عزل وحفظ الاحياء المجهرية الصناعية

تعد الاحياء المجهرية بانها المفتاح الاساسي في نجاح او فشل العمليات التصنيعية الحيوية وذلك لانها المحفز والعامل الذي يتحكم في حدوث عملية التخمر واكمالها ومن ذلك فان الحالات التي تكون فيها غير مثالية فانها تؤدي الى فشل العملية التصنيعية بكاملها.

مما تقدم وللاهمية المشار اليها فان مزرعة الكائن المجهري يجب **ان تمتلك صفات عامة** معينة كي تكون فعالة في انتاج المنتوج المرغوب التي منها:-

1. ان تكون السلالة من الاحياء المجهرية الثابتة وراثيا.
2. ان تتمكن السلالة وبسهولة من انتاج الوحدات التكاثرية كالخلايا الخضرية او السبورات في ظروف بيئية ومتطلبات غذائية بسيطة.
3. ان تكون السلالة نقية وخالية من اللاقمات Phages من خلال قدرتها في مقاومة تلك اللاقمات.
4. ان تنتج السلالة المنتوج المرغوب بمعزل عن جميع المواد السامة، وتمكين فصل المنتوج المرغوب بسهولة عن المنتجات الاخرى.
5. ان تكون السلالة ذات قابلية في حماية نفسها من التلوث قدر الامكان وتاتي هذه من خلال امكانية نموها في ظروف من درجة الحرارة او مستوى من الاس الهيدروجيني مختلفا عن الانواع الميكروبية الاخرى.
6. يجب ان تعطي السلالة المايكروبية كمية من المنتوج المراد انتاجه تكون كافية اقتصاديا في زمن التخمر المحدد.

عزل الاحياء المجهرية الصناعية من المصادر الطبيعية

ان من اهم المصادر الطبيعية والرئيسية لعزل الاحياء المجهرية الصناعية هي التربة والمياه ومياه الفضلات والاغذية الطازجة والمتخمرة والحيوانات والنباتات الحية اذ يتم عزل الاحياء المجهرية التي تستخدم في التكنلوجيا الحيوية حسب صفاتها وقابليتها على النمو في الاوساط الغذائية المنماة عليها وغالبا مايتم تصميم عمليات العزل بحيث تشجع نمو الانواع التي تحمل الصفة المرغوبة وبذلك تكون الصفة المرغوبة في هذه الحالة عامل انتخاب لتلك الاحياء ثم تجرى بقية الاختبارات للوصول الى النوع المرغوب، وفي الحالات الاخرى غير المشار اليها فانه

تعتمد الطرائق التقليدية في العزل والتشخيص للوصول الى نوع الكائن المجهري المطلوب عزله لاستخدامه في التصنيع الحيوي.

ان من اهم طرائق العزل هي:-

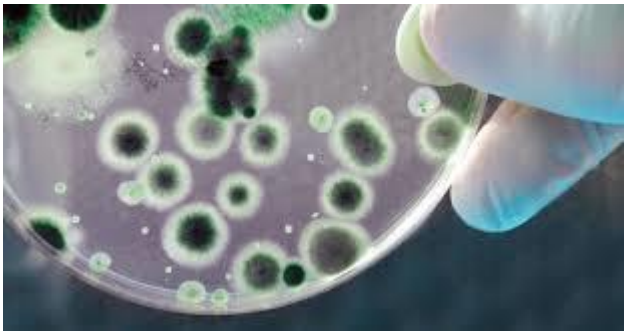
أولا:- طرائق العزل التي تعتمد الصفة المرغوبة في عملية الانتخاب

1- طريقة المزارع السائلة المدعمة

اساس هذه الطريقة هو تشجيع نمو الاحياء المجهرية المرغوبة من بين الاحياء المجهرية الاخرى الموجودة في العينة المصدر، وتتضمن هذه الطريقة في اخذ عينة من المصادر الطبيعية التي تحتوي على مزارع الاحياء المجهرية وتوفير الظروف الملائمة للانواع المرغوبة منها باضافة مادة مدعمة الى الوسط الغذائي السائل لتشجيع نمو الكائن المرغوب في العزل او اضافة مادة الى الوسط الغذائي لتثبيط نمو الاحياء المجهرية غير المرغوبة للوصول الى عزل النوع من الاحياء المجهرية المطلوب عزلها بشكل نقي.

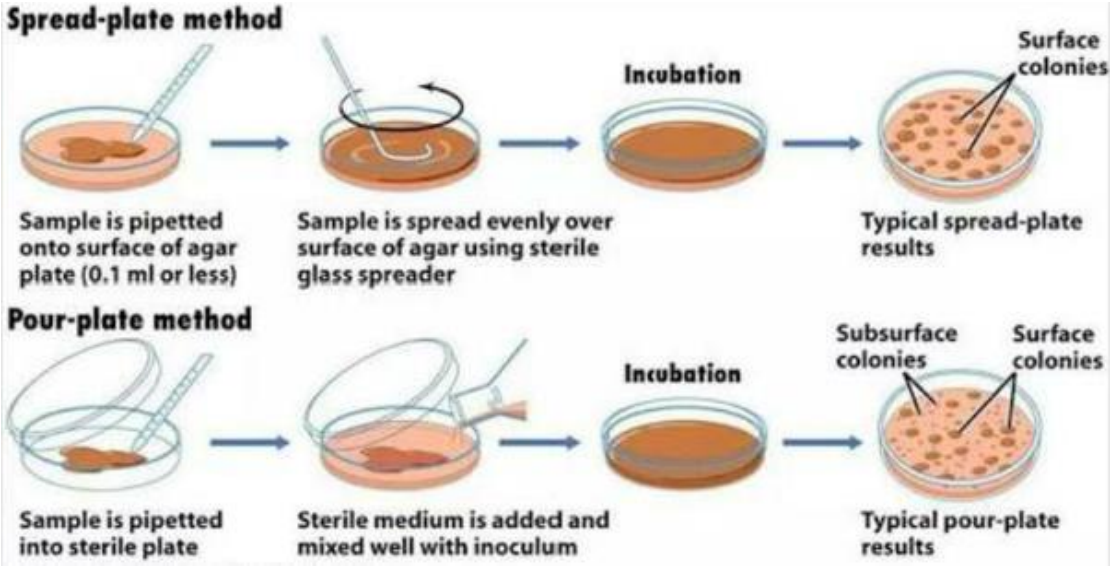
2- طريقة الاوساط الغذائية المتصلبة

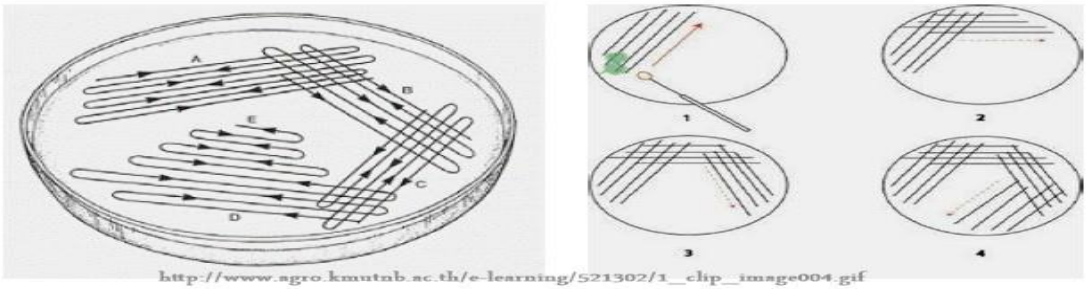
تستعمل هذه الطريقة من خلال التنمية للاحياء المجهرية المراد عزلها على الاوساط المتصلبة بالاكار وغالبا عندما يراد عزل الاحياء المجهرية المنتجة للانزيمات حيث تستعمل معها اوساط غذائية انتقائية Selective media تحتوي على المادة الخاضعة التي يعمل عليها الانزيم المرغوب وبذلك فان انواع الاحياء المجهرية المنتجة للانزيم المرغوب تكون فقط هي القادرة على النمو، وتتثبط الانواع الاخرى لان الوسط الغذائي سوف لايوفر لها المكونات الملائمة للنمو.



ثانيا:- طرائق العزل التي لا تعتمد الصفة المرغوبة في عملية الانتخاب:-

تستعمل هذه الطريقة عندما تكون عملية انتاج بعض المنتجات المرغوبة لا يعطي اية ميزة انتخابية للكائن المجهري المنتج ولذلك تستخدم في هذه الحالة طريقة العزل التقليدية للحصول على الاحياء المجهرية من خلال استعمال طريقة النشر Spread-plate method او طريقة الطبق المصبوب Pour-plate method او التخطيط Streaking method.





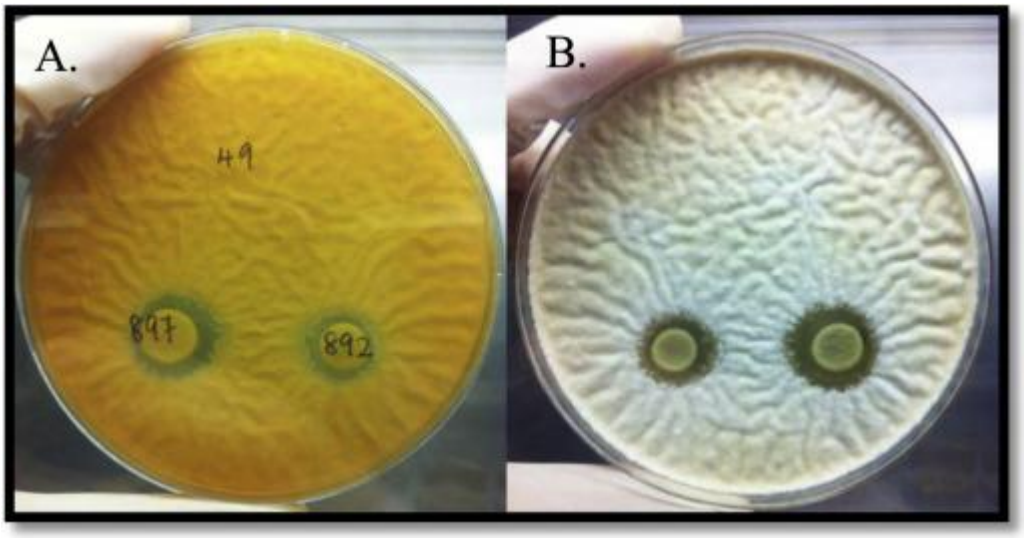
http://www.agro.kmutnb.ac.th/e-learning/521302/1_clip_image004.gif
www.protocol-online.org/.../posts/22612.html

يتم بعدها التشخيص اعتمادا الى الصفات المحددة التي يمتلكها كل كائن واختلافاته عن الكائنات الاخرى فيها والتي تشمل الصفات الظاهرية والمجهرية والصفات المزرعية والكيموحيوية التي من خلالها يتم الحصول على الكائن المجهري الذي يحمل الصفة المرغوبة بشكل نقي ثم تحدد قابلية

انتاجه الكمية واختيار العزلة الاكثر انتاجا من النوع الواحد. ان الطرائق المشار اليها يمكن استعمالها في اتجاهات متعدده منها:-

1- عزل الاحياء المجهرية المنتجة للمضادات الحيوية

يتم الكشف عن الفعالية المضادة للاحياء المجهرية من خلال تنمية الكائن المجهري المنتج للمضاد الحيوي على وسط غذائي متصلب واختبار قابلية انتاجه للمضاد الحيوي بتنمية كائن مجهري اخر يكون حساسا لهذا المضاد في حالة انتاجه وبذلك فان قابلية التثبيط لكائن الاختبار تكون دليلا على مقدرة كائن الانتاج في انتاجة للمضاد الحيوي.



2- عزل الاحياء المجهرية المنتجة لعوامل النمو

ان انتاج عوامل النمو كالاحماض الامينية والنيكلوتيدات من الاحياء المجهرية تعد من الصفات التي يصعب معها استخدام الصفة الانعكاسية في العزل، اذ يتم في هذه الطريقة عزل الاحياء المجهرية المنتجة لهذه المواد بالطرائق التقليدية اعتمادا الى صفاتها ومن ثم استخدام الغربلة بين عزلات نفس النوع للحصول على العزلة الاكثر انتاجا من بينها.

3- عزل الاحياء المجهرية المنتجة للمواد السكرية المتعددة

يتم عزل الاحياء المجهرية المنتجة للسكريات المتعددة من مصادرها المختلفة اذ لا يمكن استعمال هذه الصفة كعامل انتقائي في عملية العزل، وغالبا ما تعزل انواع الاحياء المجهرية من المواد الكاربوهيدراتية بوصفها مواد تنمو عليها تلك الانواع. يتم العزل لتلك الانواع من الاحياء المجهرية من خلال تنميتها على الاوساط الغذائية الصلبة ثم عزلها وتنميتها في مزارع سائلة للتعرف على صفة انتاج المواد السكرية فيها.

حفظ الاحياء المجهرية الصناعية:-

نظرا لكون عمليات عزل الاحياء المجهرية المهمة صناعيا تكون ذات تكلفة عالية وتحتاج الى وقت طويل فان المحافظة عليها من الهلاك والحفاظ على الصفات المرغوبة التي عزلت من اجلها وكذلك ابعادها من التلوث، تعد من الاساسيات في منع فشل عمليات التصنيع الحيوي حيث ان حصول خلل في تغذية الكائن المجهري قد يؤدي الى حدوث طفرات وراثية في جينات الكائن المجهري الصناعي او حدوث انحلال في سلالته فضلا عن التعرض لمخاطر التلوث الاخرى. لذلك فان عمليات حفظ هذه الاحياء يعد مهما في العمليات التطبيقية الحيوية وان مزارع الاحياء المجهرية الصناعية عادة ما تكون على نوعين:-

1. مزارع الحفظ قصير الاجل Short time storage cultures:-

يستعمل هذا النوع من المزارع باستمرار في الانتاج الحيوي اذ يجب ان تكون في حالة نمو كثيفة وغير ملوثة وعادة ما تحفظ بهيئة مزارع اكار مائلة Agar slant cultures او مزارع ثابتة stab culture او بشكل معلق سبورات او بحالة مزرعة سائلة، وان حفظ هذا النوع من المزارع يكون عند حرارة الثلاجة 4 ^{o}م كما يجب فحص هذه المزارع باستمرار للتاكد من نشاطيتها.

2. مزارع الحفظ طويل الاجلLong time storage cultures:-

تحفظ هذه المزارع لاستعمالها خزينا لعمليات تخمر جديدة او في الفحوصات البايولوجية للمقارنة ولا يتم حفظها في حالة فسيولوجية ذا نشاطية، اذ يتم تحضير مزارع الاحياء المجهرية منها في حالة الحاجة الى مزارع عمل او عند اعادة زراعتها لمنع هلاكها، لذلك يجب حفظها بطريقة تحتاج اقل عدد من النقلات خلال فترة زمنية معينة.

ان من اهم طرائق حفظ مزارع الاحياء المجهرية الصناعية هي الاتي:-

1- الخزن على الاكار المائل Agar slope

يتم في هذه الطريقة حفظ الكائن المجهري على وسط غذائي مناسب يحتوي على الاكار بصورة مائلة عند درجة حرارة 4 م° او 20 م° وتعاد زراعتها كل 6 اشهر تقريبا وعند استخدام الزيت النقي مثل البارافين في تغطية المزرعة فان المزرعة يمكن حفظها عند (-20 م°) وان اعادة الزراعة قد تستمر لمدة سنة كاملة. اذ ان طبقة الزيت المضافة تعمل في تقليل تجهيز الكائن المجهري بـ O_2 وتمنع في الوقت نفسه من جفاف الاكار وبالتالي تقلل الفعالية الحيوية للكائن المجهري لذلك تزداد مدة حفظها.

2- خزن السبورات في الماء Storage of spore in water

تعد هذه الطريقة محدودة الاستعمال اذ يتم فيها تحضير معلق السبورات في الماء المعقم والحفظ عند درجة حرارة 5م°.

3- الحفظ باستخدام N_2 السائل Storage under liquid nitrogen

يتم في هذه الطريقة تقليل الفعالية الحيوية للاحياء المجهرية عند حفظها على درجة حرارة واطئة بين (-196-150م°) وذلك باستخدام ثلاجات N_2 السائل. تتم هذه الطريقة من خلال تنمية الكائن المجهري ثم تعليق خلاياه في محلول حافظ من الانجماد (10% كليسيرول) يوضع المعلق بعدها في انابيب زجاجية صغيرة مقفولة وتحفظ في N_2 السائل. وللحصول على نتائج مضمونة فانه يفضل تجميد المعلق ببطء قبل الخزن، وكذلك مراعاة التذويب السريع عند استرجاع المزرعة، ومن عيوب هذه الطريقة هي الكلفة العالية في المحافظة على درجات الحرارة المنخفضة باستمرار.

4- الخزن في التربة Storage in Soil:-

تستخدم هذه الطريقة غالبا في حفظ الاعفان والبكتريا الخيطية، حيث يتم فيها تلقيح التربة المزيجية والمعقمة بالكائن المجهري المراد حفظه والتحضن عدة ايام في الدرجة الحرارية المناسبة وبعد اكتمال النمو تحفض المزرعة بدرجة حرارة الغرقة لمدة اسبوعين ثم في الثلاجة، وقد تطول مدة حفظ الاحياء المجهرية بهذه الطريقة لاكثر من 20 سنة.

5- التجفيد Freeze-drying:-

تتضمن هذه الطريقة تجميد مزارع الاحياء المجهرية ثم تجفيفها تحت التفريغ حيث يتم تسامي الماء الموجود في الخلايا. وتتم هذه الطريقة بعد تنمية المزارع في وسط غذائي مناسب ثم تعلق الخلايا في مادة تحافظ عليها مثل حليب الفرز او بلازما الدم او كلوتومات الصوديوم او الببتون او السكر ويتم وضع عدة قطرات من المعلق في امبولات ثم تجمد وتوضع تحت تفريغ عالي حتى اكمال التسامي ثم تقفل الامبولات. يفضل ان تحفظ الامبولات في الثلاجة للمحافظة على حيويتها لفترة اكثر من عشرة سنوات.

4

السيطرة النوعية على المزارع المحفوظة Quality control of preserved cultures

فيها يتم التأكد من كفاءة طريقة الحفظ من خلال التعرف على نوعية المزارع المحفوظة بغض النظر عن طريقة الحفظ المستعملة حيث يجرى فيها الفحص الروتيني لكل وجبة جديدة من المزارع المحفوظة للتاكد من نوعيتها. وتجري عادة اعادة زراعة 3% من الامبولات والانابيب من كل وجبة معدة للحفظ للتاكد من النقاوة والانتاجية والحيوية واذا اعطت المزرعة نتائج سلبية فانه يتم اتلاف جميع امبولات الوجبة المعدة، وبهذا يمكن المحافظة على المزرعة واستخدامها بثقة نتيجة لاتباع نظام السيطرة النوعية.

طرق التنمية المستعملة في التقنية الحيوية

لقد أثمر التوجه الجاد للدول المتقدمة تقنيا إلى تبني التقانات الحيوية لمواجهة تلك الظواهر والمخاطر عن بدائل وحلول حقيقية تجسدت في استثمارات هائلة تقدر بمئات المليارات من الدولارات وتشغيل عشرات الملايين من الموارد البشرية بمختلف مستويات التأهيل العلمي والتقني. وقد توزعت الاستثمارات على الصناعات والتقانات الحيوية التالية:

- إنتاج مواد الوقود الحيوي الديزل الحيوي والإيثانول الحيوي (باعتبارها تمثل أهم مصادر الطاقة المستدامة (Sustainable Energy).
- تصنيع واستخدام المفاعلات الحيوية (خلايا وأنزيمات) في الصناعات الغذائية والدوائية.
- إنتاج الأنزيمات الصناعية من الأحياء المجهرية المحبة للحرارة واستخدامها على نطاق واسع في العديد من الصناعات كالنشا والجلوكوز، متحللات البروتين، العصائر والمشروبات، دباغة الجلود، استخراج البترول.
- إنتاج الأنزيمات المنقاة واستخدامها في التحليلات الغذائية والسريرية .
- إنتاج النباتات الاقتصادية من فاكهة وخضروات ونباتات زينة (بتقنية الزراعة النسيجية) .
- (إنتاج المحاصيل المعدلة وراثيًا) فول الصويا، الكانولا، الذرة، البطاطا، البنجر السكري، القطن
- من النواتج العرضية (Biodegradable) إنتاج مواد التعبئة والتغليف الحيوية القابلة للتحلل للعمليات الزراعية والصناعات الغذائية كبلاستيك النشا الحراري، بولي لاكتيت، خلات النشا، خلات السيليلوز والتي اكتسبت مؤخرًا اهتمامًا ملحوظًا بسبب ارتفاع أسعار النفط وما يترتب عليه من ارتفاع في تكاليف إنتاج مواد التعبئة والتغليف المشتقة منه.

يعبر عن النمو في الكائنات الحية الدقيقة بانه حالة الزيادة في اعداد الخلايا والتي تسمى **بالكتلة الحيوية**. تتضمن الية النمو خطوات ايضية متسلسلة ومتناسقة تستعمل فيها مجموعة كبيرة من الانزيمات. ان الاحتياجات للنمو تتضمن توفير المواد المغذية من خلال الوسط الغذائي والظروف البيئية اللازمة للنمو، وان كل من الحالتين تحتاجها الانواع من الاحياء المجهرية بصورة مختلفة لكل نوع عن الاخر. ان تقدير كمية الكتلة الحيوية التي يستدل منها على حالة النمو للكائنات الحية المجهرية يتم من خلال حالات متعددة منها قياس الوزن الرطب او الوزن الجاف للكتلة الحيوية او من خلال قياس اعداد الخلايا المايكروبية، حيث يعرف **زمن التضاعف:** بانه الفترة الزمنية اللازمة لتضاعف وزن الكتلة الحيوية المكونة للاحياء المجهرية...اما **زمن الاخلاف:** فانه الزمن اللازم لتضاعف اعداد الخلايا (شكل 1). اللذان يكونان متساويان خلال النمو المتوازن في الطور اللوغاريتمي من نمو الكائنات المجهرية.

يختلف زمن التضاعف بين انواع الكائنات الحية حيث يكون قصيرا في بعضها مثل البكتريا ويطول في البعض الاخر كالفطريات اذ يكون بين 0.20 – 1.0 في البكتريا...1.20 – 2.0 في الخمائر...2.0 – 7.0 ساعات في الاعفان.

وكما يلاحظ فان الاحياء المجهرية لاتتكاثر بسرعة واحدة، وعند عمل منحني نمو Growth curve (هو العلاقة بين لوغارتم عدد الميكروبات على المحور الصادي والزمن على محور السيني) فانه ستظهر أربعة أطوار (الشكل 2). وهي:

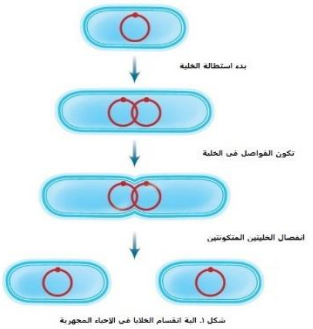
(1) طور التاقلم (طور التطبع) **Lag phase**

(2) طور النمو اللوغارتمي **Logarithmic**

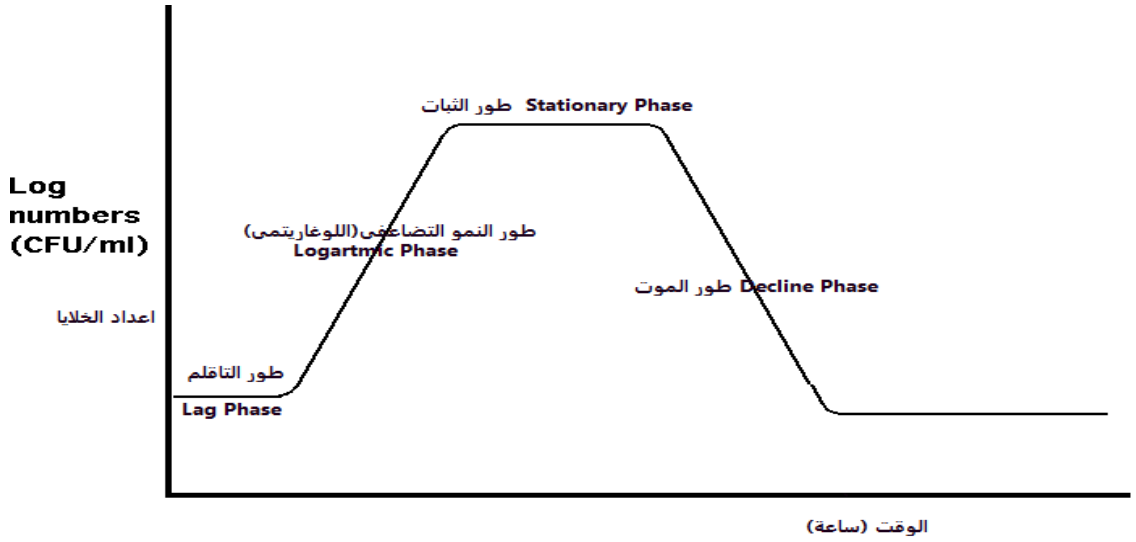
(3) طور الثبات **Stationary phase**

(4) طور الموت **Decline phase**

عند توفر الظروف المثالية للنمو التي تتمثل بالعناصر المغذية والظروف البيئية الملائمة للنمو فان الكائن المجهري يمر اولا في مرحلة التاقلم على الوسط الغذائي الجديد المنمى عليه وفي هذه الفترة يبدأ الكائن المجهري في انتاج الانزيمات والعوامل الاخرى اللازمة لاستخدام المواد الغذائية في الوسط، وتسمى المدة التي يستغرها الكائن **بطور التطبع او التاقلم** Lag Phase ان هذه الفترة تطول او تقصر اعتمادا الى نوعية الكائن المجهري الصناعي وكذلك درجة تعقيد او بساطة الوسط الغذائي. وعندما تكتمل حالة الكائن المجهري لتاقلمه على الوسط فانه يبدا بالانقسام والنمو حيث يتضاعف فيها الكائن بصورة مضطردة ومتوالية ويسمى هذا الطور **بالطور اللوغاريتمي** Logarithmic Phase ويبقى الكائن في هذا الطور مادامت الظروف البيئية مناسبة والمكونات من العناصر الغذائية متوفرة ويتجهه الكائن المجهري في هذا الطور الى انتاج **مواد الايض الاولي** Primary metabolites وهي جميع المواد الايضية التي يحتاجها الكائن المجهري خلال مرحلة نموه وانقساماته التي غالبا ماتتضمن الفيتامينات والاحماض الامينية وغيرها.



شكل ١: آلية انقسام الخلايا في الأحياء المجهرية



شكل ٢. منحنى النمو للاحياء المجهرية

ان استمرار حالة النمو والتضاعف الاسي للكائنات المجهرية الصناعية يكون مقترنا مع توفر المواد المغذية لها، وفي حالة حصول نقص في احد المغذيات او عدم توفر احد او اكثر من الظروف البيئية كدرجة الحرارة او توفر الاوكسجين او مستوى الـ pH فان حالة نمو الاحياء المجهرية سوف يحصل لها تثبيط جزئي وتكون عنده الخلايا الحية متساوية مع الخلايا الميتة ويسمى هذا الطور الذي تمر به الاحياء المجهرية **بطور نمو الثبات Stationary Phase** تتجهه الكائنات في هذا الطور الى انتاج **منتجات الايض الثانوي Secondary Metabolites** التي تنتجها اما لقتل الانواع من الاحياء من نفس النوع او الانواع الاخرى الموجودة مع الكائن المجهري او تنتجها لاجل ان تستغلها في التغذية عليها في المراحل اللاحقة عند النفاذ التام للمغذيات.

ان استمرار حالة قلة او نفاذ المغذيات سيؤدي الى وصول الكائنات الى انحسار وتثبيط الكثير من الانزيمات وطرق الايض التي تحتاجها الخلية للبقاء على قيد الحياة وبذلك تصل الخلية الى **طور الهلاك او الموت** لها **. Death Phase**

فضلا عما ذكر فان الاحياء الممجهرية تتفاوت في قابليتها على النمو والتكاثر في الاوساط المختلفة اعتمادا الى مستوى رطوبتها حيث ان الاحياء الاكثر مقاومة وتحملا للمستويات المنخفضة من الرطوبة هي انواع الاعفان التي تتحمل مستوى من النشاط المائي يكون منخفضا عند 0.80 وفي حالات معينة تكون اقل من ذلك كما في حالة نوع العفن *Aspergillus versicolor* والنوع *A. terrus* اللذان يصل مستوى النشاط المائي الذي يتحملانه الى 0.65 ويعد ذلك تحملا لمستويات جفاف عالية في نموها. ياتي بعدها في تحمل مستويات الجفاف انواع الخمائر التي تصل في تحملها الى مستويات عند 0.87 فاعلى اما اقل انواع الاحياء المجهرية تحملا للجفاف فهي انواع البكتريا التي يتراوح تحملها للنشاط المائي بين 0.90 الى 0.99 .

مما ذكر فانه يمكن تصنيف حالات قدرة الاحياء المجهرية الصناعية في النمو على الاوساط الغذائية الى ان انواع الاعفان تتمكن من استغلال انواع الاوساط الجافة وياتي بعدها انواع الخمائر ثم اقلها تحملا هي انواع البكتريا التي تحتاج في نموها الى الاوساط السائلة.

اعتمادا الى ماتقدم من حالات النمو للاحياء المجهرية الصناعية (التخمير) فان طرائق التنمية يمكن ان

تقسم اعتماد على المواد الاساس المستعملة فيها الى الاتي:

1- تخمرات الحالة السائلة Liquid State Fermentation

2- تخمرات الحالة الصلبة Solid State Fermentation

تخمرات الحالة السائلة Liquid State Fermentation:

تتضمن تخمرات الحالة السائلة استعمال الاوساط السائلة في تنمية الاحياء المجهرية الصناعية ويمكن فيها استعمال جميع انواع الاحياء المجهرية من البكتريا او الخمائر او الاعفان ويعتمد ذلك على نوع الكائن المجهري ونوع الوسط المستعمل للتنمية...ويمكن ان تكون طريقة التمية في حالات متعددة لعل اهمها هي:

اولا. مزارع الوجبات (النظام المغلق):

تتميز مزارع الوجبات في احتوائها على كمية محدودة من العناصر الغذائية او الوسط الزرعي اللازم لتنمية الكائن الصناعي، الذي يضاف بشكل لقاح في بداية عملية التخمر. في هذه الطريقة من التنمية تكون صفة

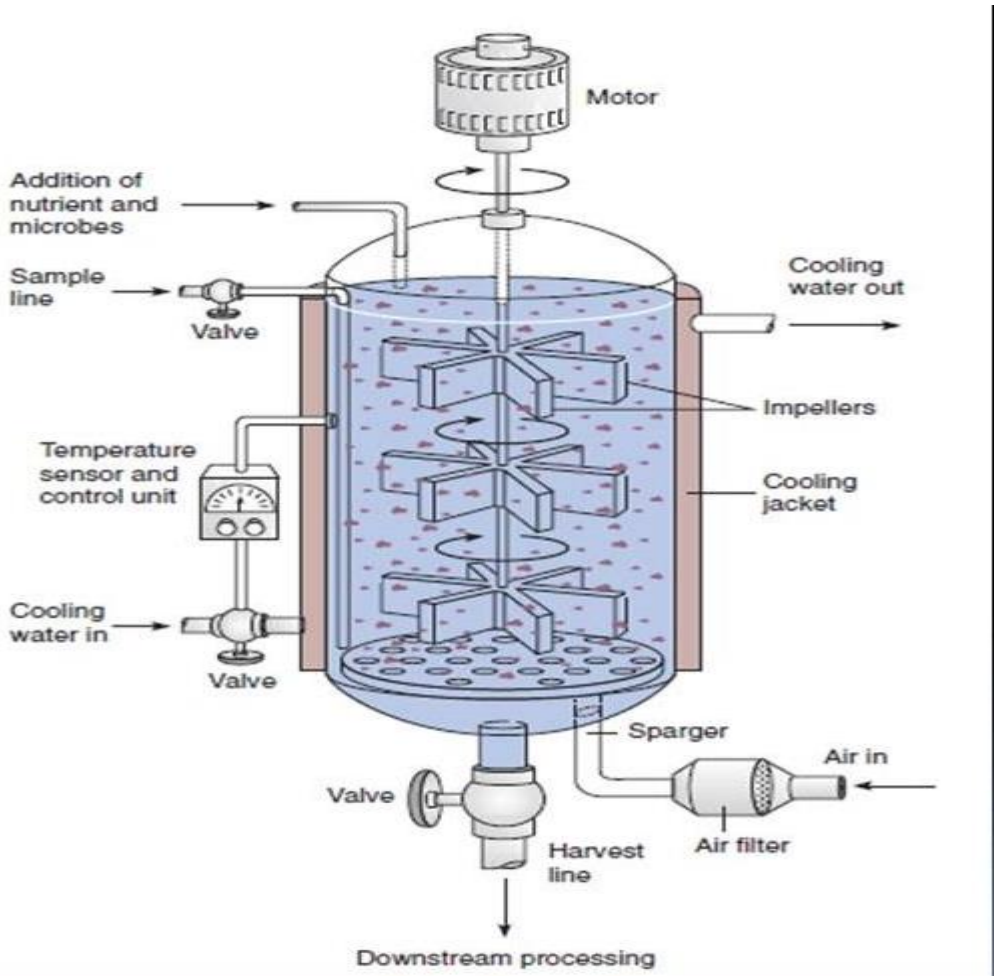
عدم الثبات في ظروف الانتاج من الصفات المميزة لها حيث ينخفض تركيز المواد المغذية مع استمرار النمو للكائن والذي يعد محددا للنمو وكذلك قد يتغير الاس الهيدروجيني أثناء التخمر فضلا عن اتجاه الكائن المجهري الى انتاج المواد الايضية والنواتج العرضية التي تزداد كمياتها اعتمادا الى نوعية الوسط الغذائي وظروف التنمية للكائن. كما يمكن توفير التهوية اللازمة للكائن الصناعي في حالة الحاجة الى ذلك من خلال التحريك المستمر للوسط الغذائي.

يمكن استعمال مزارع الوجبات في انتاج منتجات الايض الاولية او الثانوية والتي تكون من خلال الحصول على الكتلة الحيوية Biomass التي تحتوي على المواد الايضية المطلوبة.اذ ان استمرار النمو للاحياء المجهرية الصناعية من خلال توفير الظروف الملائمة لاطالة طور الثبات وتقصير الطور اللوغاريتمي فانها سوف تتجه الى اكمال مراحل النمو في دورة حياتها وبالتالي ستكون منتجات الايض الثانوي كالمضادات الحيوية ومنظمات النمو والسموم هي الاكثر انتاجا لان الكائنات تكون قد وصلت الى طور النمو الثابت من مراحل نموها. وعندما يراد ان تكون المنتجات منها هي منتجات الايض الاولي فانه يصار الى اطالة طور النمو اللوغاريتمي والذي يصاحبه افراز منتجات الايض الاولي وهي الضرورية لنمو وادامة الخلية كالفيتامينات والانزيمات وغيرها.

ثانيا.المزارع المستمرة (النظام المفتوح) Continuous culture

تتميز طريقة المزارع المستمرة في اختلافها عن مزارع الوجبات في ان مكونات النظام من الخلايا والوسط المغذي تدخل الى المخمر ويسحب منه كمية مساوية كناتج نهائي باستمرار. في هذه الطريقة تكون التفاعلات الايضية في حالة استقرار والتهوية مستمرة وتزال النواتج العرضية بين الحين والأخر بحيث يكون الحجم المتفاعل ثابتا. كما ان ظروف التخمر من الاس الهيدروجيني وتركيز العناصر الغذائية ومستوى الاوكسجين او المكونات الاخرى تكون ثابتة خلال فترة التخمر ونمو الكائن المجهري المستعمل في التنمية، اضافة الى ان هناك امكانية للسيطرة على كل واحد من العوامل المسيطرة على التفاعل على حده وبذلك يمكن من خلال هذه الطريقة دراسة تاثير كل عامل على النمو والانتاج بشكل منفرد.

بذلك يكون حجم الوسط المستعمل في التنمية ثابتا مع طول مدة التخمير حيث يكون الناتج النهائي المسحوب متساويا مع الوسط الغذائي المضاف الى المخمر (الشكل 3).



شكل 3. اجزاء المخمر الحيوي

اما حالة المزج للوسط فانها تتم من خلال وجود المقلب او التحريك للوسط. وللوصول الى افضل انتاج فانه يصار دائما الى السيطرة على المستوى المثالي من ظروف الانتاج ويتم ذلك من خلال طرائق او انظمة متعددة لعل اهمها هي:

1. **المنظم الكيميائي Chemostat** : يكون عامل النمو المحدد للسيطرة على نظام المزارع المستمرة في هذه الحالة هو احدى مكونات الوسط الغذائي الذي يتحكم بعمليات النمو ويكون سحب الناتج النهائي بكمية مساوية للحاجة الى الوسط من خلال عامل النمو المحدد.

2. **منظم العكارة Turbidostat** : يتم التنظيم بالاعتماد على قياس تركيز الخلايا في الوسط الزرعي وذلك في السيطرة على جريان الوسط الغذائي الى داخل جهاز التخمر بحيث تبقى عكارة المزرعة في حدود معينة يكون عندها الناتج في افضله ، ويمكن الوصول الى هذه الحالة من خلال ربط الجهاز مع خلية ضوئية يتم منها قياس الكتلة الحيوية اذ كلما ازدادت أعطى الجهاز إشارة لادخال كمية اكبر من الوسط الزرعي المعقم وإزالة كمية مساوية من وسط التخمر وإذا انخفض تركيز الخلايا يغلق المجرى لمنع خروج الخلايا كي تتكاثر ويزداد تركيزها.

3. **المنظم الحيوي Biostate** : يتم قياس تركيز الكتلة الحيوية الناتجة من خلال قياس معدل دخول المواد المغذية وخروجها على أساس قياس بعض النواتج الايضية مثل انتاج ثاني اوكسيد الكاربون حيث يعتمد هذا النظام على اساس ان اقصى كمية من الكتلة الحيوية تتكون عندما تصل كمية CO_2 الى اقصاها وعند هذه النقطة فانه يتجهه الى سحب المنتوج واضافة وسط غذائي جديد.

وتعد طريقة المنظم الكيميائي في انه الافضل والاكثر شيوعا لانها تتميز في عدم حاجتها الى اجهزة سيطرة معقدة للمحافظة على حالة مستقرة من النمو والانتاج.

مميزات طريقة تخمرات المزارع المستمرة:

تتميز عمليات الانتاج الحيوي بالطريقة المستمرة بمزايا مهمة مقارنة مع طريقة مزارع الوجبات والتي تتضمن الاتي:

أ- كفاءة الانتاج العالية: يحصل ذلك كون الطريقة اعلاه تكون فيها عملية الانتاج مستمرة لفترة اطول وذلك لملائمة الوسط من ناحية التجانس والتركيبة وبذلك يكون الناتج اكثر كمية مقارنة مع الطرق الاخرى لاسيما مزارع الوجبات التي يكون فيها الوسط غير متجانسا خلال مراحل التنمية اذ يكون مخففا في البداية ويصبح لزجا وكثيفا في المراحل المتاخرة من الانتاج.

ب- الطريقة المستمرة لاتحتاج الى ايدي عاملة كثيرة لادارتها، على العكس من طريقة مزارع الوجبات التي تحتاج في كل مرحلة انتاج الى تنظيف وتعقيم حاويات الانتاج المتعددة المستعملة.

ت- نظرا لاحتواء المخمر في مزارع الطريقة المستمرة على ماخذ متعددة يتم من خلالها تحديد وقياس مكونات الوسط فان التنمية في هذه الطريقة تكون معرضة للتلوث اكثر مما في حالة التنمية في مزارع الوجبات حيث يقل فيها معدل التلوث كونها عبارة عن نظام مغلق لايتم تعرضه الى الملوثات.

ث- احتمالية حصول حالات انحلال السلالة (تغير صفات السلالة عن صفاتها الاصلية) في حالة الطريقة المستمرة وذلك لكون الكائن المجهري مستمرا في النمو في الطور اللوغاريتمي او اي مرحلة تتطلبها عملية الانتاج لمدة طويلة مما يجعله في حالة غير مستقرة. كما ان هذه الحالة يمكن ان ينتج عنها حصول حالات الطفرات الذاتية اكثر مما يحصل في الكائن المجهري في مزارع الوجبات كون ان الكائن يمر في جميع اطوار النمو خلال عملية التنمية والانتاج.

ج- يمكن استعمال طريقة المزارع المستمرة في الدراسات والابحاث لتحديد تاثير اي من العوامل المؤثرة في كمية او نوعية الانتاج، على العكس من طريقة مزارع الوجبات التي لايمكن اجراء ذلك من خلالها كون حاويات التخمير لاتتضمن وجود المتحسسات عن عملية الانتاج.

ثالثا. مزارع الوجبات المغذاة: Fed-Batch Cultures

هي وصف لطريقة بين الحالتين من طريقة المزارع المستمرة وطريقة الوجبات، والتي تعتمد على التغذية من الوسط الغذائي بصورة متتالية من دون ازالة اي كمية من المزرعة وبالتالي فان حجم المزرعة يزداد مع تقدم زمن التنمية.

تتميز هذه الطريقة في المحافظة على تركيز واطيء عند الحد المثالي من المغذيات للكائن المجهري الصناعي وان لذلك فوائد متعددة اهمها هو **ازالة التاثير الكابح او المثبط لمصادر الكاربون التغذوية** لاسيما سريعة

التمثيل كالكلوكوز والمحافظة من خلال ذلك على ظروف التهوية المثالية في المخمر، فضلا عن **منع التاثير السام لبعض مكونات الوسط الغذائي** وبالتالي التخلص من تاثراتها في تثبيط الكائن المجهري الصناعي.

تعد عملية انتاج البنسلين مثالا على استعمال مزارع الوجبات المغذاة في انتاج المنتجات الايضية الثانوية. اذ تقسم عملية التخمر في انتاج البنسلين الى مرحلتين **هما مرحلة الحاجة الى النمو السريع** والثانية هي **مرحلة النمو البطيء او مرحلة الانتاج.** حيث يستعان بالكلوكوز للسيطرة على ايض الكائن المجهري ففي المرحلة الاولى يضاف الكلوكوز بتركيز عالي باعتباره مصدرا سريع الاستهلاك من قبل الكائن المجهري الذي يؤدي الى تجمع الاحماض العضوية وبذلك سوف يحتاج الكائن المجهري الى الاوكسجين اكبر مما متوفر منه في المخمر، اذ ان الكمية القليلة من الكلوكوز تسبب في استعمال النتروجين العضوي كمصدر للكاربون مما ينتج عنه ارتفاع الحموضة وانخفاض في تكون الكتلة الحيوية. اما في المرحلة الثانية وهي مرحلة النمو البطيء حيث ان معدل التغذية يجب ان يحدد كل من معدل النمو واستهلاك O_2 لاجل التخليق العالي من البنسلين.

تخمرات الحالة الصلبة Solid State Fermentation

يعرف هذا النوع من التخمرات بانها التخمرات التي تجري في أوساط تحتوي على مواد صلبة في حالة غياب او شبه غياب للماء الحر وتعتبر اليابان والصين الموطن الأصلي لهذا النوع من التخمرات التي جرى توارثها منذ آلاف السنين، حيث كانت " **طريقة تخمر كوجي** " **Koje Fermentation** " . ان الاوساط الغذائية الاكثر استعمالا في تخمرات الحالة الصلبة هي الحبوب والبقوليات ونخالة الحنطة والمواد السليلوزية مثل الخشب والقش والتي تكون غير ذائبة او قليلة الذوبان في الماء ولكنها مواد رخيصة ومن السهل الحصول عليها وانها تحتوي على تركيز عال من العناصر الغذائية. يعد تاريخ استعمال تخمرات الحالة الصلبة قديم جدا حيث استعملت منذ مئات السنين في الشرق وكان إنتاج صاص الصويا والميزو والتمبي من أهم عمليات تخمر الحالة الصلبة القديمة والمستمرة الى وقتنا الحالي. كما تم تطوير طريقة الإنتاج من الأساليب البدائية إلى التقنية الصناعية الحديثة التي تتصف بالكفاءة العالية وثبات جودة المنتجات. اثبتت تخمرات الحالة الصلبة كفاءة عالية حيث انها اتصفت بملائمتها بصورة خاصة لإنتاج المواد المفرزة خارج الخلايا (Extracellular Products) اذ انها تتميز بالميزات الإيجابية الأساسية التالية:

1- اختزال حجم وسط الإنتاج بنسبة 30 -50% في حالة تخمرات الحالة الصلبة مقارنة بالأوساط السائلة كما يكون هناك اختزال في كمية المياه المطلوب استعمالها في وسط الإنتاج .

2- انخفاض تكاليف التشغيل بسبب عدم الحاجة إلى التحريك والتقليب المستمرين ولعدم الحاجة إلى تبريد المخمرات خلال فترة الإنتاج.

3- الحصول على المنتجات الحيوية المرغوبة بتراكيز عالية كون انتاجها يكون بشكل افراز خارج الخلية، كما تكون سهولة في عمليات استرجاع وتنقية المنتجات الحيوية وانتفاء الحاجة إلى عمليات استخلاص وترشيح ومعالجة أوساط الإنتاج التي تعد ضرورية لتخمرات الأوساط السائلة، والاقتصار على عملية الجرش أو الطحن لوسط الإنتاج.

4- احتواء مخلفات التخمر الصلبة على مكونات وعناصر تغذوية مهمة تكسبها أهمية بالغة في الأعلاف الحيوانية.

5- قلة احتمالات تلوث وسط الإنتاج بالأحياء المجهرية الضارة بسبب ارتفاع درجة حرارة التخمر.

تتصف المواد المستخدمة في أوساط الإنتاج عموما بانخفاض تراكيز السكريات البسيطة فيها وارتفاع نسب الكربوهيدرات المعقَّدة كالنشا والسيليلوز ونسب متفاوتة من البروتينات ويتم ترطيب وسط الإنتاج إما بالماء، أو الماء المحتوي على بعض المواد الضرورية للنمو والإنتاج، أو مستخلص مخفف من المولاس أو مستخلص التمر.

إن أهمية هذه المنتجات تكمن في كون ان الدول العربية مستوردة لها باعتبارها موادا مساعدة تدخل في قطاعات مهمة من الصناعات الغذائية القائمة، على الرغم من توفر المواد الخام المطلوبة لإنتاجها محليًا وإقليميًا. وفي الحقيقة أن الصناعات القائمة على التقانات الحيوية تكاد تكون معدومة في تلك الدول باستثناء مصانع خميرة الخبز والإيثانول للمشروبات والاستخدامات الطبية والخل التي لا تكفي طاقاتها لسد الفجوة بين الإنتاج والاستهلاك.

توجد انواع متعددة من تخمرات الحالة الصلبة ويعتمد ذلك التنوع الى نوعية الاحياء المجهرية المستعملة والتي اما ان تكون بشكل مجاميع طبيعية (فلورا) او مزارع نقية او مزارع مختلطة.

1. **التخمرات بوساطة الفلورا الطبيعية:** يتضمن هذا النوع من التخمرات استعمال الفلورا الطبيعية في عمليات انتاج السايلج وفي عمليات تحلل المواد العضوية..اذ ان في انتاج السايلج تستعمل المخلفات الزراعية كوسط للتخمير الذي يتم لاهوائيا، حيث يكون التخمر عند حرارة 30 ° م لمدة 10 الى 15 يوما، تكون انواع بكتريا حامض اللاكتيك هي السائدة كونها تتحمل الضغط الازموزي العالي وان المنتج الاكثر من عملية التخمر هو حامض اللاكتيك الذي يمنع النمو للبكتريا المرضية وكذلك تمنع نمو الاعفان التي تحتاج الى الاوكسجين لادامة نموها وبذلك يكون ناتج التخمر امين الاستعمال والاستهلاك كونه لايتضمن السموم في محتواه. كذلك تستعمل تخمرات الحالة الصلبة في انتاج وسط التنمية للعرهون من المخلفات الزراعية البسيطة.

2. **التخمرات باستعمال المزارع النقية:** وهي حالة التخمير من الحالة الصلبة باستعمال المزارع النقية، وتعد طريقة التخمير كوجي Koji مثالا على هذا النوع من التخمرات، حيث يستعمل في هذه الطريقة تخمير الحبوب وفول الصويا لانتاج الاغذية الشرقية باستعمال نوع العفن *Aspergillus oryzae* وتعد هذه الطريقة هي الاساس في طرائق التخمرات الاخرى كانتاج الانزيمات وانتاج الاحماض العضوية وكذلك انتاج الايثانول.

3. **التخمرات باستعمال المزارع المختلطة:** تستعمل المزارع المختلطة في تخمرات الحالة الصلبة وذلك للوصول الى انتاج المنتج النهائي بكمية اكبر مما في حالة استعمال المزارع المفردة. حيث ان استعمال القش كوسط لانتاج الكتلة الحيوية من قبل مزارع مختلطة من العفن *Chaetomium cellulolyticum* وخميرة *Candida lipolytica* او العفن *Trichoderma lignorum* مع نفس الخميرة يكون اكفا مما في حالة استعمال المزارع النقية من العفن. ان السبب الرئيس في ذلك يمكن ان يعود الى استعمال الخمائر للسكريات الزائدة التي تتحرر من فعل انزيم السيلوليز الذي ينتجه العفن مسببة في منع حصول الكبح الهدمي لهذه السكريات ضد العفن التي تسبب في حالة حصولها الى اتجاه العفن لتكوين السبورات.

طرق التنمية المستخدمة في التقنية الحيوية

قبل البدء بالكلام عن طرق التنمية من المهم أن نتعرف أولاً على تصنيف للمركبات التي تنتجها الخلايا. بصورة عامة هناك نوعان من النواتج الأيضية للخلايا هما:

1- نواتج الأيض الأولية (Primary metabolites): وهي المركبات التي تنتجها الخلية وتستفيد منها في النمو وفي بناء الخلية مثل السكريات والدهون والبروتينات والأحماض النووية والأحماض الأمينية والأحماض العضوية والفيتامينات والكثير من المركبات الأخرى. وهذه المركبات تنتج عادة في الطور اللوغاريتمي للنمو أي عندما تكون الخلايا في نشاط وعندما تكون الظروف المزرعية جيدة.

2- نواتج الأيض الثانوية (Secondary metabolites): وهي المركبات التي تنتجها الخلية لمقاومة الظروف غير الطبيعية وللقضاء على الأحياء المجهرية المنافسة في البيئة الطبيعية التي تعيش فيها الخلايا. وهذه المركبات تنتج عادة في طوري الثبات والموت إذ تكون المواد الغذائية قليلة والمنافسة عليها كبيرة وكذلك عند تراكم النواتج الأيضية للخلايا والتي تؤثر سلباً في النمو. ومن أمثلة هذه المركبات هي المضادات الحيوية والسموم وبعض الصبغات.

يطلق على الوعاء الذي يستخدم في عملية التخمر وإنتاج المواد المرغوبة اسم المخمر (Fermentor) أو المفاعل الحيوي (Bioreactor). تتم زراعة أو تنمية الأحياء المجهرية في التقنية الحيوية بطريقتين هما

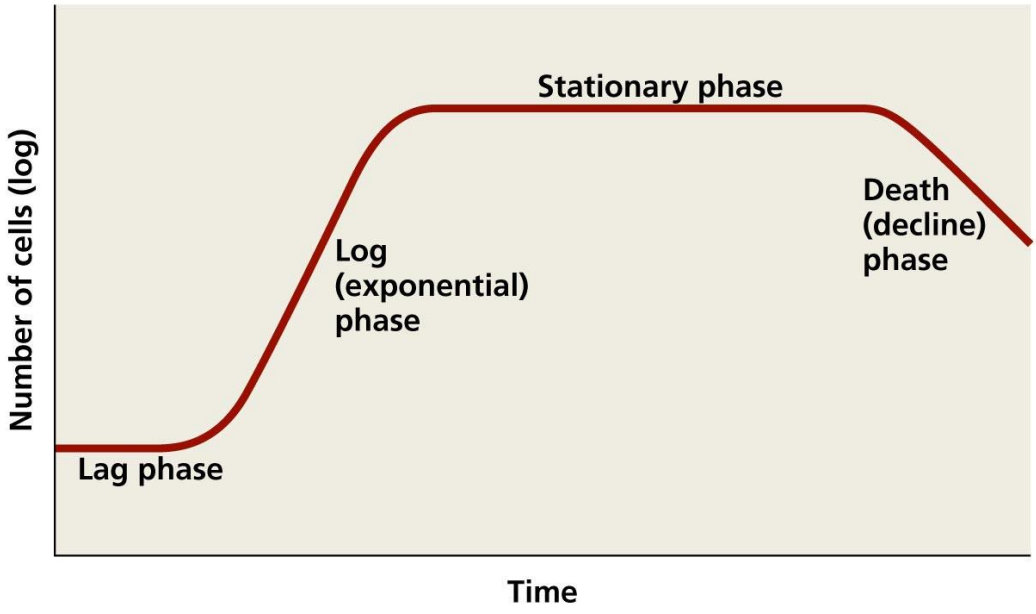
أ- **المزارع السائلة Liquid cultures** : وتسمى تخمرات الحالة السائلة، وفيها تكون جميع مكونات الوسط الغذائي بحالة ذائبة في وسط مائي أي لا توجد في الوسط أية مادة صلبة غير ذائبة.

ب- المزارع الصلبة Solid cultures: وتسمى تخمرات الحالة الصلبة. في هذه المزارع تستخدم أوساط غذائية صلبة وتكون طبيعية عادة ورخيصة الثمن مثل جريش أو نخالة الحنطة أو جريش فول الصويا أو جريش الذرة أو المخلفات النباتية السليلوزية أو مخلفات حقول الحيوانات ويتم ترطيب هذه المواد بشرط عدم ظهور ماء حر في الوسط. تكون نسبة الرطوبة والفعالية المائية (Water activity, a_w) في المزارع الصلبة منخفضة عادة مقارنة بالمزارع السائلة.

المزارع السائلة: وفيها تنمى خلايا الأحياء المجهرية في وسط غذائي سائل وتكون جميع المكونات الغذائية ذائبة في وسط مائي، وتكون الفعالية المائية مرتفعة عادة في هذه المزارع

والتي تكون مناسبة لنمو جميع الاحياء المجهرية والتي تقوم بتحويل مادة التفاعل (الركيزة او المادة الخاضعة) إلى نواتج تخمر مرغوبة. تقسم المزارع السائلة إلى ثلاثة أنواع هي:

1- **مزارع الوجبات (Batch cultures)**: تعد هذه المزارع نظاماً مغلقاً إذ يضاف اللقاح (البادئ) إلى الوسط الغذائي وتوفر الظروف المثالية للنمو مثل الحرارة والتهوية ودالة الحموضة (pH). يكون معدل النمو غير ثابت في هذ النظام بسبب عدم ثبات ظروف التغذية. إذ تظهر مراحل نمو مختلفة تعكس ظروف النمو تتغير مع مرور الوقت (الشكل).



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Lag phase = طور التأقلم

Log phase = الطور اللوغاريتمي

Stationary phase = طور الثبات

Death (Declined) phase = طور الموت

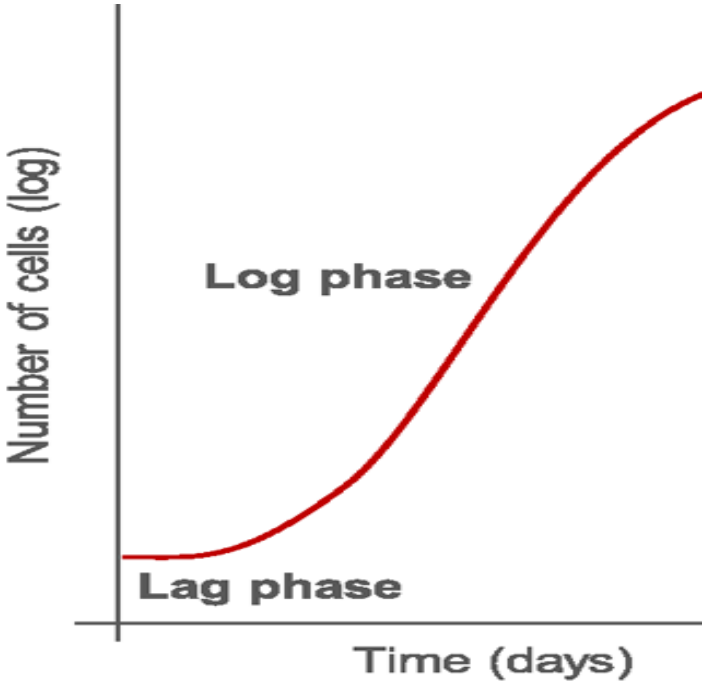
بعد إضافة اللقاح إلى الوسط الغذائي تمر الخلايا بمرحلة التأقلم على الظروف الجديدة في الوسط ولهذا لا يحصل فيها نمو أو تكاثر بالرغم من كون الظروف المزرعية جيدة ومناسبة للنمو. تسمى هذه المرحلة طور التأقلم (Lag phase). بعد ذلك تبدأ الخلايا بالنمو والتكاثر وبسرعة بسبب كون المواد الغذائية متوفرة والظروف الأخرى مناسبة، وتسمى هذه المرحلة الطور اللوغاريتمي (Log phase) لأن انقسام الخلايا يكون بسرعة وبشكل لوغاريتمي. بعد ذلك، ونتيجة النمو، يتم

استهلاك جزء كبير من المواد الغذائية وتراكم نواتج الفعاليات الأيضية للخلايا والتي تطرحها إلى الوسط والتي قد تكون سامة ومثبطة للنمو بالإضافة إلى تغير بعض الظروف المزرعية مثل الدالة الحامضية، ونتيجة لكل هذه العوامل يبدأ معدل نمو الخلايا وتكاثرها بالتناقص كما يزداد معدل موت الكثير من الخلايا وتبدأ المزرعة بالدخول في طور الثبات (Stationary phase) والذي يمكن تعريفه بأنه الطور الذي يتساوى فيه عدد الخلايا التي تتولد في وحدة الزمن مع عدد الخلايا التي تموت في نفس الفترة، أي أن عدد الخلايا الحية يبقى ثابتاً خلال هذا الطور. تستمر الظروف بعد ذلك بالاتجاه نحو الأسوأ من حيث نفاد المواد الغذائية وتراكم النواتج الأيضية السامة ويصبح معدل نمو الخلايا وتكاثرها أقل من معدل موت الخلايا أي يصبح عدد الخلايا التي تتولد في فترة زمنية معينة أقل من تلك التي تموت في نفس الفترة مما يؤدي إلى تناقص مستمر في عدد الخلايا في المزرعة ويسمى هذا الطور بالطور الهلاك أو الموت (Death phase). وتعد هذه الأطوار من الصفات المميزة لمزارع الوجبات والتي كما ذكرنا سابقاً بأنها نظام مغلق لا تتم فيه أية إضافة للمواد الغذائية أو سحب للنواتج بعد بدء التخمر. وبعد نهاية التخمر يتم فصل المنتوج المرغوب من المزرعة وتنظيف خزان التخمر والبدء بعملية تخمر جديدة ولهذا يطلق عليها مزارع الوجبات. تتميز هذه المزارع ببساطتها وإمكانية وانخفاض تكاليف إنشائها ولكنها تحتاج إلى متابعة وأيدي عاملة أكثر من التخمرات المستمرة. كما تمتاز بانخفاض احتمالية التلوث فيها.

تفضل مزارع الوجبات في إنتاج نواتج الأيض الثانوية لوجود طوري الثبات والموت فيها. كما يمكن استخدامها في إنتاج نواتج الأيض الأولية وذلك بإنهاء التخمر في نهاية الطور اللوغاريتمي وقبل دخول طور الثبات.

2- **المزارع المستمرة (Continuous cultures):** في هذه المزارع تستمر إضافة المواد الغذائية بعد إضافة اللقاح وبدء التخمر مع تقليب ومزج مكونات المزرعة ويصاحبها سحب مستمر لمكونات المزرعة وبنفس سرعة إضافة الوسط الغذائي بحيث يبقى حجم المزرعة أو الوسط في وعاء التخمر ثابتاً كما تبقى ظروف التخمر ثابتة ومستقرة ومثالية للنمو والتكاثر ولذلك تبقى الخلايا في انقسام سريع وبصورة لوغاريتمية أي تبقى الخلايا في الطور اللوغاريتمي وتبقى المزرعة في حالة إنتاج مستمرة طالما كان هناك ضخ مستمر بالمواد الغذائية مع سحب النواتج وبشرط تلافي حدوث أي تلوث للمزرعة (الشكل). تتميز هذه المزارع بإمكانية الإنتاج بصورة اوتوماتيكية وتكون الحاجة إلى الأيدي العاملة في عمليات التهيئة في بداية التخمر فقط. ولكنها

تتميز بارتفاع تكاليف التصميم والإنشاء كما أنها تكون أكثر عرضة للتلوث من مزارع الوجبات بسبب الاستمرار في إضافة المواد الغذائية وسحب نواتج التخمر. تستخدم هذه التخمرات في إنتاج نواتج الأيض الأولية بسبب طول الطور اللوغاريتمي فيها وهي غير مناسبة لإنتاج نواتج الأيض الثانوية إلا بعد إجراء بعض التعديلات فيها والتي تحفز الخلايا على الدخول في طور الثبات.

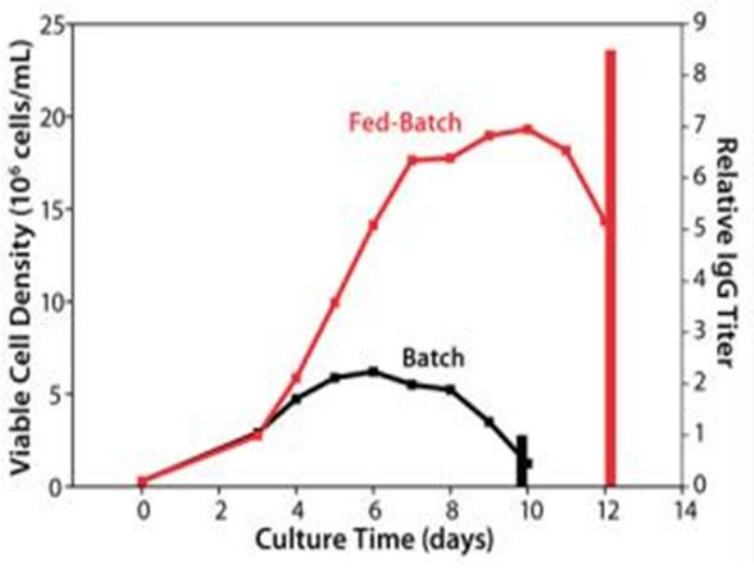


3- **مزارع الوجبات المغذاة (Fed-batch cultures):** في هذا النوع من المزارع وبعد إضافة اللقاح إلى وسط الإنتاج في المخمر تستمر إضافة بعض مكونات الوسط الغذائي ولكن بدون سحب للمنتوج وبذلك يزداد حجم المزرعة في وعاء التخمر باستمرار وقبل أن يمتلئ وعاء التخمر يتم إيقاف العملية ويتم فصل المنتوج المرغوب كما في طريقة الوجبات. ويعد هذا النوع من المزارع حالة وسطية بين مزارع الوجبات والمزارع المستمرة (الشكل). يتم اللجوء إلى هذه الطريقة في التخمرات لميزتين هما

أ- التخلص من التأثير الكبحي (Repression) لمصادر الكاربون سريعة التمثيل، مثل السكريات البسيطة، وللمحافظة على الظروف الهوائية في جهاز التخمر: لتوضيح هذا الموضوع نأخذ عملية إنتاج خميرة الخبز كمثال. يستخدم المولاس عادة كمصدر كاربوني لإنتاج خلايا الخميرة في مصنع الخميرة في الموصل، ويمكن استعمال عصير التمر أو أية

مادة رخيصة وغنية بالسكريات لهذا الغرض. تكون السكريات في المولاس سريعة الاستهلاك والتمثيل من قبل خلايا الخميرة لغرض النمو والتكاثر مع ملاحظة أن المولاس المخفف يضاف دفعة واحدة في بداية التخمر في تخمرات الوجبات كما ذكرنا سابقاً. وتحتاج هذه العملية إلى كمية كبيرة من الأوكسجين ويحصل استهلاك السكر الموجود في المولاس بسرعة تفوق قدرة المخمر على تجهيز الأوكسجين من الهواء الجوي وهذا يجعل الظروف في الخلايا لا هوائية مما يجعل الخلايا تتجه إلى إنتاج الكحول بدل النمو والانقسام لكون التخمر الكحولي عملية لا هوائية ولا تحتاج إلى الأوكسجين. وتسمى هذه الظاهرة بالتأثير الكبحي للسكر. وللتخلص من هذه الظاهرة يتم اللجوء إلى إضافة المولاس المخفف بشكل دفعات صغيرة تستمر إلى نهاية عملية التخمر بحيث تتماشى مع قدرة المخمر على توفير الهواء وبقاء الظروف داخل الخلايا هوائية مما يمكن الخلايا من النمو والتكاثر ويمنعها من الاتجاه إلى إنتاج الكحول. وهناك أمثلة أخرى كثيرة حول التخلص من التأثير الكبحي للسكريات في تخمرات أخرى.

ب- منع التأثير السام لبعض مكونات الوسط الغذائي: أحياناً تكون إحدى مكونات الوسط الغذائي سامة للكائن المجهري المستخدم في عملية التخمر عند إضافتها بتركيز عالي ومثال ذلك مادة خلات فينايل الصوديوم (Sodium phenyl acetate) في عملية إنتاج البنسيلين. يعد هذا المركب مادة تمهيدية (Precursor) لتكوين جزيئة البنسيلين وهي سامة للعفن *Penicillium chrysogenum* المستخدم في إنتاج البنسيلين لهذا تضاف هذه المادة إلى وسط الإنتاج بتركيز منخفض تحت الحد السام للعفن وبشكل دفعات صغيرة متتالية أو بالتغذية المستمرة.



التحسين الوراثي للأحياء المجهرية الصناعية

تنتج الاحياء المجهرية الصناعية المعزولة من الطبيعة (السلالات البرية Wild types) كميات قليلة من المنتوج المرغوب، لذلك تبدأ عملية التحسين بقصد زيادة الإنتاج. وتتم عملية التحسين من خلال استخدام الظروف المزرعية المثالية واختيار الوسط الغذائي المناسب، ولكن زيادة الإنتاج نتيجة تنظيم هذه الظروف تكون محدودة لأن صفة إنتاج المنتوج المرغوب وكذلك جميع صفات الكائن الحي يسيطر عليها بالصفات الوراثية للكائن الحي، ولذلك يتم اللجوء إلى تحوير الصفات الوراثية له لكي يمكن زيادة إنتاجيته بصورة كبيرة وتتم بعد ذلك دراسة الظروف المزرعية المثالية للسلالات المحسنة الجديدة لكي تعطي أعلى كمية من الإنتاج. ومن أهم طرق تحوير الصفات الوراثية لأحياء المجهرية الصناعية هي الطفرات الوراثية وعمليات التهجين وتكنولوجيا إعادة توليف الـ DNA (الهندسة الوراثية).

1- الطفرات الوراثية Mutations

تعرف الطفرة بأنها تغيير في تعاقب النيوكليوتيدات (Neucleotides) في جزيئة الحامض النووي DNA مما يؤدي إلى تحوير المعلومات الوراثية ومن ثم تكوين بروتين (إنزيم) محور.

يمكن تقسيم الطفرات الوراثية حسب أسباب حدوثها إلى نوعين هما

أ- الطفرات التلقائية (Spontiuous mutations): وهي الطفرات التي تحصل بصورة تلقائية وبدون تدخل الإنسان فيها، وكما ذكرنا سابقا فإن الخلايا تكون معرضة لحدوث طفرات فيها عند كل انقسام، وتمتاز بعض السلالات بتعرضها لعدد كبير من الطفرات التلقائية، وهذه الصفة تكون غير مرغوبة كما ذكرنا سابقاً.

ب- الطفرات المستحثة (Induced mutations): وهذه الطفرات تحدث بفعل عامل مطفر (Mutagen) يتم استعماله بصورة مقصودة لغرض التحسين الوراثي للأحياء المجهرية الصناعية وزيادة إنتاجيتها. إن السلالات التي تتقبل التطفير المستحث تعد مرغوبة للاستعمال كأحياء مجهرية صناعية.

للتطفير الوراثي أهمية كبيرة في الأحياء المجهرية لكونه المصدر الأهم لمعظم التغيرات الوراثية التي تهدف للتحسين وزيادة الإنتاج، كما أن بعض الأحياء المجهرية الصناعية المهمة مثل بعض الأنواع التابعة للجنسين Aspergillus و Penicillium ليس لها دورة تكاثر جنسي

واضحة ولهذا لا يمكن تحسينها بطريقة التهجين الجنسي. وقد استعملت برامج التطفير الوراثي في التقنية الحيوية لكونها طريقة رئيسية للحصول على سلالات ذات إنتاجية عالية. وقد حققت عملية التطفير الوراثي زيادة في إنتاج المضادات الحيوية من أعفان Penicillium و Cephalosporium والبكتريا الخيطية Streptomyces وزيادة في إنتاج الإنزيمات والأحماض العضوية من أنواع الأعفان التابعة لجنس Aspergillus والأحماض الأمينية من بعض أنواع البكتريا، فضلاً عن زيادة إنتاجية الأحياء المجهرية الصناعية الأخرى. ولم تستطع تقنيات الهندسة الوراثية الحديثة لحد الآن أن تحل محل التطفير الوراثي في تحسين صفات الأحياء المجهرية الصناعية.

إن أكفأ طريقة للتحسين الوراثي هي استخدام الطفرات المستحثة التي يعقبها انتخاب السلالات المحسنة. والصعوبة الرئيسية في هذه التقنية هي حدوث الطفرات المرغوبة بتكرار واطئ، لهذا يجب انتخاب السلالة المتطفرة المرغوبة من بين عدد كبير من الخلايا بعد عملية التطفير.

العوامل المطفِرة (Mutagens):

تقسم العوامل المطفرة إلى عوامل فيزيائية مثل الأشعة وعوامل كيميائية تشمل بعض المركبات الكيميائية. تعتمد عملية اختيار العامل المطفر كثيراً على قدرته في إعطاء مدى واسع من السلالات المطفرة (Mutants) التي تدخل في مرحلة الانتخاب (وهي عزل السلالات التي حصل فيها تغير مرغوب نتيجة التطفير). إن التغير الذي يحصل في الخلايا في عملية التطفير ليس نتيجة التأثير أو الضرر المباشر الذي يحدثه العامل المطفر في جزيئة الـ DNA وإنما نتيجة لعمليات الإصلاح (Repair processes) التي تقوم بها الخلية لجزيئة الـ DNA وتحولها إلى تحويرات ثابتة في تعاقب القواعد النتروجينية في الجين. والعوامل المطفرة التي تعمل من خلال هذا المسار هي الأشعة فوق البنفسجية والأشعة المؤينة وتجويع الخلية من الثايمين (Thymine starvation) وبعض العوامل المطفرة الكيميائية مثل Mytomycin C و 5- bomouracil و Methyl methane sulphonate وغاز الخردل (Mustard gas) و Nitrofurans. إن استعمال الجرعة الصحيحة من العامل المطفر يمكن أن يزيد من أعداد

الخلايا المطفرة المرغوبة من المجموع الكلي للخلايا المتطفرة مما يزيد من فرص الحصول على سلالات مرغوبة.

يمكن تصنيف الطفرات إلى نوعين حسب مدة وشدة التعرض للعامل المطفر هما:

أ- الطفرات الكبرى (Major mutations): وهي الطفرات التي تنشأ نتيجة تعريض الخلايا لفترة طويلة أو جرعة عالية من العامل المطفر وهي تسبب تغيرات كبيرة في الصفات الكيموحيوية للخلية وكذلك قد تتغير بعض الصفات المورفولوجية، وتكون الصفات المكتسبة عادة قابلة للفقد ورجوع الخلية إلى حالتها الأصلية البرية (انحلال السلالة) لكون الخلية غير قادرة على تحمل أو التكيف للحالة الجديدة التي يسببها التعرض الشديد للعامل المطفر. كما قد تؤدي إلى موت نسبة كبيرة من الخلايا. تستخدم الطفرات الكبرى عادة في الدراسات الوراثية. ومن الأمثلة على استخدام الطفرات الكبرى هي إنتاج سلالات غير منتجة للصبغات من العفن *Penicillium chrysogenum* ذي الإنتاجية العالية من البنسيلين.

ب- الطفرات الصغرى (Minor mutations): هي الطفرات التي تنشأ من تعرض الخلايا إلى جرعات معتدلة من العامل المطفر، وهي تسبب تغير بسيط في صفة معينة ولا يحصل تغير في الصفات المورفولوجية للخلايا، ولا تميل السلالة المطفرة إلى الرجوع إلى الحالة الأصلية بعد التطفير ولهذا تكون مفضلة على الطفرات الكبرى بالرغم من كون التغير في الصفات المرغوبة يكون قليلاً. وتلعب الطفرات الصغرى دوراً كبيراً في تطوير السلالات وهي تسبب زيادة قليلة في كمية المنتوج الذي تنتجه الخلية، وتتراوح نسبة الزيادة في الإنتاج التي تسببها الطفرات الصغرى 10-15% مقارنة بالسلالة الأبوية. وللتغلب على هذه المشكلة يتم اللجوء إلى تكرار الطفرات الصغرى في الأجيال اللاحقة لغرض الحصول على زيادات متتالية في الإنتاج مع مراعاة عدم استخدام نفس العامل المطفر بصورة متعاقبة. وبهذه الطريقة يمكن الحصول على سلالات ذات إنتاجية عالية لمادة مرغوبة معينة. إن المثال الشائع على استخدام هذه الطفرات على نطاق تجاري هم برنامج تحسين سلالات العفن *Penicillium chrysogenum* الذي استغرق أكثر من 30 سنة للحصول على سلالات ذات إنتاجية عالية جداً من البنسيلين.

2- التهجين Hybridization:

هو انتقال المادة الوراثية بين خليتين مختلفتين وراثيا وينتج عن ذلك خلية هجينية وتكوين اتحادات وراثية جديدة. وهناك نوعين من التهجين هما:

1- التهجين الجنسي (Sexual hybridization) وفيه يتم الاتحاد بين نواتين حاويتين على عدد فردي من الكروموسومات لخليتين مختلفتين جنسياً لتكوين خلية واحدة بنواة ذات عدد زوجي من الكروموسومات يليها انقسامات متعاقبة لتكوين فرد جديد. ويحدث التهجين الجنسي عادة في الخلايا ذات النواة الحقيقية (Eucaryotic cells)، وقد استخدم التهجين الجنسي بين سلالات من خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* للحصول على سلالة تستعمل في الإنتاج السريع للخبز في المخابز الحديثة وكذلك في تحسين أنواع فطر المشروم (Mushroom).

2- التهجين شبه الجنسي (Parasexual hybridization) وهو يحدث في الخلايا بدائية النواة (Procaryotic cells) وبعض الخلايا حقيقية النواة (Eucaryotic cells) التي ليس لها قابلية على التكاثر الجنسي. ويتم هذا النوع من التهجين من خلال ثلاث آليات

أ- التحول (Transformation): هي إدخال قطع من الـ DNA مأخوذة من خلية مانحة إلى خلية مضيفة واندماجها مع مادتها الوراثية وتصبح الخلية الجديدة هجينة تمتلك الصفات التي تحملها قطعة الـ DNA التي استقبلتها. وقد استعملت هذه الطريقة في تحسين الخمائر والبكتريا الخيطية ولكنها محدودة النجاح مع الأعفان.

ب- الإنتقال (Transduction): هي نقل الـ DNA من خلية إلى خلية أخرى بوساطة ناقل فايروسي، وتتم العملية باندماج الـ DNA للخلية التي أصابها الفايروس بمادته الوراثية، وبعد موت وانحلال الخلية المصابة ينتقل الفايروس إلى خلية أخرى (مستقبلة أو مضيفة) ويندمج ال DNA المنقول بمادتها الوراثية وبعد تكاثرها تظهر الصفات الجديدة المنقولة لها. وقد استعملت آلية الانتقال في تحسين صفات بكتريا*Methylophilus methylotrophus* المستعملة في إنتاج بروتين أحاديات الخلية بتنميتها على الميثانول.

ج- الإقتران (Conjugation): هو انتقال المادة الوراثية من خلية إلى أخرى عن طريق تلامس الخليتين وتكوين جسر بينهما لمرور المادة الوراثية. وقد استعملت هذه الآلية في تحسين

إنتاج المضادات الحيوية من سلالات البكتريا الخيطية التابعة للجنسين Streptomyces و Norcardia واللذان ينتجان حوالي 60% من المضادات الحيوية المستخدمة حالياً.

د- الإندماج البروتوبلاستي (Protoplastic fusion): البروتوبلاست هو خلية كاملة منزوعة الجدار ومحاطة بالغشاء السايتوبلازمي فقط. إن الحاجز الطبيعي الذي يمنع اندماج خليتين غير متشابهتين هو جدار الخلية، فإذا أزيل هذا الجدار وتم الحصول على البروتوبلاست وحيث أن أغشية الخلايا متشابهة نسبياً في التركيب، لذا يمكن دمج البروتوبلاست من أجناس مختلفة لتكوين خلية هجينة (Hybrid cell) وبهذه الطريقة يسمح لجيناتها بالاتحاد، وتعد عملية نقل الجينات بعد الاندماج بين بروتوبلاست الاحياء المجهرية من الاتجاهات الحديثة في تحسين صفات الاحياء المجهرية الصناعية. يتم الحصول على البروتوبلاست بمعاملة الخلية الكاملة بالإنزيمات المحللة لجدار الخلية يليها إضافة المثبتات الكيميائية (Chemical stabilizers) وذلك لإعطاء دعم اوزموزي (Osmotic support) للبروتوبلاست مثل بعض الاملاح غير العضوية أو السكريات أو الكحولات السكرية (Sugar alcohols) التي تحافظ على البروتوبلاست الناتج من خطر الانتفاخ ثم الانفجار.

تستطيع نسبة عالية من بروتوبلاست الخلايا توليد جدار خلوي جديد بعد الاندماج البروتوبلاستي ثم استمرار الخلية الهجينة الجديدة في النمو الطبيعي والانقسام والتكاثر. ويمكن إجراء الاندماج البروتوبلاستي بين السلالات المتشابهة أو المختلفة وتنخفض نسبة نجاح العملية كلما ابتعدت صلة القرابة بين السلالات. ويمكن زيادة احتمالية أو نسبة الاندماج بحوالي ألف مرة بإضافة عامل اندماج (Fusogenic agent) مثل مادة الـ Polyethylene glycol (PEG) كما أن وجود أيونات الكالسيوم يعد ضرورياً لحدوث الاندماج بتكرار عالي. استعمل الاندماج البروتوبلاستي في البكتريا لأول مرة بين نوعين تابعين لجنس Bacillus وبعد ذلك استخدمت هذه التقنية نوعين من البكتريا الخيطية غير منتجين للمضادات الحيوية هما *Streptomyces griseus* و *Streptomyces tenjimariensis* واستخدمت السلالة الهجينة الناتجة في إنتاج المضاد الحيوي Indolyzomycin. أما في الفطريات فقد استعمل الاندماج البروتوبلاستي في تحسين سلالات العفن *Cephalosporium acremonium* للحصول على سلالات ذات معدل نمو سريع وذات إنتاج عالي من المضاد الحيوي Cephalosporin. كما استعمل بنجاح بين سلالات النوع الواحد مثل عفن *Aspergillus niger* و خمائر *Saccharomyces*

cerevisiae و *Kluyveromyces lactis*. أما الاندماج البروتوبلاستي بين خلايا متباعدة في صلة القربى فكان أقل نجاحاً. فقد جرت محاولات للاندماج بين خلايا تابعة للجنس Candida مع خلايا تابعة للجنس Saccharomyces. وقد جرت حديثاً محاولة ناجحة للاندماج البرتوبلاستي بين العفن المحلل للسليلوز *Trichoderma reesei* وخميرة *Saccharomyces cerevisiae*.

المسارات الأيضية في الأحياء المجهرية الصناعية

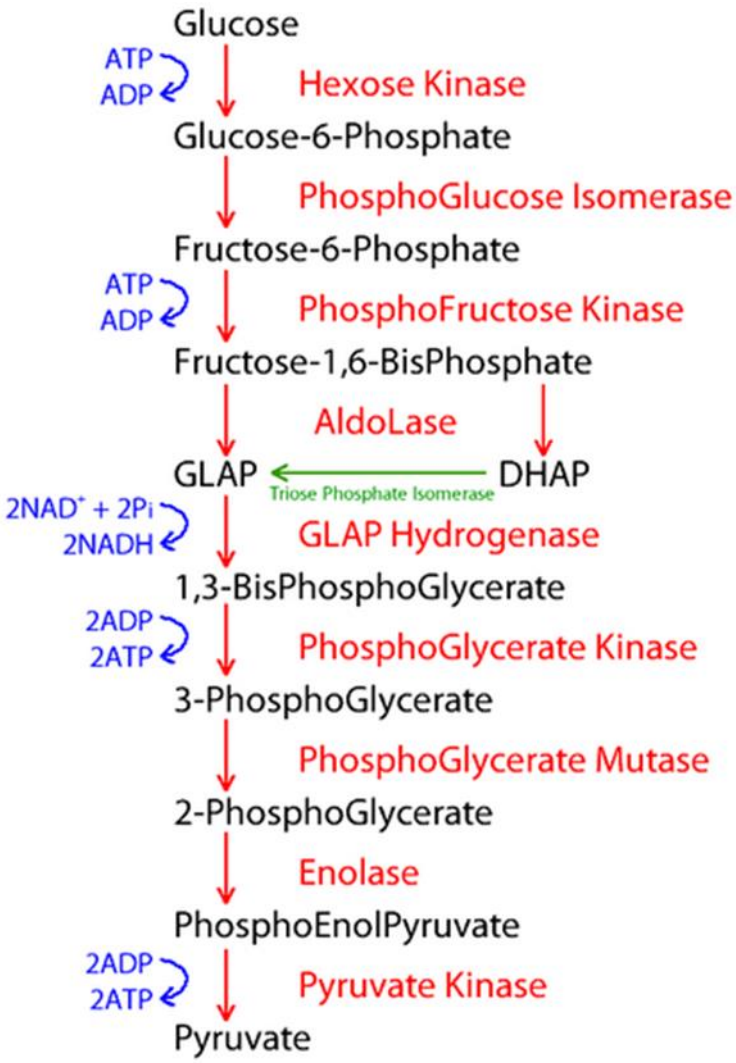
إن الهدف الأساسي من الفعاليات الحيوية لخلايا الأحياء المجهرية هو النمو والتكاثر وإنتاج خلية جديدة. ويتم ذلك من خلال عمليات الأيض والتفاعلات المختلفة والتي يتم من خلالها إنتاج مركبات ضرورية لبناء الخلية. ويشتمل الأيض الخلوي (Metabolism)على عمليتين أو فعاليتين مختلفتين ومتداخلتين وهما عملية البناء (Anabolism) وعملية الهدم (Catabolism).

تتضمن عملية البناء إنتاج مكونات الخلية والتي تشمل المكونات الرئيسية للخلية (البروتينات والكاربوهيدرات والدهون والأحماض النووية وغيرها) فضلاً عن مركباتها التمهيدية الوسطية (Intermediate precursors) مثل الأحماض الأمينية والأحماض الدهنية والسكريات البسيطة المختلفة والقواعد النتروجينية (البيورينات والبيريميدينات) وغيرها من المركبات. ومن المعلوم أن عمليات البناء تحتاج أو تستهلك طاقة بعكس عمليات الهدم التي تنتج الطاقة وتجهزها للخلايا. وتعد عملية تحلل الكاربوهيدرات إلى ثنائي أوكسيد الكاربون والماء من أهم الأمثلة لعمليات الهدم. وهناك نوعين من الكائنات الحية، يقوم الأول بعمليات الأيض هوائياً (Aerobically) وذلك باستخدام الأوكسجين الجوي بينما يقوم النوع الثاني بعملية الأيض تحت الظروف اللاهوائية (Anaerobically) أي بغياب الأوكسجين. وهناك خلايا يمكنها القيام بالأيض بوجود أو غياب الأوكسجين ويطلق عليها الكائنات الاختيارية (Facultative) مثل خميرة الخبز (*Saccharomyces cerevisiae*). إن كمية الطاقة المنتجة تحت الظروف الهوائية تكون أكبر من تلك المنتجة في الظروف اللاهوائية إذ تقوم الخميرة تحت الظروف الهوائية بإنتاج CO_2 والماء مع إنتاج عالي نسبياً من الخلايا، بينما تحت الظروف اللاهوائية تكون خلايا الخميرة ذات معدل نمو واطئ ويرافقه تحويل عالي من السكر إلى كحول الإيثانول و CO_2. إن الكثير من نواتج الأيض سواء كانت نواتج عمليات بنائية أو هدمية فضلاً عن المركبات الوسطية تعد من المواد المطلوبة والمرغوبة في مصانع التقنية الحيوية مثل الحوامض الأمينية والعضوية والنيوكليوتيدات والكاربوهيدرات والبروتينات والخلايا وغيرها من المواد.

مسارات الهدم Catabolic pathways: تستطيع الأحياء المجهرية استخدام أنواع كثيرة من مركبات الكاربون للنمو ولإنتاج الطاقة اللازمة للفعاليات المختلفة، ومن هذه المركبات

والتي تعد ذات أهمية اقتصادية كبيرة في التقنية الحيوية هي السكريات والكحولات (مثل الميثانول والإيثانول) والهايدروكاربونات (مثل الميثان). وسنتطرق إلى بعض المسارات الأيضية المهمة المؤدية إلى إنتاج المواد ذات الأهمية الاقتصادية.

الكلوكوز والكاربوهيدرات الأخرى: يعد مسار تحلل السكر (Glycolysis) والذي يطلق عليه أيضاً مسار إمبدن ــ مايرهوف (Embden-Meyerhof) أو مسار السكر السداسي ثنائي الفوسفات (Hexose diphosphate pathway) من أهم مسارات تمثيل السكر في معظم الخلايا الحية، إذ تتحول جزيئة الكلوكوز (6 ذرات كاربون) فيه إلى جزيئتين من حامض البايروفيك (Pyruvic acid) (3 ذرات كاربون) والذي يعد مصدراً للمركبات التمهيدية التي تستعمل في عمليات البناء في الخلية وكذلك يعد مادة خاضعة (Substrate) لعملية الأكسدة في الخلايا الهوائية والتي تؤدي إلى إنتاج الطاقة الكيميائية التي تحتاجها الخلية بهيئة ATP (Adinosine triphosphate) ونيوكليوتيدات الطاقة الأخرى. يبين المخطط الآتي مسار الكلايكوليسس

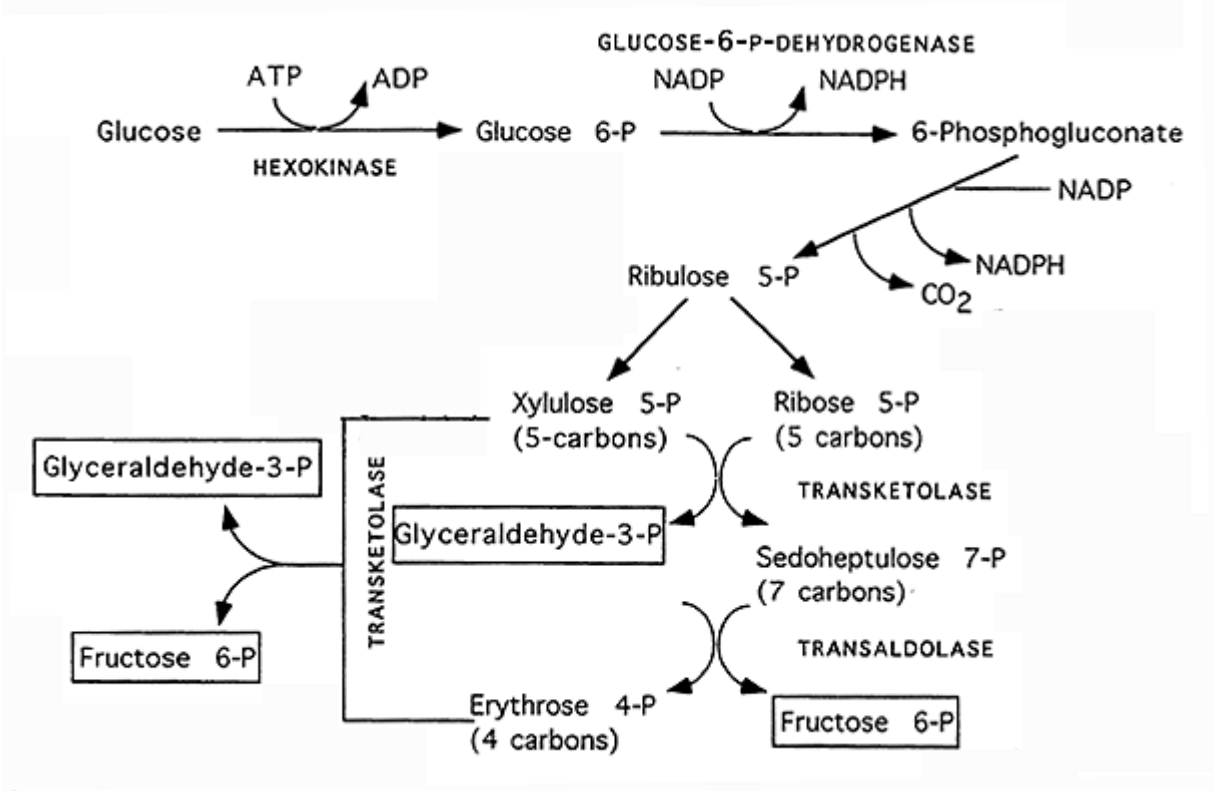


GLAP = Glyceraldehyde phosphate

DHAP = Dihydroxyacetone phosphate

أما مسار فوسفات السكر الخماسي (Pentose phosphate pathwhay) فهو عبارة عن أكسدة الكلوكوز إلى سكر خماسي الكاربون (Pentose) وثنائي أوكسيد الكاربون، وينتج في هذا المسار كذلك سكريات مفسفرة أخرى تحتوي على 3–7 ذرات كاربون من خلال سلسلة من التحولات المتداخلة العكسية. ويعد فوسفات السكر الرباعي مادة تمهيدية للاحماض المينية الأروماتية كما يستخدم فوسفات السكر الخماسي في تخليق الأحماض النووية لكونه مصدراً للسكريات الخماسية. ومن الملاحظ أن 66–80% من الكلوكوز يؤيض من خلال مسار الكلايكوليسس والباقي يؤيض عن طريق مسار فوسفات السكر الخماسي. وهناك مسارات أخرى لتمثيل الكلوكوز ولكن هاذين المسارين يعدان الأكثر شيوعاً.

يبين المخطط الآتي مسار فوسفات السكر الخماسي



دورة كريبس (Krebs): وتسمى دورة الحامض ثلاثي الكاربوكسيل (Tricarboxylic acid cycle).

يقود المساران السابقان ومسارات أخرى لتمثيل الكلوكوز إلى إنتاج مركبات خاصة ثنائية وثلاثية الكاربون وهي البايروفيت (Pyruvate) والخلات (Acetate). والخلات عبارة عن المرافق الإنزيمي Acetyl CoA وهو عبارة عن إستر مكبرت (Thioester). ويكون التمثيل اللاحق للبايروفيت والمرافق الإنزيمي الأستيلي عن طريق مسار أو دورة تؤدي وظيفتين رئيسيتين هما إنتاج مركبات وسطية تستخدم لاحقاً في التخليق الحيوي، وكذلك أكسدة المركبات مؤدية في النهاية إلى إنتاج CO_2 والماء. وتسمى هذه الدورة التي تقوم بأكسدة المرافق الإنزيمي الأسيتيلي والتي توجد في جميع الخلايا الهوائية بدورة كريبس أو دورة الحامض ثلاثي الكاربوكسيل أو دورة حامض الستريك (Citric acid cycle). وتحدث تفاعلات دورة كريبس وتفاعلات إنتاج الطاقة للكائنات حقيقية النواة في المايتوكوندريا بسبب

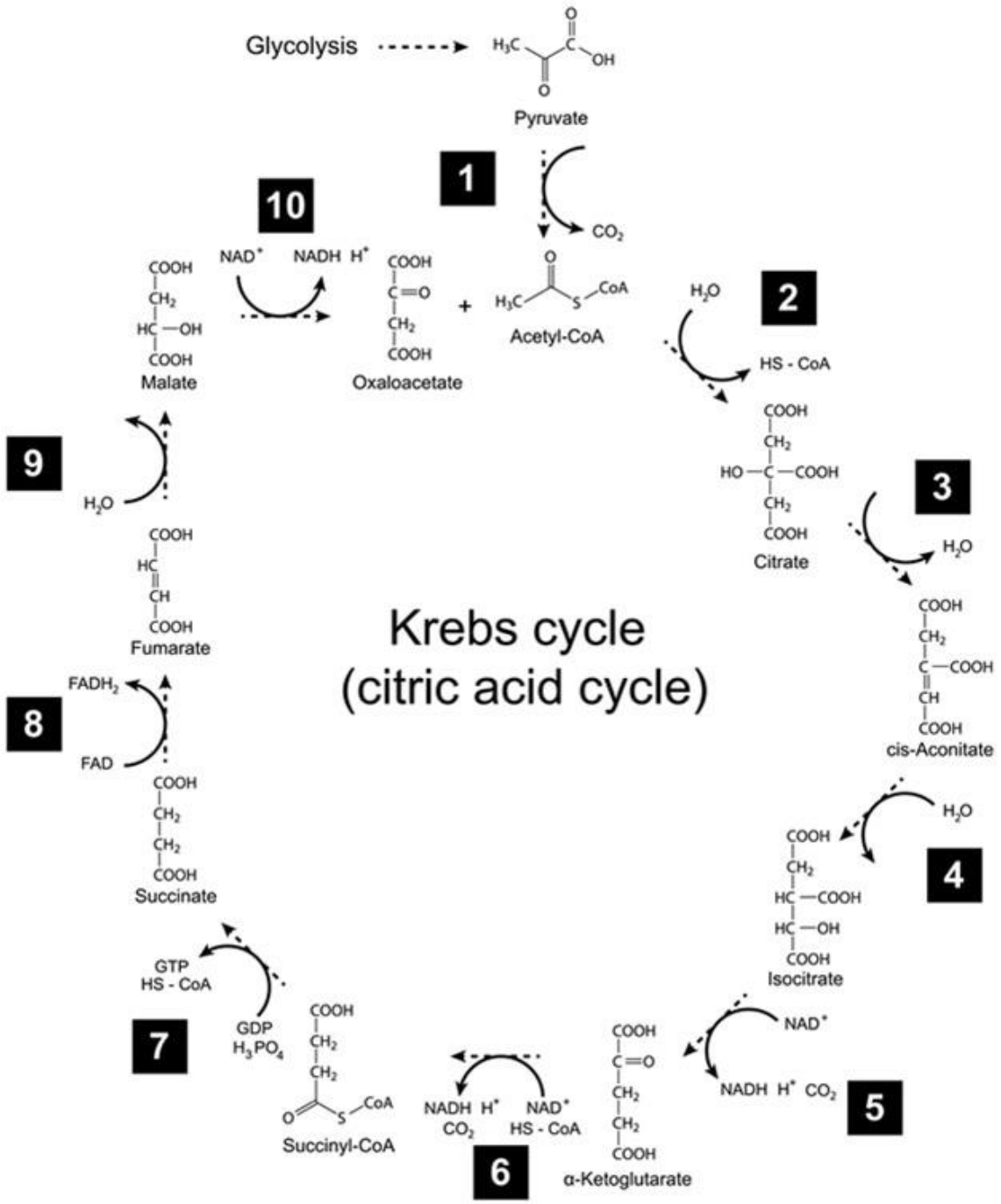
وجود الإنزيمات المسؤولة عن هذه الدورة فيها. أما في البكتريا بدائية النواة فتتواجد معظم الإنزيمات المسؤولة عن إنتاج الطاقة في الغشاء السايتوبلازمي.

تبدأ العملية في المايتوكوندريا بانتقال البايروفيت إليها وتحوله إلى المرافق الإنزيمي الأسيتيلي (Acetyl CoA) ومنه تبدأ الدورة بارتباطه مع مركب رباعي الكاربون هو أوكزالوأسيتيت (Oxaloacetate). ومن وظائف هذه الدورة:

1- إنتاج مركبات وسطية يمكن ان تستعمل في تخليق مركبات اخرى مثل الكلوتامات وحامض الفوليك والأسبارتات والمثايونين واللايسين والبروتينات.

2- إنتاج كمية كبيرة من الطاقة، إذ تنتج كل دورة من كريبس 12 جزيئة من ATP.

ويبين المخطط الآتي دورة كريبس



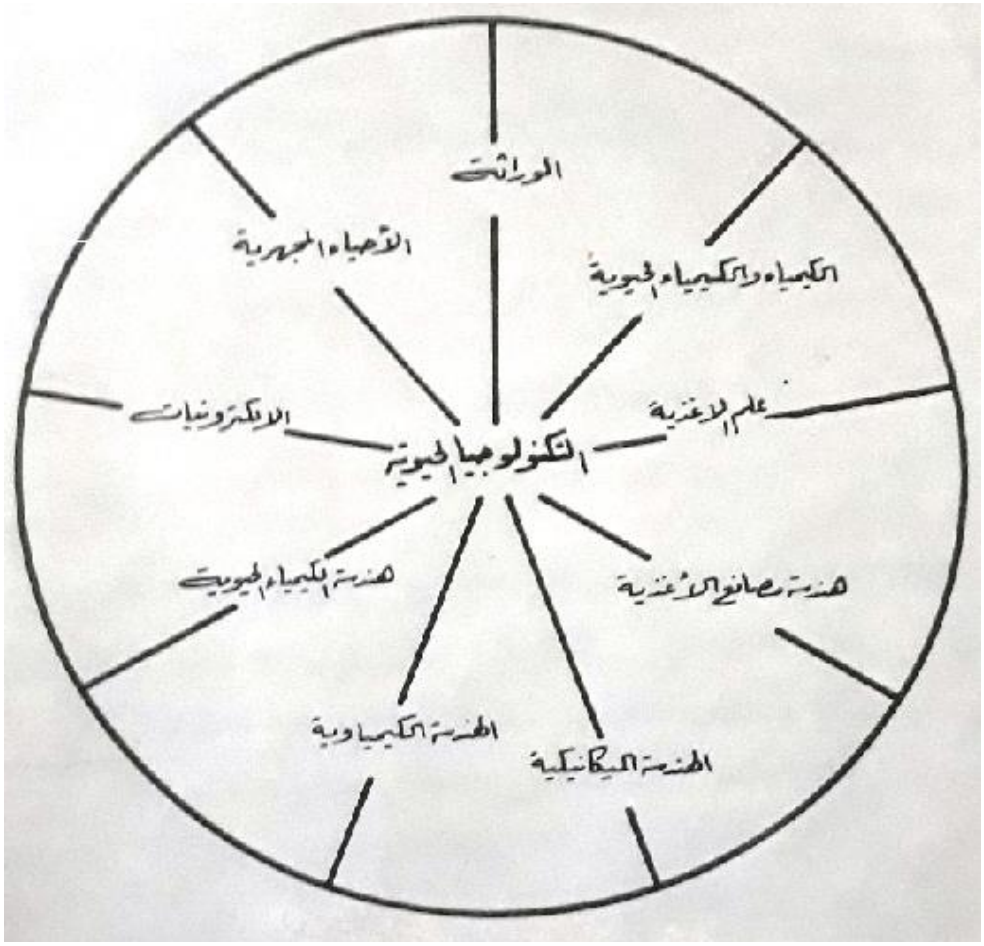
الأحماض الدهنية والهايدروكاربونات: توجد أنواع قليلة من الأحياء المجهرية لها القدرة على النمو على الهايدروكاربونات مثل الميثان. بينما توجد أنواع كثيرة من الأحياء المجهرية تتمكن من النمو على الأحماض الدهنية أو الزيوت والدهون المحتوية على هذه الأحماض الدهنية. تستخدم الهايدروكاربونات كمصدر وحيد للكاربون في إنتاج بروتين أحاديات الخلية وبعض المنتجات الأخرى مثل حامض الستريك. وتضاف الأحماض الدهنية والزيوت النباتية كمواد غذائية مساعدة في الأوساط الغذائية المستخدمة في إنتاج المضادات الحيوية.

تقنية حيوية

المحاضرة الأولى

تعريف التقنية الحيوية: هي الاستخدام الصناعي للكائنات الحية أو مكوناتها –مثل الإنزيمات– لتصنيع منتجات مفيدة –مثل الفيتامينات والاحماض الأمينية والاحماض العضوية والانزيمات– أو للسيطرة على البيئة من خلال إجراء عمليات تحلل المركبات المعقدة في فضلات المدن والفضلات الصناعية وبقع النفط. ويمكن استخدام الأحياء المجهرية مثل البكتريا والخمائر والاعفان والطحالب بالإضافة إلى الخلايا النباتية والخلايا الحيوانية.

يرتبط علم التقنية الحيوية بعدد من العلوم الاخرى مثل علوم الاحياء المجهرية والكيمياء الحيوية والوراثة والهندسة الميكانيكية والوراثة وهندسة مصانع الأغذية وعلم الأحياء الجزيئي وعلوم الأغذية. يبين المخطط الآتي علاقة التقنية الحيوية بالعلوم الأخرى



تقسم التفاعلات الكيميائية التي تحصل خلال عمليات التقنية الحيوية إلى نوعين هما:

1- التفاعلات الهدمية (Catabolic reactions) وفيها تتحلل أو تتكسر المركبات المعقدة إلى أخرى بسيطة مثل تحلل النشا إلى كلوكوز وتحلل السيللوز إلى كلوكوز وتحول الكلوكوز إلى كحول أثيلي وتحلل البروتينات إلى أحماض أمينية. تنتج هذه التفاعلات طاقة وتسمى Exergonic reactions.

2- التفاعلات البنائية (Anabolic reactions) وفيها تتحول الجزيئات الصغيرة بارتباطها مع بعضها إلى جزيئات كبيرة مثل تخليق المضادات الحيوية وتخليق النشا من الكلوكوز وتخليق الدهون من الأحماض الدهنية والكلسيرول. وتحتاج هذه التفاعلات إلى طاقة وتسمى Endergonic reactions.

يعتقد العلماء أن نسبة عالية من العمليات المستعملة في التقنية الحيوية ستكون أكثر اقتصادية وستكون أكثر اماناً من العمليات الصناعية التقليدية وستكون أغلب فضلات التصنيع غير سامة وذات قابلية على التحلل الحيوي. وعلى المدى البعيد ستساهم التقنية الحيوية في حل الكثير من المشاكل التي يواجهها العالم وخاصة في مجالات الصحة وإنتاج الأغذية والسيطرة على التلوث وإيجاد مصادر جديدة للطاقة.

نظرة تاريخية: لم تكن التقنية الحيوية من العلوم الحديثة ولكن بعض تطبيقاتها تمت حديثاً، فقد استعمل الانسان الاحياء المجهرية منذ القدم في إنتاج الأغذية والمشروبات مثل اللبن والخبز والجبن والخل. ولم تحصل تطورات كبيرة في التقنية الحديثة قبل بداية القرن العشرين عدا صناعة الكحول. وكان الدافع الرئيسي لهذا التطور هي الحروب، فعند اندلاع الحرب العالمية الاولى كان الحصار الذي فرضته بريطانيا على ألمانيا قد منع الألمان من استيراد الزيوت النباتية اللازمة لإنتاج الكلسيرول المستعمل في صناعة المتفجرات مما أدى إلى الاتجاه إلى إنتاج الكلسيرول بوساطة الاحياء المجهرية إذ تمكن الألمان من إنتاج حوالي ألف طن شهرياً منه بهذه الطريقة. كما أن المانيا قبل الحرب كانت المصدر الرئيسي للأسيتون والبيوتانول إذ كان الأسيتون يستعمل في صناعة الذخيرة والمطاط الصناعي، مما دفع بريطانيا إلى تطوير ما يسمى بتخمرات الأسيتون- بيوتانول (Acetone-butanol fermentation) باستخدام بكتريا*Clostridium acetobutylicum*. وبعد ظهور

الصناعات البتروكيميائية تم إنتاج بعض المواد الكيميائية مثل الأسيتون من خلال هذه الصناعات وتوقف إنتاجها بوساطة تخمرات الأحياء المجهرية.

من صناعات التقنية الحيوية الأخرى التي تطورت خلال الحرب العالمية الأولى هي إنتاج حامض الستريك بوساطة عفن *Aspergillus niger* إذ كان هذا الحامض ينتج قبل الحرب باستخلاصه من الحمضيات وكانت إيطاليا هي المنتج الرئيسي له، ولكن خلال الحرب تركت البساتين بدون عناية، وعند انتهاء الحرب كانت هذه الصناعة شبه مدمرة وارتفعت أسعار هذا الحامض كثيراً مما أدى إلى الاتجاه إلى إنتاجه من الأحياء المجهرية كما ذكر آنفاً.

تعد حقبة إنتاج المضادات الحيوية من الفترات الهامة في تطور التقنية الحيوية، إذ تم اكتشاف البنسلين لأول مرة من قبل العالم فليمنج (Flemeng) عام 1928 وذلك بإنتاجه من العفن *Penicillium notatum*واستمرت الدراسات حول تطوير وزيادة إنتاجه بإجراء التطفير الوراثي. وقد تمت تنقيته والتأكد من خواصه العلاجية عام 1940 واستعمل لعلاج جرحى الحرب العالمية الثانية. إن الإضافة الأخرى التي قدمها برنامج إنتاج البنسلين إلى التقنية الحيوية تتمثل في تطوير طرق انتخاب السلالات إذ كانت السلالة الأصلية من العفن المذكور آنفاً تنتج 2 ملغم فقط من البنسيلين \ لتر من الوسط الغذائي السائل، ولكن مع تطور عمليات الغربلة والعزل المستمر لسلالات أخرى من الجنس *Penicillium* تم الحصول على عزلة ذات إنتاج عالي من البنسلين بوساطة عزلة من نوع *P. chrysogenum* ثم جرت عمليات التحسين الوراثي لهذه السلالة بعمليات التطفير باستعمال غاز الخردل والأشعة فوق البنفسجية والأشعة السينية إذ أمكن زيادة الإنتاج إلى 20 غم\لتر.

الاستخدامات الصناعية لزراعة الخلايا الحيوانية: استخدمت هذه الخلايا لفترة طويلة في إنتاج اللقاحات المضادة للفايروسات (Viral vaccines) ولكن لم تنتج على نطاق تجاري إلا في فترة الستينات من القرن الماضي. بعد ذلك انفتحت مجالات جديدة أمام زراعة الخلايا الحيوانية خاصة لإنتاج بعض المواد العلاجية مثل إنتاج الإنترفيرونات (Interferons)

وهي مواد بروتينية مضادة للفايروسات والسرطان وتستخدم لإنتاج الاجسام المضادة (Antibodies).

الاستخدامات الصناعية لزراعة الخلايا النباتية: بقيت زراعة الخلايا النباتية مختبرياً هواية لفترة طويلة ولم تستخدم على النطاق التجاري. وعلى الرغم من أن النبات الكامل يعد مصدراً جيداً لبعض المواد الكيميائية والعقاقير والألوان والنكهات إلا أن عدداً قليلاً من هذه المركبات أنتج عن طريق زراعة الخلايا النباتية. وعند إنتاجها بهذه الطريقة فإن المحصول يكون واطئاً فضلاً عن فشل طرق التحسين الوراثي التقليدية مثل التطفير الوراثي والتهجين. أما في الوقت الحاضر فقد أصبحت زراعة الخلايا والانسجة النباتية ذات أهمية كبيرة نتيجة تطور طرق الحصول على نباتات كاملة من خلايا منفردة. ومن فوائد زراعة الخلايا النباتية سرعة إكثار النبات وإمكانية عزل خلايا نباتية خالية من الفايروسات وبالتالي زيادة إنتاجية النباتات.

مصادر الاحياء المجهرية الصناعية وطرق حفظها

تعد الاحياء المجهرية المستخدمة في الصناعة بمثابة المفتاح لنجاح أو فشل عمليات التقنية الحيوية. إذ تعد هذه الاحياء هي المسؤولة عن عملية التخمر ويجب أن تكون مزرعة الكائن المجهري ذات صفات عامة معينة لكي تكون فعالة في إنتاج المنتوج المرغوب. ومن أهم هذه الصفات:

1- أن تكون السلالة ثابتة وراثياً، إذ تكون المزرعة التي تنتج أفراداً مغايرة بصورة ذاتية غير مرغوبة.
2- يجب أن تنتج السلالة وبسهولة عدداً كافياً من الوحدات التكاثرية كالخلايا الخضرية أو السبورات. وبما أن الفطريات البازيدية تنتج مايسيليوم فقط فإنها لا تستعمل كثيراً في الصناعة.
3- يجب أن تنمو السلالة بغزارة وبسرعة بعد زرعها في خزانات إنتاج البادئ أو أية أوعية أخرى لإنتاج كمية كبيرة من البادئ قبل بدء عملية التخمر.
4- يجب أن تكون السلالة نقية وخالية من الاحياء المجهرية الاخرى ومن اللاقمات (Phages) أيضاً.

5- يجب أن تنتج السلالة المنتوج المرغوب في فترة زمنية قليلة لا تتجاوز ثلاثة أيام إلا في حالات خاصة.

6- يجب أن تنتج السلالة المنتوج المرغوب بدون مواد سامة، ويمكن فصل المنتوج المرغوب بسهولة عن المنتجات الاخرى.

7- أن تكون السلالة ذات قابلية على حماية نفسها من التلوث قدر الامكان. وعملية الحفظ قد تكون بعدة طرق مثل تحمل دالة الحموضة (pH) أو نموها في درجات حرارة مرتفعة أو لها القدرة على إنتاج مواد مثبطة للأحياء المجهرية الاخرى.

8- أن تكون السلالة ذات قابلية على الحفظ لفترات طويلة.

9- أن تكون السلالة ذات قابلية على تقبل التغيرات الوراثية التي تحدثها العوامل المطفرة التي قد تستعمل في برنامج تحسين السلالة.

10- أن تعطي السلالة كمية كافية من المنتوج المرغوب في زمن التخمر المحدد.

إن الاحياء المجهرية التي تتوافر فيها الصفات السابقة إما أن تعزل من الطبيعة أو يتم الحصول عليها من مراكز تجميع أو مصارف السلالات (سيتم التطرق إليها لاحقاً). كما أن هناك أحياء مجهرية قد استعملت خلال عدة قرون في تحضير منتجات غذائية متخمرة محلية يجعل هذه الأغذية مصدراً هاماً لسلالات الأحياء المجهرية الصناعية. إن المصادر الطبيعية الرئيسية للأحياء المجهرية الصناعية هي التربة والمياه والأغذية الطازجة والمتخمرة والحيوانات والنباتات والمجاري. وتصمم عملية عزل السلالات المرغوبة من المصادر الطبيعية بحيث تشجع نمو الأحياء التي تحمل الصفة المرغوبة، وقد تستعمل الطرق الانتقائية في عزل الانواع التي تتمكن من النمو في أوساط غذائية معينة أو تحت ظروف مزرعية معينة والتي لا تسمح بنمو الانواع الأخرى.

مراكز تجميع السلالات (مصارف السلالات) Cultures collections: تعد هذه المراكز من المصادر المباشرة للحصول على الأحياء المجهرية الصناعية المطلوبة لإنتاج مادة معينة. وتوجد بضعة أنواع من هذه المراكز أهمها:

1- مراكز تجميع السلالات ذات الملكية الصناعية Proprietary industrial culture collections: إن بعض المؤسسات الصناعية الكبيرة المتخصصة بصناعات التكنولوجيا

الحيوية تمتلك مراكز لتجميع لسلالات الأحياء المجهرية الصناعية، وهذه السلالات قد عزلت وفق برنامج مستمر لعزل الأحياء المجهرية المهمة في الصناعة التي تختص بها تلك المؤسسات. ويتم دائماً عزل سلالات جديدة وتحسينها بوساطة الطفرات الوراثية وطرق التحسين الوراثي الأخرى. ومن الأمور الهامة جداً أنه يمنع تداول هذه السلالات خارج المؤسسات وتستعمل من قبلها فقط.

2- مراكز تجميع السلالات الخاصة Private culture collections: تتخصص هذه المراكز عادة بمجموعة واحدة أو مجاميع قليلة من الأحياء المجهرية وترتبط بالجامعات أو مراكز البحث العلمي، ويكون تداول هذه الأحياء المجهرية محدوداً خارج هذه المراكز وتستخدم من قبل العاملين فيها فقط، ولكن بمكن أن ترسل حين الطلب إلى الباحثين العاملين في نفس المجال أو إلى مراكز بحثية أخرى أو إلى العاملين في الصناعة لغرض التطوير. ولا تستوفي هذه المراكز ثمناً لهذه السلالات كما أنها لا تنشر قوائم بأسماء الأحياء المجهرية المتوفرة لديها.

3- مراكز تجميع السلالات ذات النفع العام Public culture collections: تقوم هذه المراكز عادة بتجميع أنواع مختلفة من الأحياء المجهرية ثم بيعها للراغبين مقابل أثمانها. وعادة يكون اهذه المراكز فهارس بأسماء الأحياء المجهرية المتداولة لديها وأسعارها. وتقدم مثل هذه المراكز خدمات أخرى مثل التشخيص والتصنيف والحفظ. وقد يتخصص بعض المراكز في مجموعة معينة من الأحياء المجهرية المهمة صناعياً مثل البكتريا أو الخمائر أو الأعفان أو البكتريا الخيطية أو الإبتدائيات أو الطحالب والتي تستخدم في الصناعات الغذائية أو الدوائية أو البحث والتطوير. وفيما يأتي أسماء بعض هذه المراكز.

1- المعهد العالمي للفطريات International Mycological Institute (IMI)

2- مركز تجميع الأحياء المجهرية الروسي

3- مركز تجميع الأحياء المجهرية الأميركي American Type Culture Collection (ATCC)

4- المعهد الألماني للأحياء المجهرية Deutch sammlung von microorganismen (DSM)

5- معهد أبحاث التخمر في اليابان Fermentation Research Institute (FERM)

ألاحتياجات الغذائية والنمو للإحياء الصناعية

يعد الهدف الرئيس من عمليات التقنية الحيوية هو إنتاج المواد الحيوية التي يحتاجها الإنسان صالحة للاستعمال وبأقل كلفه ممكنه. لذلك فان انجاز عمليات التصنيع الحيوي يتطلب المعرفة الكاملة في احتياجات النمو والانتاج للإحياء المجهرية الصناعية سواء كانت تلك المتطلبات غذائية او بيئية فضلا عن الاحتياجات الاخرى التي تكون مقترنة مع الحالات الخاصة لكل كائن مجهري او عملية تصنيعية لانتاج المنتج الحيوي اللازم.

هناك متطلبات اساسية يجب توفرها للوصول الى الأنتاج الحيوي من الاحياء الصناعية التي منها:

1- الماء.
2- مصادر الطاقة.
3- مصادر النتروجين
4- المغذيات الاخرى كالفيتامينات والعناصر المعدنية .
5- غياب مثبطات النمو والانتاج الحيوي.
6- الظروف البيئية الملائمة للنمو مثل الاوكسجين والحرارة والضوء والاس الهيدروجيني وغيرها.

الماء

يعد الماء بانه المكون الاساسي والمهم في حاجة الكائنات المجهرية عند استعمالها في عمليات الانتاج الصناعي حيث ان نسبته تصل في الخلايا الحية بين 70-90% وتأتي هذه الاهمية من جوانب متعددة أهمها:-

1. يعد الماء بانه الوسط الملائم لانجاز التفاعلات الحيوية التي تجري داخل الأنظمة الحيوية وخارجها.
2. يستعمل الماء كواهب للهيدروجين في الإحياء التي تقوم بالتخليق الضوئي .
3. أن اغلب انواع الإحياء المجهرية تكون تغذيتها تنافذية لذا فانها تحتاج الى الماء لاذابة المواد الغذائية التي تحتاجها لامكانية تنافذها من خلال جدرانها الخلوية.

إن الخلايا الحيوانية والنباتية التي تنمى بشكل عالق تكون حساسة جدا للشوائب الموجودة بالماء لذلك يجب استعمال ماء ذو نوعية جيدة كالماء المقطر منزوع الايونات (حديث التقطير) لمنع نمو بعض الأحياء فيه وعند خزنه يجب ان يكون في درجات حرارة عالية أو منخفضة جدا .

أما الإحياء المجهرية فان لها القدرة على تحمل بعض الشوائب لذلك يمكن معها استعمال ماء ذو نوعية اقل جودة ويعبر عن استجابة الإحياء المجهرية للضغط الازموزي بالنشاط المائي a^w (Water activity) الذي يعبر عن مقياس كمية الماء الحر في أي نظام ويعرف **بأنه النسبة بين ضغط بخار الماء في أي محلول إلى ضغط بخار الماء النقي التي تكون عند 1 في الماء النقي** وتنخفض عند إضافة أو ذوبان المواد المختلفة فيه. اعتمادا الى ذلك فان الاحياء المجهرية تتفاوت في قابليتها على تحمل المستويات المختلفة من النشاط المائي، اذ ان بعضها يصل في قابلية تحملة الى مستويات 0.61 منه.

أن أهمية الماء لا تنحصر فقط في العلاقة المباشرة مع نمو الخلايا، اذ هناك جوانب أخرى تبرز اهمية الماء في عمليات التقنية الحيوية منها عند استعمالة في عزل الإحياء او عزل منتجات التخمر وتنقيتها او في حالات التنظيف والتعقيم وغيرها من العمليات. يلاحظ أن المياه المزودة للمصانع تكون في حالة غير مستقره في محتواها الكيماوي لذلك من الضروري إجراء فحوصات مستمرة للتأكد من نوعية المياه اذ أن وجود بعض الايونات قد يؤدي إلى تثبيط النمو آو الفعاليات الحيوية الإنتاجية لها فضلا عن انه يمكن ان يسبب في تأكل الأوعية والأنابيب. كما يتذبذب محتوى المياه الميكروبي اذ يمكن ان يكون مقبولا في استعماله إذا احتوى على اعداد بين 20–100 خلية/ مل.

مصادر الطاقة

تحصل الاحياء المجهرية على الطاقة من مصدرين رئيسيين هما:

1- **مصدر مباشر**: تكون الطاقة المتحصل عليها فيه مصدرها من ضوء الشمس ويستفاد منها من خلال عمليات التخليق الضوئي .

2- **مصدر غير مباشر**: يكون مصدر الطاقة فيه من خلال أكسدة المواد الغذائية التي سبق وان نتجت من تثبيت الطاقة الضوئية وتحويلها إلى طاقة كيماوية .

أما مقومات النمو والبقاء الاخرى فان مكوناتها تكون من العناصر الموجودة في الطبيعة والتي تكون في تكوينها أكثر من 100 عنصر من العناصر الكيماوية، التي يكون منها فقط بين 35–40 عنصر يمكن الاستفادة منه في عمليات النمو للاحياء المجهرية. يعد الكربون من العناصر الاساسية في الاحتياجات الغذائية للكائنات يليه النتروجين، الأوكسجين، الهيدروجين، الفسفور، ثم الكبريت اذ تشكل هذه العناصر في نسبتها بين 90–95% من الوزن الجاف للإحياء ثم تليها العناصر الأخرى مثل البوتاسيوم والمنغنيز والصوديوم والكالسيوم وبعض العناصر الاخرى.

لذلك فانه يمكن تقسيم المغذيات حسب الحاجة إليها إلى:

أ- المغذيات الكبيرة Macro nutrients وهي المغذيات التي تحتاجها الاحياء المجهرية بكميات كبيرة عند(غم/ لتر من الوسط الغذائي).

ب-المغذيات الصغيرة Micro nutrients وهي المغذيات التي تحتاجها الإحياء المجهرية بكميات قليلة عند (ملغم/ لتر من الوسط الغذائي).

ت-المغذيات النادرة Trace Nutrients وهي المغذيات التي تكون الحاجة اليها بكميات نادرة عند (مايكروغرام/ لتر من الوسط الغذائي) التي لاتضاف الى مكونات الوسط ويمكن ان تصل الى الاوساط في الغالب من المعدات والاجهزة المستعملة في تحضير الوسط.

مصادر الكاربون

يعتبر الكربون من العناصر الأساسية للحياة حيث تصل نسبته إلى 50% من الوزن الجاف للخلايا وتلعب العديد من مصادر الكربون دورا مزدوجا حيث تعمل كمصدر للطاقة اضافة الى كونها مصدرا للكاربون. يدخل الكاربون بصورة رئيسية في بناء الخلايا كونه يدخل في تركيب جميع مكوناتها الحيوية وبذلك تتنوع مصادر الكربون كي تكون متلائمة مع حاجة الخلايا الحية. مما ذكر فانه يمكن تقسيم الإحياء المجهرية اعتمادا الى مصادر الكربون التي تستهلكها إلى :-

1- **الإحياء ذاتية التغذية Autotrophy** وهي الاحياء التي تتمكن من تثبيت الكربون واستخدامه وتكون قادرة على القيام بعملية البناء الضوئي مثل الطحالب والبكتريا القادرة على التخليق الضوئي.

كما ان بعض الاحياء يكون لديها القدرة في استغلال الطاقة الكيماوية المشتقة من بعض المواد وتثبيتها كما في بعض انواع الطحالب التي تكون في هذه الحالة مختلطة التغذية Mix trophy.

2- **الإحياء غير ذاتية التغذية Heterotrophy** وهي الاحياء التي تستهلك الكربون العضوي وتتمثل بالخلايا الحيوانية والفطريات والابتدائيات ومعظم البكتريا وبعض الطحالب اذ ان هذه الإحياء تخلو من الصبغات المتعلقة بالتركيب الضوئي أو أنظمة تثبيت CO_2 الجوي.

مصادر الكربون :-

تتنوع مصادر الكاربون في الطبيعة وكذلك الى حاجة الاحياء المجهرية وقابليتها لاستخدامها لذلك تختلف الإحياء في مدى ونوعيات مصادر الكربون التي تستطيع أن تستهلكها فالخلايا الحيوانية والنباتية تستطيع أن تستهلك عددا محدودا من مصادر الكربون أما الأحياء المجهرية فانها تتنوع في قابليتها على استغلال

مصادر الكاربون اذ ان بعض أفراد جنس Pseudomonas تستطيع أن تستهلك مايقارب 90 نوعا منها بضمنها المصادر المعقدة مثل الفينولات والمبيدات بينما بعض انواع البكتريا ليس لها القابلية في ذلك ولاتتمكن الا في استغلال مصدر واحد او مصدرين للكاربون كما في البكتريا المولدة للميثان وان من أهم مصادر الكربون هي:-

1- **ثاني أكسيد الكربون CO2**:- يستخدم ثاني اوكسيد الكاربون من قبل بعض الاحياء المجهرية التي تسمى **الإحياء ذاتية التغذية** ويعد من اسهل انواع مصادر الكاربون كونه متوفرا في الجو. ويمكن أن يستعمل في أنتاج الكتلة الحيوية من قبل بعض انواع البكتريا والطحالب والأخيرة يمكن أن تكون الكليسيرول منه. كما تحتاجة بعض الكائنات غير ذاتية التغذية ولكن تكون الحاجه اليه بكميات اقل من الانواع ذاتية التغذية وغالبا ماتكون حاجة الخلايا له في تعويض المركبات الحاوية على أربع ذرات كربون التي تستهلك في دورة الTCA خلال النمو ويمكن أن يستفيد من CO2 الناتج من التنفس وبذلك تقل الحاجة إلى مصادر خارجية، كما أن الخلايا الحيوانية تحتاج إلى CO2 من الجو لاستعماله في نظام HCO3\CO2 في الحفاظ على درجة الحموضة داخلها .

2- **الكربوهيدرات** :- تعد بانها من أهم مصادر الكربون المستعملة في التخمرات الصناعية وتعتبر اغلب الكربوهيدرات المخلقة حيويا قابلة للتحلل بواسطة الإحياء وتقسم الكربوهيدرات حسب الوحدات البنائية إلى أحادية وقليلة التعدد ومتعددة. وان من انواعها التي تستهلك من قبل الاحياء المجهرية الصناعية هي الاتي:

اولا: الكلوكوز Glucose. يعد الكلوكوز بانه الاختيار الأول في عمليات التخمر من الاحياء المجهرية ويمكن الحصول عليه من مصادر عديدة كما أن السكريات المتعددة وغيرها لابد ان تتحول إلى الكلوكوز قبل تمثيلها وايضها في الخلايا .

ثانيا: السكروز Sucrose. يصنف بانه من السكريات الثنائية ويتم الحصول عليه من قصب السكر او البنجر السكري ويعد واسع الاستعمال في التصنيع الغذائي لذلك يعتبر مكلفا في استعماله للانتاج الحيوي.

أن استهلاك الإحياء المجهرية للسكريات البسيطة يعد سريعا جدا كونها تعد جاهزه لتايضها في الخلايا لذلك لاينصح في اضافتها في دفعة واحدة بل تكون في حالة دفعات متعددة وبشكل تدريجي خلال التصنيع كي لايحصل من خلال اضافتها حالة الكبح الايضي للكائن المجهري.

ثالثا: النشا Starch. تعتبر السكريات المتعددة (المكورة) من المصادر الكربونية الجيدة في استهلاكها من قبل الاحياء المجهرية الصناعية ولكن وجودها في جزيئات كبيرة وغير ذائبة بالماء يجعل الحاجة الى ان تكون بشكل محاليل غروية قبل إدخالها إلى الأوساط الغذائية. يمكن الحصول على النشا من مصادر كاربوهيدراتية مختلفة مثل الذرة والبطاطا والحبوب والتي يمكن أن تطحن وتستعمل بشكلها الخام آو أن

يستخلص النشا منها ويحلل بعد استخلاصه بواسطة الأنزيمات لينتج الكلوكوز ويمكن تحليله بالحوامض ولكنها محدودة الاستعمال لتأثيرها السلبي على الإحياء الصناعية.

رابعا: منتجات الشعير. يمكن تحضير المولت Malt من تخمير حبوب الشعير الذي يحوي أنواع مختلفة من السكريات بالاضافه إلى النشا، كما ان الناتج من المولت يكون محتويا على انواع من العناصر الغذائية مختلفة عن مكونات الشعير الاساسية لاسيما من الفيتامينات ومنشطات النمو.

خامسا: مخلفات قصب السكر والبنجر السكري. يطلق على مخلفات القصب والبنجر بالمولاس وهو من أكثر المواد الاولية المستخدمة في التخمرات وذلك لكونه ناتج عرضي عن انتاج السكريات من القصب او البنجر. يحتوي المولاس على نسبه عالية من السكروز ونسب لابأس بها من الكلوكوز كما يحتوي العديد من العناصر الغذائية ولكنه فقير بالنتروجين وهو من المواد سريعة التلف .

سادسا: مخلفات مصانع الورق. تحتوي مخلفات مصنع الورق على كميات كبيرة من المواد العضوية بين 80-90% ومنها اللكنين والكربوهيدرات والمعادن و So2 وكبريتات الكالسيوم والحوامض المتطايرة مثل حامض ألخليك والفورميك. لايمكن استعمال مخلفات مصانع الورق بصورة مباشرة في التخمرات بسبب ارتفاع نسبة SO2 المستعمل في التصنيع بالاضافه إلى وجود المعادن الثقيلة فيها كما أن حموضتها العالية عند pH بين 1-3 يعتبر مثبط لمعظم الاحياء المجهرية، لذلك فان من الضروري اجراء بعض التحويرات قبل استعمالها كأضافه **هيدروكسيد الكالسيوم** لمعادلة الحموضة العالية كون ان هذه الاملاح تعد بانها مركبات غير ذائبة مع العديد من الحوامض والمواد مما يسهل إزالتها كذلك فأن مخلفات مصانع الورق تعد فقيرة بالنتروجين والفسفور لذا يجب إضافتها عند استعمالها وقد استعملت هذه المادة في إنتاج الايثانول وخمائر العلف.

سابعا: السليلوز. يعد السليلوز بانه اكبر المصادر الكربونية على الأرض كونه ينتج من النباتات ومخلفاتها. تستطيع الإحياء المجهرية من استخدامه كالتي لها القابلية في اتلاف الخشب مثل الفطريات والبكتريا وغيرها، قبل استعماله يفضل إجراء بعض المعاملات الأولية لتفكيك تركيبة البلوري وفك ارتباطه من اللكنين لتسهيل تحلله من قبل الإنزيمات المحللة له ومن هذه المعاملات التحلل ألحامضي أو المعاملة بمركبات خاصة مثلCADOXIN أو الطحن . تستخدم في بعض الحالات مزارع مختلفة تعمل الأولى في تحليل السليلوز إلى وحدات صغيرة ذائبة تتمكن الانواع الاخرى من الاحياء في استعمالها. ان من اهم المصادر السليلوزية للتخمرات هي الأجزاء النباتية والأخشاب ومخلفات الحبوب والأعشاب القصبية والأشجار النفضية.

ثامنا: نقيع الذرة Corn Syrup Liquor. يعد هذا المنتج بانه ناتج عرضي عن صناعة النشا وفي الغالب يستعمل كمصدر نتروجيني ولكن احتواءه على كميات كبيرة من السكريات المختزلة وحامض اللاكتيك جعله يعد مصدرا كاربوهيدراتيا .

3-الزيوت النباتية والحيوانية: تحتوي الزيوت على طاقة عالية تفوق الكربوهيدرات بـ2,5 مرة. تعد الزيوت النباتية أكثر ملائمة من الحيوانية كونها سائلة في درجات حرارة الغرفة كما يمكن استخدامها كمضادات رغوة ومن الزيوت المستخدمة في عمليات التصنيع هي زيت الذرة ، فول الصويا ،القطن والكتان.

4-الكحوليات. ازداد الاهتمام بالكحوليات مؤخرا لعدة أسباب منها سهولة الحصول عليها بشكل نقي كما انها رخيصة الثمن ،متجانسة ،ذائبة بالماء، لاسيما الايثانول منها حيث يكون متجمعا على سطح التخمر مكونا رغوة خفيفة تزيد من توزيع الأوكسجين في وسط التخمر كذلك الميثانول الذي يتميز بنفس المواصفات لكنه أكثر تطايرا وسمية ولكن إنتاجه أسهل لان المواد الأولية المستعملة في إنتاجه أكثر انتشارا ورخصا وفي حالة استعمال الكحوليات يجب أجراء التخمر بدرجات حرارة واطئة نسبيا لتحاشي تجزئها.

5-الهايدروكربونات. تتمكن الإحياء المجهرية من استخدام الهايدروكاربونات كمصادر كربونية وتأتي البكتريا بالدرجة الأولى من استهلاكها تليها الخمائر والفطريات، ان من أهم الهايدروكربونات هي الالكانات Alcanes مثل الميثان المتوفر بالطبيعة بكثرة حيث يخرج مع مصادر النفط كما تنتجه البكتريا المولدة للميثان. وتعد كفاءة الميثان عالية في إنتاج الكتلة الحيوية.

مصادر النتروجين

يعد النتروجين من العناصر الأساسية لبناء ونمو الخلايا الحية وهو يدخل في تركيب البروتينات والحوامض النووية وبعض المركبات الأخرى ويمثل حوالي 8-14% من الوزن الجاف للخلايا ومصادر النتروجين بالطبيعة على نوعين هما النتروجينات اللاعضوية والتي منها النتروجين الجوي وأملاح الامونيوم والنترات آو النتروجينات العضوية كالأحماض الامينية والبروتينات ومشتقاتها.

أ- المصادر اللاعضوية :-

1- النتروجين الجوي. تتمكن بعض الإحياء المجهرية من تثبيت النتروجين الجوي إما بشكل حر كما في حالة جنس Azotobacter وانواع البكتريا ضوئية التغذية-العضوية والطحالب الخضراء المزرقة آو الانواع التي تتمكن من تثبيته من خلال تعايش البكتريا مع النباتات كما في الجنس Rhizobium وتعايشها مع

جذور البقوليات وتعايش الجنسAzospirillum مع العائلة النجيلية. ان عملية التثبيت تكون بطيئة وتحتاج إلى طاقة كبيرة .

2- أملاح النتروجين اللاعضوية: تتمثل **بأملاح الامونيوم (آمونيا) والنترات** اذ تستخدمها العديد من الإحياء مثل الطحالب بدائية النواة وحقيقية النواة والبكتريا والابتدائيات ألسوطية كما تستطيع العديد من الإحياء الصناعية في استخدامها. أكثر الأملاح استخداما هي **كبريتات الامونيوم** التي في حالة استعمالها فانها تسبب في تغير ظروف التفاعل لتكون حامضية بسبب استهلاك جذر الامونيوم وتحرر الكبريتات الذي يؤدي الى تكوين حامض الكبريتيك بعد ارتباطها مع جذر الهيدروجين، لذلك فانه غالبا ما يستعمل معها هيدروكسيد الامونيوم أو محلول الامونيا لموازنة الحموضة الناتجة أما الملح الأخر فهو **نترات الامونيوم** الذي في حالة استهلاكه فان الوسط يميل إلى الحموضة أولا إلى أن ينتهي استهلاك الامونيوم ثم تبدأ ألإحياء باستهلاك النترات وعندها تميل إلى القاعدية، كما يستعمل **كلوريد الامونيوم** مع بعض انواع الاحياء المجهرية أما **فوسفات الامونيوم** فانها غالبا ما تستعمل كمصدر للنتروجين والفسفور. كما ان معظم انواع الإحياء المجهرية تتمكن من استخدام الامونيا.

ب- المصادر العضوية: تتنوع المصادر العضوية التي يمكن ان تستعمل في تنمية الاحياء الصناعية ولكنها في الغالب تكون بشكل بروتينات بسيطة أو معقدة أو حوامض امينية أو اميدات أو يوريا. وتعد اليوريا قليلة الاستعمال لارتفاع سعرها وتفككها بالحرارة العالية .

تختلف الخلايا الحية في قابليتها لاستهلاك النتروجين فالخلايا الحيوانية لاتستطيع استخدام المصادر اللاعضوية لأنها لا تتمكن من اختزال النتروجين إلى درجة التكافؤ التي يمكن عندها للنتروجين من دخول الأنظمة الحيوية إي درجة الاختزال المماثلة لدرجة اختزال الحوامض الامينية. إما أملاح الامونيوم فان درجة الاختزال للنتروجين فيها تكون مشابه لدرجة الاختزال في الأنظمة الحيوية لكنه يعد ساما في الخلايا لهذا يجب تزويد الخلايا الحيوانية بالأحماض الامينية اللازمة لتخليق البروتين من المصادر الطبيعية مثل مصل العجول أو الشرش أو مستخلصات البقوليات. وفي حالة الخلايا النباتية فان مزارعها يجب ان تزود بحوامض امينية نقية بمركبات معقدة وأحيانا تضاف بعض المصادر اللاعضوية كأملاح الامونيوم .

أما الإحياء المجهرية فانها تتمكن من استخدام العديد من المصادر النتروجينية العضوية وتعد بانها أفضل من المصادر اللاعضوية اذ أن تزويد الإحياء المجهرية الصناعية بالأحماض الامينية تجعل الخلايا تلجأ إلى العديد من مسارات التخليق الحيوي التي تصرف فيها كميات كبيرة من الطاقة ولكن من الناحية الاقتصادية تكون المصادر اللاعضوية اقل تكلفة. ان من المصادر العضوية المهمة لبعض انواع الاحياء هي النيوكليوتيدات وقواعدها النتروجينية حيث تستطيع ان تستهلكها بعض الهدبيات والسوطيات اذ تعتمد

عليها بشكل كامل. كما ان بعض انواع الاحياء المجهرية تتمكن من استعمال السيانيد من مصادره كمصدر نتروجيني وتعد هذه الية في معاملة الفضلات الحاوية عليه.

ومن المصادر العضوية الأخرى المستخدمة هي **نقيع الذرة** التي تحتوي أحماض امينية عند 20% منها ولكن من مساوئها هو ظهور ترسبات تتداخل مع قياس نمو الإحياء المجهرية لهذا تجرى بعض المعاملات الأولية للتخلص من المواد المسببة للترسبات مثل أملاح الكالسيوم والمغنيسيوم كما تؤدي هذه المعاملات إلى زيادة حاصل النمو وزيادة نواتج الايض الثانوي مثل إنتاج بعض المضادات. وكذلك **نقيع البطاطا** الذي يستعمل في إنتاج بعض المضادات الحيوية كالبنسلين وكذلك مستخلص النخالة، ومن المصادر الاخرى هي مسحوق فول الصويا وفستق الحقل التي تتضمن في تركيبها على كميات كبيرة من البروتينات. فضلا عن ذلك فان مستخلص الخميرة بالإضافة إلى كونها مصدر لعوامل النمو والفيتامينات فانها يمكن الحصول من خلالها على النتروجين عند تحلل خلايا الخميرة وخاصة خميرة الخبز اليي تحضر بشكل مسحوق. ومن المصادر العضوية الاخرى هي مخلفات الأسماك والمجازر.

الأوكسجين

يعد الاوكسجين بانه من العناصر المهمة جدا فهو يدخل في تركيب مكونات الخلية والماء والمصادر الكربوهيدراتية كما أن معظم الخلايا الحية تعد بانها هوائية تستخدم الأوكسجين الجزيئي الذي يعتبر عاملا مؤكسدا قويا تستعمله الخلايا كمستلم للالكترونات إثناء أكسدتها المواد العضوية للحصول على الطاقة. يلاحظ حصول زيادة في الحاجة إلى الاوكسجين عند استهلاك الخلايا للهايدروكربونات وذلك لان الخلايا تحتاج إلى كمية اوكسجين اكبر لقلة وجوده في الهايدروكاربونات تقابلة كمية كاربون عالية التي تكون ذا طاقة عالية.

الهيدروجين

تحتاج الإحياء المجهرية الصناعية الى الهيدروجين بكميات كبيرة حيث انه يدخل في تركيب جميع المكونات الخلوية كما أن بعض البكتريا تستخدمه لإنتاج الطاقة إي يكون بمثابة واهب للالكترونات حيث يستخدم لمليء الجو المحيط بالخلايا اللاهوائية لجعل المحيط مختزل وقليل التهوية ويزود للخلايا من خلال المواد والتراكيب التي تدخل للخلية .

الأملاح والعناصر المعدنية

تعد العناصر المعدنية والاملاح المتكونة منها في غاية الاهمية في تغذية انواع الاحياء المجهرية لاسيما الصناعية، اذ ان كل عنصر من العناصر المعدنية يعد مهما اذ ان كل منها يتميز بدور فعال في نشاط

الخلية من خلال دخوله كعامل مرافق لبعض الأنزيمات او اشتراكة في بعض التراكيب الخلوية فضلا عن ان بعض العناصر تؤدي وظيفة التوازن ألايوني في الخلية.

عوامل النمو

جميع المواد التي تكون عوامل نمو هي عبارة عن مواد عضوية ذات أوزان جزيئية واطئة جدا لا تتمكن بعض الخلايا من تركيبها لذا يجب إضافتها إلى أوساط النمو لتشجيع نمو الخلايا وذلك لتقليل الجهد الواقع على الخلايا لعمليات تخليق مثل هذه المواد. وان من أنواع عوامل النمو هي الاتي:

أ- **الفيتامينات**. تعد الفيتامينات بانها من أهم عوامل النمو التي يكون لها تاثير واضح في فاعلية ونشاطية الخلية الحية وان نقصها يؤدي الى حصول خلل في فعاليتها ونشاطيتها اضافة الى النقص الحاد منها يمكن ان يسبب تثبيط او موت الخلية الحية. تتضمن الفيتامينات نوعين منها هي الذائبة بالماء والذائبة بالدهن واغلبها تعمل كمرافقات إنزيمية والبعض الاخر يدخل في تركيب بعض المركبات الخلوية مثل Inositol الذي يدخل ضمن تركيب اللبيدات الفوسفاتية ويعتمد احتياج الخلايا للفيتامينات على فعالية الخلية كما في حاجة الخمائر إلى بعض الفيتامينات عند نموها لاهوائيا.

ب-**الأحماض الامينية**. ان الدور الرئيس لهذه الوحدات يكون في حاجة الخلايا لها في البناء من خلال تكوين الانزيمات او البروتينات التي تحتاجها الخلية اضافة الى استعمالها في تعويض اجزاء الخلايا او زيادة نشاطيتها وتضاف عند الحاجة إليها بتراكيز بين 310-610 مولر.

ت-**الطلائع أو المواد السابقة Precursors**. هي المركبات التي تستعملها الخلايا في تحويلها الى مركبات حيوية مطلوبة وبذلك فان الغرض من اضافتها يكون في اختصار خطوات تكوين المركب المراد انتاجة كما في إضافة Phenyl-acetic acid لإنتاج أنواع من البنسلين.

ث-**النيوكليوتيدات**. ان بعض انواع الخلايا لاتتمكن من انتاج القواعد النتروجينية او النيوكلوتيدات الا بوجودها من مصادرها، ولما كانت النيوكلوتيدات او القواعد النتروجينية تعد بانها الوحدات الاساسية في البناء الوراثي وتكوين الـ DNA وبالتالي التعبير عن الصفات الوراثية فانها تعد ذا اهمية كبيرة، وان عدم توفرها في الوسط الغذائي يسبب في حصول التطفير في الخلايا الذي يكون ناتجا عن نقص في بعض النيوكلوتيدات او الموت في حالة النقص الشديد. لذلك فان الحاجة اليها من بعض الخلايا يكون مطلقا لأنها لا تتمكن من إنتاجها.

ج-**الهورمونات**. ان الحاجة الى الهورمونات يكون من قبل خلايا الكائنات الراقية فقط كالخلايا الحيوانية او النباتية، ولاتحتاجة خلايا الإحياء المجهرية. ان حاجة الخلايا الحيوانية إلى الهورمونات تكون في انواع

وكميات اكبر من تلك التي تحتاجها النباتية وان عملها يكون في تنظيم عمليات النمو في الخلايا من خلال السيطرة على فعالية بعض الجينات أو من خلال السيطرة على فعالية بعض الإنزيمات أو التحكم في نضوحية الأغشية الخلوية وبالتالي التحكم في تراكيز المواد داخل الخلايا.

يلاحظ أن إضافة أو حذف بعض عوامل النمو يؤدي إلى تغيير مسار العملية الإنتاجية بشكل أساسي في بعض الخلايا اذ ان حالة إنتاج حامض الكلوتاميك (glutamic acid) من قبل بكتريا Corynebacterium glutamicum فان نقص البايوتين Biotin يؤدي إلى زيادة نضوحية الأغشية الخلوية وبالتالي نضوح حامض الكلوتاميك خارج الخلية وعدم تركيزه في داخلها، اذ ان زيادة تركيزه يثبط انتاجه.

الأوساط الغذائية

أن الوسط الغذائي يمثل البيئة التي تعيش فيها الخلايا الحية ومنها تشتق المواد الضرورية لبنائها وتشتق الطاقة اللازمة لفعاليتها الحيوية ومنها ايضا تنتج المواد الصناعية لذلك فانه من الضروري ان تتوفر بعض المتطلبات العامة في الاوساط الغذائية كي يمكن ان توفر الظروف الملائمة لنمو الكائنات المنماة عليها والتي منها الاتي:

توفر الماء– توفر المصدر الكربوني – توفر المصدر النتروجيني– الحاجة الى توفر بعض العناصر او الأملاح حسب نوعية الكائن الحي ونوعية العمليات الإنتاجية– توفر بعض الفيتامينات لبعض الاحياء او لانتاج بعض المركبات– الحاجة الى وجود الأوكسجين في بعض عمليات التصنيع الحيوية .

يمكن تقسيم الأوساط الغذائية المستعملة على النطاقين المختبري او التجاري من ناحية المكونات الداخلة في تركيبها إلى :

1- الأوساط الطبيعية المعقدة: هي الاوساط الغذائية التي تحضر من مواد أولية طبيعية ذات أصل نباتي أو حيواني وتكون تراكيبها الكيماوية غير معروفة .

2- الأوساط التركيبية : هي الاوساط التي يكون تركيبها من المواد الكيماوية المعروفة وبأوزان محددة وان تحضيرها يتم لإغراض خاصة كالحالات البحثية وهي غير مناسبة للإنتاج التجاري لكونها مكلفة.

3- الأوساط شبه التركيبية :– تعد بانها الحالة بين النوعين السابقين من الاوساط حيث يتضمن تركيبها على المكونات الطبيعية ويتم دعمها من خلال إضافة بعض العناصر التي تؤدي دورا معينا في الانتاج الحيوي وتعتبر شائعة الاستعمال في التخمرات الحيوية على النطاق التجاري.

مواصفات الأوساط الغذائية

مما تقدم من خلال معرفة التركيب الذي تتميز به انواع الاوساط الغذائية فانها بشكل عام يجب ان تتضمن مواصفات خاصة كي يمكن ان تعد بانها اوساط غذائية وتؤدي الغرض الذي كونت من اجله والتي منها:

1- يجب أن تنتج الأوساط الغذائية القدر الاكبر من الناتج النهائي المرغوب انتاجه، اذ انه في حالة كون الهدف من العملية الإنتاجية هي لإنتاج نواتج ايضية أولية كالكتلة الحيوية فانه يجب ان تكون مكونات الوسط الغذائي مركبات سهلة الاستهلاك ولها خاصية في تشجيع النمو، أما عندما يكون الهدف من عملية الانتاج هو في انتاج مواد ايض ثانوية فانه يجب ان يوفر الوسط الغذائي السماح للخلايا بالنمو واكمال مرحلة الطور اللوغاريتمي ثم توجيه الكائن المجهري في الوصول الى مرحلة الطور الثابت لتمكينة من انتاج مركبات الايض الثانوي والتي تتم من خلال نفاذ أحد المواد الاساسية للنمو او تحرير عناصر في الوسط الغذائي تكون لها تلك الفعالية في الوصول الى طور الثبات وانتاج مركبات الايض الثانوي. حيث عندما يراد إنتاج الإنزيمات فانه يجب الابتعاد عن احتواء الاوساط على المواد التي تسبب عمليات كبح النمو كما في استبدال الكلوكوز في كثير من الأحيان بأحد السكريات البطيئة التخمر أو إضافة النشا المتحلل جزئيا.

2- عدم تشجيع إنتاج مواد غير مرغوب فيها كالسموم اوالصبغات.

3- لا تؤدي الأوساط الغذائية إلى حدوث مشاكل إثناء التخمر كما في حالة زيادة اللزوجة التي تسبب في صعوبة التهوية والتقليب.

4- تصميم الأوساط بحيث تكون النواتج على درجة عالية من النقاوة من خلال محاولة منع حصول التخمرات الجانبية والتي تحصل من خلال توازن المواد ألاساسية للوسط التي تؤدي في الكائن المجهري الى الاستعمال المتوازن لمكونات الوسط وعدم بقاء مخلفات من الوسط لايمكن استهلاكها.

المضافات الى الاوساط الغذائية

تضاف الى الاوساط الغذائية بعض المكونات التي تكون اضافتها لاجل انجاز مهمات خاصة التي منها الاتي:

1. **منظمات النمو.** تضاف منظمات النمو في حالة الحاجة الى المحافظة على اس هيدروجيني pH محدد خلال عمليات التخمر اضافه إلى كونها مواد غذائية لاتؤثر في النمو للكائن المجهري. ان نوعية المنظم المضاف يعتمد على مستوى الـ pH المطلوب المحافظة عليه.

2. المواد الحاثة. تعد هذه المواد بانها ضرورية للإنتاج الحيوي لاسيما في حالة انتاج الإنزيمات اذ إن اغلب الإنزيمات التجارية المنتجة يكون انتاجها من خلال اضافة المواد الحاثة لانتاجها (induced materials) حيث تخلق الانزيم عند توفر المادة التي يعمل عليها كما في اضافة النشا كمصدر كاربوهيدراتي عندما يراد زيادة إنتاج الاميليزات او اضافة سكر اللاكتوز عندما يراد إنتاج انزيم اللاكتيز وعند إضافة المواد الحاثة لإنتاج الأنزيمات يجب أن تكون الأوساط غنية بالمصادر النتروجينية وغير حاوية على مواد تسبب التثبيط بمواد الأساس مثل الكلوكوز وتضاف هذه المواد بتراكيز قليلة وبصورة مستمرة إثناء عمليات التخمر.

3.مثبطات النمو. تضاف المواد التي تسبب تثبيط النمو في بعض الحالات لتؤدي بعض الإغراض التي منها:

أ- تضاف المضادات الحيوية لبعض الاوساط الغذائية لمنع حصول التلوث لاسيما في حالة استعمال الإحياء بطيئة النمو كالخلايا الحيوانية اوالنباتية.

ب-تضاف بعض المثبطات لتثبيط مسارات معينة كما في إضافة Bisulphate لتثبيط أنتاج الايثانول وتشجيع أنتاج الكلسترول بدلا منه من الخمائر .

ت-تضاف المثبطات لمنع انتاج مركبات الايض الثانوي والوصول الى مرحلة النمو الثابت في الخلايا مما يشجع أنتاج مواد الايض الأولي التي تفرز إلى خارج الخلية عند تجمعها .

ث-تضاف المثبطات لتغيير نضوحية الأغشية والجدران الخلوية مما يؤدي إلى نضوح مواد الايض الأولية كما في إضافة البنسلين عند إنتاج حامض الكلوتاميك.

ج-تضاف المثبطات لإغراض خاصة مثل إضافة البروميد لمنع اندماج الكلور في جزيئه التتراسايكلين والسماح بتكوين مضاد آخر هو Oxytetracycline .

4.المواد السابقة أو الطلائع. هي المواد التي يتم اضافتها الى الاوساط الغذائية لغرض التسريع في انتاج مركبات الايض المرغوبة دون غيرها فضلا عن انه في بعض الحالات يكون الغرض من اضافتها لزيادة كمية الانتاج الحيوي وكذلك تقليل المسارات الايضية التي تستعملها خلايا الاحياء المجهرية لانتاج المنتوج الايضي المراد انتاجه.

5. الخلابات Chelating agents. هي المواد التي تضاف إلى الأوساط الغذائية للعمل على تنظيم تراكيز المواد الثقيلة وجعلها عند المستوى المطلوب من قبل الإحياء المجهرية من خلال ربط المعادن بمجاميع المركبات الحاوية عليها ويكون هذا الارتباط قابلا للرجوع (Reversible) ومن هذه المركبات أملاح

الـEDTA والمركبات الحاوية على SH وبعض الأحماض الامينية وبعض البروتينات. ومن المواصفات الواجب توفرها بالمخلبيات هي:

أ- أن تكون غير قابلة للاستهلاك من قبل الإحياء المستعملة .

ب- أن لا يكون لها تأثير سام على الخلايا .

ت- أن تؤدي مهمتها بتراكيز قليلة كي لاتؤثر على مكونات الوسط الغذائي.

ث- أن تكون غير قابلة للارتباط مع نواتج التخمر كي لاتسبب تعقيدات في عمليات الفصل للمنتج الحيوي.

6. مضادات الرغاوي Antifoams. تتكون في الكثير من الأوساط الغذائية المعدة للانتاج الحيوي خلال عمليات التخمر رغاوي Foams وتحصل هذه الحالة عندما تكون الاوساط الغذائية المستعملة للانتاج غنية بالبروتينات في تكوينها حيث تحصل دنترة البروتينات وعند التقاء سطح السائل مع الهواء تتكون طبقة لا تتكسر بسهولة مكونة الرغوة والتي تسبب مساوئ منها:-

أ- تسبب في إزاحة الخلايا من الوسط إلى الأعلى مما ينتج عنه تحلل الخلايا وانطلاق مكوناتها إلى الخارج مما يزيد من ثباتية الرغوة .

ب-صعود الرغوة إلى الأعلى يؤدي إلى ترطيب المرشحات الهوائية وإعاقة دخول الهواء الى داخل الوسط مما يؤدي في تثبيط نمو الخلايا الموجودة في داخل الوسط.

ج- صعود الرغوة إلى الأعلى قد يؤدي إلى عدم استهلاك مكونات الوسط من قبل خلايا الاحياء المجهرية مما يسبب في خسارة المنتوج .

هنالك بعض الوسائط التي يمكن من خلالها تقليل أو الحد من تكون الرغوة:

أ- حذف المادة المسببة للرغوة من الوسط او استبدالها إذا كانت لا تؤثر على عملية التخمر.

ب- تغير بعض الظروف مثل تغيير pH أو الحرارة أو التهوية أو التحكم بالتقليب والحفظ أو تكسير الرغوة.

ت- أضافه مواد مضادة للرغوة وذلك عندما تكون الوسائل الأخرى غير مجدية .

تعرف المواد المضادة للرغوة بانها المواد التي تقلل الشد السطحي للسوائل وهي تعمل بشكل تنافسي مع المواد المسببة للرغوة لتحل محلها وهناك بعض المواصفات لمضادات الرغوة منها.

1- أن تكون قادرة على تغليف الرغوة أو إزالتها .

2- أن تكون فعالة بتراكيز قليلة.
3- أن تكون ذات فعالية طويلة الأمد أي تعمل مع طول فترة التخمر.
4- أن لا تكون سامة للإحياء المستعملة في التخمر آو للإحياء التي ستستخدم المنتوج .
5- أن تكون أمينة وسهلة التداول ورخيصة .
6- أن تكون غير قابلة للاستهلاك من قبل الإحياء المضافة الى اوساطها.
7- تفضل المواد التي لا تؤثر على عمليات نقل الأوكسجين .
8- أن تكون قابلة للتعقيم بالحرارة .
9- أن لا تؤثر على عمليات التنقية والاستخلاص وعمليات الإنتاج الأخرى .
10-يفضل إن تكون عديمة اللون والرائحة .

مصادر مضادات الرغوة متعددة لعل اهمها:

أ- مضادات ذات أصل نباتي كزيوت بعض النباتات مثل زيت زهرة الشمس، الخردل، جوز الهند، فول الصويا، القطن والزيتون وغيرها الكثير.

ب- مواد ذات أصل حيواني مثل الشحم الحيواني أو زيت السمك بعد إزالة رائحته.

ت- الكحوليات الخاصة المتعددة التي تكون أوزانها الجزيئية عند 2000 وقد وجد إن خلطها مع الزيوت لاسيما النباتية فانها تعطي نتائج أفضل لذلك تعد الاكثر استعمالا في الوقت الحاضر.

ث- الزيوت المعدنية مثل زيت السليكون الذي يحضر بشكل مستحلب في الماءعند نسبة 10% ويعد ذا كفاءة عالية كون الإحياء المجهرية لاتتمكن من استهلاكه.

اعداد اللقاح (البادئ) Inoculum preparation

هناك صفات يجب ان تتوفر في المزارع التي تستعمل في تحضير اللقاح التي منها:

1- ان تكون المزرعة سليمة وبحالة نشطة وذلك لتقليل مدة طور الركود في عمليات التخمر اللاحقة.
2- تحضيرها يكون بحجم كافي ومناسب من اللقاح لاكمال عملية الانتاج.
3- ان تكون صفاتها ملائمة ومثالية وخالية من التلوث.
4- ان تحافظ على قابليتها في انتاج المنتوج طيلة فترة الانتاج الحيوي.

ان الاهمية في اكمال اللقاح ليكون مثاليا في اتمام عملية الانتاج الحيوي هو في اختيار الوسط الغذائي المناسب لتحضير اللقاح. لذلك فانه قد يختلف الوسط الغذائي المستعمل في انتاج اللقاح عن الوسط المستعمل في انتاج المنتج الايضي المرغوب. ان فترة الركود المتمثلة في طور الركود Lag phase تقل كثيرا في عملية انتاج المنتج المرغوب عند انتاج اللقاح في وسط غذائي يشابه الوسط المستعمل في مرحلة انتاج المنتج المرغوب. ذلك يعود الى ان هذه الحالة تسبب في تقليل الفترة الزمنية التي يحتاجها الكائن المجهري الصناعي للتاقلم في الوسط الغذائي المستعمل في الانتاج وبذلك يختزل طور الركود وكذلك زمن التخمر بشكل كامل.

تتراوح كمية اللقاح اللازمة لتلقيح وسط الانتاج بين **3 الى 10%** من حجم وسط الانتاج. لذلك يجب ان تجرى عملية اعداد اللقاح من المزرعة الاصلية في مراحل عدة للحصول على كمية كافية من اللقاح ضمن النسبة المشار اليها لاستعماله في مرحلة الانتاج في اجهزة التخمر ويعتمد ذلك كليا الى حجم اللقاح النهائي الذي سيستعمل في تلقيح وسط الانتاج.

ان مراحل التنشيط التي يمر بها الباديء تتراوح بين **3 الى 5 مراحل** للحصول على الحجم النهائي من اللقاح، وان زيادة مراحل التنشيط يمكن ان تسبب في تلوث مزرعة اللقاح او انها تسبب في مخاطر حصول تغير في صفات السلالة او انحلالها وراثيا... لذلك دائما يجب التوفيق بين حجم اللقاح المستعمل ومخاطر التلوث وتغير السلالة.

ان تحضير اللقاحات من انواع الاحياء المجهرية يختلف تبعا لكل منها وكما يلي:

تحضير لقاح الخمائر

ان اهم العمليات الحيوية التي تشترك فيها الخمائر هي في انتاج الكحول او انتاج الكتلة الحيوية. يحضر اللقاح من الخمائر على مراحل عدة تتم المراحل الاولى من تحضير اللقاح تحت ظروف التعقيم لتقليل التلوث خلال مراحل النمو الاولى، اذ يتم في تحضير لقاح الخميرة لانتاج خميرة الخبز تحضير اللقاح في المرحلتين

الاولى والثانية تحت ظروف التعقيم بينما تتم بقية المراحل في اوعية التخمير المفتوحة. يمكن ان يرجع السبب في ذلك الى امكانية حصول التلوث خلال مراحل التخمير الاولية بينما يتعذر حصولة في المراحل اللاحقة وذلك لحصول السيادة من قبل الخميرة في وسط التحضير وكذلك للكلفة الاقتصادية لاعداد ظروف التعقيم في المراحل الثلاثة الاخيرة من اعداد اللقاح لاسيما في حالات الانتاج التجاري بكميات كبيرة.

تحضير لقاح البكتريا

ان الهدف الرئيس في اعداد لقاح البكتريا هو في انتاج لقاح نشط يعطي طور ركود قصير قدر الامكان للاستفادة من ذلك في ثبات الميكروب الصناعي في مرحلة التخمر اللاحقة. حيث ان طور الركود الطويل يكون تاثيره ليس في اضاعة وقت التصنيع فحسب بل انه يسبب في استهلاك جزء من الوسط بدون حصول الانتاج. لذلك فان طول مدة الركود للكائن المجهري تتاثر دائما بحجم اللقاح المستعمل وظروف اعداده الفسيولوجية حيث يفضل ان تكون مزرعة اللقاح المحضر في بداية طور النمو اللوغاريمي كي تكون نشطة بصورة كافية للوصول الى حالة الانتاج المطلوبة. لكل ماتقدم فان مرحلة نمو اللقاح تعد ذا اهمية اذ ان البكتريا المكونة للسبورات تتجهه الى تكوين سبوراتها في نهاية الطور اللوغاريتمي الذي يؤدي في حالة استعماله كلقاح في اطالة طور الركود لمراحل الانتاج الحيوي اللاحقة.

كمثال على تحضير لقاح من بكتريا Bacillus subtilis لانتاج المضاد الحيوي Bacitracin فان اللقاح البكتيري ينمى في مرحلتين الاولى لمدة 48 ساعة في وسط سائل ثم ينقل الى جهاز التخمر الخاص بالتنشيط في نفس الوسط الزرعي المستعمل للتنمية وتعاد عملية تنشيطة لخمسة مرات قبل ان يستعمل في الانتاج الحيوي النهائي. كما يمكن التخلص كليا من فترة الركود عند تحضير مزارع اللقاحات وذلك في استعمال الوسط الغذائي لتحضير اللقاح نفسه المستعمل في عملية الانتاج.

تحضير لقاح الاعفان

يعد تحضير لقاح الاعفان بانه الاكثر شيوعا من انواع الاحياء المجهرية الصناعية الاخرى كالبكتريا والخمائر وذلك لاستعمالاته المتعددة في التكنلوجيا الحيوية، وغالبا مايتم تحضير معلق السبورات من الاعفان كونها الطريقة الرئيسة في تكاثرها. وتوجد ثلاث اليات لتحضير لقاحات السبورات من الاعفان هي:

1. **انتاج السبورات على الاوساط المتصلبة:** تعد بانها الطريقة الاكثر استعمالا اذ ان اغلب الاعفان تنتج سبوراتها على الاوساط المتصلبة بالاكار ويفضل لذلك توفير مساحة سطحية كافية لتكوين السبورات. غالبا ماتستخدم طريقة القناني الاسطوانية Roll bottle لتحضير معلق السبورات التي تتضمن استعمال 300 مل من

الوسط الغذائي في القنينة الاسطوانية الواحدة ذا حجم لتر واحد وبعد التعقيم باستعمال حرارة 121 ° م لمدة 15 دقيقة يتم تبريدها الى 45 ° م ثم تدور القنينة على اسطوانة متحركة ليتكون غلاف اسطواني من الوسط الغذائي مع الاكار داخل القنينة. بذلك تكون جاهزة للتلقيح بسبورات الاعفان ثم التحضين عند حرارة 25 ° م لمدة 7 ايام. من مميزات هذه الطريقة هي اعطاء مساحة سطحية كبيرة لتنمية السبورات.

2. **انتاج السبورات على الاوساط الصلبة:** بعض الاعفان لها القابلية في انتاج سبوراتها على الاوساط الصلبة بكميات وفيره التي تعد طريقة اقتصادية وسهلة لانتاجها. تعد حبوب الشعير والذرة المجروشة ونخالة الحنطة اوساطا غذائية ملائمة لانتاج سبورات العديد من الاعفان. ان العامل الموثر الرئيس في انتاج السبورات في هذه الطريقة هو الرطوبة النسبية لوسط الانتاج والتي يجب ان تكون عالية لتكون مناسبة لانتاجها من الاعفان. ان الية الانتاج تكون من خلال وزن 200 غم من الحبوب المشار اليها في دورق حجمي سعة 3 لتر وبعد التلقيح بالعفن وتعديل نسبة الرطوبة الى 98% تتم التنمية عند حرارة 28 ° م لمدة 7 ايام... ان كمية السبورات المنتجة في هذه الطريقة تكون اربعة اضعاف كمية السبورات المنتجة بالطريقة السابقة.

3. **انتاج السبورات في المزارع المغمورة:** ان بعض حالات انتاج اللقاح باستعمال سبورات الاعفان تستعمل معها طريقة سبورات الاعفان المغمورة التي تستعمل معها اوساط غذائية مناسبة لها وكما في انتاج المضاد الحيوي Griseofulvin الذي ينتجه العفن *Penicillium patulum* حيث يستعمل وسطا غذائيا مكون من مسحوق الشرش والاملاح المعدنية للبوتاسيوم والكالسيوم اضافة الى المواد الصلبة لمنقوع الذرة. يستعمل معلق السبورات الناتج من طريقة التنمية بنسبة 10% من وسط الانتاج الحيوي. يكون اللقاح محجوزا في داخل الوسط باستعمال اغشية ملائمة توفر تلامس دائم بين السلالة الفطرية المكونة للقاح ومكونات الوسط الغذائي المستعمل في التنمية.

تحضير اللقاح الخضري من الاعفان

ان بعض الاعفان ليس لديها القدرة في انتاج السبورات اللاجنسية لذلك يصار الى تحضير اللقاح الخضري من مايسليوم هذه الاعفان. كما في تحضير لقاح العرهون والعفن *Gibberella fujikuroi* الذي يستعمل في انتاج منظم النمو الجبريلين... ان طريقة الانتاج تتضمن في ان تنمى مزرعة الاعفان على انابيب وسط اكار البطاطا والدكستروز PDA لمدة اسبوع عند درجة حرارة 25 ° م ثم تنقل محتويات الانابيب الى وسط سائل مناسب للنمو وتحضن مزرعة اللقاح عند 28 ° م لمدة 72 ساعة مع التهوية. وبذلك يكون جاهزا لتلقيح مزرعة الانتاج حيث يكون عبارة عن مايسليوم لسلالة العفن المستعمل في الانتاج الحيوي.

ان من اهم الصعوبات في استعمال لقاح المايسليوم الخضري هو في صعوبة الحصول على لقاح متجانس وقياسي. ويمكن التقليل من عدم التجانس في امرار المايسليوم الخضري في جهاز تجنيس قبل استعماله كلقاح الذي يسبب في تجزئة المايسليوم بقطع يمكن ان تكون متساوية فضلا عن انها تزيد اعداد الوحدات التكاثرية لان اجزاء المايسليوم تتكاثر وتنمو الى عفن عند وجود الوسط الغذائي المناسب للنمو.

أسباب تفضيل الأحياء المجهرية في التقنية الحيوية وإنتاج المواد

كما ذكرنا سابقاً، تتعامل التقنية الحيوية مع جميع أنواع الكائنات الحية والخلايا ومكوناتها، وهناك الكثير من المركبات التي يمكن انتاجها في نفس الوقت بوساطة كل من الحيوانات والنباتات والأحياء المجهرية، وفي هذه الحالة يكون من المفضل اللجوء إلى الأحياء المجهرية في إنتاج هذه المركبات بسبب تمتع الأحياء المجهرية ببعض الصفات التي لا تتوفر في الحيوانات أو النباتات. ومن أهم هذه الصفات أو أسباب التفضيل:

1- سرعة النمو والانقسام الخلوي ومعدل النمو العالي في خلايا الأحياء المجهرية نظرا لصغر حجم الخلايا وبالتالي ارتفاع نسبة المساحة السطحية للخلية\ الحجم مما يؤدي إلى زيادة سرعة نقل المواد الغذائية إلى داخل الخلايا وبالتالي زيادة سرعة التفاعلات الحيوية الأيضية في الخلايا مما يؤدي إلى زيادة سرعة إنتاج المواد المرغوبة، كما أن ذلك يؤدى إلى سرعة انقسام الخلايا وقصر زمن الجيل مقارنة بخلايا الأحياء الراقية (الحيوانات والنباتات)، إذ يبلغ زمن الجيل في البكتريا 20-30 دقيقة وحوالي ساعتين في الخمائر بينما تحتاج الخلايا الحيوانية والنباتية إلى حوالي اسبوعين أو أكثر لمضاعفة الكتلة الحيوية فيها.

2- بالإمكان زراعة كميات كبيرة من الخلايا الميكروبية من البكتريا والفطريات دون حدوث مشاكل في التعامل مع هذا العدد الكبير من الخلايا.

3- إن الأحياء المجهرية يمكنها استخدام مواد رخيصة الثمن ومتوفرة في الطبيعة لغرض النمو والإنتاج، أما الخلايا الراقية فتكون احتياجاتها الغذائية معقدة.

4- للأحياء المجهرية العديد من مسارات التخليق والتفاعلات الكيميائية مما يوفر جانباً خصباً للحصول على أنواع مختلفة من المنتوجات بعكس خلايا الأحياء الراقية والتي تكون مساراتها الأيضية وتفاعلاتها الحيوية محدودة.

5- للأحياء المجهرية أجهزة تنظيم راقية ومتقنة ومتعددة تمكنها من التجاوب السريع مع التغيرات التي تحصل في البيئة وبذلك يمكنها إكمال مسيرة النمو والتكاثر والإنتاج تحت ظروف مختلفة. أما الخلايا الراقية فلها أجهزة تنظيم غير واضحة لحد الآن وتتدخل فيها عوامل داخلية وخارجية.

6- إن الأنظمة الوراثية في الأحياء المجهرية تكون بسيطة مما يؤدي إلى سهولة التلاعب والتحسين الوراثي فيها وإمكانية إدخال بعض الصفات المرغوبة فيها كما في استعمال خلايا

بكتريا *Escherichia coli* وخميرة *Saccharomyces cerevisiae* كمضايف لاستقبال قطع وراثية (جينات) مختلفة خلال إجراء تقنية الهندسة الوراثية. أما الخلايا الحيوانية والنباتية فلها أنظمة وراثية معقدة تجعل من الصعوبة ادخال صفات وراثية جديدة فيها.

7- إن خلايا الأحياء المجهرية لا تخضع لقوانين الشيخوخة وتستمر بالنمو والانقسام والتكاثر طالما كانت هناك مواد غذائية متوفرة وظروف مناسبة بعكس الخلايا الحيوانية التي تظهر فيها الشيخوخة حتى عند تنميتها بشكل عالق أو بشكل مشابه للميكروبات.

حفظ الأحياء المجهرية الصناعية Preservation of industrial microorganisms

تعد عملية عزل الأحياء المجهرية الصناعية مكلفة وتحتاج إلى جهد ووقت طويل لذا يجب المحافظة عليها بطريقة بحيث تبقى حية ومحافظة على صفاتها التي عزلت من أجلها وخالية من التلوث. وهناك احتمال لحدوث طفرة وراثية تلقائية عند كل انقسام خلوي وحيث أن عمليات التنشيط والزراعة المتكررة على وسط غذائي جديد تصاحبها انقسامات خلوية، فهناك احتمال كبير لحدوث طفرات وراثية كثيرة وحصول انحلال للسلالة (تغير في صفاتها الوراثية) وتسمى هذه الظاهرة Strain degeneration كما تسمى بالتلوث الداخلي وخاصة تلك السلالات التي قد تم إجراء تحسين وراثي لها بعمليات التطفير والتي تحاول الرجوع إلى حالتها الأصلية (البرية) خلال التكاثر والانقسامات المتكررة التي تلي عمليات التحسين الوراثي، فضلاً عن ذلك فإن إعادة الزراعة المتكررة تؤدي إلى تعرض السلالة إلى مخاطر التلوث. ولهذا فإن طرق وأساليب حفظ الأحياء المجهرية الصناعية تلعب دوراً مهماً في التقنية الحيوية للأغراض الإنتاجية أو البحثية.

هناك نوعان من مزارع الاحياء المجهرية الصناعية

1- **مزارع العمل المخزونة** Working stock cultures

تستعمل هذه المزارع باستمرار في الصناعة لتحضير اللقاح ويجب أن تحفظ في حالة نمو كثيفة ونشيطة وغير ملوثة. تحفظ هذه المزارع عادة بهيئة مزارع أكار مائلة (Slant agar) أو مزارع موخوزة (Stab cultures) وتحت ظروف التبريد ويجب فحصها بصورة دورية للتأكد من نموها وقابلية إنتاجها ومدى تلوثها.

2- **المزارع الأولية المخزونة** Primary stock cultures

تستعمل هذه المزارع كخزين لعمليات تخمر جديدة أو لأغراض المقارنة أو الفحوصات البايولوجية أو في برامج العزل والغربلة. ولا تحفظ هذه المزارع في حالة نمو كثيفة ونشيطة بل تخزن بحالة شبه خاملة لكي تقل فيها الانقسامات للتقليل من تدهور السلالة نتيجة الطفرات التلقائية لذلك تخزن بحيث تحتاج إلى أقل عدد من مرات النقل أو التنشيط خلال فترة زمنية معينة. تجرى عملية النقل (التلقيح إلى وسط غذائي جديد) عند الحاجة إلى مزارع عمل جديدة أو عند إعادة زراعة المزارع الأولية لمنع هلاكها.

ومن أهم طرق حفظ مزارع الأحياء المجهرية:

1- الخزن على الأكار المائل Slant culture

حيث تنمى المزارع على وسط غذائي مناسب يحتوي على الأكار ومحضر بصورة مائلة (لزيادة المساحة السطحية) بدرجة حرارة الثلاجة (4-5 م) وتعاد زراعتها كل 6 أشهر تقريباً وأحياناً كل سنة في حالة تغطية سطح المزرعة بزيت معدني معقم مثل زيت البارافين الذي يمنع جفاف المزرعة.

2- خزن السبورات في الماء Storage of spores in water

يمكن خزن سبورات الأعفان في الماء وذلك بتحضير معلق السبورات في ماء معقم ويحفظ في الثلاجة وهذه الطريقة ذات استخدام محدود.

3- الحفظ في النتروجين السائل Storage under liquid nitrogen

يمكن تقليل الفعالية الحيوية للأحياء المجهرية بصورة كبيرة بحفظها بدرجة حرارة واطئة جداً (-150 إلى -196) باستخدام ثلاجات النتروجين السائل. تجرى العملية بتنمية الكائن المجهري على وسط غذائي مناسب ثم تعليق الخلايا في وسط يمنعها من الانجماد (مثل 10% كلسيرول) ثم يوضع المعلق في أنابيب زجاجية صغيرة (أمبولات) وتقفل قبل غمرها في النتروجين السائل. يمكن المحافظة على الخلايا بهذه الطريقة لسنوات عديدة، ولكن من سلبيات هذه الطريقة هي الكلفة العالية والخطر الناتج عن عطل الجهاز.

4- الخزن في التربة Storage in soil

يمكن تلقيح التربة المزيجية المعقمة بالكائن المجهري المراد حفظه وتحضن عدة أيام بدرجة الحرارة المناسبة له. وبعد النمو تجفف المزرعة بدرجة حرارة الغرفة لمدة اسبوعين ثم تحفظ في جو جاف ويفضل أن تحفظ في الثلاجة. تستخدم هذه الطريقة بكثرة في حفظ الأعفان

والبكتريا الخيطية. يمكن أن يستمر الخزن إلى 7 سنوات وقد يصل إلى 20 سنة مع موت حوالي نصف الخلايا.

5- التجفيد Freeze-drying

تتضمن هذه الطريقة تجميد مزرعة الأحياء المجهرية ثم تجفيفها تحت التفريغ إذ يتسامى الماء الموجود داخل الخلايا. تنمى المزرعة عادة في وسط غذائي مناسب ثم تعلق الخلايا في مادة تحافظ عليها مثل الحليب الفرز أو بلازما الدم أو كلوتامات الصوديوم أو الببتون أو السكر. توضع كمية قليلة من معلق الخلايا في أمبولات وتجمد ثم توضع تحت تفريغ عالي إلى أن يتسامى كل الماء من المعلق ثم تقفل الأمبولات والتي يمكن حفظها في الثلاجة لمدة أكثر من 10 سنوات بدون التأثير في فعالية الخلايا. تعد هذه الطريقة من أكثر طرق الحفظ شيوعاً ويمكن استعمالها مع معظم أنواع الأحياء المجهرية.