق هذه العملية من ساعتين إلى ثلاث ساعات . والمحلول 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 المائى الإنزيمى (الخطوة اللاحقة) كما أن وجود شوائب من البروتين والدهن يؤدى إلى تكوين رغوة على سطح شراب الجلوكوز ، كما أن وجود هذه الشوائب يعيق عمليات الترشيح اللاحقة . ويمكن إزالة هذه الشوائب باستخدام الطرد المركزى .

د- التحليل المائى Hydrolysis

تجرى عملية التحليل المائى بطريقة مستمرة وذلك فى سلسلة من المفاعلات حيث يضاف هنا إنزيم آخر هو الأميلوجلوكوسيديز amyloglucosidase (AMG) والذى يؤدى إلى زيادة الـ DE للنشا المسال 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 المائى نحو 72 ساعة.

هـ- الترشيح بالفحم Carbon filtration

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

و- التبادل الأيونى Ion exchange

تستخدم بطارية من المبادلات الأنيونية 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 لراتنجات التبادل الكاتيونى باستخدام حامض الهيدروكلوريك فى حين يتم إجراء هذه العملية بواسطة هيدروكسيد الصوديوم أو هيدروكسيد الأمونيوم بالنسبة لراتنجات التبادل الأنيونى .

ز- التبخـــير Evaporation

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

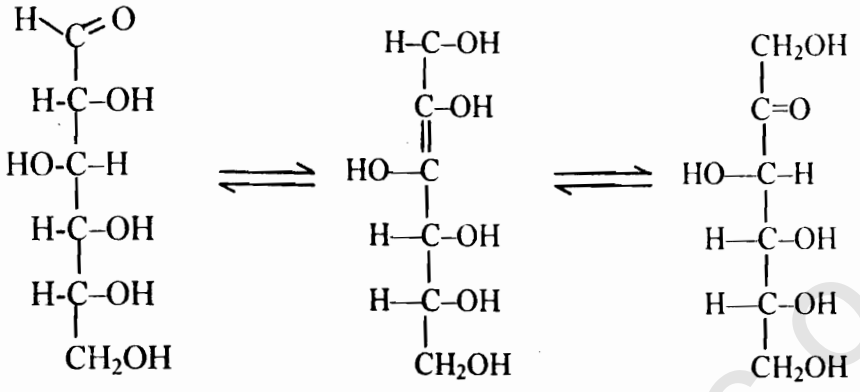
وننوه إلى أنه يتم الآن إنتاج جلوكوز سائل على النطاق الصناعى باستخدام التحويل الإنزيمى ويتوافر الجلوكوز الناتج بهذه التقنية فى عدة صور هى :

أ- الجلوكوز النمطى Standard glucose
ب- االجلوكوز عالى مكافىء 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 (ألدوز) 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 :



جلوكـوز 2-3-إين داى أول فركتوز

Glucose 2-3-Endiol Fructose

أى أن عملية تحويل الجلوكوز إلى فركتوز تتم من خلال مركب وسطى هو 2-3-إين داى أول . وتجدر الإشارة إلى أن الإنزيم لايحفز تحويل كل الجلوكوز إلى فركتوز إذ أن ما يتم تحويله من جلوكوز لايتعدى نسبة تتراوح من 42٪ إلى 45٪ فقط . وتتأثر كفاءة عملية تحويل الجلوكوز إلى فركتوز بعدة عوامل هى :

أ- تركيز أيونات الكالسيوم والماغنسيوم

ب- وقت التفاعل .

ج- درجة الحرارة .

د- رقم الأس الهيدروجينى pH .

هـ- وجود الأكسجين .

و- نقاوة المحلول .

ز- محتوى الجلوكوز من المادة الجافة .

ح- محتوى الدكستروز (الجلوكوز) .

ط- تركيز ثانى أكسيد الكبريت SO_2 .

ويتم إستخدام 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 . وترتب 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.

obeikandl.com

ويتناقص النشاط الإنزيمى 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 فى الساعة .

وبعد عملية تحويل المشابه isomerization يرشح الشراب خلال فحم نشط متبوعاً بإجراء عملية تبادل أيونى ion exchange . ثم تجرى عملية تبخير تحت تفريغ للوصول بتركيز المادة الجافة إلى 71٪. ويسوق هذا الناتج تحت إسم فركتوز 42. أما لإنتاج الجيل الثانى من شراب الذرة عالى الفركتوز (فركتوز 55) فإنه يلزم إستخدام تقنية معقدة حيث تجرى عملية فصل كروماتوجرافى 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 الـ D5 = 71٪) مع فركتوز 42 (تركيز الـ D5=46٪) باستخدام خلاط استاتيكى . ثم يمرر الشراب على بطارية من أعمدة الكروماتوجرافى مملوءة براتنجات معينة يمكنها فصل أو تفريد fractionation المخلوط إلى مكونين fraction هما :

أ- مكون الدكستروز 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 ثانية إلى خطوة التحلل المائى . وللحصول على فركتوز 55 والذى تتطلبه معظم صناعات المشروبات soft drinks فإنه يتم خلط فركتوز 98٪ مع فركتوز 42. وبعد الخلط يتم الترشيح خلال الفحم متبوعاً بالتبادل الأيونى وذلك لضمان إزالة الألوان والروائح غير المرغوبة . وكذا إزالة المعادن الموجودة فى فركتوز 55 لكى 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 عالى الفركتوز HFCS يؤدى إلى إنتاج نواتج (ثانوية) مهمة وهى زيت الذرة والجلوتين والأخير يتوافر فى 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 إنتاجا 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 الأصلى عن طريق الإستخلاص والتنقية 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 .

ثانيا : 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 بمتبقى 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 .
stachyose) مع فصل الفركتوز .

وعملية التحليل المائى للسكروز تسمى بعملية التحول ذلك لأن المخلوط النـاتج من عملية التحليل المائى يكون يسارى الدوران laevorotatory فى حين أن السكروز يمينى الدوران dextrorotatory :

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

ويتميز السكر المحول بأنه أحلى من السكروز . وتشير البحوث المنشورة على تثبيت إنزيم الانفرتيز إلى إمكانية تثبيته بطرق مختلفة وعلى دعامات مختلفة كما يلى: طبقاً للإستعراض المرجعى الذى أعدته الباحثة هناء عبداللاه (Abdellah, 1989) .

1- بالإدمصاص على ثانى إيثايل أمينو إيثايل السليلوز diethylaminoethyl cellulose (DEAE-cellulose) وقد نجحت هذه الطريقة فى تثبيت الانفرتيز 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 انفرتيز مثبت فى النظم التى يستخدم فيها التقليب أو فى نظم الوسائد أو فى أنابيب.

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

10- مسك خلايا *Saccharomyces cervisiae* 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- إستخدام 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- إستخدام طين البنتونيت bentonite clay لتثبيت الانفرتيز . وقد تبين أن معقد البنتونيت والانفرتيز إحتفظ بنحو 55.5٪ من نشاط الإنزيم ، وقد أمكن زيادة النشاط بنحو من 7 إلى 22٪ عن طريق إستخدام مواد ربط تعاونية .

14- تثبيت الانفرتيز بالربط الأيونى على سطح غشاء من كحول البولى إيثيلين فينايل poly (ethylene-vinyl-alcohol) ويعبر عنه بالمختصر PVA ثم تحويره 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- إستخدام مركب diazotized 4-aminobenzoyl cellulose لتثبيت الانفرتيز أو ربط الإنزيم تعاونيا 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 عبداللاه Abdellah (1989) ان كفاءة نشاط إنزيم الانفرتيز المثبت على الداى إيثايل أمينو سليلوز ، 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 الفيزيقية والكيماوية على التركيب الجزيئى مثل طول سلسلة الأحماض الدهنية الداخلة فى التركيب ، درجة عدم التشبع ومواقع إرتباط الأحماض الدهنية على جزىء الجليسرول . وتجرى عملية التحوير modification للزيوت والدهون عن طريق تغيير التركيب الجزيئى لمركبات ثلاثى أسايل جلسرول (الجليسريدات الثلاثية) وذلك من خلال تقنيات معينة بعضها كيماوى وبعضها إنزيمى .

وتؤدى عمليات تحوير الزيوت والدهون إلى إنتاج مركبات زيوت ودهون جديدة ذات صفات وظيفية جديدة تتباين عن نظيراتها للزيوت والدهون قبل التحوير مثل مسلك الإنصهار ، الثبات التأكسدى ، الصفات البلاستيكية . ويمكن التحكم فى عملية التحوير للحصول على ناتج ذى تركيب مطلوب (ولذا تسمى العملية بالتفصيل tailor-made) وتعتبر عملية الأسترة التبادلية إحدى الطرق الهامة التى تستخدم فى تحوير الزيوت والدهون إذ يمكن بواسطتها تبديل مواضع الأحماض الدهنية أو إستبدال أحماض دهنية بأخرى فى تركيب جزىء ثلاثى أسايل الجليسرول . ويمكن إجراء الأسترة التبادلية إما بالطرق الكيماوية 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 فى تركيب الزيت بحامض آخر آمن مثل البالمتيك .

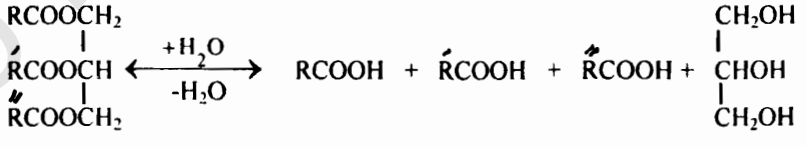
وفى الحقبة الأخيرة فقد أدى التقدم فى تقنيات تثبيت إنزيمات الليبيز إلى زيادة إمكانية التطبيق الصناعى لهذه العملية سواء باستخدام طرق متقطعة أو مستمرة . وعلى النطاق الصناعى فقد تم بدء تشغيل مصنع لودرز كروكلان Loders Croklan عام 1993 بهولندا ، وهذا المصنع يستخدم تقنية الليبيز المثبت لإجراء الأسترة التبادلية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

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

أ- إنزيمات ليبيز غير متخصصة Non-specific lipases

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

ويمكن تفسير الفعل التحفيزى لإنزيمات الليبيز غير المتخصصة بالمعادلات التالية:



TAG **F.A.** **Glycerol**

TAG: Triacylglycerol ثلاثى أسايل جليسرول

FA: Fatty acid حامض دهنى

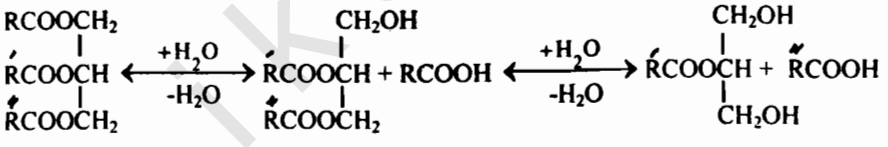
ب- إنزيمات ليبيز متخصصة للموضعين 1، 3 1,3-specific lipases

تشتمل هذه المجموعة على إنزيمات ليبيز ذات تخصص فضائى stereospecificity أى أنها تهاجم الروابط الأسترية عند موضعين هما 1، 3 على جزىء 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 الأسترة 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 الأسترة التبادلية بالطرق الإنزيمية لاتؤدى إلى تغيير الموضع رقم 2 فى جزىء 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	ثلاثى أسايل الجليسرول
DAG: Diacylglycerol	ثنائى أسايل الجليسرول
FA: Fatty acid	حامض دهنى
MAG: Monoacylglycerol	أحادى أسايل جليسرول

ج- إنزيمات ليبيز متخصصة للأحماض الدهنية

Fatty-acid specific lipases

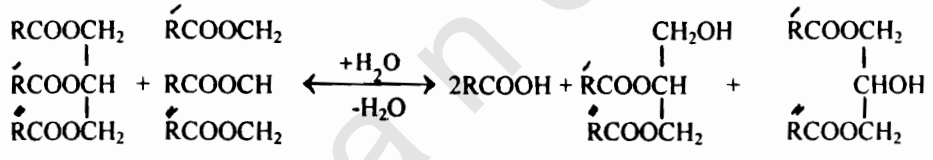
تشتمل هذه المجموعة على إنزيمات ليبيز تحفز التحلل المائى لروابط أستر شريطة تواجد أحماض دهنية معينة تدخل فى تركيب هذا الإستر .

obeikandl.com

ويلاحظ فى الأسترة التبادلية بالطرق الإنزيميـة أهميـة أن يكـون تركـيز المـاء مساوياً 50 جزءًا فى المليون لأن التركيز الأعلى من المــاء يـؤدى إلـى حـدوث عملية تحلل مائى hydrolysis بمعدل أسرع من حدوث الأسترة التبادلية، أما عند تركيز أقل من 50 جزء فى المليون فـإن الإنزيم لايحفـز حـدوث أى مـن عمليتـى التحلـل المـائى وعملية الأسترة الداخلية . ويمكن استخدام مفاعلات reactors لإجراء عمليـة الأسـترة التبادلية ويوجد من هذه المفاعلات نوعان الأول هو مفاعل الوسادة الثابتة fixed bed reactor . والثانى هـو مفـاعل الغشـاء membrane-reactor . والنـوع الثـانى يمثـل طريقة واعـدة ذات كفـاءة عاليـة فـى عمليـة التحويـر الحيـوى bioconversion وكـذا عمليات الفصل ، حيث تعتمد هذه الطريقة على استخدام عوامل حفز حيوية بين وجهين غير قابلين للإمتزاج يفصل بينهما غشاء membrane الأمر الذى يجعل لهذه الطريقـة قيمة تطبيقية فى صناعة الزيوت والدهون .

وتقوم إنزيمـات الليبيز المتخصصـة للأحمـاض الدهنيـة بتحفيز التفـاعل علـى الوجه التالى :

TAG TAG F.A. 2,3-DAG 1,3-DAG



ثلاثى أسايل الجليسرول	TAG: Triacylglycerol
ثنائى أسايل الجليسرول	DAG: Diacylglycerol
حامض دهنى	FA: Fatty acid

وقد قامت الباحثة أمل عبدالرازق (Abd-El-Razek 1996) باستخدام الليبيز المثبت فى تحفيز الأسترة التبادلية لست خلطـات مختلفـة مـن الزيـوت والدهـون ، وقـد استخدمت هـذه الخلطـات قبـل وبعـد الأسترة التبادليـة فـى صناعـة الكيك والبسـكويت بالإضافة إلى تفصيل بعض بدائل زبد الكاكاو ومقارنـة المنتجـات المسـتخدم فيهـا بتلـك المستخدم فيها كل من زبـد الكاكـاو وبديـل تجـارى مسـتورد . وعامـة فقد زادت قيمـة الحجوم النوعية للكيك المصنع من دهون مؤسترة تبادليـاً مقارنـة بنظـيره المصنـع مـن الدهون الأصلية . وقد حدثت زيادة معنوية فى عمق الإختراق مقاساً بجهـاز الإخـتراق penetrometer غير أنه تبين عدم وجـود علاقـة تـلازم بيـن الإخـتراق وقـوة القـص shearing force مقاسة بجهاز (OTMS) Ottawa texture measuring system

obeikandi.com

كما لم يحدث تغير فى لون الكيك نتيجة لإستخدام الخلطات المؤسترة تبادليا . وقد أوضحت نتائج الخواص العضوية الحسية أن البسكويت المصنع من الخلطات المؤسترة 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 .

وننوه 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 إلي تحويل نسبة من الأحماض الدهنية غير المشبعة والموجودة طبيعيا 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 .

رابعا : إزالة الرافينوز من بنجر السكر

Removal of raffinose from sugar beet

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

خامسا : إنتاج مظهرات النكهة Flavour enhancers

تمكن الباحثون اليابانيون من إنتاج مركب 5َ-أحادى نيوكليوتيد-5َ-mononucleotide والذى يعتبر من مركبات إظهار النكهة وذلك باستخدام تقنية الإنزيمات المثبتة وتعتمد الطريقة على معاملة الحمض النووى ريبونيوكليك ribonucleic acid (RNA) بواسطة إنزيم 5َ-فوسفودای استيريز 5َ-phosphodiesterase لإنتاج مركبات 5َ-ريبونيكليوتيدات 5َ-ribonucleotides مثل أدينوزين أحادى الفوسفات adenosine monophosphate (AMP) ، والجوانوزين أحادى الفوسفات guanosine monophosphate (GMP) ، ويمكن تحويل الـ AMP إلى مركب إينوزين أحادى

الفوسفات inosine monophosphate (IMP) 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 جالاكتوسيديز) lactase (β-galactosidase) واسمه العلمى (β-D-galactoside galactohydrolase) EC.3.2.1.23 فى التحليل المائى للاكتوز إلى جلوكوز ، جالاكتوز 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 كمكون 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 .

سابعاً : فى العمليات التصنيعية

يمكن إستخدام الإنزيمات المثبتة فى بعض العمليات التصنيعية مثل إستخدام إنزيم البابايين papain المثبت فى منع العكارة التى تتكون عند تبريد البيرة chill-haze وكذا إستخدام الإنزيمات البكتينية كمواد مروقة clarifying agents لعصائر الفاكهة واستخدام إنزيم النارنجينيز 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 ، الليبيز . وتتواجد مثبطات إنزيمات البروتينيز proteinases inhibitors فى كل أفراد العائلة البقولية . وفى 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 فى مدى pH من 1 إلى 12 عند درجات حرارة أقل من 30°م ، وتحدث دنترة عكسية لهذا المثبط وذلك بالتسخين لفترة قصيرة عند 80°م ، فى حين تحدث دنترة غير عكسية للمثبط إذا ما سخن لدرجة حرارة 90°م . وفى مقدور مثبط كونتز تثبيط إنزيمات التربسين بأنواعها المختلفة بما فيها النوع الموجود بالإنسان . أما مثبط بومان-برك فيعتبر أكثر ثباتاً ضد الدنترة مقارنة بمثبط كونتز إذ أن المثبط الأول لا يفقد نشاطه حتى إذا ما سخن (فى الصورة الجافة) عند درجة 105°م أو فى محلول مائى بتركيز 0.02٪ ولمدة 10 دقائق عند 100°م ، بينما يسبب التعقيم الحرارى 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 البرويتوليتى وتحلل الأستر لإنزيمات التربسين والكيموتربسين . وتشير الدراسات إلى أن مجموعة الثيول بالحمض الأمينى سستئين تدخل فى التفاعلات المتبادلة للثيول وثنائى الكبريتيد مع مثبط كونتز مما يؤدى إلى هدمه ومن ثم إيقاف فعله التثبيطى ؛ لذا فإن إيقاف فعل المثبطات فى وجود السستئين يتطلب معاملة حرارية معتدلة وهو أمر ينعكس إيجاباً على المحافظة على الصفات الوظيفية لبروتينات فول الصويا (للقارىء 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 فى البذور ؛ غير أن هذه المثبطات تتركز أيضاً فى أجزاء نباتية أخرى كالأوراق والجذور فى نبات كالبطاطا وفى الأوراق والدرنات فى البطاطس . أما فى حبوب القمح فإن مثبط إنزيم التربسين يتركز فى الفلقات والجنين.

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

وقد لاحظ أسبورن ومندل Osborne and Mendel فى 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 الأمينى مثيونين methionine (الحامض الأمينى الحدى بفول الصويا) أو الحمض الأمينى سستين cystine قد أدى إلى تحسين الإستفادة من البروتين بنفس الدرجة تقريبا كما لو كان فول الصويا قد عومل حرارياً بطريقة مناسبة . وكما هو متوقع فإن مسحوق فول الصويا المعامل حرارياً والمضاف إليه مثيونين يكون ذا قيمة تغذوية أعلى من نظيره غير المعامل حرارياً والمضاف اليه مثيونين . وأوضحت الدراسات أن تغذية الفئران والكتاكيت على عليقة تحتوى فول الصويا الخام تؤدى إلى زيادة نشاط البنكرياس . ويعتقد أن التأثير الضار لدقيق فول الصويا الخام على بنكرياس الفئران يتأتي من الميل القوى لمثبطات التربسين الموجودة بفول الصويا للتفاعل مع إنزيم التربسين بالفئران ومن ثم منع زيادة التخليق الحيوى للتربسين بالبنكرياس . وتوجد أدلة تشير إلى أن زيادة نشاط البنكرياس فى 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 فى الإنسان .

ب- مثبطات إنزيمات الأميليز Amylase inhibitors

تؤدى مثبطات إنزيمات الأميليز إلى تأخير عملية هضم النشا فى الوجبة الغذائية وهو الأمر الذى يمكن أن يؤخذ كأساس لبرامج إنقاص الوزن (الرجيم) لأولئك الأشخاص الذين يعانون من السمنة obese individuals ففى عام 1982 تم تسويق ما سمى بماسكات النشا starch blockers بالولايات المتحدة الأمريكية باعتبار هذه المركبات بمثابة مساعدات تغذية dietary aids ؛ بيد أن كفاءة مثل هذه المنتجات فى التحكم فى الوزن ما زالت موضع شك وهو الأمر الذى 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 فى 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 فى حقبة الثمانينات أشار العديد من البحوث إلى وجود جزء من النشا فى الأغذية النشوية المطبوخة يمر من الأمعاء الدقيقة للإنسان دون أن يهضم . ولقد تبين أن ظهور هذا المكون مرهون أساسا بإجراء عملية الطهى ؛ ولقد إصطلح على تسميته بالنشا المقاوم للإنزيمات enzyme resistant starch (RS) .

ومن المعروف أن العوامل التى تؤثر على هضم النشا تشتمل على :

أ- درجة جلتنة النشا .

ب- مقاس حبيبات النشا .

ج- نسبة الأميلوز إلى الأميلوبكتين فى جزىء النشا .

د- وجود إرتباطات النشا بالبروتين .

هـ-وجود معقدات بين الأميلوز والليبيدات .

و- نسبة النشا الذى حدث له تجلد retrogradation .

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

أ- نشا سهل الهضم فى الأغذية المطبوخة توا.

ب- نشا مقاوم جزئيا للهضم كما فى البطاطس الخام والموز .

ج- نشا مقاوم للهضم (RS) ويتكون نتيجة للمعاملة الحرارية للأغذية .

ولقد تبين أن كمية الـ RS فى المخبوزات والعجائن الغذائية والبقوليات والبطاطس تعتبر كمية ضئيلة لاتزيد 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 فى طرق التقدير الوزنية .

وقد أوضحت الدراسات التى أجريت على الصفات التغذوية للنشا المقاوم RS فى الأغذية المطبوخة أنه لايقاوم التحليل المائى الإنزيمى فى المعمل *in vitro* فحسب ولكن هذه المقاومة تمتد أيضاً إلى القناه 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 حاليا مفادها أن النشا المقاوم يتكون نتيجة لعملية التجلد retrogradation أى عملية إعادة بلورة النشا ، فعند تبريد النشا المجلتن يتم إتحاد تلقائى لجزيئات النشا المعلقة ، ويتبلور جزء من النشا ويكون مقاوماً للتحلل الإنزيمى . ويتبين أنه

يمكن إذابة الـ RS فى محلول جزيئى 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.

11-8-2 المثبطات الإنزيمية بالأغذية الحيوانية

Enzyme inhibitors in animal foods

تم إكتشاف مثبطات للإنزيمات البروتيوليتية فى مختلف إفرازات جسم الحيوانات وفى بنكرياس الأبقار وفى الدم وفى زلال البيض . وتبين وجود نوعين أساسيين من مثبطات البروتينيز فى زلال البيض وهما الأوفوميوكيد ovomucoid ومثبط الأوفو ovoinhibitor . ويتميز الأول فى حالته النقية بثبات غير عادى ضد الحرارة إذ يكون فى مقدور 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 والكيموتربسين 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 البروتيوليتية الموجودة طبيعيا بالبيض ، لكنها قد تقوم ببعض الوظائف الفسيولوجية فى أثناء تكوين الجنين أو أنها قد تعمل كمركبات مضادة لفعل الميكروبات أو الفيروسات .

11-9 تطبيقات تكنولوجيا الحمض النووى دى أوكسى ريبونيوكليك (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 وراثيا 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 المسئولة عن عمليات التخمر .
4- إنتاج بروتينات وببتيدات 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 دعوبة لإجراء تحوير 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 بإعتبارها 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 ماتمت 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 مبشراً 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 بانجلترا حاليا بتحضير مركب الفانيلين من مخلفات التصنيع الزراعى agro-industrial wastes ، فلقد تمكن العالم تونى ميكائيل Tony Michael وفريقه البحثى من إكتشاف إنزيم ميكروبى جديد (تم تسجيل براءة إختراع به) يمكنه تحفيز تكسير حمض الفريوليك ferulic acid إلى مركب الفانيلين من خلال المسار الميتابولزمى

لتكسر المركب الفينولى المعروف باسم الهيدروكسى سيناميت hydroxy cinnamate فلقد تبين أن الإنزيم المكتشف يحفز التفاعل التالى :

Feruloyl — CoA ⟶ Vanillin + Acetyl—CoA

مما يشير إلى إمكانية تحضير الفانيلين من مخلفات التصنيع الزراعى والتى يمكن عن طريق معاملتها بإنزيم استيريز حمض الفريوليك ferulic acid esterase والذى يوجد فى الجدر الخلوية النباتية تحفيز تحرر حمض الفريوليك من الجدر الخلوية ، والمركب الأخير يمكن تحويله فى 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.

obeikandl.com

- 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 Pomeronz, Y. (1992). Raw-starch degradation amylase (S) effect enzyme resistant starch. *J. Food Sci.*, **57**: 1433-1434.

obeikandl.com

- Gruchala, L. and Pomeronz, 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.
- Pomeronz, 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

obeikandl.com

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 Wiely & 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.