إنزيمـات الكائنات الحية الدقيقة

MICROBIAL ENZYMES

الإنزيمات:

عبارة عن مادة عضوية تفرز بواسطة الكائنات الحيه سواء حيوانية او نباتية أو كائنات دقيقة , تساعد على تنشيط التفاعلات الكيموحيويه لذلك تعتبر ضرورية للحياة.كيف؟

ما هي أهمية الإنزيمات بالنسبة للكائنات الحية الدقيقة؟

يعتمد النشاط الكيموحيوي لها على عديد من الإنزيمات التي تعمل كعوامل مساعدة في كثير من التفاعلات الأيضية المختلفة.

أهم خواص الإنزيمات:

- تزيد من سرعة التفاعلات الكيموحيوية ولو كانت بمقادير ضئيلة.
- لا تشترك في التفاعل وتبقى كما هي بدون تغير.
- لا تزيد من قيمة الطاقة ولا تغير طبيعة أو نسب المواد الناتجة من التفاعل.
- أغلب الإنزيمات تظهر نوع من التخصص وذات عمل عكسي.

طبيعة الإنزيمات البكتيرية:

ذات طبيعة بروتينية وتتكون من جزئين:

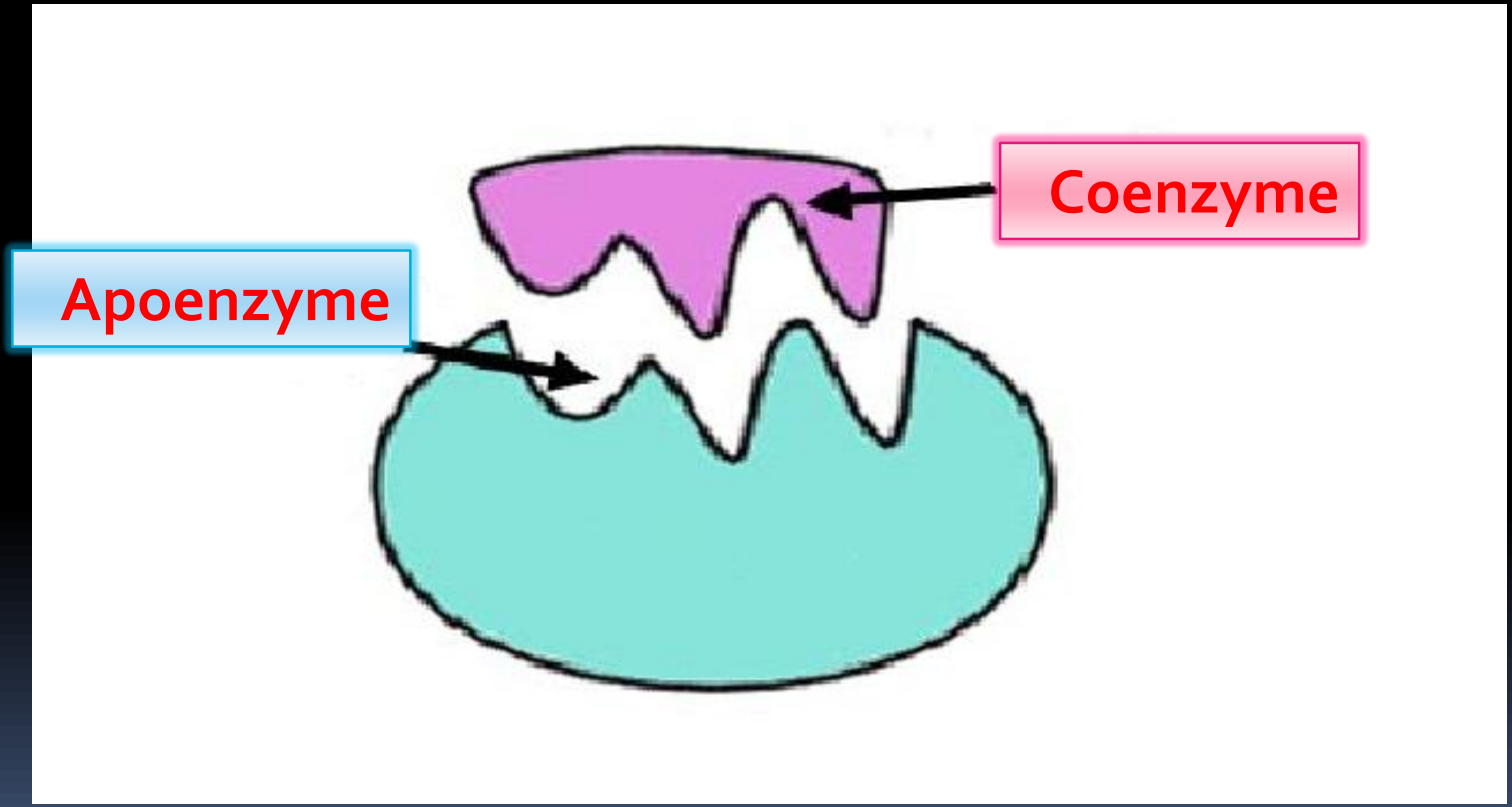
١- (Apoenzyme) له طبيعة بروتينية و يعرف باسم الإنزيم المحدد

٢- (Coenzyme) غير بروتيني ويعرف بالمرافق الإنزيمي أو المجموعة الفعالة.

يمكن لهذين الجزئين أن ينفصلا عن بعضهما وفي هذه الحالة يكونا غير فعالين في سير التفاعلات

إذن نشاط الإنزيم يتمثل في اتحاد الجزئين معا ويعرف التركيب الكامل للإنزيم (Holoenzyme).

Holoenzyme



أولاً: تحلل النشا
Starch Hydrolysis

النشا عبارة عن مادة كربوهيدراتية عديدة التسكر.

جزئ مبلمر polymer، يتكون من مكونين أساسيين:

أ-الأميلوز:

٢٠٠ – ٣٠٠ وحدة من سكر الجلوكوز مرتبط مع بعضها بالرابطة الجليكوسيدية ٤،١ في سلسلة مستقيمة.

ب- مركب الأميلوبكتين:

سلسلة طويلة ومتفرعة من وحدات من سكر الجلوكوز ومجاميع فوسفورية مرتبطة ببعضها بالروابط الجليكوسيديه ٤،١ ولكن عند التفرع يكون الاتصال بروابط جليكوسيديه ٦،١.

طريقة العمل:

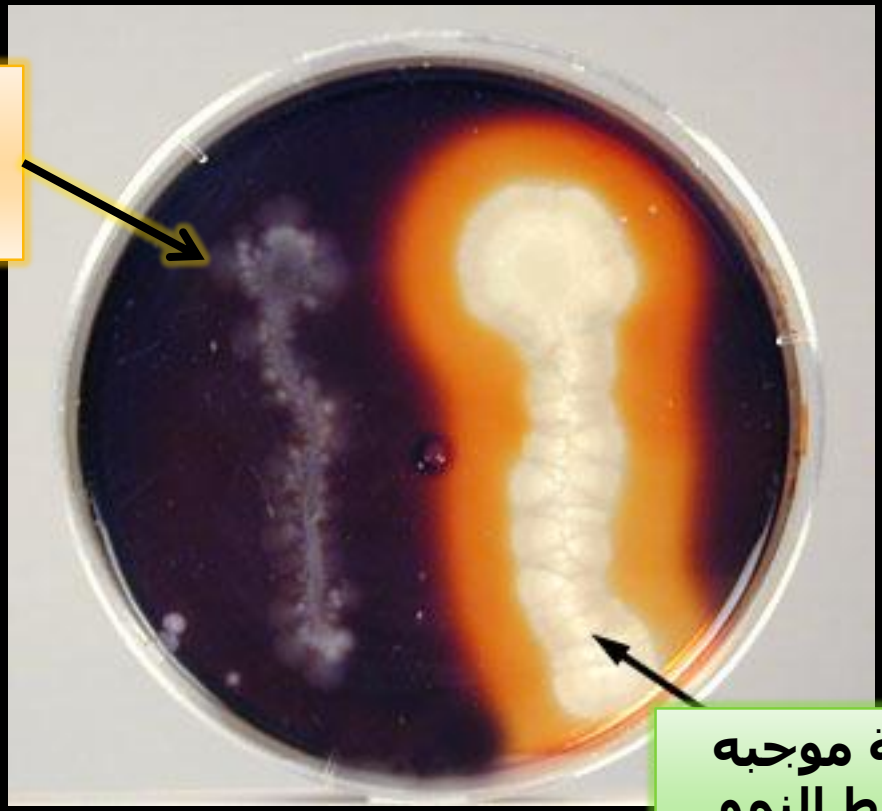
- يحضر وسط غذائي يحتوي على النشا (كمصدر للكربون) ويلقح بواسطة القرص من الفطر المراد دراسته ثم يحضن لمدة أسبوع عند ٢٨م.
- بعد التحضين، يتم الكشف عن تحلل النشا بإضافة محلول اليود (الكاشف indicator) إلى المزرعه الفطرية، لاختبار تفاعل اليود اللوني مع النشا الذي يعطي لون أزرق داكن.

النتيجة:

إذا تكونت هالة شفافة حول النمو الفطري بعد إضافة اليود دليل على أن الفطر قادر على إفراز **إنزيم الالفا أميليز α–Amylase** أو أي من الانزيمات المحلله للنشا (الإنزيم المحلل)القادر على تكسير النشا إلى مركبات أبسط.

إذا لم تظهر مناطق عديمة اللون دل ذلك على عدم قدرة الكائن على تحليل النشا وإنتاج الانزيمات المحلله له.

ب- نتيجة سالبة حول خط النمو لمزرعة *E. coli*



أ- نتيجة موجبه حول خط النمو لمزرعة *B. subtilis*

مزرعه بكتيريه لنوعين مختلفين من البكتيريا

أ- يتضح عدم تلون البيئة في المنطقة المحيطة بخط النمو (اليمين) مما يدل على تحلل المائي للنشا في هذه المنطقة عديمة اللون.

ب- يتضح تلون المنطقة المحيطة بالنمو باللون الأزرق الداكن للتفاعل بين اليود والنشا في البيئة (اليسار)

ثانياً: تحلل الجيلاتين
Gelatine Hydrolysis

الجيلاتين: بروتين حيواني يمكن لبعض الكائنات الدقيقة أن تحلله لامتلاكها أنزيم خارجي هو أنزيم الجيلاتينيز gelatinase (ناتج التحلل هو الأحماض الأمينية).

يتميز المحلول المائي للجيلاتين بأنه يكون في الحالة السائله في درجة حرارة الغرفة ويتحول للحاله الصلبه (يتصلب) عند وضعه في حمام ثلجي.

الإنزيم المحلل Hydrolytic enzyme:

يتمكن الكائن الدقيق من تحليل الجيلاتين لقدرته على إفراز الإنزيمات المحلله للجيلاتين gelatinase، بالتالي تفقد المزرعه قدرتها على التصلب عند وضعها في حمام ثلجي (الكاشف).

صورة توضح مزرعتين لآجار الجيلاتين بعد وضعها في الحمام الثلجي لمدة ١٥ دقيقة:

أ- عدم تصلب الجيلاتين بسبب تحلله بواسطة الإنزيمات المحللة المنتجه منا لكائن الدقيق النامي على الوسط (نتيجة موجبه).

ب- تصلب أجار الجيلاتين أي عدم تحلله بالنشاط الإنزيمي للكائن الدقيق النامي (نتيجة سالبة).

أ- نتيجة موجبه

ب- نتيجة سالبة

III.6 **Gelatin hydrolysis.** After hydrolysis (**1**), gelatin remains liquid. **2** is unhydrolyzed gelatin (Exercise 15).

ثالثاً: تحلل الكازين
Casein Hydrolysis

الكازين: البروتين الأساسي في اللبن ويوجد فيه كمعلق غروي يعطي اللبن اللون الأبيض غير الشفاف.

الإنزيم المحلل: تمتلك الكائنات الدقيقة إنزيم كازينيز caseinase الذي يحلل هذا البروتين مائياً إلى مشتقات أكثر ذوباناً وشفافيةً (يتحلل إلى الأحماض الأمينية المكونه لها).

يظهر الكائن الدقيق القادر على تحليل الكازين بواسطة الانزيم المحلل للبروتين محاطا بهالة رائقة بينما تظهر بقية المزرعه بيضاء معتمة لان بروتين الحليب (الكازين) لم يتحلل بها.

الكاشف Indicator : يمكن الكشف عن تحلل الكازين بإضافة حمض الهيدروكلوريك HCl الى بيئة النمو حيث تتكون هالة رائقة حول النمو الفطري وهذا دليل على التحلل.

صورة لمزارع على بيئة آجار الكازين

أ- خط النمو لبكتيريا *Bacillus subtilis* حيث تظهر منطقة رائقه حوله مما يدل على تحلل الكازين في تلك المنطقة نتيجة إفراز الكائن لإنزيم خارجي محلل للكازين يسمى Caseinase (نتيجة موجبه).

ب- خط النمور لمزرعة بكتيريا *Escherichia coli* حيث يظهر الوسط بدون تغيير(معتم) (نتيجة سالبة).

رابعاً: تحلل الدهون
Fat (Lipid) Hydrolysis

تحلل الدهون يؤدي إلى توفر كميات كبيرة من الطاقة أكثر من الطاقة الناتجة عن تحلل السكريات.

الإنزيم المحلل: قدرة الكائن الدقيق على تحليل الدهون يرجع إلى إفراز إنزيم lipase وهذا الأنزيم يقسم جزئ الدهن إلى جزئ جلسرول وثلاثة جزيئات من الاحماض الدهنية.

الكاشف indicator: محلول كبريتات النحاس $CuSO_4$

طريقة العمل:

- يضاف الزيت المعقم بالترشيح إلى الوسط الغذائي المعقم ثم يصب في أطباق بتري معقمة.
- بعد تصلب الأطباق تلقح بالكائن الدقيق(المراد الكشف عن قدرته على تحليل الدهون) ثم يحضن لمدة أسبوع عند ٢٨°م.
- يتم الكشف عن تحلل الدهون بإضافة محلول كبريتات النحاس $CuSO_4$ إلى المزرعة حيث تتكون نقاط ذات لون أخضر مزرق حول النمو الفطري وهذا دليل على أن الكائن قادر على إفراز إنزيم المحلل للدهون Lipase
  - ✓ يحلل الدهون إلى أحماض دهنية وجليسرول حيث تتفاعل كبريتات النحاس مع الأحماض الدهنية لتعطي مركب معقد لونه اخضر مزرق.

خامساً: تحلل اليوريا
Urea Hydrolysis

اليوريا Urea: مركب نيتروجيني عضوي معقد التركيب

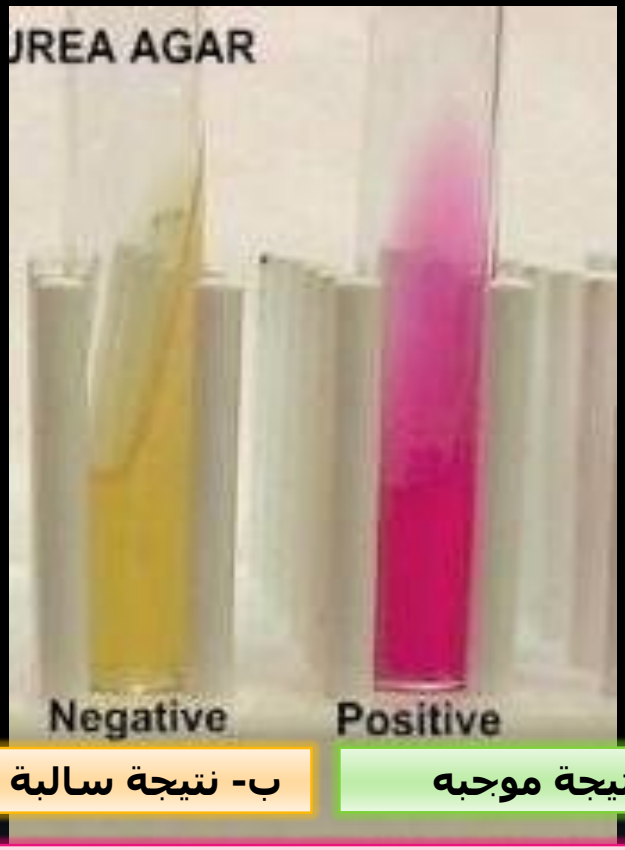
الإنزيم المحلل: يتحلل بواسطة إنزيم اليورياز Urease

ينتج عن التحلل النشادر(الأمونيا NH_3), بعض الكائنات الدقيقة (مثل بكتيريا *Proteus*) لها القدرة على إنتاج هذا الإنزيم وبالتالي تستطيع أن تحلل الوسط الذي يحتوي على اليوريا وتستخدمه كمصدر نيتروجيني.

طريقة العمل:

تضاف اليوريا المعقمة بالترشيح إلى الوسط الغذائي المعقم ثم تصب الأطباق وتلقح الأطباق بمستعمرة حديثة العمر ثم تحضن الأطباق لمدة أسبوع عند ٢٨م.

يتم الكشف عن تحلل اليوريا باستخدام كاشف أحمر الفينول phenol red المضاف إلى الوسط مسبقاً (يتحول من اللون الأصفر عند pH 6.8 إلى اللون الأحمر عند pH 8.1 أو أكثر).



أ- نتيجة موجبه

ب- نتيجة سالبة

وسط آجار اليوريا يحتوي على الكاشف الأحمر phenol red بدون تلقيح (كنترول للمقارنة).

أ- تغير لون الكاشف من اللون الأصفر إلى اللون الوردي دليل على أن الكائن قادر على إفراز الإنزيم المحلل لليوريا urease حيث يعمل على تكسير اليوريا إلى أمونيا NH_3 وهي المسئولة عن تغير لون الكاشف لتحول الوسط من حمضي إلى قاعدي (نتيجة موجبة).

ب- يبقى لون الكاشف بدون تغيير بعد نمو الكائن المختبر لعدم قدرته على إفراز الإنزيم المحلل لليوريا وبالتالي عدم تغير درجة حموضة الوسط (نتيجة سالبة).

المطلوب

الماده	الوسط الغذائي المستخدم	الكاشف	النتيجة الموجبه	النتيجه السالبه	التعليق