بسم الله الرحمن الرحيم

الإنزيمات الميكروبية
وتطبيقاتها في الصناعة والطب

تأليف

الدكتور/ أحمد شوقي محمد زهران
أستاذ ميكروبيولوجيا الألبان

الدكتور/ جابر زايد بريشة
أستاذ الميكروبيولوجي

كلية الزراعة - جامعة إلمنيا

مراجعة

الدكتور/ عبد الوهاب عبد الحافظ
أستاذ الميكروبيولوجي ورئيس جامعة عين شمس سابقاً

ح جامعة الملك سعود، ١٤٢٧هـ - ٢٠٠٦م

فهرسة مكتبة الملك فهد الوطنية أثناء النشر

زهران، أحمد شوقي

الإنزيمات وتطبيقها في الصناعة والطب/ أحمد شوقي زهران، جابر زايد بريشة

الرياض ١٤٢٦هـ

٤٣٣ ص، ١٧ × ٢٤ سم

ردمك: ١-٩٣٦-٣٧-٩٩٦٠

١- الخمائر أ.بريشة، جابر زايد (مؤلف مشارك) ب. العنوان

ديوي ٥٧٤,١٩٢٥ ١٤٢٦/٦٢٠٨

رقم الإيداع: ١٤٢٦/٦٢٠٨

ردمك: ١-٩٣٦-٣٧-٩٩٦٠

حكمت هذا الكتاب لجنة متخصصة، شكلها المجلس العلمي بالجامعة، وقد وافق المجلس على نشره بعد إطلاعه على تقارير المحكّمين في اجتماعه الثامن للعام الدراسي ١٤٢٥/١٤٢٦هـ الذي عقد بتاريخ ١٤٢٥/١٠/٢٩هـ الموافق ٢٠٠٤/١٢/١٢م.

النشر العلمي والمطابع - جامعة الملك سعود

ص.ب ٦٨٩٥٣ - الرياض ١١٥٣٧ - المملكة العربية السعودية

مقدمة

تفتقر المكتبة العربية بصفة عامة لوجود كتاب يتناول بالتفصيل وبطريقة مبسطة موضوع الإنزيمات الميكروبية وفوائدها الغذائية و الطبية. ورغم الأهمية الكبيرة للإنزيمات الميكروبية من الناحية الصناعية والبيئية والاقتصادية إلا أن ظهور مراجع عربية تتناول هذا الموضوع قد تأخر كثيراً. ومن هنا فإننا وبفضل الله تعالى نقدم هذا الجهد الذي استمر طويلاً آملين أن نكون قد قدمنا إجابة لكل تساؤل يعن بذهن القارئ العربي في مجال الإنزيمات الميكروبية بصفة عامة والإنزيمات ذات الأهمية التجارية بصفة خاصة.

والإنزيمات بصفة عامة عبارة عن مركبات بروتينية ذات وزن جزيئي كبير، وتعتبر عوامل مساعدة Catalysts بمعنى أنها تسرع من معدل التفاعلات الكيمائية دون أن يحدث لها تغيير. أول مرة استعمل فيها لفظ إنزيم كان في عام ١٨٧٨م وكان يستخدم للتمييز بين ما كان يعرف في ذلك الوقت باسم التخمرات المنظمة Organized ferments والتي تعني استخدام الكائن الحي الدقيق بأكمله Whole microorganism في التخمير وبين التخمرات غير المنظمة Unorganized ferments والتي تعني استخدام مستخلصات Extracts أو إفرازات Secretions الكائن الحي في التخمير . أي أن لفظ الإنزيم آنذاك كان يستخدم للتأكيد على أن هذا العامل المساعد في التفاعلات الكيمائية عبارة عن مستخلص أو إفراز خارج الخلايا وليس الخلايا كلها. وفي عام ١٨٩٧م استطاع أحد

العلماء الألمان أن يثبت أن مستخلصات الخميرة التي لا تحتوي على خلايا تستطيع أن تقوم بعملية التخمر Fermentation.

ولتوضيح الدور الكبير الذي تساهم به الميكروبات كمصدر مهم للإنزيمات. فيكفي أن نعلم أن خلية واحدة من البكتيريا *E. coli* (على سبيل المثال) تصنع داخلها حوالي ٣٠٠٠ نوع مختلف من البروتينات، معظمها عبارة عن إنزيمات وتقوم الميكروبات بتدوير Recycling المواد العضوية الموجودة في البيئة عن طريق ما تملكه من نظم إنزيمية مختلفة. وتقوم بعض الميكروبات بإفراز إنزيمات خارج خلاياها وتسمى الإنزيمات الخارجية (Exoenzymes) والتي تستطيع عبور الغشاء السيتوبلازمي إلى خارج الخلية، وهذه الإنزيمات تقوم بتكسير الأحماض النووية والبروتينات والسكريات العديدة والليبيدات إلى مكونات ذات وزن جزيئي منخفض تستطيع دخول الخلايا ومن ثم يمكن الاستفادة منها في عملية التمثيل الغذائي.

وعلى الرغم من أن جميع الأحياء تنتج الإنزيمات إلا أن الإنزيمات التي تنتجها الميكروبات هي المفضلة في الأغراض الصناعية؛ لأن تكاليف إنتاج الإنزيمات الميكروبية منخفضة نسبياً ولأن ظروف الإنتاج ليست مرتبطة بزمان معين (فصل معين من فصول السنة) أو مكان معين، كما أنه لا يلزم وقت طويل لعملية إنتاج الإنزيمات الميكروبية، هذا بالإضافة إلى أسباب أخرى كثيرة تم شرحها بالتفصيل في فصول هذا الكتاب.

وقد استخدمت الإنزيمات على نطاق تجاري منذ زمن بعيد في دباغة الجلود leather tanning وفي صناعة الجبن وفي صناعة الخبز وأيضاً في الحصول على بعض نواتج التخمير المختلفة. أما الآن فقد اتسعت الصناعات التي تقوم على الإنزيمات الميكروبية بشكل كبير جداً وفي مختلف المجالات الطبية والغذائية والبيئية.

ينقسم هذا الكتاب إلى تسعة فصول، يتابع **الفصل الأول** تطور التقنيات المستخدمة في إنتاج الإنزيمات الميكروبية التي أصبحت وبحق تحتل مرتبة مهمة في الصناعة؛ لما لها من مميزات تقنية واقتصادية مقارنة بالمصادر الأخرى للإنزيمات، سواءً أكانت حيوانية أو نباتية. ويتابع الفصل الأول بالتفصيل كيفية إفراز الإنزيمات خارج الخلايا الميكروبية والعوامل المتعلقة بالخلية الميكروبية وبالظروف المحيطة والتي تؤثر على تنشيط أو كبح عملية إفراز الإنزيمات.

ويتعرض **الفصل الثاني** إلى كيفية عزل وتنقية وتوصيف الإنزيمات التجارية المهمة حيث إن أول خطوة للحصول على الإنزيم في صورة نقية هي عملية فصله. وطريقة الفصل تعتمد على هل هو من النوع الداخلي Intracellular أم من النوع الخارجي Extracellular.

ويتناول **الفصل الثالث** من هذا الكتاب الجهود التي تمت بغرض تطوير تقنيات جديدة لزيادة كفاءة عمل الإنزيمات الميكروبية وزيادة كفاءة الخلايا الميكروبية التي تم اختيارها في إنتاج الإنزيمات ذات الأهمية التجارية. ففي خلال الثلاثين سنة الماضية ركزت الأبحاث العلمية على تطوير تقنية جديدة لزيادة كفاءة عمل الإنزيمات، وهي تقنية الإنزيمات المثبتة Immobilized enzymes. ويتناول هذا الفصل هذه التقنية بالتفصيل كما تم توضيح كيف أدت عملية تثبيت الإنزيمات بشكل غير مباشر إلى تطور طرق قياس متقدمة في مجال الأغذية وفي مجال الصناعات الدوائية. كما تم أيضاً توضيح المميزات العديدة للإنزيمات المثبتة بالمقارنة بالإنزيمات الحرة. ويتناول هذا الفصل بالتفصيل الطرق المختلفة لتثبيت الخلية كما يوضح مميزات الخلايا المثبتة بمواد صلبة .

بعد ذلك يتناول الكتاب أقسام الإنزيمات ذات الأهمية التجارية، حيث يتناول **الفصل الرابع** الإنزيمات المحللة للبروتين Proteolytic Enzymes التي تعتبر من وجهة النظر

الاقتصادية من أكثر الإنزيمات الميكروبية أهمية حيث تمثل حوالي ٦٠٪ من الإنتاج التجاري للإنزيمات الميكروبية. ويتناول هذا الفصل أهمية إنزيمات البروتينيز عن طريق تتبع تاريخي لاستخدامها وتطبيقاتها منذ بداية القرن العشرين. كما اتجهت الأبحاث حديثاً نحو تحسين الثبات الحراري Thermal stability والثبات على درجات مرتفعة من الأس الهيدروجيني للإنزيمات الميكروبية خاصة تلك المفرزة بواسطة الأنواع التابعة للجنس Bacillus واستخدمت الإنزيمات التابعة لأنواع هذا الجنس بنجاح في صناعة مساحيق الغسيل وفي إزالة الشعر وفي صناعة ودبغ الجلود وفي صناعة الجبن كبدائل للمنفحة Rennet substitutes. وإنزيمات البروتينيز الميكروبية لها بعض التطبيقات الطبية المهمة، مثل المساعدة في عملية الهضم وإذابة الجلطة المتكونة داخل الوعاء الدموي وفي علاج السرطان إنزيميا كما تستخدم في تنظيف بعض الأجهزة الطبية، مثل أجهزة الديلزة المستخدمة في الغسيل الكلوي، كما أن لها استخدامات عديدة في مجال الطب الشرعي.

ويتناول **الفصل الخامس** الإنزيمات المحللة للنشا Starch Hydrolyzing Enzymes حيث أن تحويل النشا إلى محاليل سكرية ودكسترينات أو دبس Syrup يعتبر الأساس بالنسبة للصناعات النشوية. و تستخدم هذه المحاليل في الصناعات الغذائية والمشروبات وكمصدر للكربون في عمليات التخمر.

ويتناول **الفصل السادس** الإنزيمات المحللة للدهون Lipolytic Enzymes، حيث يتم التصنيع الحيوي لإنزيمات الليبيز المحللة للدهون بواسطة كثير من الميكروبات، و المصدر الرئيسي للإنتاج التجاري من هذه الإنزيمات هو فطريات Rhizopus, Mucor, Aspergillus وأنواع من الخميرة Candida. ثم يتناول هذا الفصل التطبيقات الصناعية لإنزيمات الليبيز الميكروبية حيث إن هناك مجالات عديدة يتم فيها استخدام هذه الإنزيمات بما في ذلك إدخال الليبيز في مسحوق الغسيل بغرض إزالة المواد الدهنية من

الملابس. وحالياً يستخدم إنزيم الليبيز في صناعة الجبن لإعطاء الجبن نكهة محببة، كما يدخل في العديد من الصناعات الدوائية.

ويتناول **الفصل السابع** الإنزيمات المحللة للسليلوز Cellulolytic Enzymes حيث إن السليولوز هو المكون الرئيسي لجدر الخلايا النباتية وواحد من أكثر المركبات البيولوجية شيوعاً في العالم. كما يتناول هذا الفصل أيضاً التطبيقات الصناعية للإنزيمات المحللة للسليلوز والتي تركزت حتى الآن على إنتاج سكريات قابلة للتخمر من المواد السليلوزية.

ويتناول **الفصل الثامن** من هذا الكتاب الإنزيمات المحللة للبكتين Pectic Enzymes، ويتناول التصنيع الحيوي لإنزيمات البكتين بواسطة البكتيريا والفطريات، كما يتناول هذا الفصل التطبيقات العملية لإنزيمات البكتين في عمليات تصنيع منتجات الفاكهة وفي ترويق عصائر الفاكهة وفي ترويق نواتج التخمر وفي حفظ الأخشاب، ثم يتناول تطبيقات أخرى متنوعة لإنزيمات البكتين.

أما **الفصل التاسع** والأخير من هذا الكتاب فيتناول بعض الإنزيمات الأخرى Miscellaneous Enzymes والمفاعلات الإنزيمية Enzyme Reactors ورغم أن هذه الإنزيمات لها أهمية تجارية إلا أن تطبيقها على المستوى الصناعي ما زال يتم في حيز ضيق؛ ولذلك فإننا في هذا الفصل نكتفي بإلقاء الضوء عليها بشكل ملخص. وأول هذه الإنزيمات هو إنزيم اللاكتيز (β-galactosidase) وهو عامل مساعد يحلل سكر اللاكتوز (سكر الحليب) وهو سكر ثنائي إلى سكريات أحادية وهي الجلوكوز والجلاكتوز. و يتناول الفصل التطبيقات الصناعية لإنزيم اللاكتيز حيث يستخدم في كثير من الصناعات اللبنية، وفي تصنيع أغذية خاصة ببعض الأطفال وأيضا البالغين الذين لا يستطيعون تمثيل سكر اللاكتوز في أمعائهم نظراً لنقص إنزيم اللاكتيز لديهم، والذين يعانون من الخلل المعروف باسم عدم تحمل سكر اللاكتوز Lactose intolerance

والإنزيم الثاني الذي يتناوله هذا الفصل هو إنزيم Penicillin amidase الذي يستخدم في إنتاج مركب 6-aminopenicillanic acid (6-APA) من البنسلين، وهذا المركب يعتبر نواة أو مادة مولدة ذات قيمة عالية حيث تستخدم في التصنيع الكيماوي لأنواع مختلفة من بدائل البنسلين والتي لها أهمية علاجية متنوعة ضد بعض البكتيريا السالبة لجرام. والإنزيم الثالث الذي يتناوله هذا الفصل هو إنزيم البنسلينيز (Penicillin destroying enzyme) حيث إن بعض البكتريا مثل: *B. megateruium, Bacillus cereus* لها القدرة على إفراز هذا الإنزيم، كما يتناول هذا الفصل أيضاً إنزيم الـ Invertase الذي يتم الحصول عليه بسهولة من الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* وله تطبيقات كثيرة في الصناعات الغذائية وفي صناعة الحلويات.

وأخيراً يتناول هذا الفصل المفاعلات الإنزيمية Enzyme reactors بإيجاز حيث إن المفاعلات الإنزيمية بصفة عامة تنقسم إلى مفاعلات تفاعل على دفعات Batch ومفاعلات تفاعل مستمر Continuous. كما يتناول هذا الفصل أيضاً أنواعاً أخرى من مفاعلات التفاعل المستمر، مثل النوع الذي يستخدم الخزان ذا الخلاط *Stirred-tank reactor*، والنوع الذي يستخدم في التخمير المستمر بواسطة الإنزيمات المثبتة والذي يطلق عليه Fluidized-bed reactor.

وبصفة عامة فإن هذا الكتاب يهم الدارس لكل من العلوم الزراعية والطبية والطب البيطري والكيمياء الحيوية والعلوم الطبية التطبيقية، كما أنه يهم العاملين في مجال الصناعات الغذائية. وكل من له اهتمام خاص بموضوع تكنولوجيا الإنزيمات سيجد على صفحات هذا الكتاب الخطوات العملية المبسطة مع شرح الأساس العلمي لكل خطوة من خطوات تنقية ودراسة صفات الإنزيمات بصفة عامة والإنزيمات الميكروبية على وجه التحديد.

المحتويات

الفصل الأول:التصنيع الحيوي للإنزيمات الميكروبية Biosynthesis of Microbial Enzymes

١- مقدمة ١

٢- تركيب الجدار الخلوي وعلاقته بموضع الإنزيم Enzyme location ٨

٣-إفراز الإنزيمات خارج الخلايا الميكروبية Enzyme secretion ١٣

٤- نقل الأحماض الأمينية إلى داخل الخلايا ٢٠

٥- نقل الببتيدات إلى داخل الخلايا ٢٣

٦- حفز وكبح إفراز الإنزيمات الخارجية ٢٤

٧- دور الببتيدات والبروتينات في انتاج الإنزيم ٢٥

٨- دور الأحماض الأمينية في إنتاج الإنزيم ٢٥

٩- كبح إنتاج الإنزيم بواسطة نواتج التحلل النهائية End products ٢٧

١٠- دور المادة الأولية سهلة التمثيل في كبح إفراز الإنزيمات Catabolite repression ٢٧

١١- تأثير عوامل الغذاء الأخرى على إنتاج الإنزيمات الخارجية ٢٨

١٢- تأثير العوامل البيئية على التصنيع الحيوي للإنزيمات ٢٩

١٣- تأثير مرحلة النمو البكتيري على إفراز الإنزيمات الخارجية ٣٠

١٤- اختيار السلالة المنتجة للإنزيم وطرق تحسينها ٣١

١٥- طرق تحسين إنتاج الإنزيم الميكروبي ٣٨
١٦- بعض النقاط الحيوية المتعلقة بإفراز الإنزيمات خارج خلايا الميكروبات ٤٨
١٧- المراجع ٥٠

الفصل الثاني: تنقية الإنزيمات ودراسة صفاتها

Purification and Characterization of Enzymes

١-تعريف الإنزيمات ٥٣
٢-تسمية الإنزيمات ٥٥
٣-تقسيم الإنزيمات ٥٦
٤-العوامل التى تؤثر على سرعة التفاعلات الإنزيمية ٥٩
٥-ميكانيكية فعل الإنزيم ٦٢
٦- تنقية الإنزيمات ٦٣
٧- دراسة صفات الإنزيمات Characterization ١٠٣
٨- المراجع ١١٠

الفصل الثالث: نظم تثبيت الخلايا والإنزيمات

Cell and Enzyme Immobilization Systems

١- نظم تثبيت الخلية Cell immobilization systems ١١١
٢- نظم تثبيت الإنزيم Enzyme Immobilization Systems ١٢٧
٣- المراجع ١٤٤

الفصل الرابع: الإنزيمات المحللة للبروتين

Proteolytic Enzymes

١- مقدمة ١٤٧
٢- أهمية إنزيمات البروتينيز للخلية ١٥١

٣- طرق تقدير إنزيمات البروتينيز Proteinase assays ١٥٨
٤- بعض صفات إنزيمات البروتينيز الميكروبية ١٦٠
٥- تقسيم إنزيمات البروتينيز الميكروبية Classification of microbial proteinases ١٦٢
٦-بعض الاعتبارات العامة عند إنتاج إنزيم البروتينيز الميكروبى
General aspects of microbial proteinase production ١٨١
٧-تطبيقات إنزيمات البروتينيز الميكروبية Applications of microbial proteinases ١٨٦
٨- المراجع ٢٣٠

الفصل الخامس: الإنزيمات المحللة للنشا
Starch Hydrolysing Enzymes

١- مقدمة ٢٣٣
٢- التركيب الكيميائي للنشا ٢٣٤
٣- إنزيم ألفا أميليز α-Amylase ٢٣٦
٤- إنزيمات α-Amylases أخرى تم توصيفها حديثاً ٢٤١
٥- كيفية فعل إنزيمات α-Amylases ٢٤٦
٦- إنزيم جلوكوز أيزوميريز Glucose isomerase ٢٤٨
٧- إنزيم جلوكو أميليز Glucoamylase ٢٦٢
٨- إنزيم ترانس جلوكو سيديز Transglucosidase ٢٦٨
٩- إنزيم بيتا أميليز β-Amylase ٢٧٠
١٠- إنزيمات خفض التفرع Debranching enzymes ٢٧٢
١١- التطبيقات العملية لإنزيمات المحللة للنشا ٢٧٥
١٢- المراجع ٢٨٥

الفصل السادس: الإنزيمات المحللة للدهون
Lipolytic Enzymes

١- مقدمة ٢٨٧
٢- تفاعل الليبيز مع الجليسريد الثلاثي ٢٩٠
٣- التصنيع الحيوي لإنزيمات الليبيز ٢٩٢
٤- الطرق المختلفة لتقدير نشاط إنزيم الليبيز ٢٩٤
٥- درجة تخصص إنزيمات الليبيز تجاه المادة الأولية Substrate specificity ٢٩٧
٦- تأثير إنزيم الليبيز الميكروبي على كل من الفوسفوليبيدات والبروتينات الدهنية Lipoproteins ٣٠٣
٧- صفات إنزيمات الليبيز الميكروبي Properties of purified microbial lipases ... ٣٠٤
٨- بعض التطبيقات الصناعية لإنزيمات الليبيز الميكروبية Some industrial applications of microbial lipases ٣٠٧
٩- المراجع ٣١٤

الفصل السابع الإنزيمات المحللة للسليلوز Cellulolytic Enzymes

١- مقدمة ٣١٥
٢- الميكروبات المحللة للسليلوز ٣١٧
٣- طبيعة إنزيمات السلوليز ٣٢٢
٤- ميكانيكية عمل إنزيمات السلوليز Mode of Action of Cellulases ٣٢٧
٥- طرق قياس الإنزيمات المحللة للسليلوز ٣٣٤
٦- إنتاج الإنزيمات المحللة للسليلوز ٣٤١
٧- التطبيقات الصناعية للإنزيمات المحللة للسليلوز ٣٤٨
٨- إنزيم β-Glucanase ٣٥٤

٩- إنزيم Hemicellulase ٣٥٥
١٠- نموذج لعملية استخدام الإنزيمات المحللة للسليلوز ٣٥٦
١١- المراجع ٣٥٩

الفصل الثامن الإنزيمات المحللة للبكتين Pectic Enzymes

١- مقدمة ٣٦١
٢- المواد الأولية (عديدات التسكر البكتينية) ٣٦٢
٣- تواجد المواد البكتينية وخواصها ٣٦٣
٤- البكتينات التجارية ٣٦٨
٥- إنزيمات البكتين ٣٦٩
٦- تقسيم إنزيمات البكتين ٣٧٠
٧- قياس نشاط الإنزيمات المحللة للبكتين ٣٧٢
٨- إنزيمات الـ Pectinesterases ٣٧٥
٩- إنزيمات Pectc hydofases ٣٧٨
١٠- إنزيمات الـ Pectic lyases ٣٨١
١١- الإنتاج الصناعي للإنزيمات المحللة للبكتين ٣٨٦
١٢- التصنيع الحيوي للإنزيمات المحللة للبكتين بواسطة الميكروبات ٣٩١
١٣- التطبيقات الصناعية للإنزيمات المحللة للبكتين ٣٩٥
١٤- المراجع ٤٠٤

الفصل التاسع : بعض الإنزيمات الأخـــرى والمفـــاعلات الإنزيميـــة Miscellaneous Enzymes and Enzyme Reactors

١ – إنزيم اللاكتيز Lactase (β-galactosidase, EC 3.2.1.23) ٤٠٥

٢ – إنزيم Penicillin amidase ٤١١

٣– إنزيم البنسلينيز Pencillinase (Penicillin destroying enzyme) ٤١٣

٤ – إنزيم الـ Invertase ٤١٤

٥ – المراجع ٤١٨