إنتاج الأنزيمات بواسطة الأحياء المجهرية

Production of enzymes by microorganisms

استخدم الإنسان الأنزيمات منذ القدم على هيئة أنسجة نباتية أو حيوانية غنية بالأنزيمات أو على هيئة ميكروبات في صناعة الخل والنبيذ وغيرها. فقد استخدمت أنزيمات معدة الحيوان في تصنيع الأجبان سنين عديدة قبل الميلاد إلا أنه لغاية القرن التاسع عشر لم يعرف كيف تقوم الأنزيمات بعملها وذلك لعدم إمكانية تحضيرها بصورة نقية لدراسة صفاتها وميكانيكية عملها. وقد تم عزلها لأول مرة عام 1833م من قبل عالمان فرنسيان حيث عزلا مركب أنزيمي من المولت الذي يعمل على شطر جزيئة النشأ، ثم توالت الدراسات بعد ذلك والتي أدت إلى ظهور مدرستين الأولى يقودها العالم باستور (عالم البكتريولوجي) والثانية يقودها العالم الكيميائي ليبك. حيث تزعم الأول النظرية الحيوية للأنزيمات والتي مفادها ضرورة وجود الخميرة الحية في الوسط لكي يحدث التخمر، أما المدرسة الثانية كانت تدعو الى عدم ضرورة وجود الكائن الحي. وبقي الجدال قائماً بين المدرستين الى أن توفيا العالمان ثم جاء العالم بوخنر عام 1897م وأثبت أن مستخلص الخميرة بدون خلاياها يحول الكلوكوز إلى إيثانول وغاز CO_2كما تفعل الخميرة الحية. هذا يعني أن التخمر يحدث بوجود مادة غير حية داخل الخلية وليست بسبب الخلية الحية ذاتها وسميت هذه المادة والتي تعني داخل الخميرة باللغة الاغريقية enzyme in yeast . ومن هنا بدأ علم الكيمياء الحيوية بدراسة الانزيمات. ومن الجدير بالذكر أن قبل اكتشاف بوخنر بسنوات تمكن باحث ياباني من تحضير أنزيم الأميليز الفطري بتنمية الفطر *Aspergillus oryzea* على الرز ونخالة الحنطة الرطبة وسمي الأنزيم باسمه Taka – diastase والتقنية التي استخدمها هي ماتسمى الآن بالمزرعة السطحية التي مازالت تستخدم لحد الآن في إنتاج الأنزيمات.

الأهمية الصناعية للأنزيمات

دخلت الأنزيمات في الوقت الحاضر في صناعات عديدة كصناعة المنظفات والصناعة النشوية حيث حلت محل الحامض في التحلل المائي للنشأ، وفي تحويل السكريات لبعضها كما هو الحال مع أنزيم كلوكوز أيزوميريز glucoseisomerase الذي يعمل على تحويل الكلوكوز الى الفركتوز الذي يمتاز بحلاوة أعلى من الكلوكوز بمقدار مرتين أو أكثر وبذلك يمكن تحويل النشأ الى مواد أسهل استخداماً وذات طاقة أكبر، كذلك يستخدم الأميليز في صناعة البيرة والكحول الأثيلي من البطاطا والحبوب والمحاصيل النشوية الأخرى. كذلك فإن إنتاج الرنين باستخدام الأحياء المجهرية بدلاً عن منفحة العجول كان منذ عام 1967م، كما حلت مشكلة إنتاجه من الميكروبات. كما استخدم انزيم اللاكتيز في تحويل اللاكتوز الى سكريات أحادية أسهل هضماً وتحويل لاكتوز الشرش الى سكريات تستخدم في صناعة البروتين أحادي الخلية. كذلك تستخدم الأنزيمات في المجالات الطبية في العلاج والتحاليل السريرية.

الأنزيمات الميكروبية Microbial enzymes

هناك عدد كبير من الأحياء المجهرية تشمل البكتريا، الخمائر والفطريات تدخل في إنتاج مجاميع مختلفة من الأنزيمات. إن خيار استخدام الأحياء المجهرية لتصنيع الأنزيمات هو الآخر له مشاكله

الخاصة، ومنها أن السلالة البرية أو الوحشية wild type(وكما يحدث في الطبيعة) قد تنتج الأنزيم بكمية قليلة جداً وقد يكون مخلوطاً مع بروتينات وأنزيمات أخرى. كما إن عمليات النمو والتكاثر وانتخاب الوسط الزرعي الملائم لإنتاج ذلك النوع المحدد من الأنزيم و تطوير السلالة لزيادة الطاقة الإنتاجية لها وتطوير معدات الإنتاج مع تحديد والسيطرة على الظروف المثلى للإنتاج كلها تلعب دوراً مهماً في إنتاج الأنزيمات.

بعض الأنزيمات الميكروبية تكون تركيبية أي تستخدمها الخلايا ونادراً ما تكون في الوسط حيث تطلقها الخلايا في الوسط لتكسير مركب أو تغير تركيبه لأجل استغلاله وليست كل الأحياء المجهرية لها القدرة على تخليق أنزيمات تطبعية induced .ويمتاز جنس *Pseudomonas* بكونه الأول بين الأحياء المجهرية في قابليته على تخليق أنزيمات تحلل أعقد المركبات الكيميائية وقد تم الاستفادة من ذلك في إزالة الملوثات الكيميائية النفطية وغير النفطية من المياه أو في تحليل المبيدات في التربة والمياه. معظم الانزيمات الصناعية هي من نوع الانزيمات الخارجية extracellular enzymes والتي تكون عملية استرجاعها واستردادها recovery من المزرعة السائلة سهلة مثل الأميليز والبروتيز.

وبما أن الأنزيمات هي عبارة عن بروتينات ولها خصائص البروتينات الفيزيائية والكيميائية لذلك فهي تتأثر بالظروف المحيطة من درجة حرارة و رقم هيدروجيني pH . وتمتاز الأنزيمات بكونها متخصصة وهذه الصفة مطلوبة في الصناعة لكي لاتحدث تفاعلات ثانوية غير مطلوبة. تنشط الأنزيمات بدرجة حرارة أوطأ من درجة دنترتها ويمكن إيقاف عمل الأنزيم في الصناعة بالحرارة أو الحامض كما يمكن ترسيبها وعزلها من وسط التخمير باستخدام الكحول أو كبريتات الأمونيوم.

من أسباب أفضلية استخدام الميكروبات في إنتاج الأنزيمات تجارياً هي:

1- تتمكن الميكروبات من استخدام مواد خام متعددة لا تخلو منها أي بلد.

2- سرعة نمو الميكروبات وتكوينها للأنزيمات.

3- يمكن استخدام مواد خام رخيصة جداً مما يقلل كلفة الإنتاج.

4- يمكن الكشف عن آلاف الميكروبات والحصول على الميكروبات المنتجة للأنزيمات.

5- يمكن الحصول على سلالات ميكروبية ذات إنتاجية عالية للأنزيمات باستخدام طرق وراثية.

6- يمكن الحصول على أنزيم معين وذلك بتوجيه الميكروبات بالطرق الميكروبية.

تستخدم الأنزيمات خلال عمليات التخمير للصناعات المختلفة مثل الصناعات الصيدلانية pharmaceutical و الأغذية foods والمنسوجات textile وغيرها. الإنتاجية العالية والنوعية الجيدة لهذه الإنزيمات تتعين من خلال استخدام السلالة الملائمة suitable strain وظروف التنمية أو الإنتاج cultural conditions. بما أن هذه الإنزيمات تستخدم في الصناعات المختلفة، لذا أصبح الإنتاج الكمي الواسع لها شيأً أساسياً وجوهرياً في عالم الصناعة.

الانتاج التجاري Commercial production

في البداية كان إنتاج الأنزيمات يتم بطريقة تخمر الحالة الصلبة solid state fermentation التي لاتزال تستخدم في اليابان ، إلا أن الطرق الحديثة للإنتاج تعتمد على طريقة المزارع المغمورة submerged cultures الذي تتم تهويتها بصورة جيدة لأن معظم الانزيمات التجارية يتم الحصول عليها باستخدام أحياء مجهرية هوائية aerobic microorganisms ، عليه يكون الاحتياج للأوكسجين عالياً جدا كما هو الحال في إنتاج المضادات الحياتية .

هنالك عدد كبير من الانزيمات تنتج على نطاق كمي واسع بالطرق المختلفة المدرجة أدناه و تستخدم في العمليات التجارية .

- طريقة المزرعة السطحية surface culture method
- استخدام المخمرات الكبيرة fermenters
- طريقة المزرعة الصلبة أو شبه الصلبة solid or semisolid culture method
- تقنية التقيد للأنزيمات و الخلايا immobilization of enzymes and cell

1- طريقة المزرعة السطحية surface culture method

استخدمت هذه الطريقة على نطاق واسع قبل الحرب العالمية الثانية، في هذه الطريقة تستخدم أواني سطحية أو مسطحة shallow trays لتنمية الاحياء المجهرية لذلك تكون عمليات الانتاج كبيرة للأنزيمات و صعبة ومكلفة بسبب طبيعة التقنية المستخدمة .

2- استخدام المخمرات الكبيرة fermenters

يتم تحضير اللقاح الحاوي على الكائن الحي المجهري المطلوب في الانتاج بعدة مراحل كما في حالة التخمرات الإنتاجية الأخرى . الكائن الحي المجهري يتم تكاثره في مرحلة أو أكثر من خلال النقل المتتالي بعدة خزانات لزيادة حجم اللقاح.

يجب أن يكون الوسط المغذي المستخدم في هذه المراحل من النوع الغني جدا enrichment growth medium لتعزيز الحصول على نمو جيد . تحول مزرعة اللقاح من خزان اللقاح seed tank الأخير الى المخمر الانتاجي وتتراوح أحجام المخمرات الانتاجية بين 25000- 100000لتر. يجب أن يكون الوسط الإنتاجي production medium معقداً جداً complex medium وينصح أن يكون من النوع الذي يشجع أعلى إنتاجية للأنزيم.

يجب اتباع كل الإجراءات الوقائية أثناء عملية التخمير للسيطرة ومنع حدوث التلوث.الكتلة الحيوية للكائن الحي تبدأ بالزيادة خلال مراحل التخمير الاولى بينما الفعالية الإنزيمية تظهر زيادة ملحوظة في منتصف مراحل التخمير،علماً أن نهاية التخمير يشارإليها بتوقف بناء الإنزيم.

3- طريقة المزرعة الصلبة أو شبه الصلبة solid or semisolid culture method

تتم عمليات الإنتاج والتخمير للحصول على الأنزيمات باستخدام نظام مغلق من خزانات المخمرات العميقة تتراوح أحجامها أو سعتها الإنتاجية بين 1000-30000 غالون. المواد المستخدمة فيها تتكون

من نخالة الحنطة wheat bran، بنجر السكر sugar beet، السليلوزcellulose وغيرها، اعتمادا على نوع الكائن المجهري ونوع الأنزيم الذي سيتم إفرازه من قبله. المحلول الغذائي المعقم والملائم لنمو تلك السلالة يتم تلقيحه بسبورات الكائن الحي المجهري خصوصاً الاغفان أوالفطريات، حيث تستخدم هذه الأحياء بكثرة في إنتاج الإنزيمات. إن أهمية المادة المستخدمة في الإنتاج يجب أن تكون من النوع الذي يسمح للهواء بتخللها حتى تشجع مايسليوم الفطريات بالنمو من خلالها. عندما تصل الطاقة الإنتاجية لذلك الأنزيم الحد الاقصى يتم استخلاصه بواسطة مذيبات ملائمة. بعدها يتم ترشيحه وتجفيفه بما يتلائم مع طبيعة ذلك الإنزيم.

عزل وتنقية الإنزيمات Isolation and purification of enzymes

إن عزل وتنقية الإنزيمات يجب أن تتم حال انتهاء التخميرمباشرة، وذلك للحفاظ وإستبقاء فعالية الإنزيم. عند إستخدام تخمير الخلايا المقيدة ففي هذه الحالة يجب عزل وجمع الكتلة الحيوية (biomass) ومعاملتها بالطرق المناسبة حسب طبيعة الأنزيم وجعلها جاهزة للاستخدام.

يتم استرجاع الأنزيمات الخارجية من المزرعة السائلة broth بينما الأنزيمات الداخلية يتم عزلها بتمزيق الخلايا.

عمليات تنقية الإنزيم تعتمد على تقنيات مختلفة ومتنوعة في كفائتها وكلفها بشكل كبير. إلا أن العملية التي تستخدم لأي إنزيم تعتمد على مقدار النقاوة purity المطلوبة لذلك الأنزيم والكلفة كذلك بحيث تكون مقبولة نوعاً ما. كما ذكرنا آنفاً إن معظم الأنزيمات التي تنتج بواسطة الأحياء المجهرية تتم في مفاعلات أو مخمرات كبيرة، وإن الكميات الكبيرة من الإنزيمات المنتجة، عادة لا تنقى وغالباً تسوق على شكل سوائل مركزة concentrated liquids أو حبيبات مجففة granulated dried products، عدا الأنزيمات التي تستخدم في تقنيات DNA والتشخيص تحتاج الى تقنية عالية جداً.

أمثلة على الإنزيمات المصنعة تجاريا:

1- أنزيم ألفا أمليز alpha Amylases

تعتبر مجموعة أنزيمات ألفا أمليزα-amylases من أهم مجاميع الأنزيمات المحللة للنشأ starch . تتكون بواسطة مجموعة من الأحياء المجهرية من الفطريات والبكتريا وتفرز الى خارج الخلايا extracellular للكائنات الحية المجهرية. تختلف مكونات الوسط المغذي culture media وظروف الانتاج الأخرى مثل الرقم الهدروجيني pH ودرجة الحرارة حسب نوع الكائن المجهري المنتج للإنزيم.

يُنتج إنزيم الفأ أميليزمن قبل بكتريا *Bacillus subtilis* و*Bacillus licheniformis* بواسطة طريقة تخمير الوجبة الواحدة Batch fermentation لأغراض الإنتاج الكمي.

تنمى البكتريا في مزارع ساكنة بطريقة الوجبات ويستخدم وسط مغذي معقد Complex media يعتمد على نشأ البطاطا أو الذرة كما يعزز الوسط بفول الصويا وسائل نقيع الذرة (المحتوى الكلي الجاف للوسط المغذي يساوي 20%) وpH 7 تستمر عملية التخمير لمدة 5 أيام على درجة حرارة 40 م مع وجود تهوية ، وينتج البروتيز على حساب الأميليز في حالة احتواء الوسط على تركيز عال من البروتين لذلك يجب معاملة الوسط بأنزيم البروتيز لتحلل البروتين جزئياً. ثم بعد ذلك تبرد

المزرعة ويتم فصل الخلايا والمواد الصلبة من المزرعة بطريقة flocculation. أما الأنزيم الفطري فينتج بواسطة تخمرات الحالة الصلبة باستعمال نخالة الحنطة بعد ترطيبها بحامض مخفف وتعقم وتلقح بسبورات *A.oryzea* وتستغرق العملية 4 أيام. يستخدم الانزيم الفطري في معاملة الطحين لأجل تحويل جزءاً من النشأ الى سكريات، كما يمكن انتاج الأنزيم الفطري بواسطة المزارع المغمورة. وفي معظم الحالات ينتج الانزيم الفطري في نهاية طور الثبات أو قد ينتج في مرحلة الانحلال الذاتي للخلايا ، يتم فصل الخلايا بالطرد المركزي ثم يركز الراشح بالتبخير وتضاف كمية من الملح وبعض المواد المطهرة للحفاظ على الانزيم.

2- أنزيم الكلوكوأميليز Glucoamylase

يسمى أيضاً أمايلوكلوكوسيديز وينتج من الاعفان خاصة *Aspergillus* و *Rhizopus* و *Mucor* وينتج تجاريا من عفن *Aspergillus niger* ووسط غذائي يحتوي على نسبة عالية من المواد العضوية (12- 20 %) حيث تستعمل المواد النشوية كالذرة أو الحنطة أو الشوفان والتي تزود الكائن المجهري بالنيتروجين أيضاً ويمكن استعمال مصادر نتروجينية غير عضوية مثل أملاح الامونيوم ويحفز انتاج الانزيم بإضافة مستخلص الخميرة ويجب أن يكون pH 4.5 للحصول على اقصى انتاج وينخفض pH الى 2.8 عند الانتهاء وذلك بسبب انتاج الاحماض العضوية . أما عند استخدام *Rhizopus* و *Mucor* تستخدم المزارع الصلبة في تنمية الاعفان ولايمكن استخدام المزارع المغمورة في الإنتاج لأن هايفات الاعفان غير مقسمة وعندما تتمزق أثناء دوران الخلاط بسرعة عالية داخل المخمر فإن الخيوط تفقد حيويتها بسبب خروج البروتوبلازم الموجود داخل الخيوط. تستغرق عملية الإنتاج 4- 5 أيام بعدها ترشح المزرعة لفصل المايسيليوم ويركز الراشح للحصول على أنزيم مركز يحتوي على 50% من الانزيم الفعال.

3- أنزيم كلوكوز أزوميريز glucose isomerase

أنزيم كلوكوز أزوميريزglucose isomerase التجاري هو في الحقيقة أنزيم د-زايلوز كيتول ازوميريز D-xylose ketol isomerase. يُنتج هذا الإنزيم من عدة أنواع من البكتريا. بعض السلالات المحسنة تنتج الأنزيم بشكل أساسي وتركيبه بدون حث. تنمى البكتريا في المزرعة بتقنية الوجبة الواحدة Batch culture تحت ظروف تهوية جيدة بدرجة حرارة 30 مْ، الرقم الهيدروجيني 7.0 ولمدة 2-3 أيام.

الكلوكوز أزوميريز هو أنزيم داخلي interacellular enzyme وإن أفضل طريقة للإنتاج هي استخدام تقنية الخلايا المقيدة immobilized cells. تعامل الخلايا بطريقة ملائمة لزيادة ثبوتيتها وفعاليتها المحفزة Catalytic activity.

يضاف الكلوكوز المنقى السائل glucose syrup والمسخن لإزالة الأوكسجين المذاب ويرفع تركيز الكلوكوز الى 40 %، يكون الرقم الهيدروجيني 7- 8 . يمرر السكر السائل syrup خلال عمود يحتوي على خلايا البكتريا المقيدة immobilized bacterial cells والتي لها فعالية أنزيم كلوكوزأيزوميريز، ويتم المحافظة على درجة حرارة 60 مْ. تحت الظروف العملية تستمر ديمومة (طول عمر الإنزيم) بين 2000-4000 ساعة، ويمكن الحصول على 20 طن أو أكثر لكل كيلو غرام واحد من الخلايا البكتيرية المستخدمة في الإنتاج. المنتج النهائي من إنزيم كلوكوز إيزوميريز

يعمل على إنتاج خليط من 1:1من الكلوكوز : فركتوز. هذا يؤدي إلى زيادة درجة الحلاوة Swetness مقارنة بالكلوكوز، وفي الواقع يكون مماثلاً الى تحويل السكر المحصل عليه من قصب السكر أو بنجر السكر أي السكروز.

4- الأنزيمات المحللة للدهون (اللايبيزات) lipases

يحلل أنزيم اللايبيز الدهون على شكل كليسرات ثلاثية triglycerides إلى كليسيريدات ثنائية diglycerides ومن ثم الى كليسيريدات أحادية monoglycerides والأحماض الدهنية fatty acids والكليسرول glycerol. استخدمت هذه الأنزيمات وبشكل رئيسي في الطب كأنزيمات هاضمة digestive enzymes لتعزيز الأنزيمات المحللة للدهون lipases في البنكرياس. تنتج الأنزيمات المحللة للدهون من قبل العديد من الأحياء المجهرية كالفطريات مثل: *Mucor sp, Rhizopus delamar, penicillium chrysogenum A. niger,* والبكتريا مثل: *Staphylococcus aureus, Pseudomonas fragi*

5- الأنزيمات المحللة للبروتينات proteases

تعتبر الإنزيمات المحللة للبروتينات ثاني أكبر مجموعة من الأنزيمات بعد أنزيمات الأميليز المهمة صناعياً، تستخدم بصورة رئيسية في صناعات المنظفات Detergents وفي الصناعات الغذائية في السيطرة على الطعم المر الذي يعود الى الببتيدات وكذلك في تطرية اللحوم وفي صناعة الخبز حيث يؤثر على كلوتين الحنطة وبالتالي يقلل من مدة الخلط كما يستخدم الانزيم الفطري في صناعة الجبن بديلاً عن الرنين كذلك تستخدم البروتيزات في صناعة الجلود حيث يعمل الانزيم على إعطاء الجلد نعومة ومظهراً جيداً ويستعمل في الصناعات النسيجية لإزالة المواد الغروية وفي صناعة الحرير حيث يعمل على تحرير الحرير من المواد البروتينية العالقة به. تصنف هذه الانزيمات الى:

أ- بروتيزات السيرين Serine proteases

وتنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* يبدأ هذا الانزيم بالإنتاج في نهاية الطور اللوغاريتمي ويزداد انتاجه باستعمال مزارع غير مكونة للسبورات والتي تساعد في الاستغناء عن خطوة فصل السبورات من الانزيم وهي من الخطوات الصعبة تقنياً والمكلفة اقتصادياً وتمتاز هذه البروتيزات بكونها لاتحلل البروتينات الى أحماض أمينية بصورة كاملة وتستخدم عادة في صناعة مساحيق التنظيف.

ب- البروتيزات التي تحتوي على معادن Metalloprotases

تحتوي هذه الانزيمات على ذرة معدنية وتكون عادة من الخارصين والذي يعد ضرورياً لفعالية الانزيم ويكون استخدامها على نطاق تجاري أقل من بروتيزات السيرين والبروتيزات الحامضية وذلك لضعف ثباتيتها . وتستخدم عادة في تحلل بروتين المولت وتنتج بواسطة بكتريا *B. amyloliquefaciens* و *B.thermoproteolyticus* .

ت- البروتيزات الحامضية Acidic proteases

وتنتج بواسطة الاعفان وهي تشبه في صفاتها البروتيزات الحيوانية مثل الرنين والببسين وهي أكثر البروتيزات استعمالاً في الصناعات الغذائية وتكون فعاليتها القصوى وثباتيتها عند pH 2-5 وتنتج عادة البروتيزات الشبيهة بالببسين بواسطة عفن *Aspergillus niger* و *A. awamori* وكذلك أنواع تابعة لجنس *Rhizopus* و *penicillium* بطريقة تخمرات الحالة الصلبة ولا تستخدم المصادر النيتروجينية اللاعضوية لأنها تثبط تخليق البروتيزات بينما يحفز الببتون الإنتاج من عفن *A.niger* أما البروتيز المشابه للرنين فينتج من عفن *Mucor* بواسطة تخمرات الحالة الصلبة كما يمكن تنمية الاعفان بالمزارع المغمورة ويستخدم هذا الانزيم في صناعة الجبن.

5- الانزيمات المحللة للبكتين Pectinases

مثل أنزيم بكتين مثيل استريز الذي يزيل مجاميع المثيل وأنزيم بولي كالاكتيرونيز الذي يكسر سلسلة البولي كالاكتيرونان، وتستخدم هذه الانزيمات في ترويق العصائر وزيادة استخلاص العصائر ومنع تكوين الهلام في العصائر اثناء تركيزها وفي تخمر الشاي والكاكاو والتبغ.

ويستخدم عفن *A.niger* على نطاق تجاري في انتاج هذه الانزيمات وعادة تستخدم طريقة تخمرات الحالة الصلبة فضلاً عن المزارع المغمورة حيث تستخدم في الطريقة الأولى نخالة الحنطة أو نخالة الرز المنزوعة الدهن كوسط لتنمية العفن كما تستخدم بعض مخلفات الصناعات الغذائية مثل مخلفات عصر التفاح والعنب والشوندر حيث تحتوي على البكتين وتضاف بعض الاملاح والحوامض لتعديل pH وتستغرق عملية التخمر 7 أيام ويتم إنتاج الانزيم في غضون 36 -72 ساعة. تجفف النخالة الحاوية على الانزيم بعد انتهاء مدة التخمر والتي يمكن استخدامها على هيئة أنزيم خام أو يستخلص الانزيم بواسطة مذيب مناسب ويركز تحت التفريغ أو بواسطة الترشيح الفائق.

6- أنزيم الأنفرتيز Invertase

يسمى السكريز ويعمل على تحويل السكروز الى الكلوكوز والفركتوز الذي يؤدي الى زيادة ذوبان السكر وبالتالي يقلل من عملية التبلور خلال تصنيع بعض المنتجات الغذائية مثل المثلجات القشدية (الآيس كريم) والمشروبات الغازية. وينتج هذا الانزيم على نطاق تجاري من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* وتبدأ العملية بتعليق جزءاً من الخميرة الطرية في 20 جزء من نترات المغنيسيوم وتتم تهوية الخليط لمدة 3 -8 ساعات وتكون درجة حرارة الحضن 28 -30م و pH 4.5 ويضاف محلول السكروز بصورة مستمرة 3 -20 % وتزداد فعالية الانزيم في الخميرة بعد انتهاء العملية بمقدار 15 مرة.

يستخلص الانزيم من الخميرة بتحلل الخلية نفسها ويتم استخلاص الانزيم بعدة طرق منها الانحلال الذاتي للخلايا باستخدام الكلوروفورم أو التلوين أو خلات الأثيل عند 30°م لمدة 3 ساعات وتتم التنقية بدرجة عالية لاحتوائه على مواد غير مرغوبة وطعم مهيج متأتي من الخميرة، وتتم التنقية بالترشيح الفائق والترسيب والادمصاص.

7- أنزيم اللاكتيز Lactase

وهو أنزيم بيتا كالاكتوسيديز يعمل على تحلل اللاكتوز الى الكلوكوز والكالاكتوز ويستخدم في معاملة الحليب الذي يتناوله الأشخاص الذين ليس لهم قابلية هضم اللاكتوز ، كما يستخدم في التخلص

من المشاكل التي يسببها اللاكتوز في بعض منتجات الالبان مثل ظاهرة التبلور ويستعمل اللاكتيز في إنتاج عصير سكري من مصادر اللاكتوز الرئيسية مثل الشرش وبذلك يمكن استخدامه في انتاج البروتين الأحادي الخلية. ينتج الانزيم تجارياً من خميرة *Kluyveromyces fragilis* التي تنمى على وسط الشرش أو يحتوي على سكر اللاكتوز فضلاً عن العناصر الغذائية اللازمة لنمو الخميرة. تفصل الخلايا بعد انتهاء عملية التخمر وتتم بالانحلال الذاتي للخلايا ويستخلص الانزيم ويفصل بالطرد المركزي أو الترشيح وقد يرسب بعد ذلك بالأملاح أو المذيبات. يمكن غسل خلايا الخميرة بالماء وتجفيفها واستخدامها كمصدر للأنزيم الخام . ويمكن إنتاج الانزيم من بكتريا *E.coli* إلا إنه لا يستعمل في الأغذية لأسباب صحية.

8- أنزيم الكلوكوز أوكسيديز Glucose oxidase

يعمل هذا الانزيم على تحويل الكلوكوز الى حامض الكلوكونيك وبيروكسيد الهيدروجين ويحتوي الانزيم التجاري على أنزيم الكاتاليز الذي يعمل على تحلل بيروكسيد الهيدروجين الى الأوكسجين والماء. وأهم استعمالاته هي إزالة الكلوكوز من ألبومين البيض وكذلك البيض الكامل قبل تجفيفه لتجنب حدوث التفاعل البني غير الأنزيمي بين البروتينات والكلوكوز، كما يستعمل في زيادة مدة حفظ أنواع معينة من الأغذية والعصائر من خلال إزالة الاوكسجين من المادة الغذائية، كما يستعمل في منع التغيرات التي تحدث في لون وطعم المشروبات الغازية المعبأة في العلب والقناني، كما يضاف الى المايونيز والصلصات لمنع تلفها، كما يستخدم في التحليلات الكيميائية للتقدير الكمي والنوعي للكلوكوز وفي وجود مواد كاربوهيدراتية أخرى نظراً لتخصصه العالي. ينتج هذا الانزيم تجارياً من عفن *A.niger* و *Penicillium* باستخدام المزارع المغمورة كما ينتج من عفن *P. notatum* و *P. chrysogenum* باستخدام المزارع السطحية . ينتج هذا الانزيم في الطور اللوغاريتمي ويمكن إطالة الطور بالتغذية بالكلوكوز . يستخلص الانزيم من داخل الخلايا بعد انتهاء التخمر ويتم إزالة أنزيم الكاتاليز الذي يتداخل مع عمل الكلوكوز أوكسيديز من خلال ادمصاص الكاتاليز بواسطة أوكسيد الامونيوم . ويحضر مسحوق الانزيم من خلال ترسيبه بأملاح متعادلة أو مذيبات ولكن يفضل الانزيم السائل عادة.

9- أنزيم السيلوليز Cellulase

هو عبارة عن مجموعة أنزيمات لذلك يسمى أحياناً cellulases وهي ثلاثة أنزيمات على الأقل تساهم مجتمعة في تكسير الأصرة الكلايكوسيدية بيتا (1-4) وإعطاء الكلوكوز وهذه الانزيمات هي:

أ- أنزيمات البيتا كلوكانيز (1-4) الداخلي (endo) الذي يهاجم سلسلة السيليلوز بصورة عشوائية.
ب- أنزيمات بيتا كلوكانيز (1-4) الخارجي (exo) الذي يحرر السيلوبايوز وفي بعض الحالات الكلوكوز من النهايات غير المختزلة للسيليلوز.
ت- أنزيمات بيتا كلوكوسايديز الذي يعمل على تحلل السيلوبايوز الى وحدتين كلوكوز.

يستخدم أنزيم السيلوليز لعدة أغراض منها يضاف الى العليقة الحيوانية كمادة مساعدة على الهضم كما يستخدم في استخلاص القهوة والشاي واستخلاص فول الصويا حيث يعمل على زيادة كفاءة الاستخلاص ويستعمل لتحسين القوام بالنسبة للخضروات الرديئة النوعية . ينتج هذا الانزيم من أنواع عديدة من الأحياء المجهرية مثل بعض أنواع عفن *Aspergillus* وبعض أنواع بكتريا *Bacillus* وينتج على نطاق تجاري من عفن *Trichoderma reesei* وبعض سلالاته المتطفرة

باستخدام تخمرات الحالة الصلبة. يتكون الوسط الغذائي من نخالة الحنطة المرطبة لتنمية العفن ويتم الحضن عند 28°م ولمدة 7 أيام. وقد وجد أن إضافة توين -80 تزيد انتاج الانزيم بصورة ملحوظة، ويعتقد أن سبب ذلك هو زيادة نفاذية غشاء الخلية مما يؤدي الى افراز كميات إضافية من الانزيم.

الأنزيمات المستخدمة في صناعة المنظفات Enzymes in cleaning detergents

هناك عدة أصناف من الإنزيمات المعروفة بتحسين عمليات الغسيل والكوي (laundry process) للملابس تشمل:

أ- الأنزيمات المحللة للبروتينات (proteases): تعمل على الترب وأوساخها وعلى الأصباغ ومحتوياتها البروتينية. الأنزيمات المحللة للبروتين تعمل على تكسير البروتينات الطويلة إلى سلاسل أقصر أي الببتيدات وثم أحماض أمينية. تعمل على إزالة أوساخ ياقة العنق (collar) والأكمام (cuff) وإزالة الدم.

ب- أنزيمات الأميليز: تعمل على إزالة المحتويات النشوية للترب والأصباغ وأوساخها، والصلصة، والآيس كريمات المختلفة ومرق اللحم.

ث- الأنزيمات المحللة للدهنيات تكون فعالة جداً في إزالة الدهون، والزيوت، والمشتقات النفطية، ودهون الجسم وأصباغ الأغذية.

ث- الأنزيمات المحللة للسيليلوز(cellulases): لها فوائد تنظيف عديدة خصوصاً إزالة الأتربة، والطين وكذلك تعمل على الياف الملابس المصنعة من السيليلوز حيث تعمل على تنعيمها واستعادة الالوان البراقة لها وتعمل كمبيض (whiteness) جيد للملابس البيضاء.

من أهم الفوائد والإيجابيات التي تمنحها الإنزيمات إلى المنظفات مايلي :

أ- تكون فعالة بالتراكيز الواطئة جداً حوالي 1-2 جزء من المليون.

ب- عالية التخصص في إزالة الأوساخ المختلفة ذات التراكيب المختلفة.

ت- تعمل بفعالية عالية بدرجات حرارة منخفضة (لاتحتاج الى ماء ساخن للتنظيف).

ج- تقوم بعمليات التكسير الحيوي (biodegradation) بفعالية عالية.

أهم تطبيقات الأنزيمات الصناعية :

1- المنظفات detergents

2- تحلل النشأ وانتاج الفركتوز starch hydrolysis and fructose production

3- المشروبات drinks

4- المنسوجات textile

5- الأعلاف الحيوانية animal feed

6- الخبز وتحضير المعجنات baking

7- صناعة الورق pulp & paper

8- الجلود leather

9- أنزيمات خاصة تستخدم في تقنيات DNA

10- أنزيمات تحليلية Enzymes in analytics alkaline

11- أنزيمات منتجات العناية الشخصية enzyme in personal care products مثل معاجين الاسنان tooth paste ومحاليل تنظيف العدسات solution for lense cleaning

12- الأنزيمات المستخدمة في الإنتاج الكيميائي مثل أنزيم formate dehydrogenase