المحاضرة الخامسة

3- إنزيمات التحليل المائى

ميكانيكية عمل إنزيمات هذا القسم تعتمد على كسر الرابطة بين مادة A إلى أخرى B ويتم إتحال عناصر الماء محل الرابطة المكسورة فمجموعة OH تتحد مع إحدى الروابط والهيدرجين H يتحد مع الرابطة الأخرى بمعنى أن هذه المجموعة من الإنزيمات تقوم بعمل كسر الرابطة ثم إضافة الماء فى المكان الذى حدث فيها تحليل للرابط الكيميائية ومن أمثلة تلك الروابط الإسترية والجليكوسيدية والببتيدية ومن أمثلة انزيمات هذا القسم إنزيم Lipase الذى يحلل الدهون تحللا مائيا وإنزيم amylase الذى يحلل النشا تحللا مائيا وإنزيم peptidase الذى يحلل البروتين تحللا مائيا أيضا، على الترتيب.

والمعادلة النموذجية لهذا التفاعل الإنزيمى هى:

$$AB + H_2O \rightarrow AOH + BH$$

ويوضح الجدول التالى (جدول 3) أسماء بعض إنزيمات التحليل المائى والرقم الأول والثانى للـEC الخاص بهما. وتبع فى تسمية هذه المجموعة من الإنزيمات كتابة اسم مادة التفاعل يليها كلمة hydrolase.

جدول 3: إنزيمات التحلل المائى Hydrolytic enzymes (EC:3.--.--.--)

Subclass	Name
EC 3	Hydrolases
EC 3.1	Acting on ester bonds
EC 3.2	Glycosylases
EC 3.3	Acting on ether bonds
EC 3.4	Acting on peptide bonds (peptidases)
EC 3.5	Acting on carbon-nitrogen bonds, other than peptide bonds
EC 3.6	Acting on acid anhydrides
EC 3.7	Acting on carbon-carbon bonds
EC 3.8	Acting on halide bonds
EC 3.9	Acting on phosphorus-nitrogen bonds
EC 3.10	Acting on sulfur-nitrogen bonds
EC 3.11	Acting on carbon-phosphorus bonds
EC 3.12	Acting on sulfur-sulfur bonds

EC 3.13	Acting on carbon-sulfur bonds

أمثلة لأهم إنزيمات التحليل المائى

1- إنزيم Lypase (EC 3.1.1.3) ويسمى بالطريقة الحديثة glycerol ester hydrolase هو من أهم إنزيمات التحليل المائى وتنتجه العديد من الكائنات الحية الدقيقة مثل البكتيريا والخمائر والفطريات ويستخدم استخدامات صناعية عديدة من أهما المنظفات البيولوجية biological detergents. والدهون من الناحية الكيميائية عبارة عن جليسريدات ثلاثية triglycerides تتكون من ثلاثة أحماض دهنية متحدة مع كحول ثلاثى يسمى جليسرول ومرتبطة مع بعضها برابطة استرية. وهى تحتوي على الكربون والهيدروجين والأكسجين مثل السكريات إلا أن نسبة الهيدروجين إلى الأكسجين فيها تختلف عن نسبتها في السكريات. والدهون من أكثر المواد الغذائية إنتاجا للسعرات الحرارية. والأحماض الدهنية عبارة عن أحماض كربوكسيلية لديها سلسلة أساسية أليفاتية طويلة وغير متفرعة وهى إما أن تكون مشبعة أو غير مشبعة ويمكن اعتبار الأحماض الكربوكسيلية ذات سلسلة قصيرة مثل حمض البوتيريك (حمض الزبدة) (4 ذرات كربون) حمض دهني.

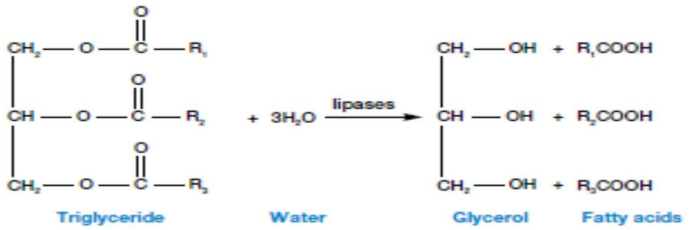
الدهون لا تذوب في الماء ولكن تذوب في الكحول والايثر والبنزين والكلوروفورم وغيرها من المذيبات العضوية والزيوت والدهون لها نفس التركيب الكيماوى ولكن جرت العادة على تسمية الدهون السائلة في الظروف العادية زيوت أما الدهون الصلبة على درجة حرارة الغرفة فتسمى دهن.

وتقسم الدهون إلى ثلاثة أقسام : الأول يسمى الدهون البسيطة مثل الجلسريدات الثلاثية والشموع waxes وفي الشموع يكون الحمض الدهنى طويل (10-40 ذرة كربون) والثانى يسمى الدهون المركبة وهي دهون بسيطة مرتبطة مع جزء غير دهني ومن أهمها الفوسفوليبيدات Phospholipides حيث تحتوي على حمض الفوسفوريك ومنها أيضا الدهون الاسفنجية, والدهون السكرية الجليكوليبيدات والدهون البروتينية التي تحتوي على البروتينات.

والقسم الثالث يسمى الدهون المشتقة وهو عبارة عن نواتج تحلل الدهون مثل الأحماض الدهنية الطليقة والكحولات طويلة السلسلة أو الحلقية التي من أمثلتها الستيرولات وفيتامين A والكاروتينويدات كما تلحق بهذه المجموعة الفيتامينات الذائبة هي الدهون (K. D. H).

ويحفز انزيم الليبيز التحلل المائى للدهون أو الزيوت (الجليسريدات الثلاثية triglycerides) عن طريق تحليل الرابطة الاسترية ويتكون ثلاثة من الأحماض الدهنية بالإضافة إلى الكحول الثلاثى المسمى الجليسرول كما يلى.

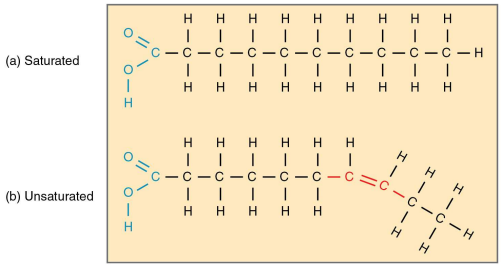
$$\text{Triglycerides} + H_2O \xrightarrow{\text{Lipase}} \text{Glycerol} + \text{Fatty acids}$$



ومن السهل الكشف عن قدرة الميكروبات على إفراز إنزيم الليبيز microorganisms Lipolytic لأنها تكون لون أخضر مزرق حول المستعمرات التى لها القدرة على تحليل الدهن نتيجة لإفراز ها إنزيم الليبيز حيث ينفرد الأحماض الدهنية وتتفاعل مع كبريتات النحاس بينما الميكروب غير المحلل لا يكون هذا اللون (راجع الدروس العملية). ومن أمثلة الميكروبات التى لها القدرة على إفراز إنزيم الليبيز *Clostridium* و *Bacillus* و *Pesudomonas* و *Streptomyces* و *Fusarium* و *Penicillium* و *Rhizopus* و *Aspergillus*.

الفسفوليبيدات phospholipid

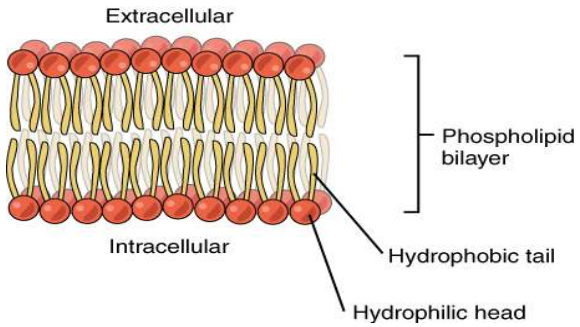
الفسفوليبيدات هى المكون الأساسى للأغسية السيتوبلازمية فى جميع الكائنات الحية وتركيبها الكيميائى يشبه تركيب الليبيدات ولكن يرتبط مع الجليسرول إثنان فقط من الأحماض الدهنية إحداهما مشبع saturated والأخر غير مشبع unsaturated (شكل 11) ويستبدل الحمض الدهنى الثالث بمجموعة فوسفات وهى المسئولة عن الخواص القطبية للفسولبيدات.



شكل رقم 11: مقارنة بين الأحماض الدهنية المشبعة a وغير المشبعة b

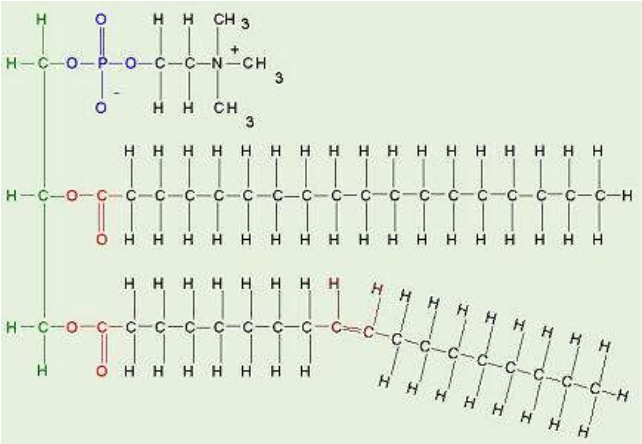
وعندما يتم وضع الفسفوليبيدات فى الماء فإنها تترتب فى صفين متقابلين حيث يتجه الرأس القطبى المحب للماء للخارج Hydrophilic head والجزء المرتبط بالأحماض الدهنية

يكون كاره للماء Hydrophobic tail فيتجه للداخل ومن هنا تأخذ الفسفوليبيدات شكلها المميز (شكل 12) وهو أيضا شكل التركيب النموذجى للغشاء السيتوبلازمى.



شكل رقم 12: الشكل الفسفوليبيدات فى الغشاء السيتوبلازمى

ومن أهم الفسفوليبيدات الموجودة باللبن الليسيثين lecithin (شكل 13) وتركيبه يشبه تركيب فسفوليبيد عادى مع قاعدة نيتروجينية تسمى الكولين مرتبط بمجموعة الفوسفات لذلك فإن تحلل الليسيثين بواسطة إنزيم lecithinase (EC 3.1.1.4) يعطى (جليسرول و2 حامض دهنى وفوسفات وكولين)، يعتبر ميكروب *Pseudomonas* من أشهر الميكروبات تحليلا له، حيث يقوم بعمل راسب حول المستعمرات المحللة لليسيثين (راجع الدروس العملية)، وعموما تسمى الإنزيمات المحللة للفسفوليبيدات باسم فسفوليبيز phospholipase (EC 3.1.1.4).



شكل رقم 13: التركيب الكيميائى لليسيثين

2- إنزيم Protease (EC 3.4.21.112) وهو يحلل الرابطة الببتيدية فى البروتين. وتستطيع الكثير من الكائنات الحية الدقيقة إفرازه. والبروتين من الناحية الكيميائية عبارة عن أحماض أمينية عديدية معقدة Polyaminoacids (بوليمر) ترتبط فيما بينها بروابط ببتيدية (بين مجموعة الكربوكسيل فى أحد الأحماض الأمينية ومجموعة الأمين فى حمض أمينى أخر) مكونة سلاسل ببتيدية فيما يعرف بالنباء الأول للبروتين ثم تلتف السلاسل حول بعضها فى شكل حلزونى مكونة

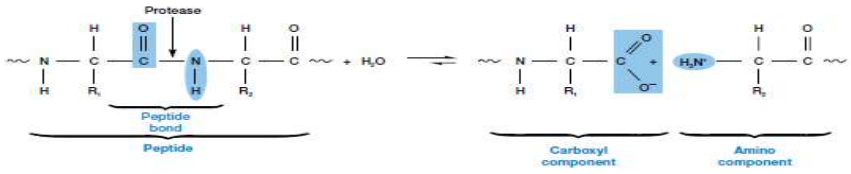
البناء الثانى ثم تتحد فى شـــكل معقد أكثر ثلاثى الأبعاد مكونة جزيئات البناء الثالث ثم تتحد كل مجموعة جزيئات معا مكونة البناء الرابع. وعند تحلل البروتين يكون الناتج الأســـاســـى الأمونيا NH_3 كما يتم إنتاج كل من H_2S , H_2O , CO_2 كنواتج نهائية لعملية التحلل الهوائى بينما التحلل تحت الظروف اللاهوائية يصـاحبه روائح كريهه فيما يعرف بأسم " تعفن Putrefaction" وفي هذه الحاله تختلف نواتج التحلل النهائية فتتكون الأمونيا والأمينات والأحماض الأمينية والأحماض عضوية والـH_2S و CO_2 والمركبتون mercaptane وغيرها.

وعندما يتحلل البروتين يتكون الطعم المر بســـبب البيتون. وتحلل البروتين قد يكون حامضـى أو قاعدى. تحلل البروتين الحامضـى يكون بسـبب بكتيريا حمض اللاكتيك سواء أكانت متجانسة التخمر homofermentative أو مختلطة التخمر heterofermentative ويكون هذا التحلل مصحوب بتكوين شرش.

أما تحليل البروتين مع إنتاج مواد قلوية يكون بواســـطة الميكروبات التى تمتلك إنزيمات نزع الأمين مثـل ميكروبـات *Micrococcus* و*Streptococcus faecalis* و بعض أنواع *Bacillus*. وغالبا فإن معظم هذه البكتريا تخثر اللبن تخثراً حلواً بإنزيمات الرينين قبل هضـــم الكازين وإنتاج مواد قلوية مثل *Serratia*, *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Flavobacterium*, *Achromobacter* . بينمـا وجود بكتريـا *Clostridium* فى اللبن يتسـبب فى تخثر اللبن ثم تتحلل الخثرة وتندفع لأعلى بسـبب الغازات المتكونة وتتشـقق فى حالة تعرف بالتخثر العاصف Stormy fermentation.

Protein → Peptones → Polypeptieds → Dipepties → Amino acid

$$\text{Protein} + H_2O \xrightarrow{\text{Protease}} \text{Amino acid}$$



الكـازين عبـارة عن فوســـفوبروتين - يوجـد فى اللبن كمعلق غروى يعطى للبن لونـه الأبيض وعند تحلله يكون مركبات قابلة للذوبان وأكثر شـفافية منه ومن السـهل الكشـف عن قدرة الميكروبات على إفراز إنزيم البروتييز أو الكازينيز لأنها تكون هالة شـــفافة نتيجة لإفراز إنزيم الكازينيز حول مستعمرات الميكروب المحلل للكازين لأن نواتج التحليل أكثر شـفافية من الكازين كما أن اسـتخدام حمض HCl المخفف يسـاعد على ذوبان نواتج التحلل وبالتالى يعمل على زيادة

وضـــوح الهالة الشـــفافة بينما الميكروب غير المحلل يكون اللون أبيض معتم (راجع الدروس العملية).

ومن أمثلــة الميكروبــات التى لهــا القــدرة على إفراز البروتييز أو الكــازينيز Proteoytic microorganisms هــى *Clostridium* و *Bacillus* و*Pesudomonas* - *Streptomyces* و*Arthrobacter* - *Micrococcus* – *Sporosarcina* و*Fusarium* – و*Penicillium*- و *Rhizopus* - *Aspergillus* – *Alternaria* .

وتعتبر جميع الميكروبــات المفرزة لإنزيم البروتييز مفرزة لإنزيم الجلاتينيز Gelatinase (EC 3.4.24.24) والعكس غير صـــحيح أى أن الميكروبات المفرز للجلاتينيز ليس بالضــرورة أو تكون مفرز للبروتييز وتعتبر هذه الصـفة صـفة تقسـيمية تسـتخدم فى تعريف الميكروبـات ومن اشـــهر الميكروبـات التى تنطبق عليـه هذه القـاعدة *Proteus* . ويلاحظ أن الميكروب المفرز لإنزيم الجيلاتينيز يغير من حالة الجيلاتين الصـــلبة ويحوله إلى ســـائل ويتم الكشـف عن اسـالة الجيلاتين بوضـع الأنابيب فى الثلاجة أو فى كأس يحتوى على ثلج أو ماء بارد بينما الإنبوبة التى تحتوى على الميكروب غير محلل يكون الجيلاتين فيها صـلب (راجع الدروس العملية).

3- إنزيم Amylase وهو يحلل الرابطة الجليكوسـيدية فى النشـا. وتسـتطيع الكثير من الكائنات الحيـة الـدقيقـة إفرازه. والنشـــا من النـاحيـة الكيميـائيـة عبـارة عن ســـكريـات عديـديـة معقـدة Polysaccharides (بوليمر) يتكون من وحدات عديدة من سـكر الجلوكوز وتتكون حبيبة النشـا من نوعان هذا البوليمر الأول يسـمى الأميلوز Amylose وهو يتكون من سـلاسـل مسـتقيمة من الجلوكوز عددها (100- 10000) مرتبطة مع بعضـها برابطة جليوسـيدية من النوع ألفا -1,4 α-glycosidic linkage (وهى رابط بين جزيئين جلوكوز حيث ترتبط الذرة رقم 4 من أحد الجزيئـات مع الـذرة رقم 1 من الجزئ الآخر فى الوضـــع ألفـا) والثـانى يســـمى الأميلوبكتين Amylopectin ويتكون من سـلاسـل متفرعة من الجلوكوز (10000- 50000) تفرعا شـديدا مثل الشـجرة مرتبطة مع بعضـها برابطة جليوسـيدية من النوع ألفا فى أماكن السـلسـلة المسـتقيمة أيضـــا أمـا عنـد التفرع فترتبط فيمـا بينهـا بنفس نوع الرابط ولكن على الـذرة رقم 6 من جزء الجلوكوز لذلك تسمى 1,6-α-glycosidic linkage.

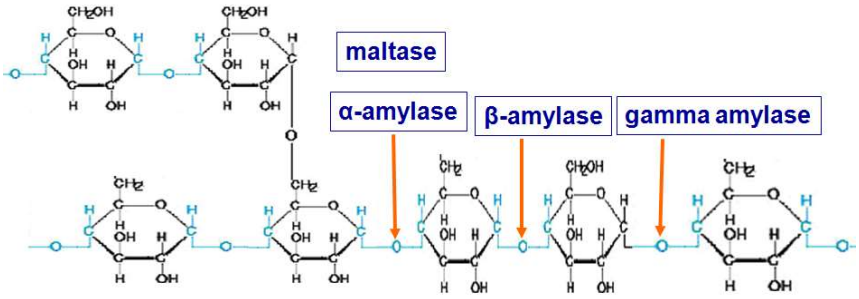
الميكروبات المحللة للنشـا تفرز مجموعة من الأنزيمات الخارجية تسـمى الأميليز (الذى كان يعرف سابقاً باسم إنزيم الدياستيز) وهى:

أ- الألفا أميليز α-amylase (EC 3.2.1.1) وهو قادر علي تكسير الروابط في السلاسل المستقيمة لكل من الأميلوز والأميلوبكتين بطريقة عشوائية لكنة غير قادر علي تكسير الروابط المتفرعة وبذلك ينتج عن فعل هذا الأنزيم علي النشا الدكسترين (شكل 14).

ب- البيتا أميليز β-amylase (EC 3.2.1.2) وهو يحلل السلاسل من نهايتها تدريجيا، ويكون التكسير عند الرابطة الثانية بين وحدات الجلوكوز ليعطي وحدات من السكر الثنائي (مالتوز) علاوة علي نسبة من الدكسترينات. وكلا الانزيمين غير قادر علي تكسير الرابطة المتفرعة في جزيء الأميلويكتين (شكل 14).

ج- المالتيز maltase (EC 3.2.1.20) يحلل السكر الثنائى المالتوز إلى 2 جزء من جلوكوز (شكل 14). وبالأضافة لهذه الإنزيمات، فإن بعض الميكروبات المحللة للنشا تفرز أنزيم gamma amylase.

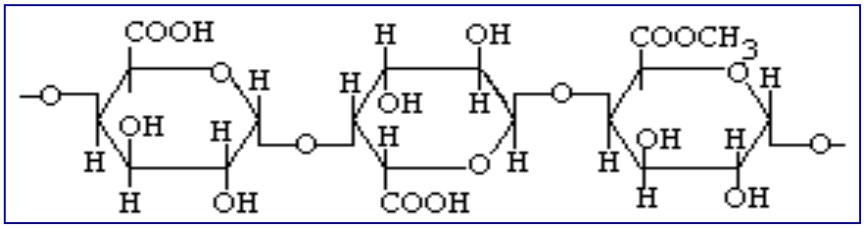
د- أنزيم gamma amylase (EC 3.2.1.3) الذي يفصل وحدات الجلوكوز من نهاية جزيء النشا (شكل 14).



شكل رقم 14: مواقع فعل إنزيم الأميليز على جزء النشا

ومن السهل الكشف على قدرة الميكروبات على تحليل النشا (راجع الدروس العملية) حيث يلاحظ تكون هالة شفافة نتيجة تحليل النشا حول مستعمرات الميكروب المحلل للنشا والذى له القدر على إفراز إنزيم الأميليز بينما بقية المزرعة فى طبق بترى تظهر بلون أزرق بعد إضافة اليود. والنشا من أسرع المواد الكربوايدراتية تحللا فهو يلي السكريات البسيطة في سرعة التحلل وهناك العديد من الميكروبات التى لها القدرة على تحليل النشا وتسمى microorganisms Amylolytic وتشتمل على : *Cytophaga - Clostridium - Bacillus - Micromonospora - Chromobacterum - Flavobacterium - Micrococcus Aspergillus - Rhizopus - Fusarium - Streptomyces*

4- إنزيم Pectinase (EC 3.2.1.15) وهو يحلل الرابطة الجليكوسيدية فى البكتين (شكل 15). وتســـتطيع بعض الكائنات الحية الدقيقة إفرازه. المواد البكتينية عبارة عن مواد تربط الخلايا النباتية ببعضها حيث تكون الصفيحة الوسطي Middle lamella بين جدر الخلايا.



شكل رقم 15: التركيب الكيميائى للبكتين

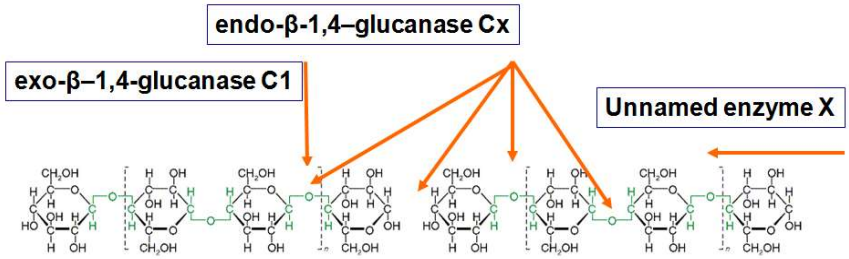
لذلك فإن تحللها بواسطة الميكروبات يساعد علي تفكك الخلايا النباتية عن بعضها. وعليه فإنها عملية هامة في تحلل المخلفات الزراعية، كما أن لها أهمية كبيرة في صـــناعه تعطين Retting الألياف (التيل - الكتان - الجوت - حطب القطن - ســـيقان الكركدية – الملوخية) حيث تتحلل المواد البكتينية التي تربط الألياف فتســهل عملية تفكك الألياف الســليلوزية, حيث تســتخدم هذه الألياف في صـــناعة النســـيج أو الحبال. كما أن قدرة الميكروبات (العفن الطري Soft rot فطريات الذبول Wilting) علي إحداث أمراض للنباتات Phytopathogenicity ترجع إلى قدرة الميكروبات الممرضة على إفراز إنزيم البكتينيز، كما أن تحلل وتعفن كثيرا من الخضروات والفاكهة يرتبط بحد كبير بإفراز إنزيم البكتينيز مثل ميكروب *Erwinia carotovora* الذى ينمو داخل درنات البطاطس ويحلل وتفكك الخلايا داخل الدرنة ومن ثم تموت الخلايا النباتية وتتحلل الدرنة ويخرج الميكروب ليغزو درنات جديدة... وهكذا.

كما ترجع أهمية إنزيم البكتينيز إلى قدرته على ترويق العصـــائر فى مجال الصـــناعات الغذائية. والمواد البكتينية تعتبر قسما من أقسام المواد الهيمسليليوزية، وتركيبها الكميائي عبارة عن ســـلاســـل من وحدات حمض الجلكتيورونيك Galacturonic acid مرتبطة كلية أو جزئيا بروابط أســـتر مع مجاميع الميثايل Methyl ester – ومجاميع الكربوكســـيل غير المرتبطة بروابط الإستر قد تكون متحدة كلية أو جزئيا مع كاثيونات مختلفة مثل++Mg,++Ca.

وهنـاك العـديـد من الميكروبـات التى لهـا القـدرة على تحليـل البكتين وتســـمى Pectinolytic microorganisms وتشـــتمل على : *- Arthrobacter. - Alternaria - Corynebacterium. - Clostridium. - Botrytis. - Bacillus, - Aspergillus. - Micrococcus. - Geotrichum. - Fusarium. - Flavobacterium - Erwinia Xanthomonas - Rhizopus - Rhisoctonia - Pseudomonas – Penicillium.*

4- إنزيم Cellulases وهو يحلل الرابطة الجليكوسيدية فى السليولوز. والسليلوز من الناحية الكيميائية عبارة عن مادة كربوايدراتية معقدة وزنها الجزيئي كبير جدا ويتركب من بوليمر لسكر الجلوكوز (Polymer of glucose) (1400 – 10000 جزئ) وترتبط وحدات سكر الجلوكوز مع بعضها برابطة جليكوسيدية من النوع بيتا (وهى رابط بين جزيئين جلوكوز حيث ترتبط الذرة رقم 4 من أحد الجزيئات مع الذرة رقم 1 من الجزئ الآخر فى الوضع بيتا) glycosidic β-1,4-linkage (شكل 16). والسليلوز لا يوجد في الطبيعة منفردا ولكن توجد هذه السلاسل متحدة في وحدات دقيقة جدا تسمي Micelles وهذه بدورها تترتب بشكل خاص في تراكيب أكبر تسمي Microfibrils ليعطى السيليلوز البللوري crysttaline cellulose (Avicel) وهذه الوحدات توجد بينها عادة مادة اللجنين.

التحليل المائى الإنزيمي للسليلوز يعتبر عملية معقدة حيث تحتاج لعمل ثلاثة أنزيمات علي الأقل لذلك يطلق علي تلك الإنزيمات cellulases الأول يسمى β–1,4- exo glucanase (E.C.3.2.1.74) (شكل 16) أو ما يعرف بـ C1 ويقوم بفصل جزئيات كبيرة من السيليلوز من نهاية السلسلة السليلوز والثانى يسمى β-1,4– endo glucanase (E.C.3.2.1.4) (شكل 16) فيقوم بتحليل السليولوز بطريقة عشوائية أو ما يعرف بـ Cx وهذان الإنزيمان يعملان معا لتكوين السيلوبيوز Cellobiose والثالث يسمى β–glucosidase أو السلوبييز Cellobiase (E.C.3.2.1.21) (شكل 16) وهو يحلل سكر السلوبيوز لتكوين 2 جزئ جلوكوز، ولتجنب حدوث عملية التثبيط فإنه يجب التخلص من السلوبيوز من وسط التفاعل الأنزيمي. وأثبتت الدراسات الحديثة أن هناك إنزيم أخر ربما يزيد من فهم هذا النظام المعقد ويسمى X (Unnamed enzyme) (شكل 16) ويعتقد أن لديه القدرة على فصل اللجنين (Phenylpropane) عن السليلوز كما يحدث مع فطريات عيش الغراب.



شكل رقم 16: مواقع فعل إنزيمات السليوليز على جزء السليولوز

الميكروبات اللاهوائية لا تستطيع القيام بالأكسدة الكاملة للمركبات العضوية لذلك فإن النواتج النهائية لتحليلها للسليلوز تشمل مركبات عديدة غير كاملة الأكسدة مثل الأحماض

العضـــوية: Succinic , Lactic , Formic , Butyric, Acetic والكحولات والغـازات مثل ;H_2; CO_2, CH_4 وتلعب البكتريا اللاهوائية المحللة للســـليلوز دوراً هاماً في قاع البرك والمستنقعات وفي كرش وروث الحيوانات المجترة وفي إنتاج المركبات الوسطية اللازمة لإنتاج غاز البيوجاز Biogas.

وهنـاك العـديـد من الميكروبـات التى لهـا القـدرة على تحليـل الســـليولوز وتســـمى Cellulytic microorganisms وتشـــتمل على : البكتيريا هوائية مثل: *Pseudomonas* - *Cytophaga* - *Bacillus* - *Sporocytophaga* والأكـتـيـنـومـيســـتـات مـثـل: *Micromonospora* - *Thermoactinomyces* - *Thermomonospora* - *Nocardia* - *Streptomyces* والفطريـات مثـل : *Sporotrichum* - *Alternaria* - *Fusarium* - *Penicillium* - *Aspergillus* - *Trichoderm* - البكتيريا لا هوائية مثل: *Clostridium dissolvens* - *Cl. thermocellum* - لاهوائيا في المجترات *(ruminants* : *Ruminococcus* - *Flavofaciens* - *Butyrivibrio* - *Fabrisolvens*- *Bacteroides*

لاحظ أن الميكروب المفرز لإنزيم السليوليز فى الظروف الهوائية يعمل على تآكل ورقة الترشـــيح فى أنبوبة الإختبار المحتوية على بيئة دوبس ويكون فى نهاية التفاعل الجلوكوز بينما الميكروب غير المحلل تظهر ورقة الترشيح بيضاء (راجع الدروس العملية).